



**KELIMPAHAN BAKTERI DAN ALIR MATERI GENETIK
DI LAHAN UJI TERBATAS (LUT) TEBU PRODUK
REKAYASA GENETIKA (PRG) RENDEMEN TINGGI**

SKRIPSI

Oleh

Moch. Rosyadi Adnan

NIM 131810401024

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER**

2018



**KELIMPAHAN BAKTERI DAN ALIR MATERI GENETIK
DI LAHAN UJI TERBATAS (LUT) TEBU PRODUK
REKAYASA GENETIKA (PRG) RENDEMEN TINGGI**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Biologi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh

Moch. Rosyadi Adnan

NIM 131810401024

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER**

2018

PERSEMBAHAN

Dengan menyebut nama Allah yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, karya tulis ilmiah ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Rosyidah, Ayahanda Amir Fatah tercinta, Mbak Dina Fitriah dan Mas Moh. Ubaidillah dan Ikilil yang telah memberikan do'a tiada henti, segala kasih sayang, motivasi, dukungan, dan semangatnya selama ini.
2. Kakek dan nenek, Alm. Mbah Rukiah, Alm. Mbah Jannah, Alm. Mbah Suep, Alm. Mbah Sukdi yang telah memberikan kenangan indah dan nasehat yang berharga.
3. Seluruh keluarga besar yang telah memberikan do'a, dukungan dan semangat untuk menuntut ilmu.
4. Guru-guru TK Dewi Masyithoh 7 Jombang-Jember, MI Al-Ma'arif 02, Mts. Mabda'ul Ma'arif Jombang-Jember, dan MAN 3 Jember
5. Dewan asatidz PP. Mabdaul Maarif Jombang Jember dan PP. Al-Jauhar Summersari Jember
6. Dosen-dosen dan almamaterku Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

MOTO

“Dan barangsiapa yang tidak dijadikan oleh Allah baginya cahaya maka tiada
(sedikit) pun cahaya baginya”

Q.S. An-Nur ayat 40

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Moch. Rosyadi Adnan

NIM : 131810401024

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul: “Kelimpahan Bakteri dan Alir Materi Genetik di Lahan Uji Terbatas (LUT) Tebu Produk Rekayasa Genetika (PRG) Rendemen Tinggi” adalah benar-benar karya sendiri dan merupakan sub tema dari penelitian Prof. Bambang Sugiharto yang berjudul “Pengujian Keamanan Lingkungan Tebu Produk Rekayasa Genetika Rendemen Tinggi”, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, serta belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 25 Januari 2018

Yang menyatakan,

Moch. Rosyadi Adnan

NIM 131810401024

SKRIPSI

**KELIMPAHAN BAKTERI DAN ALIR MATERI GENETIK
DI LAHAN UJI TERBATAS (LUT) TEBU PRODUK REKAYASA
GENETIKA (PRG) RENDEMEN TINGGI**

Oleh

Moch. Rosyadi Adnan

NIM 131810401024

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc

Dosen Pembimbing Anggota : Mukhamad Su'udi, Ph.D

PENGESAHAN

Karya tulis ilmiah berjudul “**Kelimpahan Bakteri dan Alir Materi Genetik di Lahan Uji Terbatas (LUT) Tebu Produk Rekayasa Genetika (PRG) Rendemen Tinggi**” telah diuji dan disahkan oleh Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada:

Hari :

Tanggal :

Tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas
Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota 1,

Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc
NIP. 195510221982121001

Mukhamad Su’udi, Ph.D
NRP. 760016788

Anggota II,

Anggota III,

Drs. Rudju Winarsa, M.Kes
NIP. 196008161989021001

Tri Ratnasari, S.Si., M.Si
NRP. 760016770

Mengesahkan,
Dekan

Drs. Sujito, Ph.D
NIP. 196102041987111001

RINGKASAN

Kelimpahan Bakteri dan Alir Materi Genetik di Lahan Uji Terbatas (LUT) Tebu Produk Rekayasa Genetika (PRG) Rendemen Tinggi; Moch. Rosyadi Adnan, 131810401024; 2018; 47 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Tanaman tebu overekspresi gen *SoSPS1* (*Sucrose Phosphate Synthase*), *SoSUT1* (*Sucrose Transporter*), dan double overekspresi gen *SoSPS1-SoSUT1* telah dirakit dengan metode transformasi genetik yang dimediasi oleh *Agrobacterium tumefaciens*. Overekspresi gen tersebut berkorelasi positif dengan kadar sukrosa yang lebih tinggi dibandingkan *wild type*-nya (Rafikasari *et al.*, 2015). Berdasarkan PP No. 21 tahun 2005, sebelum tebu PRG dirilis, perlu dilakukan analisis kestabilan ekspresi, kesepadanan substansi, serta pengujian keamanan pangan, pakan, dan lingkungan. Salah satu lingkungan yang terpengaruh dan berinteraksi secara langsung dengan tanaman adalah lingkungan tanah. Dalam penelitian ini, komunitas bakteri tanah merupakan representasi dari pengujian keamanan hayati tebu PRG pada lingkungan. Lokasi penelitian adalah Lahan Uji Terbatas (LUT) milik Pabrik Gula PT. Perkebunan Nusantara XI yang bertempat di Dawuhan, Jatiroto, Lumajang, Jawa Timur. Pada LUT, terdapat 4 *event* tanaman yang diambil sampel tanahnya yaitu tanaman overekspresi *SoSPS1* (SP3), *SoSUT1* (SU3), double overekspresi *SoSPS1-SoSUT1* (D12), dan tanaman *wild type* (WT).

Penelitian dilaksanakan dalam tiga tahap yaitu analisis kesuburan tanah, kelimpahan, dan alir materi genetik pada bakteri umum (BU), bakteri pelarut fosfat (BPF), dan bakteri penambat nitrogen (BPN). Analisis kesuburan tanah dilakukan melalui pengukuran pH, kadar air, dan unsur hara (C, N, P, dan K tanah). Faktor abiotik tanah secara umum sama selain persen C dan K tanah yang lebih tinggi pada sampel SU3 yaitu C (1.52 %) dan K (38.15 %). Hal ini sebanding dengan jumlah total bakteri pada sampel SU3 yang lebih tinggi (158.25×10^5 CFU/g) dari sampel lain. Kelimpahan bakteri berbeda pada tiap jenis yaitu BU lebih tinggi pada sampel SP3 (69.75×10^5 CFU/g), BPF lebih tinggi pada sampel D12 (7.5×10^5 CFU/g), dan BPN lebih tinggi pada sampel tanah SU3 (88.5×10^5 CFU/g). Komunitas bakteri tanah berperan penting dalam daur berbagai unsur di alam. Oleh karena itu, *Horizontal Gene Transfer* (HGT) yang sering terjadi antar komunitas bakteri merupakan kajian ekologis yang penting untuk dilakukan (Singh dan Kapoor, 2010). Demikian pula dengan potensi HGT dari tanaman PRG ke bakteri tanah. Konfirmasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada isolat bakteri tersebut menunjukkan bahwa tidak ada gen pengkode resistensi antibiotik *nptII* dan *hptII* yang terdeteksi yang mengindikasikan bahwa tidak terjadi alir materi genetik dari tebu PRG ke mikroorganisme tanah.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Kelimpahan Bakteri dan Alir Materi Genetik di Lahan Uji Terbatas (LUT) Tebu Produk Rekayasa Genetika (PRG) Rendemen Tinggi**” dengan baik. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan Strata satu (S1) pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Ibunda Rosyidah, Ayahanda Amir Fatah serta Dina Fitriah dan Moh. Ubaidillah atas do'a, dukungan, motivasi, perhatian dan kasih sayang tiada henti sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan S1;
2. Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc. selaku dosen pembimbing utama dan M. Su'udi, Ph.D selaku dosen pembimbing anggota yang dengan penuh kesabaran memberikan pengarahan, bimbingan, dan saran dalam penulisan skripsi ini;
3. Drs. Rudju Winarsa, M.Kes dan Tri Ratnasari, S.Si., M.Si selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik, saran dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
4. Dra. Mahriani, M.Si selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan arahan dan motivasi selama penulis menempuh pendidikan S1;
5. Teknisi laboratorium CDAST Divisi Biologi Molekuler dan Bioteknologi Tanaman : Purnama Oktaviandari, S.P, M.P., Arsetyo Rahardianto, S. Si, Nurul Hidayati, S.Si, Ni Putu Frida Okta W., S.Si., Ken Melati, S.Si yang telah meluangkan waktu untuk membantu penelitian ini;
6. Rekan-rekan kerja di laboratorium : Reza Anugrah M., Siti Nurul Afidah, Kiky Mey P., Novita Niswatun Azizah, Intan R. Neliana, Angga Aditya R., M. Solekhudin, Retnosari Apriasti, Febrian Eka Shandy, Guruh Surastomo,

Lutfiana Riski, Retna Hermawati, Nurul Mufitdhah, Firdha Narulita, Risky Mulana, Fragaria Vesca, Suwinda Fibriani, Weny Nailul, Suvia Widyaningrum, A Bagus Nur Sudrajat, Arina Amalia, Femin Damayanti, Anisatul Mukarromah yang senantiasa memberikan motivasi dan waktunya untuk membantu penelitian ini;

7. Teman-teman seperjuangan Biologi 2013 “Biogas” yang sudah luar biasa menemani dalam suka duka 4 tahun lebih perjuangan meraih S.Si. dan sahabat Pondok Pesantren Al-Jauhar yang senantiasa memberikan dukungan dan bantuan dalam penyusunan skripsi ini;
8. Ibu Nyai Hj. Lilik Istiqomah, SH., MH., selaku pengasuh PP – Al-Jauhar;
9. Sahabat-sahabat Ibnu Sholehah, Muhtar G. Wibisono, S.Si., M. Akhsan Aziz, Faqih Badriyansyah, A. Isrizal Anwar, S.Si., Badrut Tamam I. A., S.Si., Langgeng Kusumo A., Amin, Maushul, Fathur dan seluruh santri PP. Al-Jauhar dan alumni PP. Mabdaul Ma’arif yang selalu menginspirasi;
10. BFC 14 (Blendes Football Club-14), Ling-Ling FC (Tim OSN Pertamina 2014), *Single Cell Oil* (Tim PKM 2014), Kafilah MTQM 2015 Tim ONMIPA 2014 - 2017, Keluarga KKN 19 Gudang 2016, Al-Jauhar Music Orchestra, Tim Riset SUGAR GROUP, dan Exchange Student – Flensburg University of Applied Sciences : Germany Bolang 2017, yang telah memberi semangat dan menginspirasi;
11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Jember, Januari 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Bakteri Pelarut Fosfat	4
2.2 Bakteri Penambat Nitrogen	5
2.3. <i>Horizontal Gene Transfer</i>.....	6
2.4 Gen Marker Antibiotik <i>nptII</i> dan <i>hptII</i>	7
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	10
3.1. Waktu dan Tempat	10
3.2. Rancangan Penelitian	10
3.3 Alat dan Bahan.....	11
3.3.1 Alat.....	11
3.3.2 Bahan.....	11

3.4 Prosedur Penelitian	12
3.4.1 Pengambilan Sampel Tanah.....	12
3.4.2 Analisis kesuburan tanah.....	13
3.4.3 Isolasi BU, BPF, dan BPN	14
3.4.4 Uji Alir Materi Genetik.....	15
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	16
4.1 Analisis Kesuburan Tanah	16
4.2 Kelimpahan BU, BPF, dan BPN	19
4.3 Uji Alir Materi Genetik	22
BAB 5. PENUTUP	24
5.1 Kesimpulan	24
5.2 Saran	24
DAFTAR PUSTAKA	25
LAMPIRAN	31

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1	Jumlah total bakteri (BU, BPF, dan BPN) sampel tanah tebu PRG dan WT di LUT Dawuhan Jatiroto 20
Tabel 4.2	Hasil konfirmasi PCR gen <i>nptII</i> dan <i>hptII</i> 22

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 3.1 Skema Alur Penelitian.....	11
Gambar 3.2 Denah Pengambilan Sampel.....	12
Gambar 4.1 Kadar air tanah.....	16
Gambar 4.2 pH tanah	17
Gambar 4.3 Persentase C organik tanah (b/b)	18
Gambar 4.4 Persentase N tanah (b/b)	18
Gambar 4.5 Persentase P tanah (b/b)	18
Gambar 4.6 Persentase K tanah (b/b)	19
Gambar 4.7 Populasi BU, BPF, dan BPN Tebu PRG dan WT di LUT Dawuhan Jatiroto	20

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tanaman transgenik merupakan tanaman produk pemuliaan berbasis rekayasa genetika yang diharapkan mampu menghasilkan tanaman dengan kualitas unggul. Tanaman transgenik diperoleh melalui proses introduksi artifisial gen-gen tertentu ke dalam genom tanaman sehingga memiliki karakter-karakter baru yang diinginkan. Saat ini tanaman transgenik lebih dikenal dengan istilah tanaman produk rekayasa genetika (PRG). Tanaman yang diperoleh melalui *genetic engineering* tersebut diharapkan mampu menghasilkan jumlah keturunan banyak dalam waktu singkat serta dapat memiliki sifat-sifat unggul seperti yang dikehendaki (Halford, 2006). Karakter unggul yang diharapkan antara lain adalah produktivitas tinggi, ketahanan terhadap cekaman biotik dan abiotik, serta mampu memproduksi senyawa aditif yang memiliki nilai penting bagi industri maupun kesehatan. Proses insersi gen target ke dalam sel tanaman dilakukan melalui beberapa cara seperti *particle bombardment*, fusi protoplasma, maupun transformasi melalui mediasi agen fisik, kimiawi, maupun biologis seperti *Agrobacterium tumefaciens* (Hopkins, 2007). Berbagai tanaman yang telah dihasilkan melalui proses rekayasa genetika antara lain apel rendah protein alergen, kedelai kaya lemak tak jenuh, tomat toleran cekaman garam, tembakau tahan herbisida, padi dan jagung tahan hama, maupun tebu tinggi sukrosa (Halford, 2006; Baskoro, 2012; Rafikasari *et al.*, 2015).

Proses transformasi genetik pada tanaman tebu (*Saccharum officinarum*) telah banyak dilakukan antara lain untuk meningkatkan sifat ketahanan terhadap stress kekeringan (Waltz, 2014), serangan hama (Zhou *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2016), dan infeksi virus (Guo *et al.*, 2015). Selain itu, telah dilakukan transformasi serta overekspresi gen *SoSPSI* (*Sucrose Phosphate Synthase 1*) dan *SoSUT1* (*Sucrose Transporter*) yang berperan dalam produksi sukrosa (Sugiharto *et al.*, 2010) sehingga diharapkan dapat dihasilkan tebu transforman dengan rendemen gula yang tinggi.

Perkembangan pesat tebu PRG memerlukan analisis kestabilan ekspresi gen, analisis kesepadanan substansi, serta analisis keamanan tebu PRG baik dari segi pangan, pakan, maupun lingkungan. Hal ini dilakukan untuk memastikan bahwa tebu PRG tidak memiliki dampak negatif pada lingkungan maupun organisme lain. Peraturan Pemerintah (PP) No. 21 tahun 2005 tentang Keamanan Hayati Produk Rekayasa Genetika menyatakan bahwa keamanan hayati produk rekayasa genetika meliputi keamanan pangan, pakan, dan lingkungan. Salah satu pengujian keamanan lingkungan yang penting untuk dilakukan adalah pengujian potensi *horizontal gene transfer* (HGT). HGT adalah proses diperolehnya gen dari organisme asing yang dapat terjadi melalui konjugasi, transduksi, maupun transformasi pada kondisi lingkungan tertentu (Prakash *et al.*, 2011). HGT berpotensi menimbulkan masalah bila gen marker ketahanan terhadap antibiotik atau herbisida tertransfer kepada organisme non target. Hal ini berpeluang memunculkan kekebalan pada organisme hama/gulma yang pada akhirnya meningkatkan usaha membasmi hama/gulma karena resistensi meningkat. HGT dapat terjadi antar tanaman maupun dari tanaman ke mikroorganisme lingkungan sekitar (Kleter *et al.*, 2005). Dengan demikian perlu dilakukan penelitian untuk melihat apakah ada alir materi genetik tebu PRG pada bakteri tanah.

Komunitas mikroba tanah terdiri dari fungi, alga, dan bakteri. Salah satu bakteri tanah adalah bakteri pelarut fosfat (BPF) dan bakteri penambat nitrogen (BPN). Kedua kelompok bakteri tersebut merupakan penyusun komunitas bakteri yang berperan penting pada siklus nutrisi di tanah (Singh dan Kapoor, 2010). Sehingga, adanya pengaruh pada komunitas bakteri yang penting bagi sirkulasi nutrisi tanah akan berpengaruh pada kesuburan tanah. Oleh karena itu observasi pada kedua kelompok BPF dan BPN di lahan tanam tebu PRG diharapkan mampu memberi gambaran profil populasi bakteri tanah serta mengetahui apakah terjadi *gene flow* dari tanaman tebu PRG.

1.2 Rumusan Masalah

Pengkajian keamanan lingkungan tanaman PRG perlu dilakukan sebelum tanaman PRG dirilis, dimanfaatkan, dikomersilkan, dan digunakan secara luas,

termasuk uji keamanan lingkungan terhadap komunitas bakteri tanah. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk melihat bagaimana profil kelimpahan BPF dan BPN pada tanah yang ditanami tebu PRG dan dibandingkan dengan *wild type*-nya. Selain itu perlu dilakukan konfirmasi secara molekuler untuk mengetahui apakah terjadi *gene flow* pada populasi bakteri tanah. Perubahan-perubahan yang terjadi pada populasi bakteri tanah akan berpengaruh terhadap kandungan hara. Oleh karena itu, dalam penelitian ini akan dilakukan pula pengamatan terhadap kandungan C, N, P, dan K tanah.

1.3 Tujuan

Penelitian dilakukan untuk mengetahui profil kelimpahan BPF dan BPN pada tebu PRG rendemen tinggi dan tebu *wild type* serta menguji apakah telah terjadi *gene flow* tebu PRG pada populasi bakteri tanah. Dalam penelitian ini diamati pula faktor abiotik tanah seperti kadar air, pH, serta kadar C, N, P, dan K tanah.

1.4 Manfaat

Manfaat yang diharapkan dengan dilakukannya penelitian ini adalah bagi mahasiswa, mampu mengaplikasikan teori yang berkaitan dengan pengujian keamanan lingkungan tanaman PRG dalam bentuk riset. Bagi institusi, memberikan salah satu data keamanan lingkungan yang penting dalam penelitian, pengembangan, pemanfaatan, dan pelepasan tebu PRG rendemen tinggi. Bagi kegiatan penelitian, memberi referensi tentang pengujian keamanan lingkungan tanaman tebu PRG terhadap komunitas bakteri yang berpengaruh pada kesuburan tanah. Bagi masyarakat, dapat memberikan wawasan dan pengetahuan mengenai keamanan tebu PRG rendemen tinggi.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri Pelarut Fosfat

Fosfor (P) termasuk salah satu jenis unsur penyusun makromolekul yang penting seperti N dalam tanaman. P bagi tanaman berperan penting dalam proses pembentukan senyawa penyimpan energi, fotosintesis, pembelahan sel dan pembentukan sistem perakaran yang bagus. Menurut Taiz dan Zeiger (2002), unsur P memiliki beberapa fungsi bagi tanaman yaitu pertahanan integritas sel, penyusun gula fosfat, nukleotida, asam nukleat, koenzim dan beberapa jenis fosfolipid. Kekurangan unsur P pada tanaman dapat mengakibatkan gejala *browning*, daun kecil, batang yang lemah, maupun gangguan pertumbuhan dan perkembangan (Sharma *et. al.*, 2011).

P yang terkandung dalam tanah ada dalam bentuk organik dan inorganik. Meskipun kandungan rata-rata P total dalam tanah cukup melimpah berkisar 0.05% (w/w) namun hanya 0.1% dari P total yang dapat digunakan oleh tanaman karena kelarutan P yang rendah (Sharma *et al.*, 2013). Oleh karena itu, agar dapat dimanfaatkan oleh tanaman maka P yang sering terikat pada unsur Al, Fe, Ca, dan Mg pada tanah harus diubah ke bentuk yang terlarut. Bakteri pelarut fosfat (BPF) merupakan bakteri yang berperan penting dalam pelarutan unsur P baik dari pupuk maupun yang dalam bentuk terikat di tanah (Atekan *et. al.*, 2014). Mekanisme pelarutan P dapat difasilitasi oleh aktivitas enzim seperti *nonspecific* phosphatase, phytase, phosphonate, dan C-P lyase maupun oleh sekresi asam organik seperti asam glukonat, asam malat, suksinat, fumarat, tartarat, alpha keto butir, oksalat, dan 2-ketoglukonat (Rodriguez *et al.*, 2006; Ahmed dan Shahab, 2009). Adanya asam organik yang dilepaskan oleh bakteri ke lingkungan kemudian bereaksi dengan fosfat yang tak larut, menurunkan pH, dan melepaskan fosfat dari molekul yang mengikatnya sehingga menjadi bentuk terlarutnya (Ahmed dan Shahab, 2009).

Beberapa kelompok bakteri yang termasuk dalam BPF adalah *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*,

Erwinia, *Flavobacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, dan *Serratia*. Keberadaan BPF dalam tanah dapat berperan sebagai agen *biofertilizer* sehingga mendukung serta memacu pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan. Beberapa penelitian lain menyebutkan bahwa aplikasi bakteri pelarut fosfat dengan kombinasi beberapa bakteri lainnya bahkan dapat mengurangi kebutuhan pupuk P sampai 25% pada tanaman tebu (Sundara *et al.*, 2001).

Beberapa spesies BPF telah berhasil diisolasi oleh Tam dan Diep (2015) di area rhizosfer tebu seperti *Bacillus megaterium*, *Terriglobus roseus*, *Burkholderia acidipaludis*, *Burkholderia ambifaria*, *Novosphingobium subterraneanum* dan lain-lain. Baliah *et al.* (2016) menjelaskan tentang adanya populasi BPF di sekitar garis pertumbuhan tebu. Hal ini mengindikasikan bahwa BPF juga merupakan sampel yang representatif untuk pengujian alir materi genetik pada tanaman PRG.

2.2. Bakteri Penambat Nitrogen

Ketersediaan nitrogen (N) dalam tanah berperan penting dalam pemenuhan kebutuhan nutrisi tanaman. N merupakan salah satu unsur penyusun makromolekul yang digunakan tanaman untuk sintesis protein, asam amino, enzim, nukleotida dan lain-lain (Taiz dan Zeiger, 2002). Keberadaan N dalam tanah merupakan salah satu siklus kunci dalam regulasi siklus N di tanah. Siklus N dipengaruhi oleh proses nitrifikasi, denitrifikasi, dan fiksasi N. Unsur N yang menyusun 78% atmosfer ada dalam bentuk N_2 sehingga tidak dapat secara langsung digunakan oleh kebanyakan organisme termasuk tanaman oleh karena itu diperlukan proses fiksasi yang banyak dimediasi oleh mikroorganisme baik yang simbiotik maupun yang hidup bebas (Walworth, 2013). Bakteri Penambat Nitrogen (BPN) merupakan bakteri yang dapat mengikat N_2 bebas di udara menjadi bentuk NH_4^+ sehingga dapat digunakan oleh organisme lain seperti tanaman. Organisme prokariotik yang mampu mengikat N_2 atmosfer disebut juga diazotroph (Stella dan Suhaimi, 2010). Proses fiksasi N_2 di udara oleh organisme diazotroph dikatalisis oleh enzim nitrogenase yang terdiri dari dinitrogenase reduktase (protein Fe) dan dinitrogenase (protein MoFe). Kompleks nitrogenase merupakan enzim yang sensitif terhadap keberadaan oksigen yang dapat menghambat aktifitas enzim nitrogenase pada BPN (Shridhar, 2012).

BPN dikelompokkan menjadi 2 yaitu yang simbiotik seperti *Rhizobium* dan *Frankia* dan yang hidup bebas seperti *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Clostridium*, dan *Gluconeobacterium* (Burdass, 2002). Pada tanaman tebu, adanya BPN diduga kuat berkorelasi positif terhadap produktivitas tebu. Hal ini dilihat dari akumulasi N tanaman tebu yang sangat tinggi yaitu mencapai 100 sampai 200 kg N per hektar per tahun pada aplikasi pupuk N yang relatif rendah 60 kg N per hektar. Bahkan pada beberapa tempat di Brazil, studi yang dilakukan memperlihatkan adanya tanaman tebu yang telah lebih dari 100 tahun dikultivasikan tanpa aplikasi pupuk N (Ohyama *et al.*, 2014). Hal ini mengindikasikan bahwa akumulasi N pada tebu tidak hanya dipengaruhi oleh aplikasi pupuk, namun juga terdapat proses lain yang berpengaruh salah satunya adalah aktivitas fiksasi N oleh BPN. Beberapa genus BPN ditemukan banyak di tanah daerah perakaran tanaman tebu yang diketahui berasosiasi dengan tebu dalam proses penambatan N seperti genus *Beijerinckia* yang banyak ditemukan di rhizosfer dan rhizoplan tanaman tebu (Ohyama *et al.*, 2014). Selain itu beberapa genus termasuk *Bacillus*, *Derxia*, *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Azospirillum*, dan *Klebsiella* juga telah ditemukan di wilayah rhizosfer tanaman tebu (Reis *et al.*, 2007). Oleh karena itu adanya BPN yang berperan penting dalam siklus nutrisi dalam tanah lahan tanam tebu merupakan sampel yang representatif untuk pengujian alir materi genetik tebu PRG.

2.3. Horizontal Gene Transfer

Horizontal Gene Transfer (HGT) merupakan proses alir materi genetik dari satu spesies ke spesies lain tanpa melalui proses reproduksi maupun propagasi vegetatif, sehingga HGT berbeda dari *Vertical Gene Transfer* (VGT) yang terjadi pada organisme induk ke keturunannya (ERMA-NZ, 2006). HGT dapat mengakibatkan munculnya sifat baru sehingga memediasi proses evolusi genomik, variasi fenotipik, dan perubahan adaptasi (Prakash *et al.*, 2011; Yoshida *et al.*, 2012; Yue *et al.*, 2012). HGT menjadi salah satu isu penting dalam pengembangan tanaman PRG karena berdasarkan Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 21 tahun 2005 adalah tidak diperkenankannya adanya HGT dari tanaman ke organisme lingkungan sekitar termasuk bakteri. Adanya HGT dari tanaman PRG

ke mikroba sekitar dapat berpotensi memunculkan strain bakteri patogen yang resisten terhadap antibiotik maupun herbisida, serta mengubah populasi, dan diversitas mikroba (Khan dan Mina, 2008). Mekanisme HGT antar bakteri telah diketahui dapat terjadi melalui 3 mekanisme, yaitu konjugasi, transduksi dan transformasi (Nielsen *et al.*, 1998). Sedangkan mekanisme HGT dari tanaman ke bakteri masih jarang diketahui secara pasti.

Penelitian tebu PRG yang membawa gen *CryIAc* oleh Zhou *et al.* (2016) menunjukkan bahwa tidak ada perubahan genetik dan potensi HGT pada komunitas mikroba sekitar. Hal ini menunjukkan rendahnya resiko HGT pada tebu PRG. Selain itu karena lebih banyak bereproduksi secara vegetatif, tebu merupakan tanaman PRG yang paling rendah potensinya dalam menimbulkan HGT. Proses HGT melalui mekanisme transformasi merupakan proses yang paling memungkinkan terjadinya HGT dari tanaman ke mikroba (DHAOGTR, 2005).

Beberapa kondisi yang memungkinkan terjadinya proses HGT melalui transformasi adalah kontak DNA dengan mikroba, *uptake* DNA oleh mikroba, dan integrasi DNA dengan genom mikroba (ERMA-NZ, 2006). Selain itu DNA yang terdapat bebas di dalam tanah harus lengkap mengkode gen resistensi antibiotik dan stabil dalam tanah sebelum kontak dengan mikroba. Persistensi DNA secara bebas dipengaruhi oleh faktor biotik dan abiotik termasuk UV, suhu, aktivitas DNase, mineral dan sekret dari tanaman maupun kandungan kimiawi tanah. Kompetensi bakteri tanah, aktivitas degradasi DNase, maupun kondisi fisik dan kimia tempat transformasi juga harus mendukung untuk proses transformasi secara alami di tanah (Khan dan Mina, 2008).

2.4. Gen Marker Antibiotik *nptII* dan *hptII*

Gen marker penyandi ketahanan terhadap antibiotik maupun herbisida sering digunakan dalam proses rekayasa genetika tanaman sebagai penanda untuk seleksi tanaman yang positif transforman. Hal ini dilakukan melalui serangkaian proses seleksi hingga menghasilkan tanaman transforman yang stabil. Oleh karena itu, penggunaan gen marker penyandi ketahanan terhadap antibiotik maupun

herbisida merupakan hal yang penting dan tidak dapat ditinggalkan dalam perakitan tanaman PRG (Sundar dan Sakthivel, 2008).

Marker gen yang sering digunakan adalah *nptII* dan *hptII*. Gen *nptII* menyandikan enzim neomycin phosphotransferase II yang berperan dalam resistensi terhadap antibiotik neomycin dan kanamycin. Enzim neomycin phosphotransferase II berperan dalam menghambat sintesis protein dengan mengikat subunit 30S ribosom sehingga mengganggu proses translasi (Sundar dan Sakthivel, 2008). *nptII* pertama kali diisolasi dari DNA transposon Tn5 *E. coli* strain K12 yang berperan dalam resistensi terhadap antibiotik aminoglikosida (kanamycin dan neomycin) serta dalam reaksi tranposisi (Ghanem, 2011). Penggunaan gen *nptII* telah secara luas diaplikasikan dan dianggap aman berdasarkan karakter persebaran gen di lingkungan, rendahnya keluhan secara klinis dari kanamycin, dan rendahnya potensi transfer genetik gen tersebut ke mikroorganisme lain (Kleter *et al.*, 2005).

Gen *hptII* atau *aphIV* merupakan gen penyandi enzim hygromycin B phosphotransferase yang berperan terhadap resistensi terhadap hygromycin. Antibiotik hygromycin dapat menyebabkan kegagalan translasi dengan cara menempel pada sisi ribosom *elongation factor 2* (EF-2) serta gangguan pengenalan aminoasil tRNA. Pada tanaman, adanya aktivitas hygromycin dapat berpengaruh pada mitokondria dan kloroplas sehingga dapat memicu klorosis pada tanaman (Blochlinger dan Diggelmann, 1984; Sundar dan Sakthivel, 2008). Gen *hptII* diketahui dapat berasal dari *Streptomyces hygrosopicus* maupun *E. coli* (Htwe *et al.*, 2014). Hygromycin B merupakan antibiotik kedua setelah kanamycin yang paling sering digunakan dalam seleksi tanaman transforman (Miki dan McHugh, 2004).

Penggunaan *nptII* dan *hptII* secara luas sebagai agen penyeleksi menunjukkan kemudahan dan efisiensi gen ini sebagai *selectable marker* yang telah diaplikasikan pada berbagai spesies (Miki dan McHugh, 2004). Dalam analisis keamanan lingkungan tanaman PRG, resiko adanya HGT gen marker penanda resistensi antibiotik pada organisme lain berpeluang terhadap munculnya sifat

resistensi yang sama pada organisme patogen, hama, maupun gulma sehingga menimbulkan masalah baru (Bennett *et al.*, 2004).

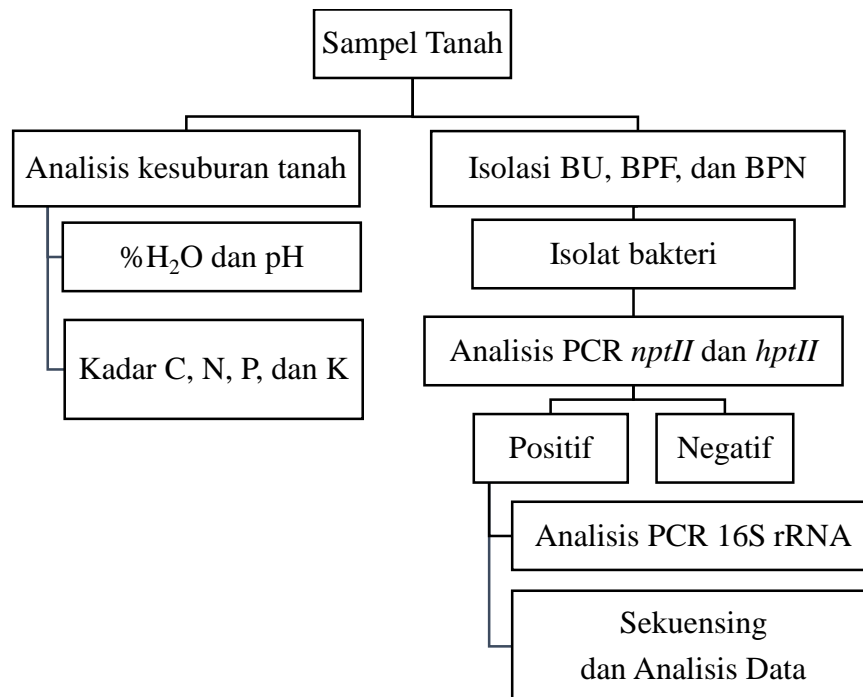
BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan bulan Juni sampai September 2017. Sampel tanah diambil dari lahan uji terbatas (LUT) tebu PRG rendemen tinggi Pabrik Gula PT. Perkebunan Nusantara XI Dawuhan, Jatiroto, Lumajang, Jawa Timur. Penelitian dilanjutkan dengan isolasi bakteri umum (BU), bakteri pelarut fosfat (BPF), dan bakteri penambat nitrogen (BPN) serta uji alir materi genetik, maupun analisis kesuburan tanah di laboratorium CDAST (*Center for Development of Advanced Science and Technology*) Universitas Jember.

3.2. Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan dengan metode deskriptif melalui tahapan isolasi, enumerasi, dan uji alir materi genetik pada isolat BU, BPF, dan BPN di sekitar perakaran tebu pada usia 7 bulan setelah tanam. Selain itu dilakukan pengujian kadar C, N, P, dan K tanah. Metode pertama merupakan pengambilan sampel tanah di LUT. Selanjutnya dilakukan analisis data karakter tanah yang meliputi suhu, kadar air, pH dan hara tanah (C, N, P, dan K). Tahapan ketiga adalah isolasi dan enumerasi BU, BPF, dan BPN. Berikutnya adalah uji alir materi genetik dari isolat yang tumbuh di masing-masing medium menggunakan analisis *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan gen target penyandi resistensi antibiotik *nptII* dan *hptII*. Tahapan kelima adalah uji alir materi genetik dengan analisis PCR dari sampel tanah. Tahapan keenam adalah analisis data hasil keseluruhan penelitian meliputi analisis kesuburan tanah, profil populasi BU, BPF, BPN, dan profil genetik bakteri bila positif memiliki marker gen tanaman PRG. Alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Skema Alur Penelitian

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah bor tanah, penggaris, kantong plastik berukuran 1 kg, tisu, termometer, oven inkubator, aluminium foil, pH meter, titrator, *microdistillation*, alat destruksi sampel tanah, *beaker glass*, *erlenmeyer*, *atomic absorption spectrophotometer* (AAS), *spectrophotometer*, *microplate reader*, tabung reaksi, sendok logam, petri dish, drygalski, bunsen, mikropipet, *colony counter*, lup, *centrifuge*, *cutter*, *UV trans illuminator*, *moisture analyzer*, *eppendorf*, *tube PCR*, dan *thermal cyclers*.

3.3.2 Bahan

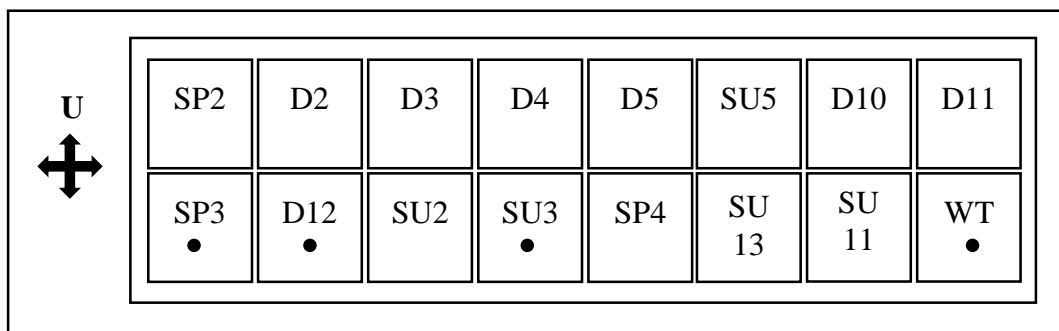
Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel tanah, H₂SO₄, selen, H₂O, H₃BO₃, HCl, Bromocresol green (BCG) 3%, Metil merah (MM), HCl 37%, ((NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O-NH₄VO₃), NaOH, larutan standar glukosa (C₆H₁₂O₆),

larutan standar fosfat (KH_2PO_4), alkohol 96%, *phospate buffer saline* (PBS) pH 7.4, medium nutrient agar (NA), Pikovskaya (PVK), dan Jensen.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pengambilan Sampel Tanah

Pengambilan sampel tanah dilakukan secara acak (*random purposive sampling*) di lahan. Metode ini dipilih karena memudahkan proses pengambilan sampel dan kondisi *event* tanaman yang acak. Setiap petak berisi tanaman tebu PRG dengan *event* transformasi yang berbeda. Lahan uji memiliki 4 jenis tanaman yaitu tanaman tebu overekspresi gen *SoSPS1* (SP), *SoSUT1* (SU), double overekspresi *SoSPS1-SoSUT1* (D), dan tanaman *wild type* (WT). Dari setiap jenis tanaman dipilih satu *event* yaitu masing-masing SP3, SU2, D12, dan WT. Kemudian dari tiap *event* diambil tanah dari 3 tanaman di juring yang berbeda. Pada setiap tanaman diambil sampel tanah dari 3 titik di sekitar perakaran. Sampel tanah diambil di kedalaman 0-20 cm sebanyak ± 30 g kemudian dikompositkan di lapang. Kedalaman tersebut sesuai untuk diaplikasikan pada lahan tanam yang dipilih dan representatif digunakan untuk *sampling* populasi mikroba tanah, meminimalisir pengaruh faktor abiotik yang dapat berpengaruh pada saat pengambilan sampel, dan sesuai untuk analisis keamanan tanaman PRG (Bloem *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2016). Skema pengambilan sampel tanah ditampilkan pada Gambar 3.2



Gambar 3.2 Denah pengambilan sampel

3.4.2 Analisis kesuburan tanah

Karakter kesuburan tanah yang diukur antara lain suhu, pH, kadar air, kandungan C, N, P, dan K. Pengukuran pH tanah dilakukan dua kali dengan menimbang 1 g tanah sebanyak 2 kali ulangan. Selanjutnya pada masing-masing sampel ditambahkan 5 mL H₂O dan dikocok selama 30 menit kemudian diukur pH-nya. Penetapan kadar air tanah dilakukan dengan cara membandingkan berat sampel tanah sebelum dan sesudah diletakkan dalam *Moisture Analyzer* pada suhu 105°C selama 15 menit.

Pengukuran kandungan C, N, P, dan K dilakukan dengan metode spektrofotometri dan titrimetri berdasarkan Sulaeman *et al.* (2005) dan Usman (2012) yang dimodifikasi. Pengukuran kandungan N dilakukan metode Kjeldahl dengan destruksi 0.5 g sampel tanah dalam 3 mL H₂SO₄ p.a. dengan katalis ± 0.2 g campuran selen dan dipanaskan pada suhu 350°C selama 4 jam. Selanjutnya pada hasil destruksi ditambahkan ±10 mL NaOH 30%. Selanjutnya dilakukan destilasi selama ±3 menit. Destilat ditampung dalam ±20 mL H₃BO₃ 4% yang mengandung 3 tetes indikator BCG-MM 3%. Destilasi dilakukan selama 3.3 menit dengan menggunakan alat *KjelFlex*. Kemudian dilakukan titrasi dengan HCl 0.001 N sampai larutan berwarna merah muda, kemudian dilakukan perhitungan %N.

Kandungan P dan K tanah diekstraksi menggunakan larutan HCl 25% sebanyak 3 mL untuk sampel tanah 0.5 g. Selanjutnya dilakukan pengocokan menggunakan shaker dengan kecepatan 150 rpm selama 5 jam. Kemudian didiamkan selama ±30 menit dan dilakukan sentrifugasi 10.000 rpm selama 1 menit. Supernatan selanjutnya diencerkan dengan H₂O sampai 10 mL. Setelah itu dilakukan pengukuran kadar P dan K secara kolorimetri dengan menggunakan *microplate reader* dan AAS. Pengukuran P dilakukan dengan terlebih dahulu mereaksikan 0.5 mL supernatan yang telah diencerkan dengan 2 mL pereaksi amonium molibdovanadat ((NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O-NH₄VO₃ dalam HCl 37%) selanjutnya diencerkan dengan H₂O sampai 10 mL. Kadar P dideteksi pada panjang gelombang 400 nm. Kadar K dalam supernatan yang telah diencerkan kemudian diukur pada panjang gelombang 693 nm (Sulaeman *et al.*, 2005).

3.4.3 Isolasi BU, BPF, dan BPN

Sampel tanah sebanyak 1 g dari tiap plot dilarutkan dalam 10 mL *Phosphate Buffer Saline* (PBS) kemudian dihomogenkan dengan cara dishaker selama ± 1 menit. Selanjutnya dilakukan seri pengenceran dengan melarutkan 1 mL suspensi pada 9 mL PBS sampai pengenceran 10^{-5} . Kemudian dilakukan inokulasi seri pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , dan 10^{-5} sebanyak 10 μ L dengan masing-masing dua kali pengulangan pada tiga jenis media yaitu medium NA untuk isolasi BU dengan komposisi (gr/L) *yeast extract* 3, pepton 5, dan agar 15, medium Pikovskaya (PVK) menurut Sagervanshi (2012) yang dimodifikasi dengan Ca_3PO_4 37,5% untuk isolasi BPF dengan komposisi (gr/L) glukosa 10, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, *yeast extract* 0.5, KCl 0.2, NaCl 0.2, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002, Ca_3PO_4 1.25, dan agar 15. Adapun medium Jensen (Himedia, 2015) dengan komposisi (gr/L) sukrosa 20, K_2HPO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, NaCl 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.005, CaCO_3 2, dan agar 15 untuk isolasi BPN. Untuk isolasi BU, dilakukan inkubasi 24 jam pada suhu 28°C . Sedangkan BPF dan BPN diinkubasi pada suhu 28°C selama 72 jam.

Koloni bakteri yang tumbuh dihitung dan dibedakan berdasarkan perbedaan morfologi koloni isolat (warna, bentuk, dan tepi koloni). Pada medium NA, bakteri yang tumbuh dihitung sebagai BU. Pada medium Pikovskaya, koloni yang dihitung sebagai BPF dicirikan dengan adanya zona bening yang menunjukkan aktivitas pelarutan fosfat (Saragih, 2013). Pada medium Jensen, koloni yang tumbuh diduga merupakan BPN. Jumlah koloni kemudian dihitung dengan menggunakan metode *total plate count* (TPC) dan dinyatakan dalam *colony forming unit* (CFU)/gram sampel. Selanjutnya dipilih 3 isolat yang berbeda dari tiap media untuk digunakan sebagai *template* dalam PCR. Analisis PCR dilakukan untuk mengonfirmasi keberadaan gen marker resistensi antibiotik yang digunakan pada tebu PRG rendemen tinggi yaitu gen *nptII* (neomycin phosphotransferase) dan *hptII* (higromycin phosphotransferase).

3.4.4 Uji Alir Materi Genetik

Uji alir materi genetik dilakukan melalui analisis PCR dengan target gen marker pengkode resistensi antibiotik kanamycin (*nptII*) untuk isolat dari tebu PRG overekspresi *SoSPS1*, dobel overekspresi *SoSPS1-SoSUT1*, dan tebu WT. Kemudian isolat dari tebu PRG overekspresi *SoSUT1*, dobel overekspresi *SoSPS1-SoSUT1*, dan tebu WT diambil pula sebagai template untuk konfirmasi PCR gen *hptII*. PCR gen *nptII* dilakukan dengan primer *nptII-F* (5'-GTCATCTCACCTTGCTCCTGCC-3'), dan primer *nptII-R* (5'-GTCGCT TGGTCGGTCATTTTCG -3') dengan produk amplifikasi berukuran ± 550 basepair (bp). PCR gen *hptII* dilakukan dengan menggunakan primer *hpt-F* (5'-TCCTGCAAGCTCCGGATGCCTC-3') dan *hpt-R* (5'-CGTGCACAGGGTGT CACGTTGC-3') dengan produk amplifikasi berukuran ± 470 bp. PCR dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan KAPA2G Fast ReadyMix PCR Kit dari KAPABIOSYSTEMS, dan GoTaq[®]Green Master MIX 2 \times dari PROMEGA sebanyak 5 μ L, primer (*forward* dan *reverse*) 10 μ M masing-masing sebanyak 0.5 μ L, dan ddH₂O ditambahkan sampai 10 μ l. PCR dilakukan dalam 35 siklus dengan program sebagai berikut : *pre-denaturation* 95°C 5 menit, *denaturation* 95°C 30 detik, *annealing* 55°C 30 detik, *extension* 72°C 1 menit, dan *final extension* 5 menit.

Hasil PCR kemudian dielektroforesis pada gel agarose 1,5% selama 1 jam pada *voltage* 100 V dan diwarnai dengan ethidium bromide (EtBr). Marker yang digunakan 1 Kb Ladder (Geneaid). Hasil elektroforesis divisualisasi dengan *Gel Imagine System* dari *Major Science*.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dipaparkan, dapat ditarik kesimpulan bahwa faktor abiotik tanah pada LUT Dawuhan Jatiroto meliputi pH, kadar air, dan unsur hara tanah relatif tidak berbeda. Namun, pada *event* SU3 diperoleh kadar C dan K tanah yang lebih tinggi dibandingkan dengan *event* lainnya. Hal ini juga diikuti oleh jumlah isolat bakteri terbanyak yang diperoleh dari sampel SU3. Biodiversitas bakteri pada tanah yang ditanami tebu PRG dan WT bervariasi, namun tidak terdeteksi adanya aliran materi genetik dari tanaman ke komunitas bakteri. Sehingga perbedaan biodiversitas bakteri disebabkan oleh faktor selain HGT (*horizontal gene transfer*). Variasi biodiversitas ini diduga berasal dari perbedaan biomassa maupun sekresi senyawa organik yang berbeda antar *event* tanaman. Perbedaan aktifitas fisiologi ini dapat terjadi karena karakter pertumbuhan alami tanaman yang berbeda-beda maupun sebagai akibat dari proses transformasi genetik. Hasil uji aliran materi genetik menggunakan analisis PCR pada bakteri umum, bakteri pelarut fosfat, dan bakteri penambat nitrogen menunjukkan bahwa tebu PRG rendemen tinggi di LUT Dawuhan Jatiroto tidak berpotensi menularkan materi genetiknya pada komunitas bakteri tanah.

5.2 Saran

Uji aliran materi genetik maupun kelimpahan bakteri sebaiknya dilakukan pada waktu yang berbeda setiap jenisnya sehingga proses isolasi dapat dilakukan secara bersamaan dan keragaman data tidak besar. Selain itu perlu disertakan kontrol positif internal dalam uji aliran materi genetik dengan PCR sehingga data yang diperoleh lebih lengkap.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Falih, A. M. K. 2002. Factors affecting the efficiency of symbiotic nitrogen fixation by *Rhizobium*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 5(11): 1277-1293.
- Atekan, Y. Nuraini, E. Handayanto, dan Syekhfani. 2014. The potential of phosphate solubilizing bacteria isolated from sugarcane wastes for solubilizing phosphate. *Journal of Degraded and Mining Lands Management*. 1(4): 175-182.
- Ahmed, N. dan S. Shahab. 2009. Phosphate solubilization: their mechanism genetics and application. *The Internet Journal of Microbiology*. 9(1): 1-19
- Badan Standardisasi Nasional (BSN). 2010. *Standar Nasional Indonesia (SNI): Pupuk NPK Padat*. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional.
- Baliah, N.T., G. Pandiarajan, dan M. Kumar. 2016. Isolation, identification and characterization of phosphate solubilizing bacteria from different crop soils of Srivilliputtur Taluk, Virudhunagar District, Tamil Nadu. *Tropical Ecology*. 57(3): 465-474.
- Baskoro, A. 2012. Efektifitas Transformasi Gen *SoSPSI* Menggunakan Vektor Plasmid pCl₄ dan Eksplan Tunas Lateral Tebu (*Saccharum officinarum* L.). *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Bennett, P. M., C. T. Livesey, D. Nathwani, D. S. Reeves, J. R. Saunders, dan R. Wise. 2004. An assessment of the risks associated with the use of antibiotic resistance genes in genetically modified plants: report of the working party of the British society for antimicrobial chemotherapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53(3): 418-431.
- Blochlinger, K. dan H. Diggelmann. 2012. Hygromycin b phosphotransferase as a selectable marker for DNA transfer experiments with higher eucaryotic cells. *Molecular and Cellular Biology*. 4(12): 2929-2931.
- Bloem, J., Hopkins, D.W., dan Benedetti, A. 2006. *Microbiological Methods for Assessing Soil Quality*. London, UK: CABI Publishing.
- Burdass, D. 2002. *Rhizobium, Root Nodules & Nitrogen Fixation*. Reading: Society for General Microbiology.
- Department of Health and Ageing Office of the Gene Technology Regulator (DHAOGTR). 2004. Field Trials to Evaluate Genetically Modified

- Sugarcane Lines Expressing Sucrose Isomerase. *Risk Assessment and Risk Management Plan*. Queensland: DHAOGTR.
- Döbereiner, J. 1961. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugarcane. *Plant Soil*. 15: 211-216.
- Environmental Risk Management Authority-New Zealand (ERMA-NZ). 2006. Risk Assessment of Horizontal Gene Transfer from GM Plants to Bacteria and Human Cells. *Generic Issues Report*. New Zealand: ERMA-NZ.
- Eviati dan Sulaeman. 2009. *Petunjuk Teknis Edisi 2 Analisis Kimia Tanah, Tanaman, Air, dan Pupuk*. Bogor: Balai Penelitian Tanah
- Filipecki, M. dan S. Malepszy. 2006. Unintended consequences of plant transformation: a molecular insight. *J. Appl. Genet.* 47(4): 277-286.
- Gao, S., Y. Yang, C. Wang, J. Guo, D. Zhou, Q. Wu, Y. Su, L. Xu, dan Y. Que. 2016. Transgenic sugarcane with a *CryIac* gene exhibited better phenotypic traits and enhanced resistance against sugarcane borer. *PLoS ONE*. 11(4): e0153929.
- Ghanem, S. 2011. Cloning of the *nptII* gene of *Escherichia coli* and construction of a recombinant strain harboring functional *recA* and *nptII* antibiotic resistance. *Genetics and Molecular Research*. 10(3): 1445-1454.
- Griffiths, B. S., A. Spilles, dan M. Bonkowski. 2012. C: N: P stoichiometry and nutrient limitation of the soil microbial biomass in a grazed grassland site under experimental p limitation or excess. *Ecological Processes*. 1(6): 1-11.
- Guo, J., S. Gao, Q. Lin, H. Wang, Y. Que, dan L. Xu. 2015. Transgenic sugarcane resistant to sorghum mosaic virus based on coat protein gene silencing by RNA interference. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International*. ID: 861907.
- Halford, N.G. 2006. *Plant Biotechnology Current and Future Applications of Genetically Modified Crops*. Chicester: John Wiley and Sons Ltd.
- Himedia, 2015. *Technical Data: Jensen's Medium*. HiMedia Laboratories: India.
- Hopkins, W.G. 2007. *Plant Biotechnology*. New York: Chelsea House Publishers.
- Htwe, N. H., H. C. Ling, F. Q. Zaman, dan M. Maziah. 2014. Plant genetic transformation efficiency of selected Malaysian rice based on selectable marker gene (*hptII*). *Pakistan Journal of Biological Science*. 17(4): 472-481.

- Khan, S. dan U. Mina. 2008. An approach for impact assessment of transgenic plants on soil ecosystem. *Applied Ecology and Environmental Research*. 6(3): 1-19.
- Kleter, G.A., Ad A. C. M. Peijnenburg, dan H. J. M. Aarts. 2005. Health considerations regarding horizontal transfer of microbial transgenes present in genetically modified crops. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 4: 326-352.
- Koomnok, C., N. Teaumroong, B. Rerkasem dan S. Lumyong. 2007. Diazotroph endophytic bacteria in cultivated and wild rice in Thailand. *ScienceAsia* 33: 429-435
- Koorem, K., A. Gazol, M. Opik, M. Moora, U. Saks, A. Uibopuu, V. Sober, dan M. Zobel. 2014. Soil nutrient content influences the abundance of soil microbes but not plant biomass at the small-scale. *PLoS ONE*. 9(3): e91998.
- Li, S., Y. Liu, J. Wang, L. Yang, S. Zhang, C. Xu, dan W. Ding. 2017. Soil acidification aggravates the occurrence of bacterial wilt in South China. *Front. Microbiol.* 8: 1-12.
- Miki, B. dan S. McHugh. 2004. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *Journal of Biotechnology*. 107: 193-232.
- Momose, A., N. Ohtake, K. Sueyoshi, T. Sato, Y. Nakanishi, S. Akao, dan T. Ohshima. 2009. Nitrogen fixation and translocation in young sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants associated with endophytic nitrogen-fixing bacteria. *Microbes Environm.* 24(3): 224-230.
- Nielsen, K. M., A. M. Bones, K. Smalla, dan J. D. van Elsas. 1998. Horizontal gene transfer from transgenic plant to terrestrial bacteria a rare event. *FEMS Microbiology Reviews*. 22: 79-103.
- Naher, U. A., O. Radziah, Z. H. Shamsuddin, M. S. Halimi dan I. M. Razi. 2009. Isolation of diazotrophs from different soils of Tanjung Karang Rice growing area in Malaysia. *Int. J. of Agriculture & Biology*. 11: 547 – 552.
- Ohyama, T., A. Momose, N. Ohtake, K. Sueyoshi, T. Sato, Y. Nakanishi, C.A. Asis Jr., S. Ruamsungsri dan S. Ando. 2014. *Nitrogen Fixation in Sugarcane*. Dalam Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation. Editor: T. Ohshima. London: InTech.
- Pan, Y., N. Cassman, M. de Hollander, L. W. Mendes, H. Korevaar, R. H. E. M. Geerts, J. A. van Veen, dan E. E. Kuramae. 2014. Impact of long-term N, P,

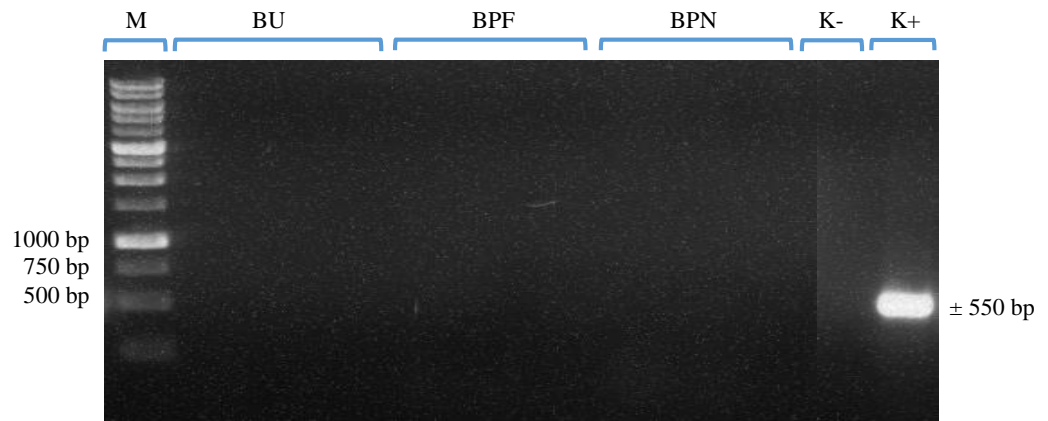
- K, and NPK fertilization on the composition and potential functions of the bacterial community in grassland soil. *FEMS Microbial Ecol.* 90: 195-205.
- Prakash, D., S. Verma, R. Bhatia, and B. N. Tiwary. 2011. Risks and precautions of genetically modified organisms. *ISRN Ecology*. ID 369573
- Rafikasari, R., P. Dewanti, dan B. Sugiharto. 2015. Karakterisasi Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L. Var. BL) Transgenik Double Overekspresi Gen *SoSPS1-SoSUTI* Generasi Kedua. *Prosiding Seminar Nasional Kimia*. 117-120.
- Reis, V., Lee, S., and Kennedy, C. 2007. *Biological Nitrogen Fixation in Sugarcane*. Dalam *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*, Editor: Emerich, C. dan Newton W. E., Belanda: Springer.
- Reece, J. B., L. A. Urry, M. L. Cain, S. A. Wasserman, P. V. Minorsky, R. B. Jackson., N. A. Campbell. 2014. *Campbell Biology 10th Edition*. USA: Pearson Education.
- Rodriguez, R. Fraga, T. Gonzalez, dan Y. Bashan. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil*. 287: 15-21.
- Sadiq, H. M., G. Z. Jahangir, I. A. Nasir, M. Iqtidar dan M. Iqbal. 2014. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from rhizosphere soil. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 27(6): 4248-4255.
- Saragih, A.B. 2013. Skrining Bakteri Pelarut Fosfat Adaptif Vinasse dari Lahan Tebu Pabrik Gula Jatiroto Kabupaten Lumajang Jawa Timur. *Skripsi*. Jember: Jurusan Biologi FMIPA Universitas Jember
- Sagervanshi, A., P. Kumari, A. Nagee and A. Kumar. 2012. Media optimization for inorganic phosphate solubilizing bacteria isolated from anand argiculture soil. *International Journal of Life Science and Pharma*. 2(3): 245-255.
- Singh, U.S. dan K. Kapoor. 2010. *Introductory Microbiology*. Jaipur India: Oxford Book Company.
- Sharma, S., V. Kumar dan R. B. Tripathi. 2011. Isolation of phosphate solubilizing microorganism (PSMs) from soil. *J. Microbiol. Biotech. Res.* 1(2): 90-95.
- Sharma, S. B., R. Z. Sayyed, M. H. Trivedi1 dan T. A. Gobi. 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*. 2: 587.

- Shridhar, B.G. 2012. Review: Nitrogen fixing microorganisms. *International Journal of Microbiological Research*. 3(1): 46-52.
- Sugiharto, B., P. Dewanti, dan N. Ermawati. 2010. Peningkatan Produksi Gula Melalui Overekspresi Gen untuk *Sucrose-Phosphate Synthase* dan *Sucrose Transporter Protein* pada Tanaman Tebu. *Laporan hasil penelitian hibah kompetensi*. Jember: Universitas Jember.
- Sulaeman, Suparto, dan Eviati. 2005. *Petunjuk Teknis Analisis Kimia Tanah, Tanaman, dan Pupuk*. Bogor: Balai Penelitian Tanaman.
- Sundar, I. K., dan N. Sakthivel. 2008. Advances in selectable marker genes for plant transformation. *Journal of Plant Physiology*. 165: 1698-1716.
- Sundara, B., V. Natarajan, dan K. Hari. 2002. Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *Field Crop Research*. 77: 43-49.
- Stella, M. dan M. Suhaimi. 2010. Selection of suitable growth medium for free living diazotrophs isolated from compost. *J. Trop. Agric. and Fd. Sc.* 38(2): 211-219.
- Taiz, L. dan E. Zeiger. 2002. *Plant Physiology*. 3rd ed. Sunderland: Sinauer.
- Tam, H. M. dan C. N. Diep. 2015. Isolation and identification of rhizospheric bacteria in sugarcane (*Saccharum spp.* L.) cultivated on acrisols and ferrasols of Dong Nai Province, the Southeast of Vietnam. *American Journal of Life Sciences*. 3(2): 109-118.
- Undang - Undang Republik Indonesia Nomor 21 Tahun 2005. *Keamanan Hayati Produk Rekayasa Genetik*. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 21 Tahun 2005. 19 Mei 2005. Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2005 Nomor 44. Jakarta.
- Usman. 2012. Teknik penetapan nitrogen total pada contoh tanah secara destilasi titrimetri dan kolorimetri menggunakan *Autoanalyzer*. *Buletin Teknik Pertanian*. 1(1): 41-44.
- Walworth, J. 2013. *Nitrogen in Soil and the Environment*. Arizona: University of Arizona.
- Waltz, E. 2014. Beating the Heat. *Nature Biotechnology*. 32(7): 610-613
- Yoshida, S., S. Maruyama, H. Nozaki, dan K. Shirasu. 2012. Horizontal gene transfer by the parasitic plant *Striga hermonthica*. *Science*. 328.

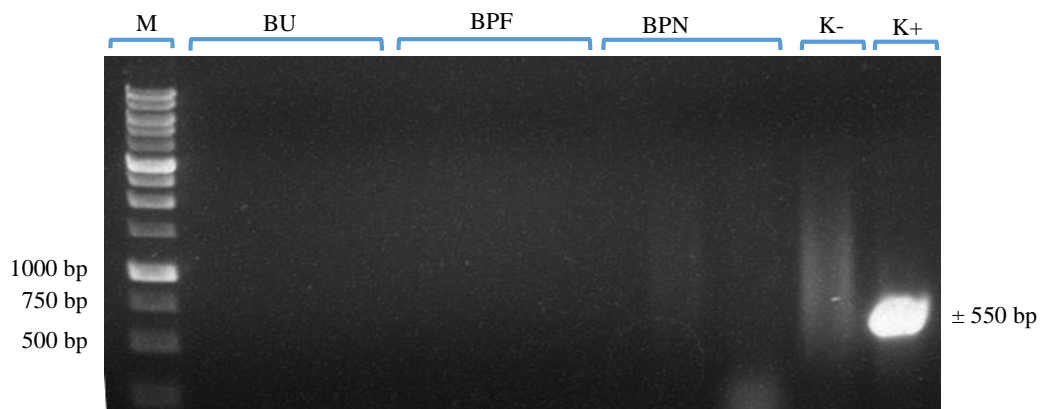
- Yue, J., X. Hu, H. Sun, Y. Yang dan J. Huang. 2012. Widespread impact of horizontal gene transfer on plant colonization of land. *Nature Communications*. 3: 1152.
- Zhou, D., L. Xu, S. Gao, J. Guo, J. Luo, Q. You, dan Y. Que. 2016. *CryIAc* Transgenic sugarcane does not affect the diversity of microbial communities and has no significant effect on enzyme activities in rhizosphere soil within one crop season. *Frontier in Plant Science*. 7: 1-16
- Zul, D., S. Denzel, A. Kotz, dan J. Overmann. 2007. Effects of plant biomass, plant diversity, and water content on bacterial communities in soil lysimeters: implications for the determinants of bacterial diversity. *Appl. and Envir. Microbiol.* 73(21): 6916-6929.

LAMPIRAN

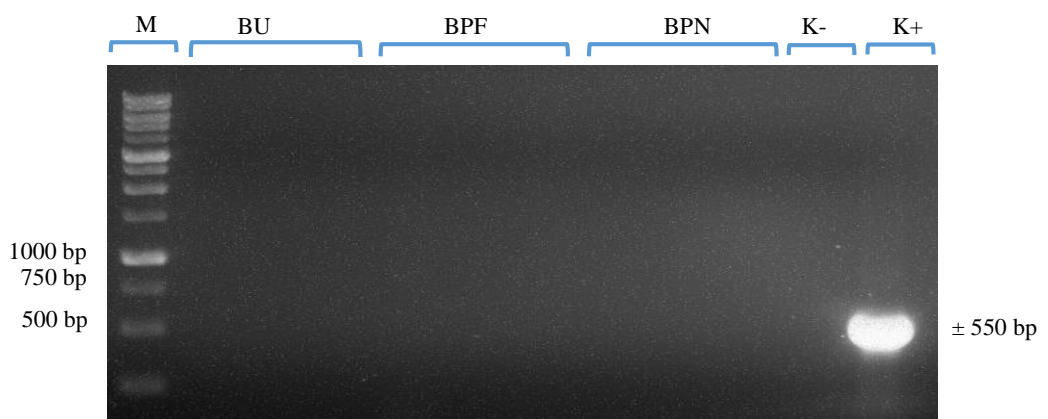
Lampiran 1. Hasil PCR isolat bakteri dengan gen marker *nptII*



(a)



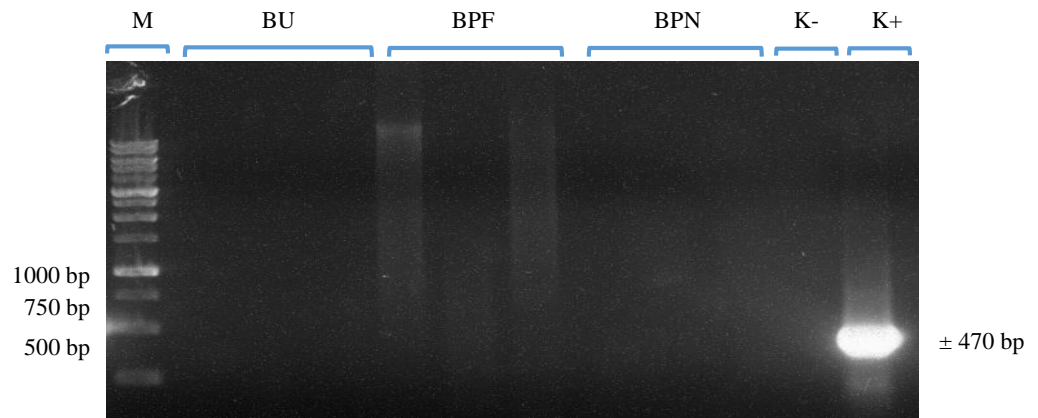
(b)



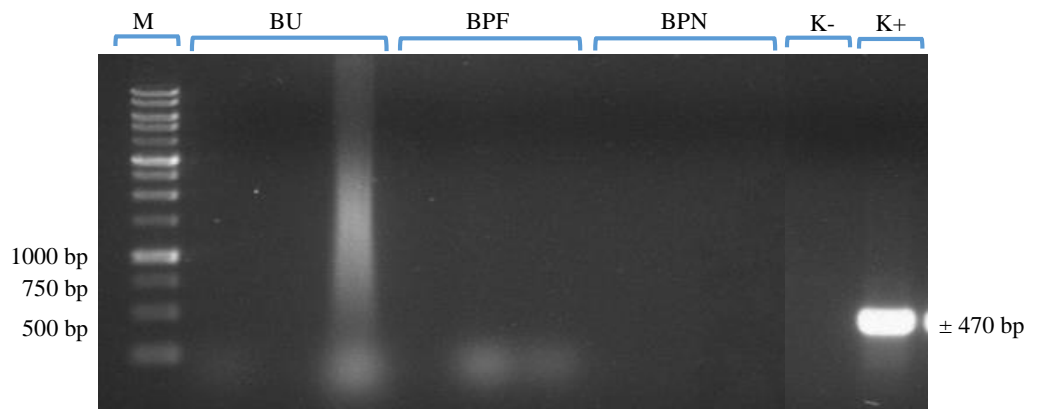
(c)

(a) Sampel SP3, (b) Sampel D12, (c) Sampel WT, M: marker DNA, BU: bakteri umum, BPF: bakteri pelarut fosfat, BPN: bakteri penambat nitrogen, K-: Kontrol negatif (PCR reagent mixture tanpa sampel), K+: Kontrol positif (*A. tumefaciens* transforman GV 3101-pAct *SoSUT1*)

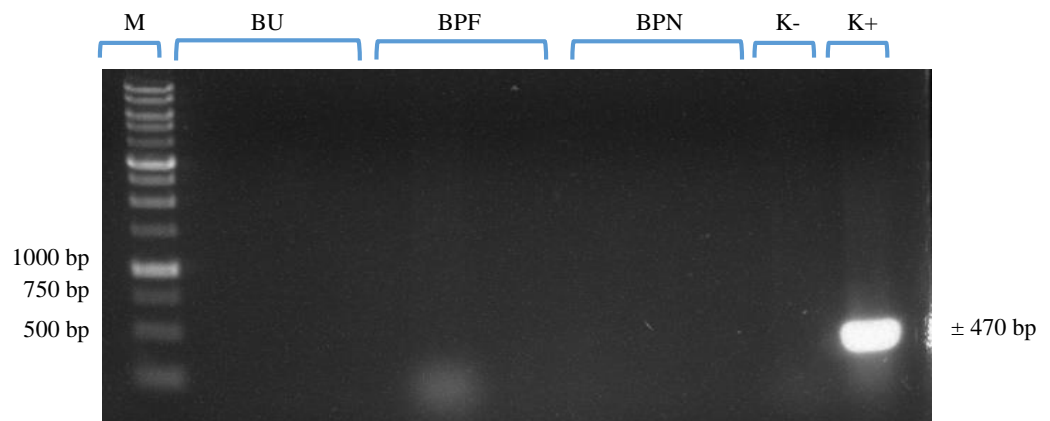
Lampiran 2. Hasil PCR isolat bakteri dengan gen marker *hptII*



(a)



(b)



(c)

(a) Sampel SU3, (b) Sampel D12, (c) Sampel WT, M: marker DNA, BU: bakteri umum, BPF: bakteri pelarut fosfat, BPN: bakteri penambat nitrogen, K-: Kontrol negatif (PCR reagent mixture tanpa sampel), K+: Kontrol positif (*A. tumefaciens* transforman GV 3101-pAct *SoSUT1*)