

**ISOLASI DAN UJI POTENSI BAKTERI RHIZOSFER DAN
ENDOFIT SORGUM (*Sorghum bicolor*) SEBAGAI AGEN *Plant
Growth Promoting* (PGP)**

SKRIPSI

oleh
VIOLITA YULPHA EKAPUTRI
145090101111010



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**ISOLASI DAN UJI POTENSI BAKTERI RHIZOSFER DAN
ENDOFIT SORGUM (*Sorghum bicolor*) SEBAGAI AGEN *Plant
Growth Promoting* (PGP)**

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Sains dalam Bidang Biologi**

oleh
Violita Yulpha Ekaputri
145090101111010



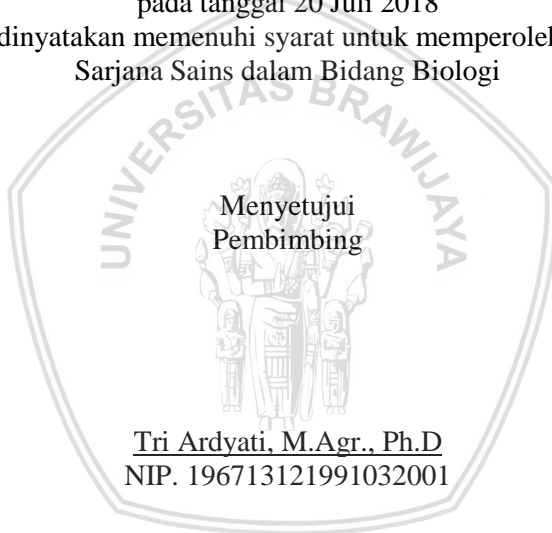
**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

HALAMAN PENGESAHAN

ISOLASI DAN UJI POTENSI BAKTERI RHIZOSFER DAN ENDOFIT SORGUM (*Sorghum bicolor*) SEBAGAI AGEN *Plant Growth Promoting* (PGP)

VIOLITA YULPHA EKAPUTRI
145090101111010

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 20 Juli 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam Bidang Biologi



Tri Ardyati, M.Agr., Ph.D
NIP. 196713121991032001

Mengetahui
Ketua Program Studi S-1 Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Rodiyati Azrianingsih, S.Si., M.Sc., Ph.D.
NIP. 19700128 199412 2 001

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



HALAMAN PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Violita Yulpha Ekaputri

NIM : 145090101111010

Jurusan : Biologi

Penulis Skripsi berjudul : ISOLASI DAN UJI POTENSI BAKTERI
RHIZOSFER DAN ENDOFIT SORGUM
(*Sorghum bicolor*) SEBAGAI AGEN *Plant
Growth Promoting* (PGP)

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Skripsi ini adalah benar-benar karya saya sendiri dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Karya-karya yang tercantum dalam daftar pustaka skripsi ini semata-mata digunakan sebagai acuan/referensi,
2. Apabila kemudian hari diketahui bahwa isi skripsi saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung akibat hukum dari keadaan tersebut.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 20 Juli 2018
yang menyatakan,

Violita Yulpha Ekaputri
145090101111010

Isolasi dan Uji Potensi Bakteri Rhizosfer dan Endofit Sorgum (*Sorghum bicolor*) sebagai Agen *Plant Growth Promoting* (PGP)

Violita Yulpha Ekaputri, Tri Ardyati
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya
2018

ABSTRAK

Sorgum (*Sorghum bicolor*) merupakan tanaman serealia yang dikenal adaptif pada lahan kering yang mengandung sedikit nutrisi. Kekurangan nutrisi pada tanah kering umumnya diatasi dengan pemberian pupuk sintesis yang apabila penggunaannya berlebihan akan menurunkan kualitas tanah. Penggunaan agen hayati seperti bakteri menjadi salah satu alternatif untuk mencegah terjadinya kerusakan tanah. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jumlah sel dan menguji kemampuan isolat bakteri yang diisolasi dari akar (endofit) dan tanah (rhizosfer) sorgum dalam memproduksi IAA, melarutkan fosfat, dan memfiksasi nitrogen. Isolat potensial diidentifikasi secara molekular berdasarkan sekuen 16S rDNA dan diuji interaksinya. Sampel diperoleh dari lahan sorgum Tapos, Bogor. Bakteri penghasil IAA, pelarut fosfat, dan pemfiksasi nitrogen masing-masing diisolasi menggunakan medium TSA yang mengandung triptofan 5 µg/mL, Pikovskaya, dan Nfb. Hasil isolasi didapatkan 42 isolat bakteri penghasil IAA, 20 isolat bakteri pelarut fosfat, dan 26 isolat bakteri pemfiksasi nitrogen. Isolat penghasil IAA, pelarut fosfat dan pemfiksasi nitrogen masing-masing diseleksi menggunakan membran nitroselulosa yang ditetesi dengan reagen Salkowski, pengukuran indeks kelarutan dengan medium Pikovskaya padat, dan SERA *Ammonia Test Kit*. Hasil seleksi didapatkan masing-masing empat isolat untuk diuji lanjut. Isolat E244 menghasilkan IAA dengan konsentrasi tertinggi 93,97±4,51 µg/mL. Isolat R233 memiliki kemampuan pelarutan fosfat tertinggi 14,02±2,41 µg/mL. Isolat R3-544 memfiksasi nitrogen paling baik dengan konsentrasi amonia 2,83±0,68 µg/mL. Isolat E244, R233, dan R3-544 secara berurutan teridentifikasi sebagai *Enterobacter cloacae* RCB680 (99,90%), *Pantoea dispersa* (96,38%), dan *Leclercia adecarboxylata* (99,80%).

Kata kunci: endofit, IAA, PGP, rizosfer, sorgum

Isolation and Potency Assay of Sorghum (*Sorghum bicolor*) Rhizospheric and Endophytic Bacteria as Plant Growth Promoting (PGP) Agent

Violita Yulpha Ekaputri, Tri Ardyati
Biology Department, Faculty of Mathematic and Natural Science,
Universitas Brawijaya, Malang
2018

ABSTRACT

Sorghum (*Sorghum bicolor*) is a cereal plant which well-known as adaptive plant in arid soil which contain less nutrition. Small amount of nutrition in arid soil generally solved by addition of synthetic fertilizers. The usage of synthetic fertilizer in much amount will decreased soil quality. Biological agent utilization such as bacteria is one of the alternative solution to prevent soil damage. These research aimed to observe the population and potency of bacteria isolated from sorghum root (endophyte) and soil (rhizosphere) on IAA production, phosphate solubilization, and nitrogen fixation. Isolates with the highest potency were identified based on 16S rDNA. The next step was assay the interaction types of isolates obtained. Samples were taken from sorghum plantation in Tapos, Bogor. IAA producing, phosphate solubilizing, and nitrogen fixing bacteria were isolated using TSA medium contained tryptophan 5 µg/mL, Pikovskaya, and Nfb, respectively. Total isolates obtained from isolation were 42 IAA isolates of producing bacteria, 20 isolates of phosphate solubilizer bacteria, and 26 isolates of nitrogen fixing bacteria. Screening of IAA producing was using nitrocellulose membrane with addition of Salkowsky reagent, phosphate solubilization was detected based on solubilization index, and nitrogen fixation potency was assayed using SERA Ammonia Test Kit. Isolate E244 able to produce IAA with highest concentration of 93.97 ± 4.51 µg/mL. Isolate R233 able to solubilizing phosphate with concentration of 14.02 ± 2.41 µg/mL. Isolate R3-544 able to fixing nitrogen with high ammonia concentration of 2.83 ± 0.68 µg/mL. Isolate E244, R233, and R3-544 were identified as *Enterobacter cloacae* RCB680 (99,90%), *Pantoea dispersa* (96,38%), and *Leclercia adecarboxylata* 60ft2 (99,80%) respectively.

Keywords : endophyte, IAA, PGP, rhizosphere, sorghum

KATA PENGANTAR

Puji Syukur dipanjatkan pada Tuhan Yesus Kristus, yang memberikan berkat dan karunia-Nya sehingga skripsi yang merupakan syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam Bidang Biologi di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang. Pada kesempatan ini, disampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Ibu Tri Ardyati, M.Agr., Ph.D selaku Dosen Pembimbing yang telah mendampingi, memberikan pengarahan, tambahan ilmu, serta motivasi dalam menyelesaikan penelitian skripsi ini.
2. Bapak Dr. Suharjono, MS dan Bapak Dian Siswanto, S.Si, M.Sc., M.Si., Ph.D selaku Dosen Penguji yang telah memberikan saran, ilmu dan motivasi yang bermanfaat dalam penyusunan skripsi.
3. Orang tua, Bapak Paulus Tambing, Ibu Yulin Tirsani Sipi serta adik, Janter Paul Dwirichardo yang senantiasa memberikan doa, kasih sayang, dukungan dan motivasi yang tidak terkira.
4. Ibu Nanik Dwi Rahayu selaku laboran Laboratorium Mikrobiologi yang selalu memberikan semangat dan membantu dalam kelancaran kegiatan penelitian.
5. Siti R., Helena D., Rr. Intan K., Nofa P., Lita N. U., Laksmita T. O., Vania A., Ni Made D. W., Kinanti N. P., Kurrotul U., Geraldo J. F., Arnoldus R. D., Sony H. P., teman-teman seperjuangan di Laboratorium Mikrobiologi yang selalu mendukung serta memberikan semangat.
6. Dellystiya F. A. P. W., Wiaam R. S., Sayyidatul A. N., Hani K., Wahyu I. A., dan Eloys F. C. H. yang selalu memberikan doa serta semangat.
7. Seluruh anggota *Working Group* Mikrobiologi, teman-teman S1 Biologi angkatan 2014 (AMINO 2014) dan segenap civitas akademika di Universitas Brawijaya.

Penulisan skripsi ini merupakan upaya untuk memberikan sarana dalam pengembangan ilmu pengetahuan. Penulisan skripsi ini masih kurang dari sempurna, maka kritik dan saran sangat diharapkan untuk menjadikan karya ini menjadi semakin bermanfaat.

Malang, 20 Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK.....	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN.....	xiii

BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3

BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Potensi dan Pemanfaatan Sorgum di Indonesia.....	4
2.2 Diversitas Bakteri PGP pada Sorgum dan Faktor-faktor yang Mempengaruhi.....	5
2.3 Bakteri Endofit dan Rhizosfer serta Aktivitasnya sebagai <i>Plant Growth Promoting Bacteria</i> (PGPB).....	6
2.3.1 Bakteri Penghasil IAA.....	8
2.3.2 Bakteri Pelarut Fosfat	10
2.3.3 Bakteri Pemfiksasi Nitrogen dan Aktivitas Fiksasi Nitrogen secara Biologis	11

BAB III METODE PENELITIAN.....	13
3.1 Waktu dan Tempat	13
3.2 Deskripsi Sampel dan Pengukuran Faktor Fisikokimia Tanah	13
3.3 Isolasi Bakteri Endofit dan Rhizosfer.....	13
3.4 Uji Potensi Isolat Bakteri Penghasil IAA	14
3.5 Uji Potensi Isolat Bakteri Pelarut Fosfat	15
3.6 Uji Potensi Isolat Bakteri Pemfiksasi Nitrogen.....	16
3.7 Uji Interaksi antar Isolat Unggul	16
3.8 Analisis Data	17
3.9 Identifikasi Isolat Potensial	17



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	19
4.1 Faktor Fisikokimia Tanah Rhizosfer	19
4.2 Populasi Bakteri Endofit dan Rhizosfer Sorgum.....	20
4.3 Potensi Isolat dalam Produksi IAA	21
4.4 Potensi Isolat dalam Pelarutan Fosfat.....	24
4.5 Potensi Isolat dalam Fiksasi Nitrogen	27
4.6 Tipe Interaksi Isolat Unggul.....	29
4.7 Identifikasi Isolat Potensial	29
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	34
5.1 Kesimpulan.....	34
5.2 Saran.....	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN	44



DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1	Rata-rata luas tanam, produksi dan produktivitas sorgum di Indonesia	4
2	Komposisi <i>master mix</i> PCR	18
3	Proses PCR	18
4	Nilai rata-rata parameter fisiko-kimia rhizosfer yang terukur	19
5	Kemampuan produksi IAA masing-masing isolat berdasarkan perubahan warna membran nitroselulosa	22
6	Kemampuan fiksasi nitrogen masing-masing isolat setelah 7 hari inkubasi pada suhu ruang	28

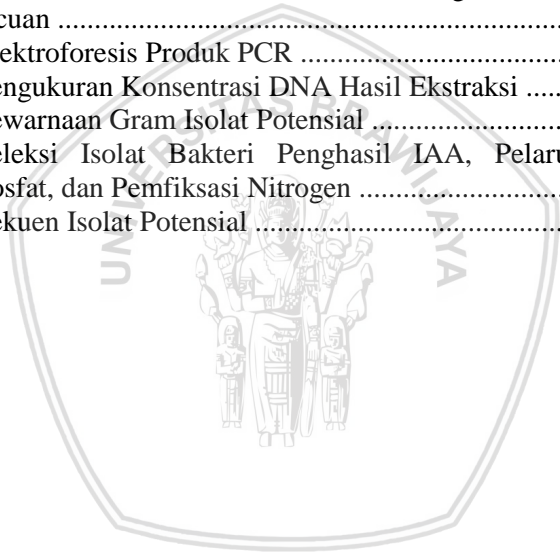


DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1	Macam-macam jalur biosintesis IAA pada bakteri	9
2	Alur mineralisasi fosfat anorganik menjadi fosfat terlarut	10
3	Jumlah bakteri endofit dan rhizosfer pada bakteri penghasil IAA dan pelarut fosfat serta bakteri pemfiksasi nitrogen	20
4	Konsentrasi IAA yang dihasilkan masing-masing isolat pada tiap jam inkubasi	23
5	Dinamika jumlah sel pada masing-masing isolat di tiap jam inkubasi	24
6	Indeks kelarutan fosfat masing-masing isolat	25
7	Konsentrasi fosfat terlarut masing-masing isolat pada tiap jam inkubasi	26
8	Konsentrasi amonia masing-masing isolat setelah inkubasi selama tujuh hari	28
9	Interaksi isolat bakteri pemfiksasi nitrogen dengan isolat bakteri penghasil IAA (E244) dan bakteri pelarut fosfat (R233)	29
10	Pohon filogeni isolat E244	30
11	Pohon filogeni isolat R233	31
12	Pohon filogeni isolat R3-544	32

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1	Kurva standar	44
2	Hasil Uji Statistik Konsentrasi IAA	45
3	Hasil Uji Statistik Jumlah Sel Bakteri Penghasil IAA	46
4	Hasil Uji Statistik Indeks Kelarutan Fosfat	47
5	Hasil Uji Statistik Konsentrasi Fosfat Terlarut	48
6	Hasil Uji Statistik Konsentrasi Amonia	49
7	Jarak Similaritas Isolat Potensial dengan Isolat Acuan	49
8	Elektroforesis Produk PCR	50
9	Pengukuran Konsentrasi DNA Hasil Ekstraksi	51
10	Pewarnaan Gram Isolat Potensial	51
11	Seleksi Isolat Bakteri Penghasil IAA, Pelarut Fosfat, dan Pemfiksasi Nitrogen	53
12	Sekuen Isolat Potensial	55



DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

Singkatan

PGP
 PGPB
 IAA
 BNF
 N_2
 NH_3
 NO_3^-
 MoFe
 Fe
 Fe_3PO_4
 Al_3PO_4
 $Ca_3(PO_4)_2$
 EPS
 AcPase
 NaOCl
 NaCl
 TPC
 MPN
 IK
 INP
 RAL
 KH_2PO_4
 ANOVA

Keterangan

Plant Growth Promoting
Plant Growth Promoting Bacteria
Indole-3-Acetic Acid
Biological Nitrogen Fixation
 Nitrogen
 Amonia
 Nitrat
Molybdenum-Iron
 Besi
 Besi (II) Fosfat
 Aluminium Fosfat
 Kalsium Fosfat
Exopolysaccharide
Phosphatase
Natrium Hypochlorite
Natrium Chloride
Total Plate Count
Most Probable Number
 Indeks Kelarutan
 Indeks Nilai Penting
 Rancangan Acak Lengkap
Potassium Dihydrogen Phosphate
Analysis of Variance

Lambang

α
 $^\circ$
 %
 μ
 \pm

Nama unit

Alfa
 derajat
 persen
 mikro
 kurang-lebih





BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sorgum (*Sorghum bicolor*) merupakan tanaman sereal yang memiliki berbagai manfaat ekonomis maupun ekologis. Bagian bulir, batang, maupun daun sorgum dapat dimanfaatkan secara ekonomis sebagai bahan pangan, pakan, maupun industri. Bulir sorgum dapat dibuat menjadi tepung sebagai bahan baku pembuatan kue, mie, dan dapat pula dimanfaatkan untuk pakan unggas. Batang dan daun sorgum memiliki tekstur renyah dan rasa yang manis sehingga banyak dimanfaatkan sebagai pakan ternak. Bioetanol, gula, sirup, dan pati merupakan contoh produk industri yang dihasilkan dari Sorgum. Pati dari sorgum juga secara lanjut dapat diolah menjadi bahan perekat, pengental, dan zat aditif industri tekstil (Suryaningsih & Irhas, 2014; Hariprasanna & Rakshit, 2016). Tanaman sorgum memiliki kemampuan adaptasi yang tinggi pada lingkungan kering sehingga dijadikan sebagai produk tani potensial di daerah-daerah kering di Indonesia khususnya Nusa Tenggara Timur. Kemampuan adaptasi Sorgum sangat baik terutama pada lahan marjinal seperti lahan semi arid (Subagio & Aqil, 2013).

Sorgum dapat tumbuh pada lahan kering, mengandung sedikit nutrisi dan tidak berpotensi untuk ditumbuhi tanaman. Tanah dengan karakter tersebut termasuk lahan marjinal. Pada umumnya, tanaman yang tumbuh di lahan kering bergantung sepenuhnya pada alam dan sumber air berasal dari hujan (Sumarno & Hidayat, 2007). Sumber nutrisi tanaman tersebut didapatkan dari bahan organik yang berasal dari sisa-sisa tumbuhan yang telah mati, sisa-sisa metabolisme makhluk hidup, maupun dari pupuk sintesis (Jones, 2012). Kekurangan nutrisi pada lahan marjinal diatasi dengan mengaplikasikan pupuk sintesis, namun dampak penggunaannya akan menurunkan kualitas tanah secara perlahan-lahan. Hal tersebut dikarenakan pupuk sintesis dapat mengurangi jumlah mikroorganisme tanah yang berperan penting dalam daur bahan organik di tanah (Gach, 2012).

Mikroorganisme tanah berperan penting dalam daur ulang unsur organik. Selain menyediakan nutrisi bagi tanah, asosiasi antara mikroorganisme tanah dengan tumbuhan akan memberikan berbagai manfaat penting bagi pertumbuhan tanaman (Gach, 2012). Bakteri pemacu pertumbuhan tanaman atau *Plant Growth Promoting Bacteria*

(PGPB) memiliki berbagai macam kemampuan untuk mendukung pertumbuhan tanaman. Kebutuhan nutrisi esensial tumbuhan seperti nitrogen dan fosfor harus selalu tersedia agar pertumbuhan tanaman optimal. Namun nitrogen serta fosfor yang tersedia di lingkungan tidak dapat langsung dimanfaatkan oleh tumbuhan (Nosrati dkk., 2014). Aktivitas pemacu pertumbuhan tanaman yang dimiliki oleh bakteri rhizosfer maupun bakteri endofit dalam memfiksasi nitrogen, melarutkan fosfat anorganik, dan menghasilkan hormon pertumbuhan (fitohormon) mampu meningkatkan penyerapan nutrisi esensial untuk pertumbuhan tanaman (Felestrino dkk., 2017).

Keanekaragaman bakteri khususnya PGPB pada rhizosfer dan endofit tanaman sorgum telah banyak dieksplorasi. Bakteri seperti *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Herbaspirillum* sp., *Azotobacter* sp., *Azospirillum* sp., *Aminomonas* sp., *Pantoea* sp., *Erwinia* sp., dan *Sphingobacterium* merupakan beberapa genus bakteri yang diketahui berperan sebagai PGPB pada tanaman sorgum (James dkk., 1997; Finyom, 2012; Sivasankari & Pradeep, 2013; Xu, 2014; Maropola dkk., 2015). Bakteri yang memiliki aktivitas pemacu pertumbuhan tanaman dapat dijadikan sebagai *biofertilizer* (Gupta dkk., 2014). Penelitian mengenai PGPB pada tanaman sorgum secara langsung menyumbang informasi-informasi serta membantu peningkatan usaha produksi sorgum khususnya di Indonesia, karena upaya pengembangan produksi sorgum masih tergolong rendah sehingga memiliki potensi yang besar untuk diteliti lebih lanjut.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Bagaimana potensi isolat-isolat bakteri dari rhizosfer dan endofit sorgum dalam memfiksasi nitrogen, melarutkan fosfat, dan menghasilkan hormon IAA?
2. Bakteri apakah yang memiliki potensi terbaik dalam memfiksasi nitrogen, melarutkan fosfat, dan menghasilkan hormon IAA berdasarkan sekuen 16S rDNA?
3. Bagaimana tipe interaksi antar isolat unggul yang didapatkan?

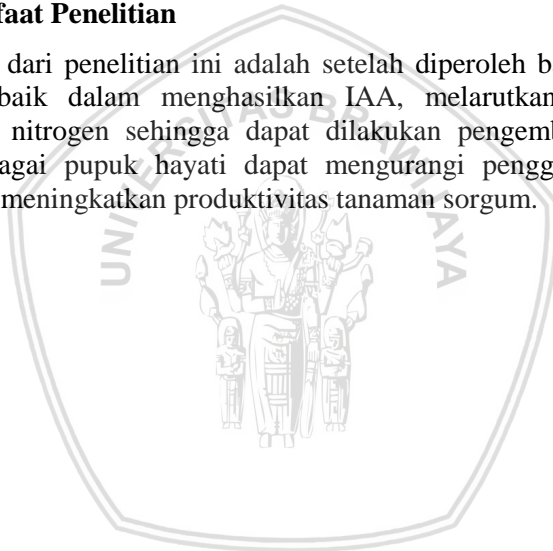
1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah berikut:

1. Mengetahui potensi isolat bakteri rhizosfer dan endofit sorgum dalam memfiksasi nitrogen, melarutkan fosfat, serta menghasilkan hormon IAA.
2. Mengidentifikasi isolat bakteri rhizosfer dan endofit sorgum dengan potensi terbaik dalam memfiksasi nitrogen, melarutkan fosfat, dan menghasilkan hormon IAA berdasarkan sekuen 16S rDNA.
3. Mengetahui tipe interaksi antar isolat unggul yang didapatkan.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah setelah diperoleh bakteri dengan potensi terbaik dalam menghasilkan IAA, melarutkan fosfat, dan memfiksasi nitrogen sehingga dapat dilakukan pengembangan isolat unggul sebagai pupuk hayati dapat mengurangi penggunaan pupuk sintetis dan meningkatkan produktivitas tanaman sorgum.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Potensi dan Pemanfaatan Sorgum di Indonesia

Sorgum merupakan tanaman serealia yang termasuk ke dalam famili Poaceae. Distribusi sorgum sangat luas khususnya di Afrika, bagian selatan India, hingga Indonesia. Sorgum diperkirakan merupakan tanaman asli dari daerah Timur Laut Afrika yaitu pada daerah perbatasan Mesir dengan Sudan (Hariprasanna & Rakshit, 2016). Sorgum Afrika dibawa ke luar negeri untuk diperkenalkan sehingga adanya pengenalan tersebut membuat distribusi sorgum kian meluas terutama ke negara-negara yang beriklim kering. Kemampuan beradaptasi sorgum pada daerah kering menjadi salah satu alasan mengapa distribusi sorgum sangat luas di daerah Afrika, India, dan Indonesia (Reddy & Patil, 2015). Beberapa daerah di Indonesia seperti Jawa Tengah, Jawa Timur, Daerah Istimewa Yogyakarta, Jawa Timur, Nusa Tenggara Barat, dan Nusa Tenggara Timur telah mengembangkan sorgum. Rata-rata luas tanam serta produktivitas sorgum di daerah Jawa Tengah merupakan yang tertinggi dibandingkan tempat lainnya (Tabel 1). Sirappa (2003) menyebutkan bahwa rata-rata luas tanam dan produktivitas sorgum berbeda pada masing-masing daerah karena perbedaan agroekologi serta teknologi budidaya yang diterapkan petani.

Tabel 1. Rata-rata luas tanam, produksi dan produktivitas sorgum di Indonesia

Tempat/tahun	Luas tanam (ha)	Produksi (ton)	Produktivitas (ton/ha)
Jawa Tengah (1973-1983)	15.309	17.350	1,13
Jawa Timur (1984-1988)	5.963	10.522	1,76
DI Yogyakarta (1974-1980)	1.813	670	0,37
Nusa Tenggara Barat (1993/94)	30	54	1,80
Nusa Tenggara Timur (1993/94)	26	39	1,50

(Sirappa, 2003)

Adaptasi tanaman sorgum terhadap lingkungannya sangat luas karena mampu mentolerir kondisi tanah. Tanah dengan rentang pH 5 hingga 8,5 dapat ditanami sorgum. Sorgum sangat toleran terhadap kekeringan dan relatif tahan terhadap gangguan hama atau penyakit

(Sirappa, 2003; Shoemaker & Bransby, 2010). Karakter-karakter tersebut membuat sorgum banyak dikenal sebagai tanaman yang adaptif pada lahan marjinal. Lahan marjinal merupakan lahan yang memiliki nilai agrikultur dan ekonomi yang rendah. Tanah kering, tanah asam, dan tanah yang terkena polusi akibat aktivitas industri merupakan contoh tanah marjinal (Shahid & Shankiti, 2013). Menurut Subagio & Suryawati (2013), beberapa karakter sorgum yang menjadi keunggulan untuk dibudidayakan adalah kemampuan adaptasi yang luas, keragaman genetik yang tinggi, budidaya mudah, resiko gagal panen yang rendah, dan dapat dijadikan komoditas ekspor. Kandungan nutrisi pada sorgum antara lain protein, lemak, karbohidrat, serat jenuh, energi, dan kalsium. Jumlah protein, karbohidrat, dan energi yang dimiliki sorgum tidak berbeda pada jagung dan gandum sehingga tanaman ini sangat berpotensi untuk dimanfaatkan (Hariprasanna & Rakshit, 2016).

Selain dikenal sebagai tanaman yang adaptif, sorgum juga dikenal sebagai tanaman yang multifungsi karena seluruh bagian tanaman meliputi daun, batang, biji, tangkai biji, serta akar dapat dimanfaatkan. Batang dan biji sorgum memiliki kandungan gula sehingga dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan bioetanol (Suryaningsih & Irhas, 2014). Biji sorgum dapat diolah menjadi tepung sorgum dan dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan produk makanan seperti roti, tape, kue kukus, dan sebagainya. Menurut Dicko dkk. (2006), sorgum mengandung serat pangan yang dibutuhkan tubuh untuk mencegah berbagai penyakit seperti penyakit jantung, hipertensi, dan kanker usus. Serat pangan berfungsi untuk mengikat asam empedu sehingga kadar kolesterol dalam darah dapat turun. Bagian daun, akar, batang segar, dan tangkai biji dapat dimanfaatkan menjadi pakan ternak.

2.2 Diversitas Bakteri PGP pada Sorgum dan Faktor-faktor yang Mempengaruhi

Berbagai penelitian telah dilakukan untuk mempelajari tentang diversitas bakteri khususnya bakteri pemacu pertumbuhan tanaman pada tanaman sorgum. Sivasankari & Pradeep (2013) pada penelitiannya mengisolasi genus *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., dan *Klebsiella* spp. dari tanah sorgum memiliki kemampuan menghasilkan hormon IAA. Menurut penelitian Finyom (2012), pada bagian batang Sorgum terdapat *Pantoea* sp. dan *Erwinia* sp. dimana kedua genus tersebut diketahui mampu menghasilkan hormon IAA sedangkan pada bagian

akar didapatkan *Pseudomonas* sp., *Aminomonas* sp., dan *Staphylococcus saprophyticus*. *Herbaspirillum seropedicae* yang merupakan bakteri pemfiksasi nitrogen diketahui dapat tumbuh pada jaringan daun sorgum. Salah satu bakteri pemfiksasi nitrogen yaitu *Herbaspirillum rubrisubalbicans* diketahui mengkolonisasi pembuluh xilem pada daun sorgum dan akar tebu (James dkk., 1997; Xu, 2014).

Bakteri dapat bekerja secara sinergis dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman. *Azotobacter chroococcum* dan *Azotobacter vinelandii* dapat bekerja secara individu maupun sinergis dengan bakteri PGP lainnya dalam meningkatkan germinasi biji serta meningkatkan produksi pada tanaman sorgum, tomat, kentang, dan jagung (Xu, 2014). Berdasarkan hasil analisis *pyrosequencing* yang dilakukan oleh Maropola dkk. (2015) pada jaringan akar serta batang sorgum, diketahui bahwa komunitas bakteri yang terdapat kedua mikrohabitat tersebut berbeda. Genus-genus yang umumnya terdapat pada batang serta akar sorgum yaitu *Microbacterium*, *Agrobacterium*, *Sphingobacterium*, *Herbaspirillum*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, dan *Stenotrophomonas* yang seluruhnya berperan sebagai bakteri pemacu pertumbuhan tanaman.

Diversitas dan struktur komunitas mikroorganisme tanah dipengaruhi oleh eksudat akar seperti gula, asam amino, siderofor, dan enzim. Interaksi antara akar tanaman dan mikroorganisme tanah berpotensi untuk mempengaruhi komunitas bakteri pada tanah dan meningkatkan kesuburan tanah. Sekresi eksudat oleh akar tanaman juga dipengaruhi oleh kesuburan tanah. Jenis tanah, ketersediaan nutrisi dan kelembaban tanah dapat mempengaruhi sekresi eksudat dan secara langsung juga berpengaruh terhadap diversitas mikroorganisme tanah (Souza dkk., 2015; Wu dkk., 2018). Menurut Santoyo dkk. (2017), beberapa faktor abiotik yang dapat mempengaruhi diversitas mikroorganisme tanah antara lain pH, kadar air, bahan organik, temperatur, tipe tanah, pupuk, dan karbon dioksida.

2.3 Bakteri Endofit dan Rhizosfer serta Aktivitasnya sebagai *Plant Growth Promoting Bacteria* (PGPB)

Mikroorganisme pada tanaman dapat ditemukan di tanah maupun jaringan tanaman (endofit). Keanekaragaman mikroorganisme pada taaman banyak dikaji terutama dalam hal interaksi serta aktivitas yang memberikan dampak positif maupun negatif terhadap tanaman. Bakteri merupakan salah satu mikroorganisme yang memiliki berbagai kemampuan dalam membantu pertumbuhan tanaman. Keberadaannya

dapat ditemukan di tanah maupun jaringan tanaman seperti akar, batang, dan daun (Felestrino dkk., 2017). Zona tanah dengan diversitas bakteri yang paling tinggi berada di rhizosfer. Tanah rhizosfer merupakan tanah yang berada di sekitar akar tanaman. Jumlah bakteri lebih banyak pada rhizosfer dibandingkan pada tanah yang jauh dari perakaran. Pada rhizosfer terdapat senyawa-senyawa organik yang berasal dari akar tanaman dan senyawa-senyawa tersebut digunakan oleh bakteri untuk pertumbuhannya (Gaiero dkk., 2013). Aktivitas sel akar tanaman menghasilkan berbagai senyawa organik yang dikeluarkan ke rhizosfer sebagai eksudat. Fenol, asam organik, asam amino, fitosiderofor, vitamin, purin, enzim, dan gula merupakan beberapa komponen yang terkandung di rhizosfer dan berasal dari eksudat akar (Finyom, 2012). Komponen-komponen tersebut dimanfaatkan oleh bakteri sebagai sumber nutrisi. Fenol dan asam amino berperan penting dalam mekanisme persinyalan pada sel bakteri, contohnya respon motil bakteri dari lingkungan tak menguntungkan menuju lingkungan yang menguntungkan (Baker dkk., 2006).

Interaksi bakteri dengan tanaman merupakan interaksi yang saling menguntungkan. Bakteri tidak hanya memanfaatkan eksudat akar tanaman namun juga membantu pertumbuhan tanaman. Bakteri endofit yang mengkolonisasi jaringan tanaman juga memiliki peranan dalam proteksi tanaman dari patogen (Ali dkk., 2014). Peranan bakteri dalam pertumbuhan serta proteksi tanaman dapat dikaitkan dengan interaksi antar bakteri endofit dengan bakteri rhizosfer. Santoyo dkk. (2016) dalam penelitiannya mengungkapkan bahwa bakteri yang berada di rhizosfer dapat masuk ke dalam jaringan tanaman melalui akar. Hal tersebut membuat bakteri endofit diperkirakan merupakan bagian dari bakteri rhizosfer atau bagian dari bakteri yang berasosiasi dengan akar. Bakteri rhizosfer yang mampu masuk dan beradaptasi pada jaringan tumbuhan diyakinimerupakan bakteri yang terspesialisasi dikarenakan memiliki mekanisme sendiri untuk masuk ke dalam jaringan tumbuhan dan bertahan pada mikrohabitat tersebut. Bakteri endofit pun memiliki gen yang berbeda dengan bakteri rhizosfer terutama gen-gen yang berperan dalam kolonisasi jaringan tanaman (Ali dkk., 2014).

Aktivitas yang dimiliki bakteri endofit maupun rhizosfer terkait dengan pertumbuhan tanaman sangatlah beragam. Bakteri mampu memacu pertumbuhan tanaman dengan berbagai mekanisme. Mekanisme-mekanisme tersebut terbagi ke dalam mekanisme langsung dan tak langsung. Mekanisme langsung berkaitan dengan nutrisi esensial dan fitohormon sedangkan mekanisme tak langsung berkaitan

dengan fitopatogenitas (Glick, 2015; Pandya dkk.,2015). Aktivitas bakteri yang berkaitan dengan nutrisi esensial pada tanaman yaitu fiksasi nitrogen, pelarutan fosfat, dan produksi siderofor (*iron carrier*) sedangkan aktivitas bakteri yang berkaitan dengan fitohormon yaitu produksi hormon IAA (*indole-3-acetic-acid*), sitokinin, asam giberelin, dan etilen. Bakteri yang memiliki kemampuan-kemampuan tersebut dapat digolongkan sebagai bakteri pemacu pertumbuhan tanaman (*Plant Growth Promoting Bacteria*) (Felestrino dkk.,2017).

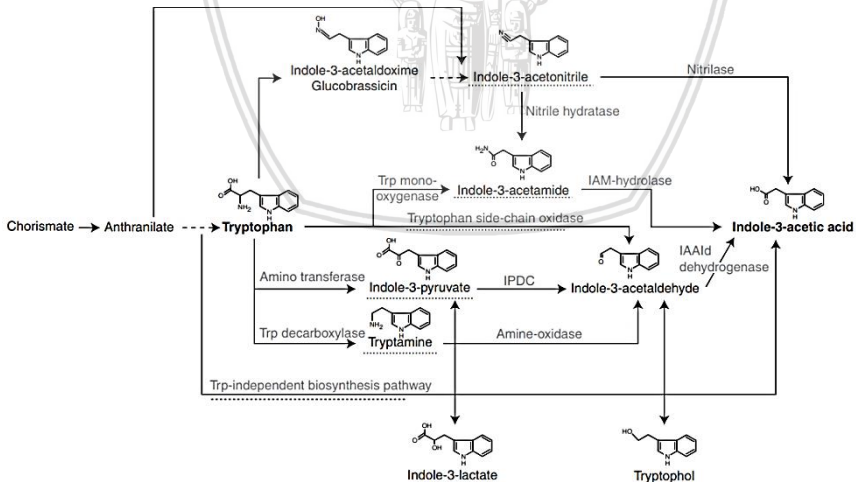
Nitrogen dan fosfor merupakan nutrisi esensial pada tanaman dan termasuk makronutrien utama. Kedua unsur tersebut merupakan komponen penyusun asam amino, protein, asam nukleat, koenzim, nukleotida, dan fosfolipid pada tanaman (Marschner, 2012). Jumlah nitrogen (N_2) lebih banyak di udara dibandingkan tanahnamuntanaman tidak dapat menggunakan nitrogen secara langsung karena memiliki tiga ikatan sehingga bersifat inert. Organisme lain diperlukan oleh tanaman untuk mengkonversi nitrogen menjadi senyawa yang dapat dimanfaatkan. Berbeda dengan nitrogen, jumlah fosfat di tanah lebih banyak namun dalam bentuksenyawa organik sedangkan tanaman hanya dapat memanfaatkan fosfat terlarut. Bakteri memiliki kemampuan untuk melarutkan fosfat *insoluble* menjadi ion fosfat (*soluble*) dengan mensekresikan asam organik (Nosrati dkk.,2014). Bakteri juga dapat menghasilkan hormon IAA (*indole-3-acetic-acid*) yang berfungsi untuk meningkatkan pertumbuhan akar, menghambat pertumbuhan tunas lateral, dan pembentukan jaringan vaskuler (Sukmadewi dkk., 2015).

2.3.1 Bakteri Penghasil IAA

IAA (*indole-3-acetic acid*) merupakan senyawa auksin yang meregulasi pertumbuhan serta perkembangan tumbuhan. Auksin berperan dalam pembelahan sel tumbuhan, diferensiasi jaringan, dominansi apikal, serta respon tumbuhan terhadap cahaya, gravitasi dan patogen. IAA pada bakteri juga berperan sebagai molekul persinyalan yang berhubungan dengan mekanisme pertahanan tumbuhan dari patogen (Spaepen dkk., 2007). Produksi IAA oleh bakteri dapat meningkatkan interaksi antara tanaman dengan bakteri. Senyawa IAA yang disekresikan oleh bakteri dapat melonggarkan dinding sel tanaman sehingga jumlah eksudat akar yang disekresikan tanaman meningkat dan nutrisi untuk bakteri pada tanah lebih tercukupi. Selain itu, sekresi IAA oleh bakteri juga dapat membantu tanaman dalam menyeimbangkan produksi hormon etilen (Kim dkk., 2001; Chi dkk., 2005). Senyawa

IAA juga menyediakan nutrisi bagi bakteri karena dapat mengikat karbon dan nitrogen dalam bentuk molekul tunggal (Leveau & Lindow, 2005).

Biosintesis IAA pada bakteri membutuhkan senyawa asam amino triptofan sebagai prekursor. Terdapat lima macam jalur biosintesis IAA oleh bakteri yaitu *indole-3-pyruvic acid*, *indole-3-acetic aldehyde*, *indole-3-acetamide*, *indole-3-acetonitrile* dan *tryptophan-independent pathway* (Gambar 2). Jalur *indole-3-pyruvic acid* banyak digunakan genus *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* dan *Enterobacter* dalam sintesis IAA. Beberapa genus *Pseudomonas* dan *Azospirillum* juga dapat mengkonversi triptofan menjadi IAA melalui jalur *indole-3-acetic aldehyde*. Bakteri fitopatogenik seperti *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* dan *Erwinia herbicola* memproduksi IAA melalui jalur *indole-3-acetamide*. Jalur *indole-3-acetonitrile* banyak ditemukan pada *Cyanobacteria* sedangkan jalur *tryptophan-independent* lebih banyak ditemukan pada tanaman namun beberapa bakteri dari genus *Azospirillum* dan *Cyanobacteria* juga dapat menggunakan jalur tersebut dalam menghasilkan IAA (Hariprasanna & Rakshit, 2016).

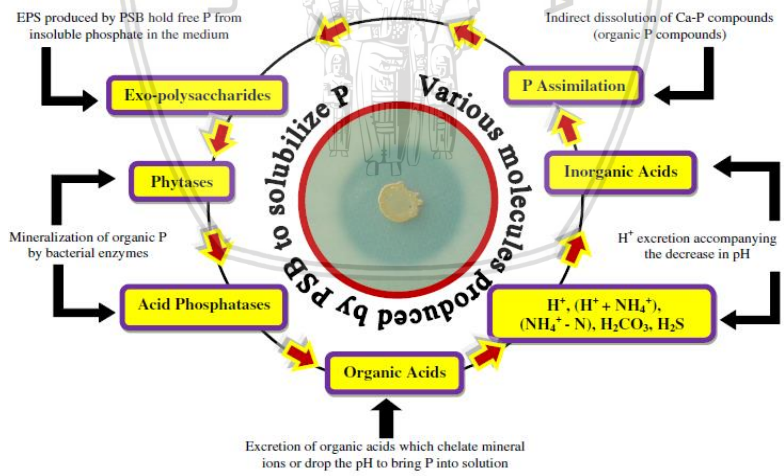


(Spaepen dkk., 2007)

Gambar 1. Macam-macam jalur biosintesis IAA pada bakteri

2.3.2 Bakteri Pelarut Fosfat

Fosfat merupakan nutrisi makro yang sangat penting fungsinya bagi tumbuhan. Tumbuhan maupun bakteri memerlukan fosfat untuk pembentukan asam nukleat, nukleotida, koenzim, dan fosfolipid, serta berperan dalam transfer energi seperti *adenosine triphosphate* (ATP) (Boyer, 1997). Defisiensi fosfat pada tanaman mengakibatkan perubahan warna pada daun serta terbentuknya jaringan nekrotik. Selain itu, maturasi pada tanaman yang kekurangan fosfat akan terhambat (Taiz & Zeiger, 2002). Konsentrasi fosfat terlarut pada tanah sangat rendah yaitu kurang dari 1 ppm. Fosfat yang dapat diserap oleh sel tumbuhan maupun bakteri berada dalam bentuk HPO_4^{2-} atau H_2PO_4^- . Sumber fosfor di alam dapat diperoleh dari biji-bijian, bebatuan, dan endapan lainnya. Fosfat pada tanah juga dapat ditemukan dalam bentuk senyawa anorganik seperti besi (II) fosfat ($\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$), aluminium fosfat (Al_3PO_4), kalsium fosfat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Senyawa-senyawa tersebut sulit untuk larut dan diperlukan organisme lain untuk memecah senyawa tersebut (mineralisasi) menjadi senyawa yang bersifat larut (Rodriguez & Fraga, 1999).



(Ahemad & Kibret, 2014)

Gambar 2. Alur mineralisasi fosfat anorganik menjadi fosfat terlarut

Mekanisme pelarutan fosfat melalui berbagai proses seperti asidifikasi, pertukaran ion H^+ , dan secara enzimatik. Bakteri pelarut fosfat memproduksi *exopolysaccharide* (EPS) yang akan berikatan dengan fosfat tak larut. Fosfat selanjutnya dimineralisasi dengan bantuan enzim fitase dan fosfatase (AcPase) dan menghasilkan asam organik. Sekresi asam organik oleh bakteri pelarut fosfat mengakibatkan terjadinya penurunan pH menjadi asam (asidifikasi). (Behera dkk., 2017). Enzim fosfatase dan fitase bekerja melarutkan fosfat di luar sel ketika molekul fosfat terikat pada eksopolisakarida. Pelarutan fosfat oleh bakteri juga dapat terjadi melalui pelepasan dan pertukaran ion H^+ pada permukaan sel bakteri (Ahemad & Kibret, 2014; Rodriguez & Fraga, 1999). Beberapa macam asam organik yang dihasilkan oleh bakteri pelarut fosfat yaitu asam glukonik, keto-glukonik, laktat, suksinat, malat, sitrat, oksalat, fumarat, dan asetat (Khan dkk., 2013).

2.3.3 Bakteri Pemfiksasi Nitrogen dan Aktivitas Fiksasi Nitrogen secara Biologis

Fiksasi nitrogen merupakan konversi nitrogen (N_2) menjadi senyawa yang dapat dimanfaatkan oleh organisme, seperti amonia (NH_3) atau nitrat (NO_3^-). Proses fiksasi nitrogen dapat terjadi melalui mekanisme geokimia, biologis, dan industri. Fiksasi nitrogen secara biologis dilakukan oleh bakteri Rhizobia dan Diazotrof yang memiliki enzim nitrogenase sebagai katalis dalam konversi nitrogen (Silva dkk., 2011). Bakteri pemfiksasi nitrogen dibedakan menjadi bakteri simbiotik dan bakteri non simbiotik. Bakteri pemfiksasi nitrogen simbiotik diketahui mampu menghasilkan nitrogen terikat dalam jumlah banyak dibandingkan bakteri non simbiotik (Glick, 2012; Ahemad & Kibret, 2014). Selain pada nodul akar, bakteri endofit yang mengkolonisasi jaringan tumbuhan juga merupakan bakteri simbiotik (Hallman dkk., 1997).

Mekanisme fiksasi nitrogen meliputi reaksi kompleks enzim yaitu nitrogenase. Enzim nitrogenase tersusun atas protein MoFe (*molybdenum-iron*) dan protein Fe yang dikode oleh gen *nif*, yaitu gen konservatif yang ada pada bakteri Diazotrof (Hoffman dkk., 2014). Protein Fe (dinitrogenase reduktase) berfungsi sebagai penyedia elektron bagi protein MoFe (dinitrogenase) untuk mereduksi nitrogen (N_2) hingga menjadi amonia (NH_3). Masing-masing genus bakteri pemfiksasi nitrogen memiliki mekanisme fiksasi nitrogen yang berbeda,

namun pada umumnya bakteri pemfiksasi nitrogen melakukan aktivitas fiksasi dengan enzim nitrogenase (Antonio dkk., 2011).



BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan bulan Desember 2017 hingga Juni 2018. Penelitian bertempat di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang.

3.2 Deskripsi Sampel dan Pengukuran Faktor Fisikokimia Tanah

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu akar dan tanah rhizosfer Sorgum (*Sorghum bicolor*) yang didapatkan dari lahan sorgum Tapos, Bogor. Faktor fisikokimia sampel tanah yang diukur meliputi pH, kadar air, dan kandungan bahan organik. Parameter pH tanah diukur dengan melarutkan 10 gram tanah dalam 25 mL akuades, diukur menggunakan pH meter. Kadar air tanah diukur dengan metode gravimetri. Sampel tanah sebanyak lima gram dikeringkan dalam oven bersuhu 105°C selama 48 jam. Kadar air tanah dihitung dengan persamaan 1 (Brower dkk., 1998).

$$\text{Kadar air tanah (\%)} = \frac{g_0 - g_i}{g_0} \times 100 \dots \dots \dots (1)$$

g_0 : berat basah tanah
 g_i : berat kering tanah

Kandungan bahan organik diukur dengan menghaluskan tanah kering kemudian dua gram tanah ditimbang pada cawan porselen. Sampel tanah dibakar dalam tungku (*furnace*) bersuhu 500°C hingga warna tanah berubah menjadi merah keabu-abuan. Tanah didiamkan pada suhu kamar lalu ditimbang beratnya. Persentase bahan organik tanah dihitung dengan persamaan 2 (Brower dkk., 1998).

$$\text{Bahan organik tanah (\%)} = \frac{1}{2} \times (2 - b) \times 100\% \dots \dots \dots (2)$$

b : berat tanah setelah dibakar

3.3 Isolasi Bakteri Endofit dan Rhizosfer

Bakteri endofit diisolasi dengan cara menggerus 25 gram sampel akar yang telah disterilisasi permukaan berdasarkan metode Finyom



(2012). Akar disterilisasi permukaan dengan dicuci bersih terlebih dahulu kemudian dipotong kecil-kecil. Sampel akar secara berturut-turut direndam dalam etanol 70% selama 10 menit, NaOCl 5,25% selama 10 menit, dan etanol 70% selama lima menit. Langkah terakhir adalah sampel direndam kembali dalam akuades steril sebanyak tiga kali, masing-masing selama satu menit. Akar yang telah disterilisasi permukaan kemudian digerus dan disuspensikan dalam 225 mL NaCl 0,85% untuk dilakukan seri pengenceran.

Bakteri rhizosfer diisolasi dengan cara mensuspensikan 25 gram sampel tanah ke dalam 225 mL NaCl 0,85%. Langkah selanjutnya dilakukan dilusi berseri dari 10^{-1} hingga 10^{-6} kemudian diambil 0,1 mL dari tiap seri pengenceran dan dibagi ke medium TSA yang mengandung triptofan $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Pikovskaya agar, dan *N-free bromothymol blue* (NFb) *semi solid* masing-masing untuk isolasi bakteri penghasil IAA, bakteri pelarut fosfat, dan bakteri pemfiksasi nitrogen. Cawan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam untuk bakteri penghasil IAA, 48 jam untuk bakteri pelarut fosfat, dan tujuh hari untuk bakteri pemfiksasi nitrogen. Koloni yang tumbuh pada media TSA dan Pikovskaya dikarakterisasi. Jumlah koloni dihitung berdasarkan *Total Plate Count* (TPC). Jumlah bakteri pemfiksasi nitrogen ditentukan berdasarkan perhitungan *Most Probable Number* (MPN). Koloni yang berbeda morfologi dimurnikan dan dilakukan pewarnaan Gram.

3.4 Uji Potensi Isolat Bakteri Penghasil IAA

Isolat bakteri yang telah dimurnikan, diuji kemampuannya dalam memproduksi IAA secara kualitatif menggunakan membran nitroselulosa. Isolat ditumbuhkan pada 10 mL TSB dan diinkubasi selama 24 jam. Kultur disamakan densitasnya lalu di-*spread* pada medium TSA yang mengandung triptofan $5 \mu\text{g}/\text{mL}$. Membran nitroselulosa diletakkan pada permukaan agar lalu cawan diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang. Membran nitroselulosa kemudian diambil dan ditetaskan reagen Salkowski. Perubahan warna membran nitroselulosa diamati setelah 30 menit. Isolat dikatakan mampu memproduksi IAA apabila warna membran nitroselulosa berubah menjadi kemerahan.

Isolat yang dapat memproduksi IAA kemudian diuji lanjut kemampuannya dalam menghasilkan IAA dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Percobaan dilakukan sebanyak tiga kali ulangan dengan perlakuan jenis isolat dan waktu inkubasi.

Sebanyak dua ose isolat ditumbuhkan pada 10 mL TSB yang mengandung triptofan 5 µg/mL selama 24 jam pada *incubator shaker* dengan kecepatan 120 rpm. Selanjutnya diambil 10% kultur yang telah disetarakan densitasnya untuk diinokulasikan pada 30 mL medium TSB yang baru. Kultur diinkubasi hingga jam ke-72 dengan pengambilan sampel dilakukan pada jam ke-0, 24, 48, dan 72. Pengukuran konsentrasi IAA dilakukan dengan mengambil lima mililiter kultur pada tiap jam pengambilan sampel untuk disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm, 4°C, selama 10 menit. Sebanyak dua mililiter supernatan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan empat mililiter reagen Salkowski. Tabung diinkubasi pada ruang gelap selama 30 menit kemudian diukur absorbansi larutan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 535 nm. Konsentrasi IAA dihitung berdasarkan persamaan kurva standar IAA. Selain itu dilakukan pula penghitungan jumlah sel bakteri pada setiap jam pengambilan sampel menggunakan metode TPC.

3.5 Uji Potensi Isolat Bakteri Pelarut Fosfat

Isolat bakteri pelarut fosfat yang telah dimurnikan, diuji kemampuannya dalam melarutkan fosfat secara semikualitatif menggunakan metode *disc diffusion*. Isolat bakteri diinokulasikan sebanyak dua ose ke dalam 10 mL *Nutrient Broth* dan disetarakan densitasnya. Uji dilakukan sebanyak tiga kali ulangan menggunakan kertas cakram Whatman No. 1. Sebanyak 20 µL kultur diinokulasikan pada kertas cakram (5 mm) dan diletakkan pada cawan berisi *Pikovskaya agar*. Cawan diinkubasi 48 jam pada suhu ruang. Indeks kelarutan fosfat diukur dengan rumus 3 (Edi-Premono dkk., 1996; Paul & Sinha, 2017).

$$IK = \frac{\text{diameter zona bening} + \text{diameter koloni}}{\text{diameter koloni}} \dots\dots\dots (3)$$

Uji lanjutan pelarutan fosfat menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Percobaan dilakukan sebanyak tiga kali ulangan dengan perlakuan jenis isolat dan waktu inkubasi. Sebanyak dua ose isolat ditumbuhkan pada 10 mL *Pikovskaya* cair dan disetarakan densitasnya sebagai starter. Sebanyak 10% (v/v) kultur starter diinokulasikan ke dalam 80 mL media *Pikovskaya* cair (pH 7). Kultur diinkubasi selama 72 jam pada *rotary shaker* dengan kecepatan 120 rpm. Pengambilan sampel dilakukan pada jam ke-0, 24, 48, dan 72.

Pengukuran fosfat terlarut dilakukan dengan mengambil 10 mL kultur pada tiap jam pengambilan sampel lalu disaring dengan kertas saring. Filtrat disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm, 4°C, selama 20 menit. Supernatan diambil satu mililiter kemudian ditambahkan 10 mL *chloromolibdic* dan 0,1 mL *chlorostannous*. Larutan diinkubasi selama 10 menit kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm. Konsentrasi fosfat terlarut dihitung berdasarkan persamaan kurva standar fosfat (KH_2PO_4). Selain itu dilakukan pula pengukuran pH akhir medium pada tiap jam pengambilan sampel.

3.6 Uji Potensi Isolat Bakteri Pemfiksasi Nitrogen

Isolat bakteri pemfiksasi nitrogen yang telah dimurnikan, diuji secara kualitatif dilakukan menggunakan *Sera Ammonia Test Kit*. Sebanyak dua ose isolat diinokulasikan pada 10 mL *N-freebroth* tanpa penambahan indikator warna *bromothymol blue*. Isolat diinkubasi selama tujuh hari pada *incubator shaker* dengan kecepatan 120 rpm. Kultur disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm dengan suhu 25°C selama 10 menit. Lima mililiter supernatan kemudian direaksikan dengan reagen 1, 2, dan 3 dari *test kit*. Perubahan warna diamati setelah 20 menit lalu dibandingkan dengan *color chart* untuk menentukan konsentrasi amonium yang ada pada larutan (Iwata dkk., 2012).

Isolat dengan konsentrasi amonium yang tinggi dipilih untuk dianalisis potensi fiksasi nitrogennya secara kuantitatif menurut metode Nesslerisasi. Sebanyak dua ose isolat ditumbuhkan dalam 10 mL *N-free broth* selama tujuh hari pada *incubator shaker* dengan kecepatan 120 rpm. Pengukuran ammonium dilakukan dengan mengambil 5 mL kultur yang telah disetarakan densitasnya lalu disentrifugasi pada kecepatan 11.000 rpm dengan suhu 25°C selama 10 menit. Sebanyak 1 mL supernatan direaksikan dengan 1 mL reagen Nessler dan ditera hingga volume total 10 mL. Larutan diinkubasi selama 30 menit dan absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 425 nm. Konsentrasi amonium terikat dihitung menggunakan kurva standar amonia.

3.7 Uji Interaksi antar Isolat Unggul

Isolat di-*streak* silang dengan isolat lainnya pada cawan berisi medium *Nutrient Agar* (NA). Cawan diinkubasi selama 24 jam pada inkubator bersuhu 30 °C. Setelah 24 jam, pertumbuhan koloni diamati dan ditentukan apakah isolat tumbuh sinergis atau antagonis. Isolat

dikatakan tumbuh sinergis apabila tidak terdapat zona hambat dan tumbuh antagonis apabila terdapat zona hambat.

3.8 Analisis Data

Data parameter konsentrasi IAA, fosfat terlarut, dan amonia dianalisis ragam menggunakan *one-way* ANOVA ($p \leq 0,05$). Apabila terdapat beda nyata, maka dilanjutkan dengan uji Tukey. Hasil analisis data akan menentukan isolat bakteri yang selanjutnya diidentifikasi.

3.9 Identifikasi Isolat Potensial

DNA isolat potensial diekstraksi menggunakan *Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit* dari *GeneAid*. Isolat berumur 24 jam diambil sebanyak lima ose lalu disuspensikan pada *microtube* berisi 100 μL ddH₂O. Suspensi kemudian disentrifugasi pada kecepatan 14.000 g selama satu menit. Pelet ditambahkan 180 μL *buffer* GT dan diresuspensi. Suspensi kemudian ditambahkan 20 μL proteinase-K lalu diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit. Sel bakteri kemudian dilisiskan dengan menambahkan 200 μL *buffer* GB lalu sampel diinkubasi selama 10 menit pada suhu 70°C. Hasil lisis kemudian ditambahkan 200 μL etanol absolute lalu dipindahkan ke *GD column* yang telah diletakkan pada *collection tube*. *GD column* disentrifugasi pada kecepatan 14.000 g selama dua menit. *Collection tube* selanjutnya dibuang dan *GD column* dipindahkan ke *collection tube* yang baru. Sebanyak 200 μL *buffer* W1 ditambahkan ke *GD column* lalu disentrifugasi pada kecepatan 14.000 g selama 30 detik. *Flow-through* yang tertampung pada *collection tube* dibuang. Sebanyak 200 μL *wash buffer* ditambahkan ke *GD column* lalu disentrifugasi pada kecepatan 14.000 g selama 30 detik. *Flow-through* yang tertampung pada *collection tube* dibuang lalu *GD column* disentrifugasi kembali pada kecepatan 14.000 g selama tiga menit. *GD column* kering dipindahkan ke *collection tube* yang baru lalu ditambahkan 50 μL *elution buffer* yang telah dipanaskan pada suhu 70°C. Selanjutnya *GD column* didiamkan selama tiga menit lalu disentrifugasi pada kecepatan 14.000 g selama 30 detik. *Flow-through* yang tertampung pada *collection tube* merupakan sampel DNA. Sampel kemudian dipindahkan ke *microtube* baru untuk diamplifikasi.

Sekuen 16S rDNA diamplifikasi menggunakan primer universal 27F (5'GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') dan 1492R (5'CTACGGCTACCTGTTACGA3'). Larutan PCR *master mix* dibuat menurut tabel 2. Amplifikasi sekuen 16S rDNA dilakukan menggunakan program PCR dengan rangkaian proses menurut tabel 3.

Amplikon sekuen 16S rDNA diverifikasi menggunakan elektroforesis. Konsentrasi agarosa yang digunakan yaitu 1,5% dan *running* elektroforesis dilakukan selama satu jam dengan kekuatan arus 50 volt. Pita DNA yang terbentuk didokumentasi dengan Gel Doc. Amplikon 16S rDNA disekuensing di 1stBASE Malaysia. Sekuen 16S rDNA disejajarkan (*alignment*) dengan program MEGA. Hasil *alignment* dilakukan *BLAST* dan dicocokkan urutan nukleotidnya pada *GenBank* (Soeka dan Sulistiani, 2011). Pohon filogeni dikonstruksi menggunakan program MEGA dengan *bootstrap* 1000 menggunakan metode *Neighbor Joining*. Jarak evolusi dianalisis dengan menggunakan algoritma *Tamura-Nei*.

Tabel 2. Komposisi *master mix* PCR

Komposisi	Volume (µL)	Konsentrasi
PCR <i>master mix</i>	25 µL	-
Primer 27F	2 µL	10 pmol/µL
Primer 1492R	2 µL	10 pmol/µL
Template DNA	2 µL	100 ng/µL
ddH ₂ O	19 µL	-

Tabel 3. Proses PCR

Tahapan	Temperatur	Waktu (s)	Siklus
<i>Pra denaturation</i>	95°C	120	1
35 siklus : <i>Denaturation</i>	95°C	30	35
<i>Annealing</i>	55°C	60	35
<i>Extension</i>	72°C	90	35
<i>Post extension</i>	72°C	300	1

(Mulhardt, 2010)

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Faktor Fisikokimia Tanah Rhizosfer

Terdapat tiga sampel tanah rhizosfer yang diukur faktor fisikokimianya yaitu R1, R2, dan R3. Sampel tanah rhizosfer yang diteliti memiliki rata-rata pH yang asam dengan nilai 6,05. Kadar air tanah yang diteliti bernilai 1,00% dengan kandungan bahan organik 0,30% (Tabel 4). Rentang pH optimal untuk pertumbuhan bakteri adalah 5,5 hingga 8,5 sehingga pH sampel tanah yang diteliti termasuk pH optimal. Pengukuran pH tanah penting untuk dilakukan karena pH dapat mempengaruhi kandungan nutrisi, toksisitas, serta struktur komunitas organisme tanah (Calvino & Baath, 2010).

Tabel 4. Nilai rata-rata parameter fisikokimia rhizosfer yang terukur

Parameter Fisiko-kimia	Nilai
pH	6,05
Kadar Air (%)	1,00
Bahan Organik (%)	0,30

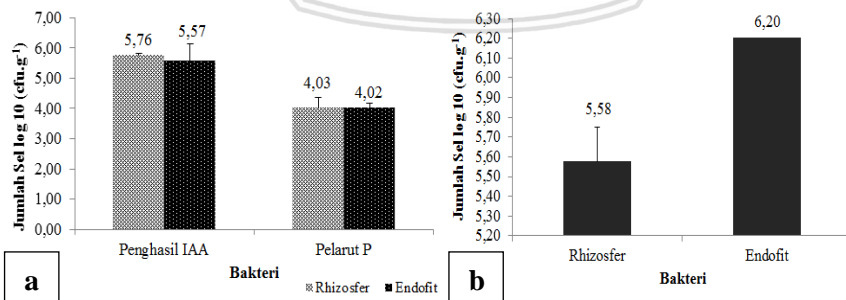
Kadar air sampel tanah rhizosfer yang didapatkan termasuk rendah. Tanah dengan kadar air di bawah 40% merupakan tanah yang kekurangan air (*water stress*). Rentang kadar air tanah adalah 10% hingga 50%. Kadar air tanah bervariasi pada jenis tanah maupun tanaman (Pitts, 2016). Penelitian Manurung dkk. (2015) menemukan bahwa kadar air 60% - 80% baik untuk pertumbuhan bibit karet yang diberi mikoriza asbuskular. Penelitian Setiadi dkk. (2016) juga menemukan bahwa tanah andisol dan inceptisol memiliki kadar air 7% hingga 10% dan rentang tersebut sudah optimal untuk pertumbuhan tanaman pada jenis tanah tersebut. Tanah pertanian yang produktif memiliki bahan organik tanah 3% hingga 6% dan bervariasi bergantung pada jenis tanah, kondisi lingkungan, dan tanaman yang ditanam. Kadar air dan bahan organik tanah yang rendah diduga disebabkan oleh kondisi lahan sorgum yang termasuk lahan marginal (Fenton dkk., 2008).

Defisiensi air merupakan masalah utama pada lahan kering. Lahan yang mengalami kekeringan memiliki struktur tanah yang mudah hancur. Tidak adanya suplai air juga menyebabkan tanah mengalami defisiensi nutrisi dan hal ini menyebabkan tanah kering memiliki bahan organik

yang rendah hingga di bawah 1,0 % (Zhang dkk., 2016). Jumlah bahan organik pada tanah dapat menentukan potensi tanah untuk dimanfaatkan sebagai lahan pertanian. Bahan organik dalam tanah mengalami perubahan kimiawi hingga menjadi humus yang kaya akan asam humat dan asam fulvat. Kedua senyawa organik ini memproduksi ion mineral (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+}) yang akan meningkatkan nutrisi tanah (Tan, 2014; Tang dkk., 2014; Tiessen dkk., 1994).

4.2 Populasi Bakteri Endofit dan Rhizosfer Sorgum

Penghitungan jumlah sel bakteri penghasil IAA dan pelarut fosfat menggunakan metode TPC sedangkan penghitungan jumlah sel bakteri pemfiksasi nitrogen menggunakan metode MPN. Jumlah sel bakteri penghasil IAA pada rhizosfer dan endofit adalah $5,76 \times 10^4$ cfu/g dan $5,57 \times 10^4$ cfu/g. Jumlah sel bakteri pelarut fosfat pada rhizosfer dan endofit adalah $4,03 \times 10^4$ cfu/g dan $4,02 \times 10^4$ cfu/g. Jumlah sel bakteri penghasil IAA dan pelarut fosfat pada rhizosfer dan endofit cenderung sama meskipun nilai tertinggi adalah pada rhizosfer. Hal yang berbeda didapatkan pada penghitungan jumlah sel bakteri pemfiksasi nitrogen dimana jumlah sel tertinggi ada pada sampel endofit yaitu $6,20 \times 10^5$ cfu/g (Gambar 3a dan 3b). Perbedaan ini diduga disebabkan oleh metode isolasi yang digunakan. Metode isolasi bakteri pemfiksasi nitrogen menggunakan medium *nitrogen-free semi solid* dengan tujuan melindungi bakteri pemfiksasi nitrogen dari oksigen sehingga dapat tumbuh pada kondisi tersebut. Oleh sebab itu, jumlah sel bakteri pemfiksasi nitrogen pada endofit lebih banyak dibandingkan rhizosfer.



Gambar 3. Jumlah bakteri endofit dan rhizosfer pada bakteri penghasil IAA dan pelarut fosfat (a) serta bakteri pemfiksasi nitrogen (b)

Jumlah sel bakteri penghasil IAA lebih tinggi dibandingkan bakteri pelarut fosfat baik itu pada rhizosfer maupun endofit. Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian Patten & Glick (1996) yaitu sebanyak 80% mikroorganisme tanah yang diisolasi dari rhizosfer pertanian memiliki kemampuan untuk mensintesis dan memproduksi IAA. Katiyar & Goel (2003) juga menyatakan bahwa kelimpahan bakteri pelarut fosfat pada tanah bergantung pada spesies tumbuhan, komposisi mikroorganisme tanah, dan kondisi tanah. Hal ini berlaku pula untuk kelompok bakteri lainnya, kelimpahan bakteri pada tanah bervariasi antar kelompok bakteri dan tanah yang diteliti (Chabot dkk., 1993).

Tingginya jumlah sel bakteri pemfiksasi nitrogen pada sampel endofit berkaitan dengan kerja enzim nitrogenase. Aktivitas fiksasi nitrogen oleh bakteri terjadi secara anaerob. Keberadaan oksigen akan menghambat kerja enzim nitrogenase karena kompleks enzim nitrogenase tersusun atas protein MoFe (*molybdenum-iron*). Protein Fe sangat sensitif terhadap oksigen (Postgate, 1998). Protein Fe pada *Anabaena variabilis* yang diberi oksigen dalam konsentrasi tinggi mengalami perubahan ukuran. Pada bakteri diazotrof, keberadaan oksigen akan memutuskan gugus 4Fe-4S dan menghambat transfer elektron. Terhambatnya transfer elektron akan menyebabkan kerja enzim nitrogenase terhambat sehingga aktifitas fiksasi nitrogen menurun (Bar & Or, 1994; Nomata dkk., 2006).

Populasi bakteri pada rhizosfer lebih tinggi dibandingkan endofit diduga disebabkan oleh perbedaan jumlah nutrisi pada kedua sampel. Pada rhizosfer terdapat senyawa-senyawa organik yang berasal dari akar tanaman yang dimanfaatkan oleh bakteri untuk pertumbuhannya. Selain dari akar tanaman, tanah juga mendapatkan nutrisi dari lingkungan luar seperti air dan pupuk sehingga lebih kaya akan nutrisi (Gaiero dkk., 2013). Penelitian Mesa dkk. (2017), menunjukkan bahwa komunitas bakteri rhizosfer *Betula celtiberica* lebih tinggi dibandingkan endofit. Menurut Tian & Zhang (2017), tingginya diversitas bakteri rhizosfer disebabkan karena tanah kaya akan nutrisi karbon yang disekresikan oleh tumbuhan.

4.3 Potensi Isolat dalam Produksi IAA

Sebanyak 42 isolat yang diduga dapat memproduksi IAA telah diisolasi dari sampel rhizosfer (22 isolat) dan endofit (20 isolat). Seleksi isolat dalam produksi IAA dilakukan menggunakan membran

nitroselulosa serta reagen Salkowski. Lima isolat dari rhizosfer dan enam isolat dari endofit diketahui dapat memproduksi IAA. Indikasi isolat mampu memproduksi IAA terdapat perubahan warna membran nitroselulosa dari putih menjadi kemerahan. Warna merah yang terbentuk pada membran nitroselulosa untuk masing-masing isolat berbeda-beda. Hal ini diduga disebabkan derajat difusi masing-masing bakteri yang berbeda. Terdapat empat isolat yaitu R239, R334, E244, dan E233 yang diduga dapat menghasilkan IAA (Tabel 5). Keempat isolat tersebut selanjutnya diuji potensi produksi IAA secara kuantitatif.

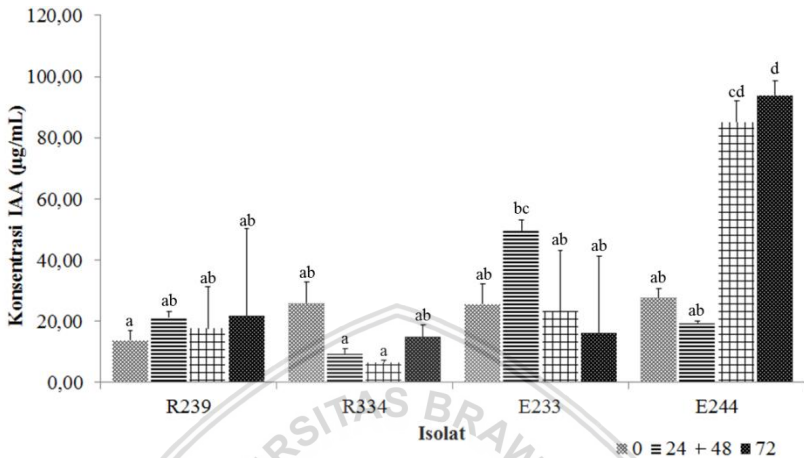
Tabel 5. Kemampuan produksi IAA masing-masing isolat berdasarkan perubahan warna membran nitroselulosa

Jenis Isolat	Warna Membran
R236	+
R348	+
R251	+
R239	+++
R334	+++
E244	++
E232	+
E233	+++
E314	+
E213	+
E231	+

+ : bercak merah/ungu; ++ : ungu pudar; +++: ungu kemerahan

Uji kuantitatif terhadap keempat isolat menunjukkan adanya perbedaan kemampuan produksi IAA pada masing-masing isolat. Isolat E244 menghasilkan IAA dengan konsentrasi tertinggi pada jam inkubasi ke-48 dan 72 (Gambar 4). Konsentrasi IAA tertinggi dihasilkan oleh isolat E244 pada jam ke-72 yaitu $93,97 \pm 4,51 \mu\text{g/mL}$ sedangkan isolat E233 menghasilkan IAA tertinggi pada jam ke-24 dengan nilai $49,58 \pm 3,61 \mu\text{g/mL}$. Kedua isolat lainnya yaitu R239 dan R334 menghasilkan IAA dengan kadar yang lebih rendah dari isolat E233 dan E244. Selain pengukuran konsentrasi IAA, dilakukan pula penghitungan jumlah sel hidup dari masing-masing isolat tersebut menggunakan metode TPC. Jumlah sel tertinggi isolat E244 pada jam ke-24 yaitu $4,22 \pm 0,14 \times 10^7 \text{ cfu/g}$, diikuti isolat E233, R334, dan R239. Seluruh isolat menunjukkan peningkatan jumlah sel dari jam ke-0 sampai jam

ke-24. Pada jam ke-72, jumlah sel masing-masing isolat telah mengalami penurunan (Gambar 5).

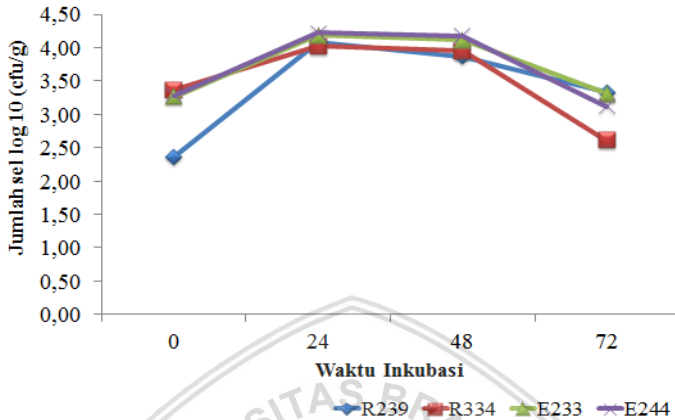


Gambar 4. Konsentrasi IAA yang dihasilkan masing-masing isolat pada tiap jam inkubasi. Notasi uji beda diperoleh dari uji Tukey ($p \leq 0,05$)

Konsentrasi IAA tertinggi yang didapatkan pada penelitian ini lebih tinggi apabila dibandingkan dengan konsentrasi IAA tertinggi yang diperoleh pada penelitian Sivasankari (2016). Pada penelitian tersebut penambahan prekursor triptofan sebanyak $5 \mu\text{g/mL}$ mampu menghasilkan IAA dengan konsentrasi $48,77 \mu\text{g/mL}$. Pada penelitian ini, konsentrasi prekursor yang digunakan adalah sama yaitu $5 \mu\text{g/mL}$, namun konsentrasi IAA yang dihasilkan oleh isolat E244 lebih tinggi yaitu $93,97 \pm 4,51 \mu\text{g/mL}$ sehingga dapat dikatakan isolat E244 unggul dalam memproduksi IAA.

Produksi IAA bakteri dipengaruhi oleh beberapa faktor lingkungan seperti pH, temperatur, dan ketersediaan nutrisi. Bakteri menghasilkan IAA secara optimal pada pH 6 hingga 7. Nilai pH yang terlalu asam atau terlalu basa membuat produksi IAA oleh bakteri terhambat. Suhu 25°C hingga 28°C merupakan suhu optimal bagi bakteri untuk memproduksi IAA (Aphine & Jadhav, 2011). Pada penelitian ini, suhu yang digunakan sudah optimal karena merupakan suhu kamar dengan rentang suhu 25°C hingga 28°C . Selain itu, jumlah vitamin terlarut juga mempengaruhi produksi IAA oleh bakteri. Vitamin terlarut juga membantu proses biosintesis IAA pada bakteri sehingga jumlah vitamin

terlarut yang rendah menyebabkan produksi IAA menurun (Zakharova dkk., 2000).



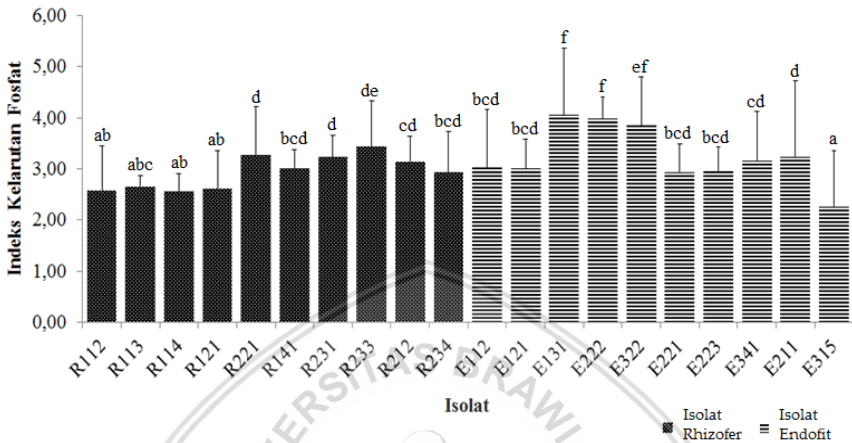
Gambar 5. Dinamika jumlah sel pada masing-masing isolat di tiap jam inkubasi.

Produksi IAA juga dapat dipengaruhi oleh gen pengkode enzim yang mengkatalis biosintesis IAA. Pada jalur biosintesis indole-3-pyruvic acid (IPyA), terdapat tiga enzim penting yang bekerja yaitu amino transferase, *indole-3-pyruvate decarboxylase* (IPDC), dan IAAId dehidrogenase. Enzim IPDC dikode oleh gen *ipdC*. Prinsen dkk. (1993) menemukan bahwa inaktivasi gen *ipdC* pada *Azospirillum brasilense* akan menurunkan produksi IAA hingga 90%. Terdapat pula gen-gen yang menginisiasi degradasi IAA seperti gen *iaC*, *iaE*, dan *iaD* pada *Pseudomonas putida* 1290 (Koga dkk., 1991; Scott dkk. 2013).

4.4 Potensi Isolat dalam Pelarutan Fosfat

Terdapat total 20 isolat bakteri pelarut fosfat yang berhasil diisolasi, sebanyak 10 isolat dari rhizosfer dan 10 isolat dari endofit. Berdasarkan uji semikuantitatif pelarutan fosfat, diketahui terdapat tiga isolat dengan indeks kelarutan fosfat tertinggi. Ketiga isolat tersebut yaitu E131, E222, dan E322 dengan indeks masing-masing sebesar $4,05 \pm 1,32$, $3,98 \pm 0,42$, dan $3,85 \pm 0,94$. Ketiga isolat tersebut berasal dari sampel endofit. Tiga isolat lain berasal dari sampel rhizosfer dengan nilai indeks kelarutan fosfat tertinggi adalah R233, R221, dan R231 masing-masing sebesar $3,43 \pm 0,90$, $3,28 \pm 0,94$, dan $3,23 \pm 0,43$ (Gambar 6). Empat isolat terpilih

dengan indeks kelarutan fosfat tertinggi berdasarkan analisis statistik yaitu E131, E222, E322 dan R233 diuji kemampuan pelarutan fosfatnya secara kuantitatif.

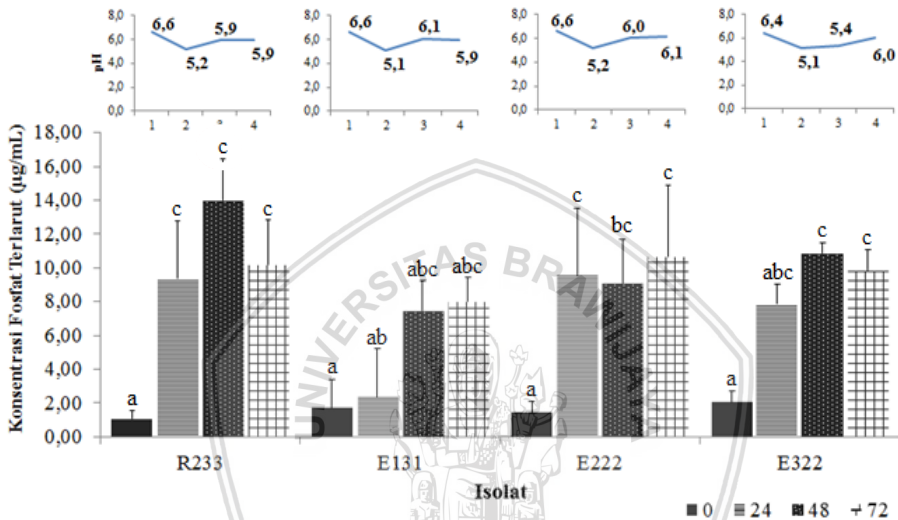


Gambar 6. Indeks kelarutan fosfat masing-masing isolat. Notasi uji beda diperoleh dari uji Tukey ($p \leq 0,05$)

Berdasarkan uji kuantitatif kemampuan pelarutan fosfat, kemampuan terbaik pelarutan fosfat isolat R233 paling baik dibandingkan ketiga isolat lainnya. Konsentrasi fosfat terlarut tertinggi dihasilkan oleh isolat R233 pada inkubasi 48 jam yaitu sebesar $14,02 \pm 2,41 \mu\text{g/mL}$. Konsentrasi fosfat tertinggi yang dihasilkan isolat E131 dan E222 pada jam ke-72 dengan nilai masing-masing sebesar $8,02 \pm 1,40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dan $10,66 \pm 4,23 \mu\text{g/mL}$. Isolat E322 menghasilkan fosfat terlarut dengan konsentrasi tertinggi yaitu $9,86 \pm 1,23 \mu\text{g/mL}$ pada jam ke-48 (Gambar 7). Uji lanjutan ini menggunakan medium *Pikovskaya broth* yang telah diatur pH netral. Setelah diinkubasi, medium mengalami penurunan pH pada jam ke-0 hingga jam ke-24 lalu kembali meningkat pada jam ke-48. Pada jam ke-48 hingga jam ke-72, pH medium isolat R233, E131, dan E222 cenderung stasioner sedangkan pH medium isolat E322 mengalami peningkatan.

Keempat isolat pada uji semikuantitatif seluruhnya menunjukkan aktivitas pelarutan fosfat dengan adanya zona bening dengan isolat E131 yang memiliki indeks pelarutan fosfat tertinggi. Namun, hasil ini tidak berbanding lurus dengan hasil uji kuantitatif dimana isolat R233 yang memiliki kemampuan pelarutan fosfat terbaik pada medium cair.

Hal ini disebabkan karena perbedaan derajat difusi asam organik yang disekresikan oleh bakteri pada medium yang berbeda (Nautiyal, 1999). Selain itu, konsentrasi fosfat yang dihasilkan isolat R233 mengalami penurunan setelah jam ke-48 dan pH medium konstan sehingga diduga isolat tersebut melarutkan fosfat melalui dua mekanisme yaitu asidifikasi dan enzimatis.



Gambar 7. Konsentrasi fosfat terlarut masing-masing isolat pada tiap jam inkubasi. Grafik pada bagian atas menunjukkan perubahan pH medium Pikovskaya pada tiap jam inkubasi

Hasil yang didapatkan pada penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian Chen dkk. (2014). Pada penelitian tersebut, bakteri pelarut fosfat yang diuji yaitu *Pantoea dispersa* memiliki ukuran koloni yang kecil dengan zona bening yang sedikit pada medium padat namun mampu melarutkan fosfat pada medium cair dengan konsentrasi fosfat terlarut yang lebih tinggi dibandingkan isolat lainnya. Penurunan pH medium menjadi asam menandakan bahwa selama proses mineralisasi fosfat berlangsung, bakteri mensekresikan berbagai asam organik sehingga fosfat dapat larut dan mekanisme ini disebut asidifikasi. Selain melalui proses asidifikasi, bakteri dapat melarutkan fosfat melalui proses lainnya yaitu secara enzimatis, eksklusi proton, produksi EPS, dan produksi siderofor. Tidak terjadinya penurunan pH diduga

disebabkan karena bakteri melarutkan fosfat tidak melalui proses asidifikasi (Marra dkk., 2015).

4.5 Potensi Fiksasi Nitrogen

Sebanyak 26 isolat bakteri pemfiksasi nitrogen telah diisolasi dari sampel rhizosfer (13 isolat) dan endofit (13 isolat). Uji potensi fiksasi nitrogen didasarkan pada kemampuan masing-masing isolat dalam mengubah nitrogen (N_2) menjadi amonia (NH_3). Berdasarkan hasil uji kualitatif dengan menggunakan SERA *Ammonium Test Kit*, diketahui bahwa seluruh isolat menunjukkan perubahan warna yang hampir sama yaitu kuning (Tabel 6).

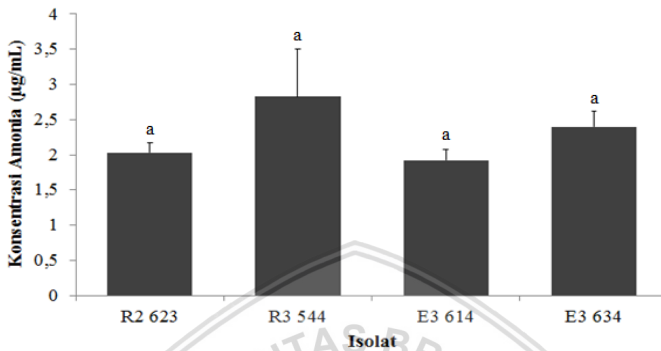
Tabel 6. Kemampuan fiksasi nitrogen masing-masing isolat setelah 7 hari inkubasi pada suhu ruang

Isolat	Konsentrasi Amonium (mg/L)	Isolat	Konsentrasi Amonium (mg/L)
R1-514	0	E1-614	0
R1-544	0	E1-624	0
R1-554	0	E1-634	0
R1-623	0	E1-644	0
R1-634	0	E2-514	0
R2-514	0	E2-554	0
R2-534	0	E2-624	0
R2-623	0,5	E2-644	0
R2-643	0	E3-614	0,5
R3-514	0	E3-624	0
R3-533	0	E3-634	0,5
R3-544	0,5	E3-643	0
R3-554	0	E3-654	0

Indikator warna kuning menandakan bahwa kandungan amonia pada supernatan adalah 0 mg/L. Supernatan yang diamati hampir seluruhnya berwarna kuning pekat sehingga konsentrasi amonia yang ada berkisar antara 0 mg/L hingga 0,5 mg/L. Terdapat empat isolat yang menunjukkan warna kuning paling pekat yaitu R2-623, R3-544, E3-614, dan E3-634. Keempat isolat tersebut dipilih untuk diuji lanjut.

Uji kuantitatif keempat isolat yaitu R2-623, R3-544, E3-614, dan E3-634 menunjukkan terdapat perbedaan konsentrasi amonia yang dihasilkan setelah inkubasi tujuh hari. Konsentrasi amonia yang

dihasilkan isolat R3-544 lebih tinggi dibandingkan isolat lainnya yaitu $2,83 \pm 0,68 \mu\text{g/mL}$. Berdasarkan hasil analisis statistik, nilai tersebut tidak berbeda nyata dengan konsentrasi amonia yang dihasilkan isolat lainnya (Gambar 8).



Gambar 8. Konsentrasi amonia masing-masing isolat setelah inkubasi selama tujuh hari. Notasi uji beda diperoleh dari uji Tukey ($p \leq 0,05$)

Laju fiksasi nitrogen secara biologis paling baik pada bakteri simbiotik. Aktivitas fiksasi nitrogen pada bakteri tidak lepas dari peran enzim nitrogenase. Enzim nitrogenase sensitif terhadap oksigen dimana enzim tidak aktif bekerja jika terdapat oksigen, hal ini yang menyebabkan bakteri endofit/simbiotik lebih baik dalam memfiksasi nitrogen. Beberapa genus bakteri non-simbiotik (bakteri rhizosfer) seperti *Azotobacter*, *Azomonas*, *Beijerinckia*, dan *Derxia* memiliki mekanisme pembentukan matriks ekstraselular untuk mengatur keluar-masuknya oksigen sehingga tidak mengganggu kerja enzim nitrogenase. Bakteri simbiotik (bakteri endofit) melakukan aktivitas fiksasi nitrogen di bawah kondisi anaerobik (Dalton, 1980; Hallman dkk., 1997).

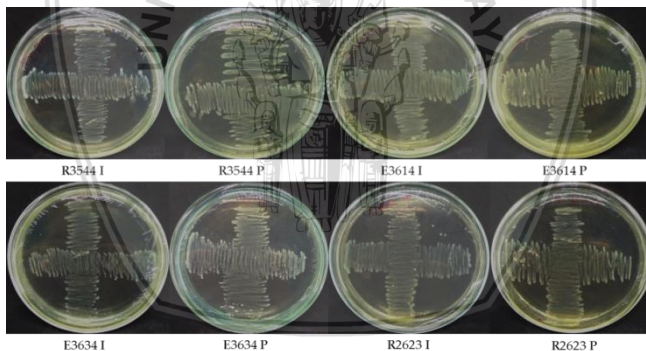
Interaksi antara tumbuhan dengan bakteri dapat terjadi dalam bentuk simbiotik, endofitik, asosiatif, maupun *free-living*. Bakteri endofit mengkolonisasi akar dan lebih tahan terhadap habitatnya sehingga cocok untuk dijadikan kandidat inokulum *plant growth promoting*. Tidak seluruh bakteri endofit merupakan bakteri simbiotik. Bakteri endofit non-simbiotik mengkolonisasi bagian intraseluler pada jaringan tumbuhan. Bagian tersebut mengandung karbohidrat, asam amino, dan nutrisi inorganik. Nodul akar merupakan bentuk interaksi simbiotik

antara akar tanaman dengan bakteri *Rhizobiaceae* pada tanaman legum (Bacon & Hinton, 2006).

4.6 Tipe Interaksi Isolat Unggul

Uji interaksi dilakukan untuk menentukan tipe interaksi antara isolat yang terpilih. Keempat isolat bakteri pemfiksasi nitrogen yaitu R2-623, R3-544, E3-614, dan E3-634 pada uji potensi fiksasi nitrogen menghasilkan konsentrasi amonia yang tidak berbeda nyata berdasarkan analisis statistik. Hal tersebut mengindikasikan bahwa keempat isolat memiliki kemampuan yang sama dalam memfiksasi nitrogen sehingga keempat isolat dipilih untuk dilakukan uji interaksi.

Uji interaksi dilakukan antara keempat isolat bakteri pemfiksasi nitrogen (R2-623, R3-544, E3-614, dan E3-634) dengan isolat unggul penghasil IAA (E244) dan pelarut fosfat (R233). Seluruh isolat tidak menunjukkan adanya zona hambat setelah inkubasi 24 jam. Hal ini menandakan bahwa tidak ada interaksi antagonis antar isolat sehingga seluruh isolat tersebut memungkinkan untuk digunakan bersama.



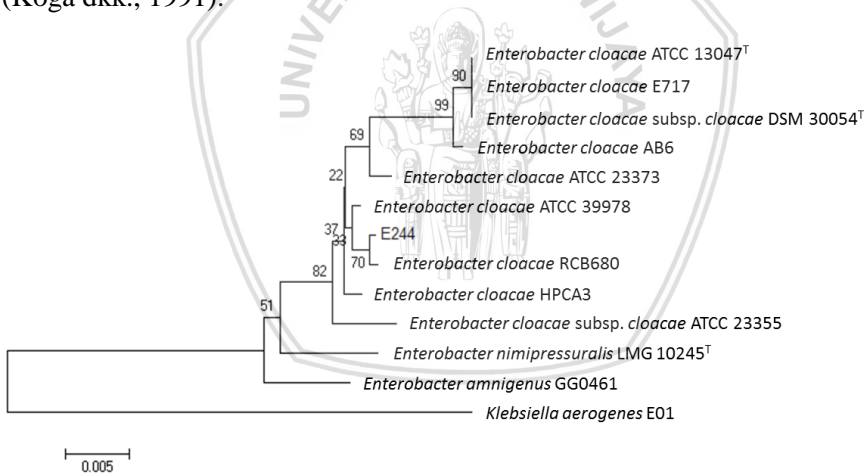
Gambar 9. Interaksi isolat bakteri pemfiksasi nitrogen dengan isolat bakteri penghasil IAA (E244) dan bakteri pelarut fosfat (R233)

4.7 Identifikasi Isolat Potensial

Isolat bakteri penghasil IAA E244, isolat bakteri pelarut fosfat R233, dan isolat bakteri pemfiksasi nitrogen R3544 dipilih untuk diidentifikasi secara molekuler berdasarkan sekuen 16S rDNA. Berdasarkan analisis filogenetik, isolat E244 memiliki kekerabatan paling dekat dengan *Enterobacter cloacae* RCB680 dengan persentase similaritas tertinggi

99,90% (Gambar 10). Isolat R233 memiliki kekerabatan paling dekat dengan *Pantoea dispersa* dengan persentase similaritas tertinggi 96,38% (Gambar 11). Isolat R3-544 memiliki kekerabatan paling dekat dengan *Leclercia decarboxylata* 60ft2 dengan persentase similaritas tertinggi 99,80% (Gambar 12). Bentuk sel serta jenis Gram masing-masing isolat yang teridentifikasi adalah berbentuk batang (basil) dan merupakan bakteri Gram negatif. Seluruh isolat yang teridentifikasi berada dalam satu famili yaitu Enterobacteriaceae.

Enterobacter cloacae merupakan bakteri Gram negatif dengan bentuk sel basil dan merupakan jenis bakteri dari genus *Enterobacter* yang banyak dikenal. Pada penelitian Khalifa dkk. (2016), *Enterobacter cloacae* yang diisolasi dari nodul akar Alfalfa (*Medicago sativa*) dapat memacu pertumbuhan tanaman melalui pelarutan fosfat, produksi IAA dan asetoin. Asetoin merupakan senyawa yang dapat menginduksi resistensi tanaman terhadap fitopatogen. Biosintesis IAA oleh *Enterobacter cloacae* dilakukan melalui jalur *indole-3-pyruvic acid* (Koga dkk., 1991).

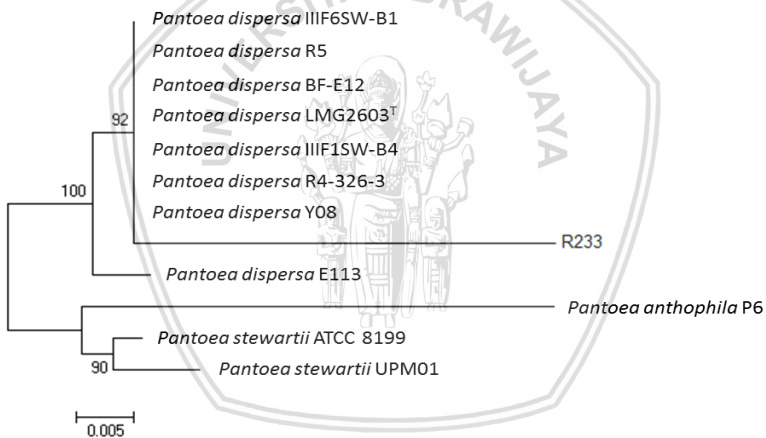


Gambar 10. Pohon filogeni menurut algoritma *Neighbor Joining* yang menunjukkan kekerabatan antara strain-strain bakteri acuan dengan isolat E244 berdasarkan sekuen 16S rDNA

Keberadaan *Enterobacter cloacae* sangat luas di alam. Spesies tersebut dapat ditemukan pada jaringan tanaman, rhizosfer, maupun saluran pencernaan manusia. Pada kondisi aerob, *Enterobacter cloacae* akan memproduksi IAA untuk memacu pertumbuhan tanaman. Sebaliknya, pada kondisi anaerob seperti saluran pencernaan, spesies

tersebut dapat bersifat patogen (Hinton & Bacon, 1995; Liu dkk., 2012; Regli & Pages, 2015). *Enterobacter cloacae* dapat menyebabkan infeksi nosokomial pada manusia. Infeksi nosokomial merupakan infeksi mikroorganisme patogen dari rumah sakit (Jonas dkk., 2007).

Isolat R233 yang teridentifikasi sebagai *Pantoea dispersa* memiliki nilai similaritas yang sama terhadap beberapa strain, tidak spesifik pada satu strain. Hal ini diduga disebabkan karena hasil sekuensing yang kurang bagus atau metode identifikasi yang dipilih. Menurut Patel (2001), identifikasi bakteri berdasarkan sekuen 16S rDNA bisa jadi kurang dapat menentukan secara sempurna perbedaan sekuen secara keseluruhan antar bakteri sehingga perbedaan antar strain yang dipilih tidak begitu terlihat. Salah satu metode identifikasi bakteri yang dapat menentukan perbedaan sekuen secara akurat adalah menggunakan uji reasosiasi DNA-DNA.

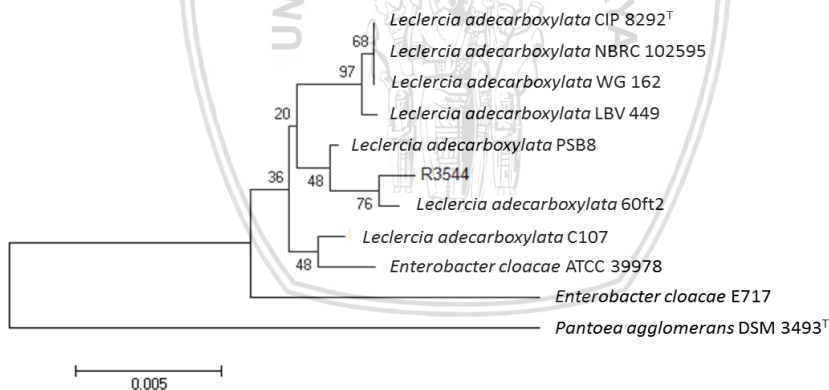


Gambar 11. Pohon filogeni menurut algoritma *Neighbor Joining* yang menunjukkan kekerabatan antara strain-strain bakteri acuan dengan isolat R233 berdasarkan sekuen 16S rDNA

Pantoea dispersa merupakan bakteri Gram negatif dengan bentuk sel batang. Spesies ini termasuk dalam famili Enterobacteriaceae. *Pantoea dispersa* banyak ditemukan pada rhizosfer tanaman maupun lingkungan akuatik. Pada manusia, *Pantoea dispersa* diketahui merupakan penyebab sepsis neonatal yaitu infeksi pada bayi yang baru lahir. Beberapa spesies dari genus *Pantoea* diketahui merupakan patogen pada tanaman namun ada pula yang dapat berperan sebagai pemacu

pertumbuhan tanaman (Mehar, dkk., 2013; Walterson & Stavrinides, 2015). Chen dkk. (2014) pada penelitiannya menunjukkan bahwa *Pantoea dispersa* yang diisolasi dari akar singkong mampu melarutkan fosfat.

Leclercia adecarboxylata merupakan bakteri Gram negatif dengan bentuk sel basil. Sebelumnya, spesies ini dikenal sebagai *Escherichia adecarboxylata* dan keberadaannya banyak ditemukan di alam khususnya lingkungan perairan. *Leclercia adecarboxylata* diketahui merupakan patogen penyebab infeksi lapisan dalam jantung dan infeksi kulit pada manusia yang terpapar air dari lingkungan (Hess dkk., 2008; Keren dkk., 2014; Stock dkk., 2004). Tam & Nayak (2012) dalam penelitiannya mengisolasi *Leclercia adecarboxylata* yang menyebabkan nekrosis pada kulit seorang pasien yang terluka akibat banjir. Laili dkk. (2017) pada penelitiannya mengisolasi *Leclercia adecarboxylata* dari akar stroberi dan dari hasil uji kemampuan sebagai pemacu pertumbuhan tanaman, spesies tersebut dapat memfiksasi nitrogen, menghasilkan IAA, melarutkan fosfat, memproduksi enzim selulase, dan siderofor.



Gambar 12. Pohon filogeni menurut algoritma *Neighbor Joining* yang menunjukkan kekerabatan antara strain-strain bakteri acuan dengan isolat R3-544 berdasarkan sekuen 16S rDNA

Identifikasi bakteri berdasarkan sekuen 16S rDNA merupakan metode identifikasi bakteri universal. Sekuen 16S rDNA ada pada seluruh jenis bakteri dan merupakan sekuen yang tidak mudah mengalami perubahan (*conserve*). Adapun perubahan yang terjadi

merupakan perubahan acak sehingga tidak mempengaruhi sekuen secara keseluruhan. Selain itu, panjang sekuen 16S rDNA yaitu 1500bp cukup untuk analisis bioinformatika (Patel, 2001). Jika sekuen bakteri memiliki persentase similaritas yang mencapai 97% atau lebih maka bakteri tersebut tergolong berkerabat dekat atau dapat dikatakan spesies yang sama. Suatu bakteri dapat dikatakan merupakan strain yang sama jika sekuennya memiliki nilai similaritas 99% atau lebih (Stackebrandt & Goebel, 1994).



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah :

1. Sebanyak 24 isolat penghasil IAA, 20 isolat pelarut fosfat, dan 20 isolat pemfiksasi nitrogen telah didapatkan. Hasil uji kuantitatif produksi IAA tertinggi ditunjukkan oleh isolat E244 ($93,97 \pm 4,51$ $\mu\text{g/mL}$), pelarutan fosfat tertinggi oleh isolat R233 ($14,02 \pm 2,41$ $\mu\text{g/mL}$), dan fiksasi nitrogen tertinggi oleh isolat R3-544 ($2,83 \pm 0,68$ $\mu\text{g/mL}$).
2. Isolat E244, R233, dan R3-544 secara berurutan teridentifikasi sebagai *Enterobacter cloacae* RCB680 (99,90%), *Pantoea dispersa* (96,38%), dan *Leclercia adecarboxylata* 60ft2 (99,80%).
3. Tidak ada antagonisme antara isolat bakteri pemfiksasi nitrogen (R2-623, R3-544, E3-614, E3-634), isolat penghasil IAA E244 dan isolat pelarut fosfat R233.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan pengukuran total nutrisi sampel tanah sehingga dapat dihubungkan dengan jumlah bakteri yang didapatkan pada penelitian ini.
2. Perlu dilakukan uji silang kemampuan *plant growth promoting* pada setiap isolat unggul untuk mengetahui apakah isolat memiliki kemampuan multifungsi.
3. Identifikasi isolat R233 perlu dispesifikkan untuk menentukan similaritas terdekat dengan strain tertentu.
4. Ketiga isolat yang teridentifikasi merupakan patogen pada manusia sehingga perlu dilakukan uji patogenitas.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, S., J. Duan, T. C. Charles & B. R. Glick. 2014. A bioinformatics approach to the determination of genes involved in endophytic behavior in *Burkholderia* spp. *J. Theor. Biol.* 343: 193-198.
- Ahemad, M. & M. Kibret. 2014. Mechanism and applications of plant growth promoting Rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University – Science.* 26: 1-20.
- Antonio, O. R., M. Hernandez, E. Salazar, S. Contreas, G. M. Batallar, Y. Mora & S. Encarnacion. 2011. Systems biology of bacterial nitrogen fixation: High-throughput technology and its integrative description with constraint-based modelling. *BMC Systems Biology.* 5: 120-135.
- Aphine, O. A. & J. P. Jadhav. 2011. Optimization of medium for indole-3-acetic acid production using *Pantoea agglomerans* strain PVM. *Journal of Applied Microbiology.* 110(5): 1235-1244.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith & K. Struhl. 2003. **Current protocols in molecular biology.** John Wiley & Sons, Inc. New Jersey.
- Bacon, C.W. & D. M. Hinton. 2006. **Bacterial endophytes: The endophytic niche, its occupants, and its utility.** Springer. Netherlands.
- Baker, M. D., P. M. Wolanin & J. B. Stock. 2006. Signal transduction in bacterial chemotaxis. *Bioessays.* 28(1): 9-22.
- Bar, Etan & E. T. Or. 1994. Effect of light and oxygen on nitrogenase activity and dinitrogenase reductase (Fe-protein) content in *Azolla-Anabaena* association. *J. Plant Physiol.* 144: 438-443.
- Behera, B. C., H. Yadav, S. K. Singh, R. R. Mishra, B. K. Sethi, S. K. Dutta & H. N. Thatoi. 2017. Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology.* 15: 169-178.
- Boyer, P. D. 1997. The ATP synthase: a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem.* 66: 717-749.
- Brenner, D. J., N. R. Krieg, J. T. Staley. 2005. **Bergey's manual of systematic bacteriology.** Springer, New York.
- Brower, J. E., J. H. Zar & C. von Ende. 1998. **Field and laboratory methods for general ecology.** WCB McGraw Hill. New York.

- Calvino, D. F. & E. Baath. 2010. Growth response of the bacterial community to pH in soils differing in pH. *FEMS Microbiology Ecology*. 73(1): 149-56.
- Chabot, R., H. Antoun, M. P. Cescas. 1993. Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. *Can. J. Microbiol.* 39: 941–947.
- Chen, Y., J. B. Fan, L. Du, H. Xu, Q. H. Zhang, Y. Q. He. 2014. The application of phosphate solubilizing endophyte *Pantoea dispersa* triggers the microbial community in red acidic soil. *Applied Soil Ecology*. 84: 235-244.
- Chi, F., S. H. Shen, H. P. Cheng, Y. X. Jing, Y. G. Yanni, F. B. Dazzo. 2005. Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Appl Environ Microbiol.* 71(11): 7271-7278.
- Dalton, H. 1980. **The cultivation of diazotrophic microorganism.** John Wiley & Sons. Chichester.
- Dicko, M. H., H. Gruppen, A. S. Traore, A. G. J. Voragen, W. J. H. van Berkel. 2006. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. 1(1): 21-38.
- Edi-Premono, M., A. M. Moawad, P. L. G. Vlek. 1996. Effect of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indonesian Journal of Crop Science*. 11: 13-23
- Felestrino, E. B., I. F. Santiago, L. S. Freitas, L. H. Rosa, S. P. Ribeiro & L. M. Moreira. 2017. Plant growth promoting bacteria associated with *Langsdorffia hypogaea*-rhizosphere-host biological interface: a neglected model of bacterial prospecting. *Frontiers in Microbiology*. 172(8): 1-15.
- Fenton, M., C. Albers, Q. Ketterings. 2008. Soil organic matter. www.franklin.cce.cornell.edu. Diakses 21 Juli 2018.
- Finyom, C. W. B. 2012. **Characterization of the endophytic bacterial communities associated with South African sorghum plants: looking for potential plant growth-promoting endophytes.** University of the Western Cape. Cape Town. Thesis.
- Fu, S. H., J. Y. Wei, H. W. Chen, Y. Y. Liu, H. Y. Lu & J. Y. Chou. 2015. Indole-3-acetic acid: A widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms. *Plant Signal Behav.* 10(8): 1-9.

- Gach, J. 2012. Synthetic vs. organic fertilizers. *www.enviroingenuity.com*. Diakses 8 September 2017.
- Gaiero, J. R., C. A. McCall, K. A. Thompson, N. J. Day, A. S. Best & K. E. Dunfield. 2013. Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American Journal of Botany*. 100(9): 1738-1750.
- Glick, B. R. 2012. **Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications (Review Article)**. Hindawi Publishing Corporation. Scientifica.
- Glick, B. R. 2015. **Beneficial plant-bacterial interactions**. Springer. Heidelberg.
- Gupta, A., M. Gopal, G. V. Thomas, V. Manikandan, J. Gajewski, G. Thomas, S. Seshagiri, S. C. Schuster, P. Rajesh & R. Gupta. 2014. Whole genome sequencing and analysis of plant growth promoting bacteria isolated from the rhizosphere of plantation crops coconut, cocoa and arecanut. *PLOS ONE*. 9(8): 1-14.
- Hallman, J., A. Q. Hallman, W. F. Mahaffee, J. W. Kloepper. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol*. 43: 895-914.
- Hariprasanna, K. & S. Rakshit. 2016. Economic Importance of Sorghum. dalam Wang, Y. H. (Ed.). **The sorghum genome**. Springer. Switzerland.
- Hess, B., A. Burchett, & M. K. Huntington. 2008. *Leclercia adecarboxylata* in and immunocompetent patient. *J. Med. Microbiol*. 57(7): 896-898.
- Hinton, D. M. & C. W. Bacon. 1995. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. *Mycopathologia*. 129(2): 117-25.
- Hoffman, B. M., D. Lukoyanov, Z. Y. Yang, D. R. Dean & L. C. Seefeldt. 2014. Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage. *Chem. Rev*. 114: 4041-4062.
- Iwata, K., S. S. Yu, N. N. A. binti Azlan & T. Omori. 2012. Ammonia accumulation of novel nitrogen-fixing bacteria. DOI: 10.5772/30654.
- James, E. K., F. L. Olivares, J. J. Baldani & J. Dobereiner. 1997. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. *Journal of Experimental Botany*. 48(308): 785-797.
- Jonas, S., R. L. Goldstein, K. Goldstein. 2007. **Introduction to the US health care system**. Springer Publishing Company. New York.

- Jones, J. B. 2012. **Plant nutrition and soil fertility**. CRC Press. New York.
- Katiyar, V. & R. Goel. 2003. Solubilization of inorganic phosphate and plant growth promotion by cold tolerant mutants of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiol. Res.* 158: 163–168.
- Keren, Y., D. Keshet, M. Eidelman, Y. Geffen, A. R. Pasteur, K. Hussein. 2014. Is *Leclercia adecarboxylata* a new and unfamiliar marine pathogen?. *J Clin Microbiol.* 52(5): 1775-1776.
- Kim, J. H., W. T. Kim, B. G. Kang. 2001. Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Plant Cell Physiol.* 42(10): 1056-1061.
- Khan, M. S., E. Ahmad, A. Zaidi & M. Oves. 2013. Functional aspect of phosphate-solubilizing bacteria: importance in crop production. dalam: Maheshwari DK dkk. (eds) *Bacteria in agrobiology: crop productivity*. Springer. Berlin.
- Khalifa, A. Y. Z., A. M. Alsyeeh, M. A. Almalki, F. A. Saleh. 2016. Characterization of the plant growth promoting bacterium, *Enterobacter cloacae* MSR1, isolated from roots of non-nodulating *Medicago sativa*. *Saudi J Biol Sci.* 23(1): 79-86.
- Koga, J., T. Adachi, & H. Hidaka. 1991. IAA biosynthetic pathway from tryptophan via indole-3-pyruvic acid in *Enterobacter cloacae*. *Agric. Biol. Chem.* 55(3): 701-706.
- Leveau, J. H. J. & S. E. Lindow. 2005. Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(5): 2365-2371.
- Laili, N. S., O. Radziah & S. S. Zaharah. 2017. Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria (pgpr) and their effects on growth of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.). *Bangladesh J Bot.* 46(1): 277-282.
- Liu, W. Y., K. M. K. Chung, C. F. Wong, J. W. Jiang, R. K. H. Hui, F. C. C. Leung. 2012. Complete genome sequence of the endophytic *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* strain ENHKU01. *J Bacteriol.* 194(1): 5965-5970.
- Manurung, Y. C., A. S. Hanafiah, P. Marbun. 2015. Pengaruh berbagai kadar air tanah pada efektifitas mikoriza arbuskular terhadap pertumbuhan dan serapan hara bibit karet (*Hevea brassiliensis* Muell. Arg.) di Rumah Kasa. *Jurnal Agroekoteknologi.* 3(2): 465-475.

- Maropola, M. K. A., J. B. Ramond & M. Trindade. 2015. Impact of metagenomic DNA extraction procedures on the identifiable endophytic bacterial diversity in *Sorghum bicolor* (L. Moench). *J Microbiol Methods*. 112: 104-117.
- Marra, L. M., S. M. O. Longatti, C. R. F.S. Soares, J. M. Lima, F. L. Olivares, F. M. S. Moreira. 2015. Initial pH of medium affects organic acids production but do not affect phosphate solubilization. *Brazilian Journal of Microbiology*. 46(2): 367-375.
- Marschner, P. 2012. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. Elsevier. Atlanta.
- Mehar, V., D. Yadav, J. Sanghvi, N. Gupta, K. Singh. 2013. *Pantoea dispersa*: an unusual cause of neonatal sepsis. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 17(6): 726-728.
- Mesa, V., A. Navazas, R. G. Gil, A. Gonzalez, N. Weyens, B. Lauga, J. L. R. Gallego, J. Sanchez, A. I. Pelaez. 2017. Use of endophytic and rhizosphere bacteria to improve phytoremediation of arsenic-contaminated industrial soils by autochthonous *Betula celtiberica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 83(8): 1-18.
- Mulhardt, C. 2010. **Molecular biology and genomics**. Academic Press, Waltham.
- Nautiyal, C. S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*. 170(1): 265-270.
- Nomata J., M. Kitashima, K. Inoue, Y. Fujita. 2006. Nitrogenase Fe protein-like Fe-S cluster is conserved in L-protein (BchL) of dark-operative protochlorophyllide reductase from *Rhodobacter capsulatus*. *FEBS Letters*. 580(26): 6151-6154.
- Nosrati, R., P. Owlia, H. Saderi, I. Rasooli & M. A. Malboobi. 2014. Phosphate solubilization characteristics of efficient nitrogen fixing soil *Azotobacter* strains. *Iranian Journal of Microbiology*. 6(4): 285-295.
- Pandya, M., M. Rajput & S. Rajkumar. 2015. Exploring plant growth promoting potential of non rhizobial root nodules endophytes of *Vigna radiata*. *Microbiology*. 84: 80-89.
- Paul, D. & S. N. Sinha 2017. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential from river Ganga, India. *Annals of Agrarian Science*. 15(1): 130-136.
- Patel, J. B. 2001. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *J. Mol. Diagn.* 6: 313-321.

- Patil, N. B., M. Gajbhiye, S. S. Ahiwale, A. B. Gunjal, B. P. Kapadani. Optimization of indole-3-acetic acid (IAA) production by *Acetobacter diazotrophicus* L1 isolated from Sugarcane. *Int J Environ.* 2:295-302.
- Patten, C. L. & B. R. Glick. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42: 207-220.
- Pitts, L. 2016. Monitoring Soil Moisture for Optimal Crop Growth. <https://observant.zendesk.com>. Diakses 25 Juni 2018.
- Postgate, J. R. 1998. **Nitrogen fixation**. Cambridge University Press. Cambridge.
- Prinsen, E., A. Costacurta, K. Michiels, J. Vanderleyden, H. Van Onckelen. 1993. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. *Mol Plant-Microbe Interact.* 6: 609-615.
- Reddy, P. S. & J. V. Patil. 2015. **Genetic enhancement of rabi sorghum: adapting the indian durras**. Elsevier. Atlanta.
- Regli, A. D. & J. M. Pages. 2015. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Front Microbiol.* 6(392): 1-10.
- Rodriguez, H. & R. Fraga. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances.* 17: 319-339.
- Santoyo, G., C. H. Pacheco, J. H. Salmeron, R. H. Leon. 2017. The role of abiotic factors modulating the plant-microbe-soil interactions: toward sustainable agriculture. A review. *Spanish Journal of Agricultural Research.* 15(1): 1-13.
- Santoyo, G., G. M. Hagelsieb, M. C. O. Mosqueda & B. R. Glick. 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research.* 283: 92-99.
- Scott, J. C., I. V. Greenhut, J. H. Leveau. 2013. Functional characterization of the bacterial iac genes for degradation of the plant hormone indole-3-acetic acid. *J Chem Ecol.* 39(7):942-51.
- Setiadi, C., K. S. Lubis, P. Marpaung. 2016. Evaluasi kadar air tanah, bahan organik dan liat serta kaitannya terhadap indeks plastisitas tanah pada beberapa vegetasi di kecamatan Pamatang Sidamanik kabupaten Simalungun. *Jurnal Agroekoteknologi.* 4(4): 2420-2427.
- Shahid, S. A. & A. A. Shankiti. 2013. Sustainable food production in marginal lands-case of GDLA member countries. *International Soil and Water Conservation Research.* 1(1): 24-38.

- Shoemaker, C.E. & D.I. Bransby. 2010. The role of sorghum as a bioenergy feedstock. dalam R. Braun, D. Karlen, & D. Johnson (Ed.). Sustainable alternative fuel feedstock opportunities, challenges and roadmaps for six U.S. regions. Proceedings of the Sustainable Feedstocks for Advance Biofuels Workshop. *Soil and Water Conserv. Soc.* 9: 149-159.
- Silva, K., R. S. A. Nobrega, A. S. Lima, A. Barberi & F. M. S. Moreira. 2011. Density and diversity of Diazotrophic bacteria isolated from Amazonian soils using N-free semi-solid media. *Sci. Agric.* 68(5): 518-525.
- Sirappa, M. P. 2003. Prospek pengembangan sorgum di Indonesia sebagai komoditas alternatif untuk pangan, pakan, dan industri. *Jurnal Litbang Pertanian.* 22(4): 133-140.
- Sivasankari, B. & J. S. Pradeep. 2013. Isolation of plant growth promoting bacterial species from *Sorghum bicolor* rhizosphere soil. *International Journal of Science and Research.* 5(7): 1523-1526.
- Sivasankari, B. 2016. Indole-3-acetic acid production by the bacterial strains isolated from vermicomposts in the presence and absence of tryptophan. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology.* 5(5): 8698-8706.
- Soeka, Y. S. & Sulistiani. 2010. Seleksi, karakterisasi, dan identifikasi bakteri penghasil kitinase yang diisolasi dari gunung bromo jawa timur. *J. Natur Ind.* 13(2): 155-161.
- Souza, R., A. Ambrosini, L. M. P. Passaglia. 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genet Mol Biol.* 38(4): 401-419.
- Spaepen, S., J. Vanderleyden & R. Remans. 2007. Indole-3-acetic-acid in microbial and microorganism-plant signalling. *FEMS Microbiol Rev.* 31:425-448.
- Stackebrant, E. & B. M. Goebel. 1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol.* 44: 846-849.
- Stock, I., S. Burak, B. Wiedemann. 2004. Natural antimicrobial susceptibility patterns and biochemical profiles of *Leclercia adecarboxylata* strains. *Clin. Microbiol. Infect.* 10: 724-733.
- Subagio, H. & M. Aqil. 2013. Pengembangan produksi sorgum di Indonesia. Seminar Nasional Inovasi Teknologi Pertanian. Balai Penelitian Tanaman Serealia.

- Subagio, H. dan Suryawati. 2013. Wilayah penghasil dan ragam penggunaan sorgum untuk pengembangan tanaman sorgum di Indonesia. Laporan Tengah Tahun Balitsereal.
- Sukmadewi, D. K. T., Suharjono & S. Antonius. 2015. Uji potensi bakteri penghasil hormon IAA (*Indole Acetic Acid*) dari tanah rhizosfer cengkeh (*Syzigium aromaticum* L.). *Jurnal Biotropika*. 3(2): 91-94.
- Sumarno & J. R. Hidayat. 2007. Perluasan areal padi gogo sebagai pilihan untuk mendukung ketahanan pangan nasional. *Iptek Tanaman Pangan*. 2(1): 26-40
- Sun, P. F., W. T. Fang, L. Y. Shin, J. Y. Wei, S. F. Fu, J. Y. Chou. 2014. Indole-3-acetic acid producing yeasts in the phyllosphere of the carnivorous plant *Drosera indica* L. *PloS One*. doi.org/10.1371/journal.pone.0114196.
- Suryaningsih, R. & Irhas. 2014. Bioenergy plants in indonesia: sorghum for producing bioethanol as an alternative energy substitute of fossil fuels. *Energy Procedia*. 47: 211-216.
- Taiz, L & E. Zeiger. 2002. **Plant Physiology**. Sinauer Associates, Sunderland.
- Tam, V. & S. Nayak. 2012. Isolation of *Leclercia adecarboxylata* from a wound infection after exposure to hurricane-related floodwater. *BMJ Case Rep*. DOI: 10.1136/bcr-2012-007298.
- Tan, K. H. 2014. **Humic matter in soil and the environment: Principles and controversies**. CRC Press, New York.
- Tang, W. W., G. M. Zeng, J. L. Gong, J. Liang, P. Xu, C. Zhang, B. B. Huang. 2014. Impact of humic/fulvic acid on the removal of heavy metals from aqueous solutions using nanomaterials: A review. *Science of the Total Environment*. 468-469: 1014-1027.
- Tian, X. Y. & C. S. Zhang. 2017. Illumina-Based Analysis of Endophytic and Rhizosphere Bacterial Diversity of the Coastal Halophyte *Messerschmidia sibirica*. *Front Microbiol*. 8(2288): 1-10.
- Tiessen, H., E. Cuevas, P. Chacon. 1994. The role of soil organic matter in sustaining soil fertility. *Nature*. 371: 783-785.
- Walterson, A. M. & J. Stavrinos. 2015. *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiology Reviews*. 39(1): 986-984.
- Wu, Z., Q. Liu, Z. Li, W. Cheng, J. Sun, Z. Guo, Y. Li, J. Zhou, D. Meng, H. Li, P. Lei, H. Yin. 2018. Environmental factors shaping

- the diversity of bacterial communities that promote rice production. *BMC Microbiology*. 18(51): 1-21.
- Xu, J. 2014. **Isolation and Assessment of Nitrogen-Fixing and Phosphate-Solubilizing Bacteria for Use as Biofertilizers**. PhD. Auburn University. Alabama. Dissertation.
- Zakharova, E. A., A. D. Iosipenko, V. V. Ignatov. 2000. Effect of water-soluble vitamins on the production of indole-3-acetic acid by *Azospirillum brasilense*. *Microbiol Res*. 155: 209-214.
- Zhang, D., P. Yao, Z. Na, W. Cao, S. Zhang, Y. Li, Y. Gao. 2016. Soil water balance and water use efficiency of dryland wheat in different precipitation years in response to green manure approach. *Sci Rep*. 6: 26856.

