

# Konstruksi Mutan *Pseudomonas* sp. untuk Meningkatkan Produksi *Indole Acetic Acid* (IAA) melalui Mutagenesis dengan Transposon

Aris Tri Wahyudi, Mutiha Panjaitan, dan Nisa Rachmania

Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi Fakultas MIPA, Institut Pertanian Bogor

## Abstract

*Pseudomonas* sp. is one of bacterial groups having ability to promote plant growth and health. Of a hundred successfully isolated *Pseudomonas* sp. from soybean rhizosphere, 98 were found to produce *indole acetic acid* (IAA) ranging from 0.33 to 16.02 ppm. These isolates are bacilli, motile, Gram negative, and showing positive oxidase assay. One of them, i.e. *Pseudomonas* sp. CRB17, can promote plant growth by means of significant stimulation of primary root length and lateral root number. This isolate was then subject to mutagenesis using transposon Mini-Tn5Km1 to increase IAA production. Mutagenesis was done by conjugation between *E coli* S17-1 ( $\lambda$  pir) carrying transposon mini-Tn5Km1 (donor) and *Pseudomonas* sp. (recipient), resulting in conjugation frequency of approximately  $3.1 \times 10^{-5}$  cell per recipient. The resulted CRB17 mutants were then tested for their ability to produce IAA, one of which showed an increment of IAA production up to 77.5%, while some others showed no significant change or even had a reduction to 55.3%. Sequence analysis of 16S rRNA gene of *Pseudomonas* sp. CRB17 indicated that it has a high homology with that of *Pseudomonas plecoglossicida* (identical value of 99%). The results recommends that mutagenesis using transposon can be applied to increase IAA production, especially in *Pseudomonas* sp. CRB17.

**Key words:** *Pseudomonas* sp., transposon mutagenesis, IAA, plant growth stimulation

## Pendahuluan

Usaha ekstensifikasi dan intensifikasi pertanian yang kian digalakkan untuk mencapai swasembada pangan berimplikasi terhadap penggunaan pupuk kimia yang terus meningkat. Residu pupuk kimia diketahui dapat mencemari perairan dan menimbulkan eutrofikasi. Teknologi berwawasan lingkungan yang dapat meningkatkan efektivitas penggunaan pupuk kimia menjadi penting untuk dikembangkan. Salah satu produk teknologi alternatif yang ramah lingkungan ialah dengan menggunakan mikroba sebagai pupuk hayati.

Bakteri tanah dapat hidup bebas di daerah rizosfer yang menguntungkan dan telah menunjukkan kemampuan untuk memperbaiki kesehatan atau meningkatkan hasil tanaman. Kelompok bakteri ini disebut *plant growth promoting rhizobacteria* (PGPR) (Dey *et al.*, 2004). Mekanisme pemacuan pertumbuhan tanaman yang dilakukan oleh PGPR ialah melalui penambatan nitrogen, produksi antibiotik, produksi siderofor, pelarutan fosfat, dan produksi zat pengatur tumbuh tanaman (Kapulnik dan Okon, 2002). Beberapa PGPR mampu menghasilkan zat pengatur tumbuh seperti auksin, giberelin, dan sitokinin (Dey *et al.*, 2004).

Salah satu genus PGPR yang banyak diteliti karena kemampuannya dalam menghasilkan auksin ialah *Pseudomonas*. Sebagai contoh, *Pseudomonas putida* telah diketahui mampu menghasilkan berbagai zat pemacu tumbuh, termasuk auksin dan giberelin, siderofor, asam organik dan antibiotik (Premono dan Widyastuti, 1996, Patten dan Glick, 2002).

Asam indol asetat (*indole acetic acid*, IAA) adalah auksin yang paling aktif pada berbagai tanaman dan berperan penting dalam pemacuan pertumbuhan, seperti inisiasi akar, pembesaran sel, diferensiasi pembuluh, dan pemacuan pembungaan. Tanaman kurang mampu menghasilkan IAA yang cukup untuk pertumbuhan yang optimal. Sementara itu, sejumlah bakteri telah diidentifikasi mampu menyintesis IAA pada biakan murni dan di tanah (Husen dan Saraswati, 2003). *Pseudomonas putida* GR12-2 penghasil auksin berupa asam indol asetat telah diketahui mampu memacu perpanjangan akar primer dan pembentukan akar lateral (Patten dan Glick, 2002).

Berbagai jalur sintesis IAA digunakan oleh prokariot. Suatu galur bakteri dapat menggunakan lebih dari satu jalur dalam biosintesis IAA. Jalur-jalur ini dikelompokkan berdasarkan jenis intermediatnya, yaitu jalur indol asetat (IAM), asam indol-3-piruvat (IPA), triptamin, dan indol-3-asetonitril (Manulis *et al.*, 1998). Jalur yang menguntungkan bagi bakteri adalah jalur IPA sebagai jalur utama untuk menyintesis IAA (Patten dan Glick, 2002).

Mutagenesis dengan transposon merupakan salah satu metode untuk membuat mutan dengan cara menyisipkan segmen DNA (transposon) ke dalam genom bakteri yang digunakan (Wahyudi, 2001). Secara umum metode ini digunakan untuk isolasi dan lokalisasi gen. Transposon merupakan suatu fragmen DNA yang dapat meloncat dan menyisip pada genom organisme (Wahyudi, 2000). Transposon ini akan menyisip pada DNA secara random. Dengan adanya penyisipan transposon ini dapat menyebabkan perubahan genetik yang memiliki kontribusi penting dalam evolusi genom karena selain dapat menyisip ke dalam genom, penyisipan juga dapat terjadi pada sekuens DNA yang berperan untuk regulasi proses fisiologi tertentu sehingga dapat menyebabkan modifikasi ekspresi gen dan menyebabkan mutasi kromosom.

Transposon Tn5 sering digunakan untuk kegiatan mutagenesis dengan transposon seperti pada penelitian yang dilakukan oleh Harayama *et al.* (1984) untuk menganalisis operon gen jalur pemotongan meta dari plasmid TOL *Pseudomonas putida* mt-2. Selain itu, Wahyudi (2005) juga melakukan mutagenesis dengan transposon dalam penelitiannya untuk melaporkan konstruksi pustaka genom *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 dan penapisan pustaka yang membawa gen yang terlibat dalam biosintesis magnetosom.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengarakterisasi *Pseudomonas* sp. asal rizosfer tanaman kedelai yang berpotensi sebagai pemacu pertumbuhan tanaman, serta mengonstruksi mutan *Pseudomonas* sp. CRB17 untuk meningkatkan produksi IAA melalui mutagenesis dengan transposon.

## Materi dan Metode

*Pseudomonas* sp. diisolasi dari tanah rizosfer kedelai daerah Cirebon. Isolasi dilakukan dengan pengenceran serial menggunakan garam fisiologis 0.85 % hingga  $10^{-4}$ . Tiga pengenceran terakhir disebar pada media agar King's B (20 g pepton, 15 mL gliserol, 1,5 g  $K_2HPO_4$ , 1,5 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 15 g agar, 1 L akuades) dan diinkubasi selama 24 jam. Koloni-koloni yang tumbuh kemudian diamati morfologinya dan diuji fisiologinya yang meliputi pewarnaan Gram, bentuk sel, motilitas, dan reaksi uji oksidase.

Uji produksi IAA dilakukan sesuai dengan metode Patten dan Glick (2002). Isolat-isolat *Pseudomonas* sp. diinokulasikan ke dalam 5 ml media cair King's B dengan penambahan triptofan 0,5 mM. Selanjutnya, dilakukan inkubasi selama 48 jam dan pengocokan dengan kecepatan 120 rpm pada suhu ruang. Triptofan digunakan sebagai prekursor terbentuknya IAA (Vande Broek *et al.*, 2005). Sebanyak 1,5 mL kultur disentrifugasi selama 15 menit pada 10000 rpm. Selanjutnya, 1 mL supernatan yang diperoleh dicampur dengan reagen Salkowski (150 ml  $H_2SO_4$  pekat, 250 mL  $H_2O$  destilata, 7,5 mL 0,5 M  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ) dan diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit untuk kemudian diukur absorbansinya pada  $\lambda 520$  nm (Spectronic 20, Bausch & Lomb, US). Konsentrasi IAA ditentukan dengan membandingkannya terhadap kurva standar IAA dengan kisaran konsentrasi 0–30 ppm.

Esai pemacuan pertumbuhan dilakukan menurut metode Dey *et al.* (2004). Isolat *Pseudomonas* sp. CRB 17 yang memproduksi IAA tinggi digoreskan secara penuh pada media agar King's B, diinkubasi selama 24 jam, dan selanjutnya disuspensikan dengan kaldu nutrisi steril. Sebanyak 100  $\mu$ L kultur dengan konsentrasi  $10^{10}$  sel per mL dipipet dan diinokulasikan pada tiap kecambah kedelai varietas Slamet berumur 24 jam pada media agar semisolid dalam cawan petri. Kecambah diinkubasi selama 7 hari. Uji ini dilakukan dengan tiga ulangan. Sebanyak 9 kecambah digunakan untuk tiap ulangan.

Parameter yang diamati meliputi panjang akar primer dan jumlah akar lateral. Analisis data dilakukan menggunakan uji Anova SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) 12.0 for Windows.

Genom DNA *Pseudomonas* sp. CRB17 diekstrak menggunakan metode CTAB (Sambrook *et al.*, 2001). Amplifikasi gen 16S rRNA dilakukan dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer 63f (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') dan 1387f (5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3') (Marchesi *et al.*, 1998). PCR dilakukan sebanyak 30 siklus yang meliputi pradenaturasi pada 94°C selama 2 menit, denaturasi selama 30 detik pada suhu 92°C, penempelan primer selama 30 detik pada suhu 55°C, pemanjangan DNA selama 60 detik pada suhu 75°C. Pemanjangan DNA terakhir dilakukan selama 7 menit pada suhu 75 °C. Fragmen DNA produk PCR selanjutnya dimurnikan dan disekuens serta dianalisis bioinformatikanya menggunakan Program BLAST yang ada di pangkalan data (NCBI).

Uji resistensi antibiotik dilakukan terhadap *Escherichia coli* S-17  $\lambda$  pir (donor) dan isolat *Pseudomonas* sp. CRB 17. Jenis antibiotik yang digunakan dalam pengujian ini adalah kanamisin, kloramfenikol, rifampisin, dan ampisilin pada konsentrasi 50  $\mu$ g/mL. Masing-masing jenis antibiotik ditambahkan pada media agar Luria (10 g tripton, 5 g ekstrak khamir, 10 g NaCl, 15 g agar, dan akuades 1 L). Baik *E. coli* S17-1  $\lambda$  pir maupun CRB17 ditumbuhkan pada media tersebut dengan cara digores dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang untuk CRB17 dan pada suhu 37°C untuk *E. coli*.

Konstruksi mutan dilakukan dengan menyisipkan gen kanamisin resisten (Km1) yang dibawa oleh transposon mini-Tn5Km1 pada plasmid pUTmini-Tn5Km1 di dalam *E. coli* S17-1  $\lambda$  pir (donor) ke dalam genom *Pseudomonas* sp. CRB17 (resipien) secara konjugasi *diparental mating* (Wahyudi *et al.* 2001). Biakan resipien CRB17 ditumbuhkan pada 50 mL King's B cair + kloramfenikol (KI) 50  $\mu$ g/mL dalam erlenmeyer 250 mL. Selanjutnya, kultur diinkubasi pada mesin bergoyang dengan kecepatan 120 rpm pada suhu ruang selama 24 jam. Sementara itu, biakan donor *E. coli* S17-1 ( $\lambda$  pir) ditumbuhkan pada media 50 mL Luria Broth (LB) + kanamisin (Km) 50  $\mu$ g/mL dalam erlenmeyer 250 mL dan dinkubasi pada inkubator bergoyang (120 rpm) pada suhu 37°C selama 20 jam.

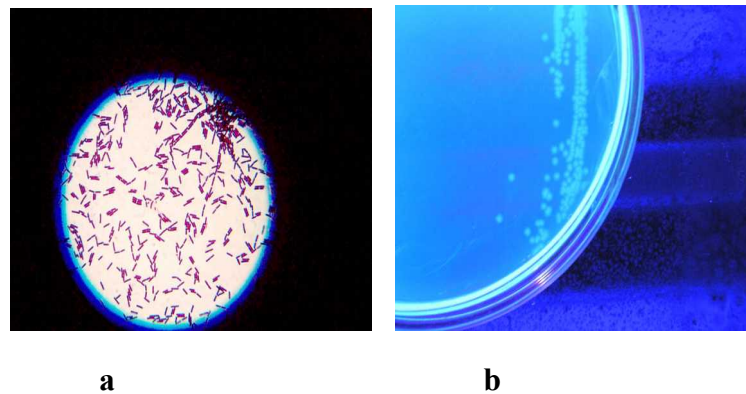
Perbandingan jumlah sel donor dan resipien yang digunakan ialah 1:1 (kisaran konsentrasi  $10^8$ : $10^8$  sel). Kultur sel donor dan resipien disentrifugasi, dan pelet yang terbentuk dicuci sebanyak 3 kali dengan garam fisiologis steril. Pelet sel resipien yang telah dipanen ditambah LB sebanyak 40  $\mu$ L. Suspensi sel resipien kemudian dipindahkan ke dalam tabung mikro yang berisi pelet sel donor. Suspensi campuran sel donor dan resipien diresuspensi dan dipindahkan dan diletakkan di atas membran filter *milipore* steril dan diletakkan di atas media Luria Agar (LA). Begitu pula, pelet sel donor dan pelet sel resipien sebagai kontrol negatif. Inkubasi dilakukan selama 24 jam. Masing-masing membran *milipore* selanjutnya diangkat dan dimasukkan ke dalam tabung mikro berisi 1 mL garam fisiologis. Setelah divorteks hingga sel terlepas dari membran *milipore*, sebanyak 100  $\mu$ L suspensi sel disebar pada agar cawan King's B + Km 50  $\mu$ g/mL + KI 50  $\mu$ g/mL dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Koloni yang muncul pada media tersebut menunjukkan *Pseudomonas* sp. CRB17 mutan yang telah tersisipi genomnya oleh gen Km1 dari transposon Mini-Tn5Km1 sehingga selain resisten terhadap kloramfenikol juga resisten terhadap kanamisin.

Seleksi dilakukan terhadap 49 mutan *Pseudomonas* sp. CRB17 yang ditentukan secara acak. Tiap mutan ditumbuhkan dalam 5 mL media King's B cair + 50  $\mu$ g/mL KI dan diinkubasi pada inkubator bergoyang (120 rpm, suhu ruang) selama 24 jam sebagai prakultur. Sebanyak 100  $\mu$ L biakan prakultur kemudian diinokulasikan ke dalam 5 mL media King's B cair + KI 50  $\mu$ g/mL yang disuplementasi dengan 0,5 mM L-triptofan dan dinkubasi pada suhu ruang serta digoyang pada 100 rpm selama 48 jam. Sebanyak 1,5 mL kultur disentrifugasi selama 15 menit pada 10000 rpm, kemudian sebanyak 1 mL supernatan dicampur rata dengan 4 ml reagen Salkowski dan dibiarkan pada suhu ruang

selama 20 menit dalam keadaan gelap, dan selanjutnya diukur absorbansinya pada  $\lambda$  520 nm (Spectronic 20, Bausch dan Lomb, US). Konsentrasi IAA ditentukan dengan membandingkannya terhadap kurva standar IAA dengan kisaran konsentrasi 0–30 ppm. Konsentrasi IAA yang dihasilkan oleh mutan *Pseudomonas* sp. CRB17 dibandingkan dengan konsentrasi IAA yang dihasilkan oleh *Pseudomonas* sp. CRB17 tipe liarnya.

### Hasil dan Pembahasan

Seratus isolat yang dikategorikan sebagai *Pseudomonas* sp. telah berhasil diisolasi dari tanah rizosfer kedelai daerah Cirebon, Jawa Barat setelah melalui uji biokimia/fisiologi secara parsial. Isolat-isolat tersebut memiliki karakter mampu tumbuh pada media agar King's B, berbentuk batang, motil, Gram negatif, dan uji oksidasenya positif (Gambar 1).



Gambar 1. a. Penampilan sel *Pseudomonas* sp. CRB 17 hasil pewarnaan Gram  
b. Penampilan koloni *Pseudomonas* sp. CRB 17 berfloresens pada agar King's B berumur 48 jam

Figure 1. a. Performance of *Pseudomonas* sp. CRB 17 cells after Gram staining  
b. Performance of fluorescence *Pseudomonas* sp. CRB 17 colonies on agar King's B of 48 hours

*Pseudomonas* sp. yang berpotensi dalam penghasilan IAA yang mampu memacu pertumbuhan banyak terdapat di rizosfer suatu tanaman (Dey *et al.*, 2004). Oleh karenanya, dalam penelitian ini untuk mendapatkan isolat *Pseudomonas* sp. penghasil IAA dilakukan isolasi *Pseudomonas* sp. dari rizosfer tanaman kedelai. Sebanyak 100 isolat dikategorikan sebagai *Pseudomonas* sp. Karakter-karakter umum yang dimiliki oleh *Pseudomonas* sp. tersebut adalah berbentuk batang, motil, Gram negatif, memiliki oksidase positif dan mampu tumbuh pada media semiselektif King's B (Holt *et al.*, 1994).

Berdasarkan hasil uji produksi IAA oleh *Pseudomonas* sp. diperoleh 98 isolat yang menghasilkan IAA dengan konsentrasi yang berbeda-beda. Salah satu isolat, yaitu *Pseudomonas* sp. CRB17, diketahui sebagai isolat penghasil IAA tertinggi, yakni sebesar 16,02 ppm. Isolat tersebut diketahui memiliki koloni yang mampu menghasilkan pigmen floresens pada media agar King's B sehingga dapat dikatakan bahwa *Pseudomonas* sp. CRB17 termasuk dalam kelompok *Pseudomonas* yang berfloresens. Isolat CRB17 ini selanjutnya digunakan untuk telaah pemacuan pertumbuhan dan mutagenesis dengan transposon.

Hasil uji pemacuan pertumbuhan terhadap kecambah kedelai menunjukkan bahwa isolat *Pseudomonas* sp. CRB17 ternyata mampu memacu pertumbuhan secara signifikan dengan cara memperpanjang akar primer dan memperbanyak jumlah akar lateral. Hal ini dibuktikan dari nilai parameter bioasai pemacuan pertumbuhan kecambah kedelai yang diinokulasi dengan CRB 17, yang secara signifikan berbeda nyata dengan kontrol pada taraf 5% (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil uji pemacuan pertumbuhan kecambah kedelai oleh *Pseudomonas* sp CRB17Table 1. Analysis of *Pseudomonas* sp CRB17 growth stimulation on soybean sprout

Perlakuan	Rata-rata Panjang akar primer (cm)	Rata-rata Jumlah akar Lateral
Kecambah diinokulasi dengan <i>Pseudomonas</i> sp. CRB 17	21,4*	75*
Kontrol (tanpa inokulasi dengan <i>Pseudomonas</i> sp CRB17)	11,4	32

\* berbeda nyata secara statistik pada taraf 5%; percobaan dilakukan dengan tiga ulangan, masing-masing ulangan terdiri atas 9 kecambah kedelai.

Pada Tabel 1 dapat dilihat bahwa panjang akar primer kecambah yang diinokulasi dengan CRB17 memiliki rata-rata sebesar 21,4 cm dan jumlah akarnya sebanyak 75 buah. Sementara itu, panjang akar primer kontrol sebesar 11,4 cm dan jumlah akarnya sebanyak 32 buah. Dari hasil ini dapat dikatakan bahwa isolat *Pseudomonas* sp. CRB17 dengan konsentrasi IAA yang dihasilkannya dapat berperan sebagai rizobakteria pemacu pertumbuhan tanaman, khususnya kedelai.

IAA yang disekresikan oleh suatu bakteri diduga dapat memacu pertumbuhan, baik secara langsung dengan merangsang pemanjangan atau pembelahan sel maupun secara tidak langsung dengan mempengaruhi aktivitas asam 1-aminosiklopropana-1-karboksilat (ACC) deaminase. Enzim ini menghidrolisis ACC tanaman, prekursor fitohormon etilen, sehingga mencegah produksi etilen yang berlebihan dengan konsentrasi yang menghambat pertumbuhan. IAA eksogenus dapat meningkatkan transkripsi dan aktivitas sintesis ACC pada tanaman. ACC ini memacu aktivitas ACC deaminase bakteri (Patten dan Glick, 2002).

Isolat CRB17 ini selanjutnya dipilih untuk dikonstruksi sebagai mutan yang menghasilkan IAA lebih tinggi. Karakter lain yang dimiliki oleh CRB17 ialah menghasilkan pigmen fluoresens pada media King's B. Banyak spesies *Pseudomonas* sp. yang mampu menghasilkan pigmen yang berfluoresens, terutama pada kondisi pertumbuhan miskin besi, misalnya jika ditumbuhkan pada media King's B yang tidak ditambah dengan zat besi. Beberapa pigmen ini dan turunannya berperan sebagai siderofor (zat pengkhelat besi) yang berpotensi menghambat pertumbuhan patogen (Garibaldi, 1967).

Amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR menghasilkan pita DNA berukuran sekitar 1.300 pasang basa (pb). Analisis sekuens DNA/gen 16S rRNA tersebut dilakukan menggunakan Program BLASTN. Ternyata gen 16S rRNA CRB17 memiliki homologi sangat tinggi dengan gen 16S rRNA *Pseudomonas plecoglossicida* strain NyZ12 dengan nilai kesamaan hingga 99%. Hal ini menunjukkan bahwa isolat CRB17 memang benar-benar termasuk dalam kelompok *Pseudomonas* yang mempunyai sifat berfluoresens.

Berdasarkan hasil uji resistensi diketahui bahwa *E. coli* S17-1  $\lambda$  pir (donor) sensitif terhadap kloramfenikol 50  $\mu$ g/ml tetapi resisten terhadap kanamisin 50  $\mu$ g/ml. Sementara itu, *Pseudomonas* sp. CRB17 diketahui sensitif terhadap kanamisin 50  $\mu$ g/ml tetapi resisten terhadap kloramfenikol 50  $\mu$ g/ml. Dengan demikian, antibiotik kanamisin dan kloramfenikol dapat digunakan sebagai marker seleksi transkonjugan/ mutan *Pseudomonas* sp. CRB17 hasil mutagenesis dengan transposon.

Hasil mutagenesis dengan transposon menunjukkan bahwa gen kanamisin resisten (Km1) telah berhasil diintegrasikan ke dalam genom *Pseudomonas* sp. CRB17 melalui konjugasi *diparental mating*. Hal ini diketahui melalui kemampuan mutan *Pseudomonas*

sp CRB17 untuk tumbuh pada media King'S B yang ditambah dengan kloramfenikol dan kanamisin. Frekuensi transkonjugasi hasil transposon mutagenesis tersebut yang didapat dengan waktu inkubasi konjugasi selama 24 jam adalah sekitar  $3,1 \times 10^{-5}$  sel per resipien. Frekuensi ini lebih tinggi bila dibandingkan dengan hasil penelitian Rukayadi (1998), yang mendapatkan frekuensi transkonjugasi pada *Xanthomonas campestris* sebesar  $8,3 \times 10^{-6}$  menggunakan galur *E. coli* yang sama.

Seleksi mutan *Pseudomonas* sp. CRB17 terhadap produksi IAA dilakukan terhadap 49 mutan hasil mutagenesis dengan transposon. Dari hasil seleksi diperoleh 21 transkonjugan yang menghasilkan IAA lebih tinggi daripada tipe liarnya, yaitu mengalami kenaikan produksi IAA hingga 77,52 % (Tabel 2). Hal ini diduga karena adanya penyisipan transposon di daerah represor dan mengakibatkan terjadinya perubahan pada gen-gen yang terlibat dalam regulasi biosintesis IAA sehingga produksi IAA menjadi meningkat (Pratiwi *et al.*, 2001). Transkonjugan I 3 diketahui merupakan mutan yang menghasilkan IAA paling tinggi dengan kenaikan produksi IAA hingga 77,52 % bila dibandingkan dengan tipe liarnya. Sementara itu, sebanyak 28 mutan menghasilkan IAA yang lebih rendah bila dibandingkan dengan tipe liarnya, yaitu dengan persentase penurunan hingga 55,31%. Salah satu transkonjugan, yaitu II 73 mengalami penurunan (*downregulated*) sebanyak 55,31% (Tabel 3). Penurunan produksi IAA ini mungkin disebabkan oleh adanya penghambatan salah satu gen dalam produksi IAA.

Tabel 2. Persentasi kenaikan IAA yang dihasilkan oleh mutan *Pseudomonas* sp CRB17 hasil mutagenesis dengan transposon

Table 2. Percentage of IAA increase produced by transposon mutagenic *Pseudomonas* sp CRB17

Kode Mutan	Kenaikan produksi IAA (%)	Kode Mutan	Kenaikan produksi IAA (%)
III 73	1,80	I 22	22,99
II 20	2,93	II 99	30,41
I 25	5,12	V 20	32,67
I 33	8,13	I 23	37,94
III 41	8,33	I 8	48,43
III 14	9,53	II 11	49,58
II 30	9,83	I 2	51,48
V 11	10,29	I 1	65,59
II 7	10,62	I 11	70,54
I 31	14,76	I 3	<b>77,52</b>
I 32	17,81		

Melalui mutagenesis dengan transposon ini tidak didapatkan mutan yang tidak menghasilkan IAA. Hal ini diduga karena banyaknya jalur sintesis yang digunakan dalam produksi IAA yang mungkin dimiliki oleh genus *Pseudomonas*. Jika salah satu jalur saja terhambat karena salah satu gen yang berperan dalam jalur tersebut tidak dapat diekspresikan akibat penyisipan transposon, maka bakteri penghasil IAA dapat mengambil jalur sintesis alternatif. Hal serupa juga ditemui dalam penelitian Pratiwi *et al.* (2001), yang mendapatkan mutan-mutan *Azospirillum braziliense* dengan produksi IAA lebih tinggi dan lebih rendah melalui mutagenesis dengan transposon.

Tabel 3. Persentasi penurunan IAA yang dihasilkan oleh mutan *Pseudomonas* sp CRB17 hasil mutagenesis dengan transposon  
 Table 3. Percentage of IAA decrease produced by transposon mutagenic *Pseudomonas* sp CRB17

Kode Mutan	Penurunan produksi IAA (%)	Kode Mutan	Penurunan Produksi IAA (%)
I 18	2,66	III 52	22,79
II 41	4,39	III 2	30,12
II 4	7,68	I 26	31,47
III 20	8,64	III 11	32,94
I 16	10,39	II 83	33,71
II 23	11,37	V14	34,56
II 52	11,49	II 92	39,68
II 33	14,37	V 7	39,96
I 30	14,63	III 23	40,61
I 27	14,76	III 83	47,31
III 4	17,90	V 23	47,68
I 29	19,58	I 28	54,61
III 63	20,04	III 30	54,73
II 63	21,62	II 73	<b>55,31</b>

### Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan tersebut di atas dapat ditarik kesimpulan bahwa melalui mutagenesis dengan transposon dapat dikonstruksi mutan *Pseudomonas* sp. CRB 17 penghasil IAA yang lebih tinggi daripada tipe liarnya.

### Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didanai oleh Program Insentif Penelitian Dasar dari Kementerian Negara Riset dan Teknologi (KNRT) Indonesia. Oleh karena itu, peneliti mengucapkan terima kasih atas dukungan dana dan kepercayaan yang diberikan untuk melaksanakan penelitian ini.

### Daftar Pustaka

- Dey R., Pal, K.K., Bhatt, D.M., and Chauhan, S.M. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiol. Res.*, 159, 371-394.
- Garibaldi, A. 1967. Media for the enhancement of fluorescent pigment production by *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.*, 94, 1296-1299.
- Harayama, S., Lehrbach, P.R., and Timmis K.N. 1984. Transposon mutagenesis analysis of meta-cleavage pathway operon genes of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. *J. Bacteriol.*, 160, 251-255.
- Holt J.G. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9<sup>th</sup> Ed. Philadelphia: Lippincott William and Wilkins.

- Holtwick, R., Meinhard, F., and Keweloh, H. 1997. Cis-trans isomerization of unsaturated fatty acids: cloning and sequencing of the *cti* gene from *Pseudomonas putida* P8. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 4292-4297.
- Husen, E., dan Saraswati, R. 2003. Effect of IAA-producing bacteria on the growth of hot pepper. *J. Mikrobiol. Indones.*, 8, 22-26.
- Kapulnik, Y., Okon, Y. 2002. Plant growth promotion by rhizosphere bacteria. In Warsel Y, Eshel A, Kafkafi U (editor). *Plant Roots: The Hidden Half*. 3<sup>rd</sup> Ed. New York: Marcel Dekker. hlm. 869-885.
- Manulis, S., Haviv-Chesner, A., Brandl, M.T., Lindow, S.E., and Barash, I. 1998. Differential involvement of Indole-3-Acetic Acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae*. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, 11, 634-642.
- Patten, C.L. and Glick, B.R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 3795-3801.
- Pratiwi, E., Suwanto, A., Gunarto, L., and Adijuwana, H. 2001. Karakterisasi mutan biosintesis asam indol asetat pada *Azospirillum lipoferum* J21.4 yang dihasilkan dari mutagenesis transposon. *Hayati*, 8, 18-22.
- Premono, M.E. dan Widyastuti R. 1996. Status hara tanaman jagung yang diinokulasi dengan *Pseudomonas putida* L27A4A1. *Hayati*, 3, 55-60.
- Rukayadi, Y., Suwanto, A. dan Tjahjono B. 1998. Konstruksi plasmid yang mengandung situs *PacI* dan *PmeI* untuk transposon mutagenesis pada *Xanthomonas campestris*. *Hayati*, 5, 79-85.
- Vande Broek, A., P. Gysegom, O. Ona, N. Hendrickx, E. Prinsen, J. Van Impe and J. Vanderleyden. 2005. Transcriptional analysis of the *Azospirillum brasilense* Indole-3-Pyruvate decarboxylase gene and identification of a cis-Acting sequence involved in auxin responsive expression. *Mol. Plant. Microbe Interac*, 18, 311-323.
- Wahyudi, A.T. 2000. Inverse polymerase chain reaction. *Hayati*, 7, 121-123.
- Wahyudi, A.T. 2001. Perpustakaan gen: bagaimana mengkonstruksinya. *Hayati*, 8, 27-30.
- Wahyudi, A.T. 2005. Konstruksi pustaka genom *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 dan penapisan gen yang terlibat dalam sintesis magnetosom. *Hayati*, 10, 91-95.