

**EKSPLORASI *PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA* (PGPR)
PADA KAWASAN AGROFORESTRI
DI UB FOREST**

**Oleh
RIZAL SUHARMULYONO**



**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERTANIAN
MALANG**

2019

**EKSPLORASI *PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA* (PGPR)
PADA KAWASAN AGROFORESTRI
DI UB FOREST**

Oleh
RIZAL SUHARMULYONO
155040200111042

**PROGRAM STUDI AGROEKOTEKNOLOGI
MINAT PERLINDUNGAN TANAMAN**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh
Gelar Sarjana Pertanian Strata Satu (S-1)**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERTANIAN
JURUSAN HAMA DAN PENYAKIT TUMBUHAN
MALANG
2019**



PERNYATAAN

Saya menyatakan bahwa segala pernyataan dalam skripsi ini merupakan hasil penelitian saya sendiri, dengan bimbingan komisi pembimbing. Skripsi ini tidak pernah diajukan untuk memperoleh gelar di perguruan tinggi manapun dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang dengan jelas ditunjukkan rujukannya dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.



Malang, Agustus 2019

Rizal Suharmulyono

LEMBAR PERSETUJUAN

Judul Skripsi : Eksplorasi *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) Pada Kawasan Agroforestri di UB Forest

Nama Mahasiswa : Rizal Suharmulyono

NIM : 155040200111042

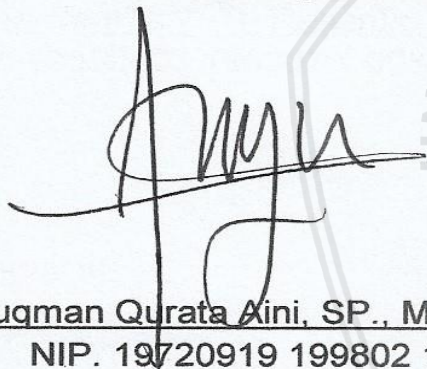
Jurusan : Hama dan Penyakit Tumbuhan

Program Studi : Agroekoteknologi

Disetujui

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping



Luqman Qurata Aini, SP., M.Si., Ph.D.
NIP. 19720919 199802 1 001



Restu Rizkyta Kusuma, SP., M.Sc
NIK. 201409 880504 2 001

Mengetahui
Ketua

Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan



Dr. Ir. Ludji Pantja Astuti, MS.
NIP. 19551018 198601 2 001

Tanggal Persetujuan: 30 JUL 2019


LEMBAR PENGESAHAN


Mengesahkan

MAJELIS PENGUJI

Penguji I

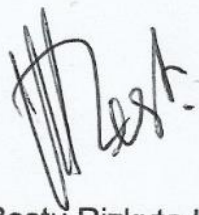
Penguji II

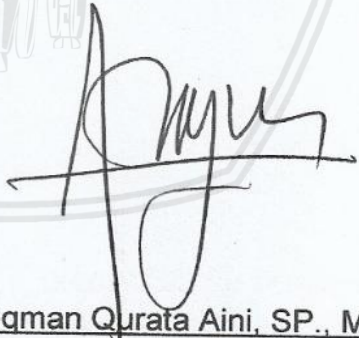

Dr. Ir. Bambang Tri Rahardjo, SU.
NIP. 19550403 198303 1 003


Fery Abdul Choliq, SP., M.Sc
NIK. 201503 860523 1 001

Penguji III

Penguji IV


Restu Rizkyta Kusuma, SP., M.Sc
NIK. 201409 880504 2 001


Luqman Qurata Aini, SP., M.Si., Ph.D
NIP. 19720919 199802 1 001

Tanggal Lulus: 01 AUG 2019



*Skripsi ini ku persembahkan untuk
Ibu saya yang sudah berjuang keras membiayai sekolah saya sampai kuliah ini,
Kakak saya yang sangat berkontribusi dalam pembuatan skripsi ini,
Dan bapak yang sudah tiada sejak saya SD, keluarga besar, sahabat serta
Seluruh orang yang membutuhkan informasi dalam skripsi ini.*

RINGKASAN

Rizal Suharmulyono. 155040200111042. Eksplorasi *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) Pada Kawasan Agroforestri di UB Forest. Di bawah bimbingan Luqman Qurata Aini, Sp., M.Si., Ph.D sebagai pembimbing utama dan Restu Rizkyta Kusuma, SP., M.Sc. sebagai pembimbing pendamping.

Mikroba tanah memiliki peran penting didalam tanah yang diperkirakan bahwa 80-90% dari peran tersebut dipengaruhi oleh mikroba tanah. Salah satu contoh mikroba yaitu bakteri. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) adalah kelompok bakteri yang menghuni rizosfer serta berpengaruh positif pada pertumbuhan tanaman melalui mekanisme langsung dan tidak langsung yang menjaga kesehatan tanaman dan kesuburan tanah. Kegiatan pertanian di hutan produksi UB Forest didominasi oleh tanaman kopi dengan naungan pinus serta terdapat perbedaan budidaya yang diterapkan oleh petani setempat. Hal ini dapat berpengaruh terhadap kelimpahan serta keanekaragaman bakteri. Tujuan dari penelitian ini yaitu mengkaji keberadaan, kelimpahan, dan keanekaragaman bakteri PGPR pada kawasan agroforestri di UB Forest.

Plot sampel penelitian berada di hutan pendidikan Universitas Brawijaya (UB Forest), sedangkan pengamatan mikroba dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya dan Laboratorium Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya mulai bulan Desember 2018–Juni 2019. Terdapat tiga plot sampel pengamatan, yaitu (a) plot LC (*Low density Coffee*), (b) plot MC (*Medium density Coffee*), dan (c) plot HC (*High density Coffee*). Rangkaian penelitian meliputi pembuatan plot sampel pengamatan, pengamatan suhu tanah, pengamatan pH, pengamatan bahan organik, pengambilan sampel tanah dan isolasi bakteri rizosfer, seleksi bakteri rizosfer sebagai PGPR, karakterisasi morfologi koloni tunggal dan morfologi sel bakteri serta uji Gram. Analisis data menggunakan uji korelasi iklim mikro dengan keanekaragaman bakteri.

Pada hasil eksplorasi dari semua plot sampel pengamatan ditemukan sebanyak 54 isolat bakteri, sebanyak 35 isolat bakteri mampu menambat nitrogen, 49 isolat bakteri mampu melarut fosfat serta sebanyak 30 isolat bakteri mempunyai sifat keduanya. Selain itu, terdapat 61% atau 33 isolat bakteri yang bersifat Gram negatif dan 39% atau 21 isolat bakteri bersifat Gram positif. Kelimpahan dan keanekaragaman bakteri pelarut fosfat lebih tinggi dibandingkan bakteri penambat nitrogen disetiap plot sampel pengamatan. Kelimpahan bakteri penambat nitrogen tertinggi terdapat pada plot MC yaitu sebesar $7,00 \times 10^7$, selain itu kelimpahan bakteri pelarut fosfat tertinggi terdapat pada plot MC yaitu sebesar $9,70 \times 10^7$. Keanekaragaman dari semua plot sampel pengamatan termasuk sedang dan kondisi ekosistem cukup seimbang. Hal ini disebabkan oleh suhu, pH, dan bahan organik disetiap plot sampel pengamatan terlihat hampir sama. Selain itu, uji korelasi menunjukkan bahwa suhu tanah, pH, dan bahan organik memiliki hubungan yang kuat (0,71-0,72) hingga sangat kuat (0,89-0,96) terhadap keanekaragaman *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR).



SUMMARY

Rizal Suharmulyono. 155040200111042. Exploration of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) in Agroforestry Areas in UB Forest. Supervised by Luqman Qurata Aini, SP., M.Si., Ph.D. and Restu Rizkyta Kusuma, SP., M.Sc.

Soil microbes have an important role in the soil, it is estimated that 80-90% of these roles are influenced by soil microbes. One example of microbes are bacteria. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) are a group of bacteria that inhabit the rhizosphere and have a positive effect on plant growth through direct and indirect mechanisms that maintain plant health and soil fertility. Agricultural activities in the production forests of UB Forest are dominated by coffee plants with pine shade and there are differences in cultivation applied by local farmers. This can affect the abundance and diversity of bacteria. The purpose of this study is to examine the presence, abundance, and diversity of PGPR bacteria in agroforestry areas in UB Forest.

The research sample plot was in the Brawijaya University's education forest (UB Forest), while microbial observations were carried out at the Central Laboratory of Biological Sciences of Brawijaya University and the Laboratory of Plant Diseases at the Faculty of Agriculture, Brawijaya University from December 2018-June 2019. There were three sample plot observations, namely (a) LC (Low-density Coffee) plot, (b) MC (Medium-density Coffee) plot, and (c) HC (High-density Coffee) plot. The series of studies include making sample plot observations, soil temperature observations, pH observations, observing organic matter, soil sampling and isolation of rhizosphere bacteria, selection of rhizosphere bacteria as PGPR, characterization of single colony morphology and bacterial cell morphology and Gram tests. Data analysis used a micro-climate correlation test with bacterial diversity.

In the results of exploration from all the observation sample plots, 54 bacterial isolats were found, 35 bacterial isolats were able to tether nitrogen, 49 bacterial isolats were able to dissolve phosphate and as many as 30 bacterial isolats had both properties. Also, there are 61% or 33 bacterial isolats that are Gram-negative and 39% or 21 bacterial isolats are Gram-positive. The abundance and diversity of phosphate solubilizing bacteria were higher than that of nitrogen-fixing bacteria in each plot of the observed sample. The highest abundance of nitrogen-fixing bacteria was found in the MC plot which was $7,00 \times 10^7$, besides that the highest abundance of phosphate solubilizing bacteria was found in the MC plot which was $9,70 \times 10^7$. The diversity of all observation sample plots included moderate and the ecosystem condition was quite balanced. This is caused by temperature, pH, and organic matter in each observation sample plots looks almost the same. Also, the correlation test shows that soil temperature, pH, and organic matter have a strong relationship (0,71-0,72) to very strong (0,89-0,96) on diversity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR).

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala limpahan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Eksplorasi Bakteri *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) Pada Kawasan Agroforestri di UB Forest” dengan baik. Skripsi ini dapat terwujud berkat bimbingan dan bantuan berbagai pihak. Untuk itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Center for Ecology & Hidrogy (CEH) selaku pemilik proyek yang telah mengizinkan saya bergabung di proyek penelitian ini.
2. Bapak Luqman Qurata Aini, SP., M.Si., Ph.D. selaku pembimbing utama dan Ibu Restu Rizkyta Kusuma, SP., M.Sc. selaku pembimbing kedua atas bimbingan serta nasehat dalam penyelesaian skripsi.
3. Ibu Dr. Ir. Ludji Pantja Astuti, MS. selaku Ketua Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya.

Penulis berharap semoga karya tulis ini dapat bermanfaat bagi banyak pihak serta bisa memberikan sumbangan pemikiran dalam kemajuan ilmu pengetahuan. Kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan guna memperbaiki karya tulis selanjutnya.

Malang, Agustus 2019

Penulis

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Desa Tuwiri Kulon, Kecamatan Merakurak, Kabupaten Tuban, Jawa Timur pada tanggal 06 Februari 1998 sebagai anak kedua dari 2 bersaudara dari pasangan Bambang Suharyono (Alm.) dan Mohlisah, S.Pd. Penulis menempuh pendidikan dasar di SDN Tuwiri Kulon lulus pada tahun 2009, pendidikan menengah pertama di SMPN 1 Merakurak lulus pada tahun 2012, pendidikan menengah atas di SMK Negeri 3 Tuban lulus pada tahun 2015, penulis terdaftar sebagai mahasiswa Strata-1 di Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Permainan Universitas Brawijaya, Malang melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN). Pada semester 6, penulis memasuki jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan.

Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif dalam kegiatan akademik maupun non-akademik. Dalam kegiatan akademik, penulis pernah aktif menjadi asisten praktikum mata kuliah Teknologi Produksi Agens Hayati. Dalam kegiatan non-akademik, penulis pernah menjabat sebagai anggota Informasi dan Komunikasi (INFOKOM) HIMAPTA 2018, anggota divisi catur UKM Sport Corner 2017, anggota Hubungan Masyarakat (HUMAS) UABT UB 2016.

DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN	i
SUMMARY	ii
KATA PENGANTAR	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Hipotesis Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 UB Forest	4
2.2 Mikroba Tanah	4
2.3 <i>Plant Growth Promoting Rhizobacteria</i> (PGPR)	6
2.4 Pengaruh Kerapatan Vegetasi Terhadap Mikroba Tanah	9
III. METODE PENELITIAN	11
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	11
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	11
3.3 Metode Penelitian	12
3.4 Pelaksanaan Penelitian	12
3.5 Variabel Pengamatan	17
3.6 Analisa Data	19
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	20
4.1 Seleksi Bakteri Rizosfer Sebagai PGPR	20
4.2 Karakteristik <i>Plant Growth Promoting Rhizobacteria</i>	23
4.3 Kelimpahan <i>Plant Growth Promoting Rhizobacteria</i>	27
4.4. Keanekaragaman <i>Plant Growth Promoting Rhizobacteria</i>	28
V. KESIMPULAN DAN SARAN	32
5.1 Kesimpulan	32
5.2 Saran	32
DAFTAR PUSTAKA	33
LAMPIRAN	39



DAFTAR TABEL

Nomor	Teks	Halaman
1.	Distribusi mikroba dalam horizon dari suatu profil tanah.....	6
2.	Komposisi dan kerapatan pohon	13
3.	Nilai tolak ukur indeks keanekaragaman	18
4.	Kemampuan bakteri sebagai penambat nitrogen pada media Burk.....	20
5.	Kemampuan bakteri sebagai pelarut fosfat pada media Pikovskaya	21
6.	Karakteristik isolat bakteri hasil eksplorasi.....	23
7.	Nilai kelimpahan PGPR	27
8.	Nilai indeks keanekaragaman PGPR.....	29
9.	Nilai koefisien korelasi iklim mikro dengan keanekaragaman PGPR.....	30
Lampiran		
1.	Data suhu tanah selama satu bulan.....	41
2.	Data pH sampel tanah tiap plot sampel pengamatan.....	42
3.	Data bahan organik sampel tanah tiap plot pengamatan	43



DAFTAR GAMBAR

Nomor	Teks	Halaman
1.	Citra Google Earth lokasi pengamatan.....	11
2.	Denah plot pengamatan.	13
3.	Denah sub plot tiap plot pengamatan	14
4.	Skema sub plot pengambilan sampel tanah.....	14
5.	Kemampuan tumbuh isolat bakteri media Burk.....	21
6.	Kemampuan isolat bakteri pada media Pikovskaya	23
7.	Bentuk sel bakteri dan pewarnaan Gram.....	26
8.	Hasil uji KOH 3%	26

Lampiran

1.	Posisi pohon	39
2.	Dokumentasi zona bening pada media Pikovskaya	44
3.	Dokumentasi isolat bakteri pada media Burk.....	45
4.	Dokumentasi pewarnaan Gram	46
5.	Dokumentasi uji KOH 3%	47
6.	Dokumentasi koloni tunggal	48



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Mikroba tanah memiliki peran penting didalam tanah yang diperkirakan bahwa 80-90% dari peran tersebut dipengaruhi oleh mikroba tanah (Nannipieri *et al.*, 2003). Mikroba tanah berpartisipasi aktif dalam daur ulang nutrisi penting, pertumbuhan tanaman, dan menghambat pertumbuhan patogen tanaman. Kelimpahan mikroba tanah tergantung pada beberapa faktor, seperti sumber energi yang tersedia, suhu, kelembaban, intensitas cahaya matahari, dan interaksi dengan mikroorganisme lain (Delgado-Baquerizo *et al.*, 2017) serta faktor lain seperti, urbanisasi, teknik budidaya pertanian, dan polusi (Huot *et al.*, 2017). Mikroba tanah dapat digunakan untuk menilai gangguan lingkungan karena mikroba tanah merespon dengan cepat perubahan serta mampu beradaptasi dengan kondisi lingkungan tertentu. Perbedaan jumlah dalam komunitas mikroba tanah berfungsi sebagai indikator perubahan yang terjadi pada suatu habitat mikroba khususnya bakteri yang berfungsi sebagai *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR).

Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) adalah kelompok bakteri yang menghuni rizosfer serta berpengaruh positif pada pertumbuhan tanaman melalui mekanisme langsung dan tidak langsung yang meningkatkan produktivitas dan melakukan kontrol terhadap patogen akar. Tanaman memberikan pengaruh pada keragaman fungsional populasi mikroba melalui eksudat yang dikeluarkan oleh akar (rizosfer) serta memainkan peran penting dalam kesehatan tanaman dan kesuburan tanah (Gomes *et al.*, 2001). *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) lebih erat terkait dengan daerah perakaran tanaman daripada tanah yang berada diluar daerah perakaran. Beberapa komunitas PGPR seperti genus *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Actinobacter*, *Burkholderia*, *Arthrobacter*, dan *Paenibacillus* yang menghuni rizosfer, dapat membatasi atau menghambat pertumbuhan patogen potensial dengan memproduksi antibiotik, bahan kimia fungisida, insektisida, serta mampu melarutkan fosfat dan menambat nitrogen menjadi tersedia bagi tanaman (García-Salamanca *et al.*, 2013).

Penelitian sebelumnya tentang keanekaragaman bakteri melibatkan penentuan jumlah spesies dan kelimpahan relatif bakteri, namun hubungan antara keanekaragaman dengan sifat-sifat ekologi dari komunitas bakteri masih belum

diketahui (Nannipieri *et al.*, 2003). Keanekaragaman mikroba bakteri fungsional khususnya pada ekosistem mengalami gangguan konstan, seperti adanya kegiatan pertanian. Hutan pendidikan UB Forest terdiri dari hutan produksi dan hutan konservasi. Kegiatan pertanian di hutan produksi UB Forest didominasi oleh tanaman kopi dengan naungan pinus serta terdapat perbedaan budidaya yang diterapkan oleh petani setempat. Penelitian sebelumnya telah melaporkan bahwa perubahan struktur vegetasi akan mempengaruhi komunitas mikroba tanah (Garcia-palacios *et al.*, 2016). Selanjutnya Kim *et al.*, (2011) melaporkan bahwa perubahan keragaman vegetasi atau kepadatan suatu naungan akan berpengaruh terhadap fungsi dan peran ekosistem di dalam tanah. Prastyo (2018) melaporkan bahwa pada kawasan UB Forest terdapat beberapa genus PGPR yang meliputi *Pantoea*, *Pseudomonas*, dan *Xanthomonas*. Menurut Ariani (2018) pada kawasan UB Forest yang digunakan sebagai lahan pertanian berupa kopi dan pinus yang ditanam secara polikultur terdapat beberapa bakteri dari genus *Erwinia* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp., *Xanthomonas* sp., *Bacillus* sp., dan *Clostridium* sp. yang mempunyai potensi sebagai patogen dan non-patogen yang dapat menjadi pengendali hayati pada tanaman.

Berdasarkan uraian yang telah dipaparkan, maka dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kelimpahan dan keanekaragaman bakteri rizosfer yang berpotensi sebagai *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) pada kawasan agroforestri di hutan pendidikan UB Forest yang memiliki tujuan untuk mengkaji atau mengevaluasi kelimpahan dan keanekaragaman *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) pada beberapa tingkat kepadatan naungan yang berbeda serta melihat tingkat hubungan iklim mikro terhadap keanekaragaman *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR).

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang diajukan dalam penelitian ini yaitu apakah terdapat bakteri rizosfer UB Forest yang bersifat sebagai PGPR serta bagaimana kelimpahan dan keanekaragaman PGPR pada beberapa kawasan agroforestri yang berbeda?

1.3 Tujuan Penelitian

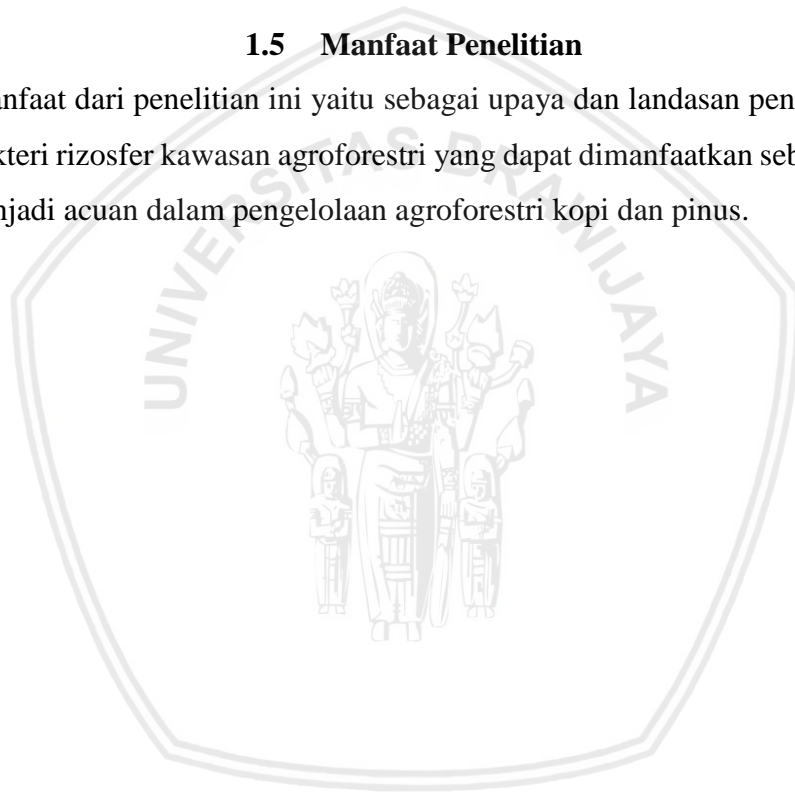
Tujuan dari penelitian ini yaitu mengkaji keberadaan, kelimpahan, dan keanekaragaman PGPR pada kawasan agroforestri yang berbeda serta melihat tingkat hubungan antara iklim mikro terhadap keanekaragaman PGPR.

1.4 Hipotesis Penelitian

Hipotesis yang diajukan dari penelitian ini adalah pada rizosfer kawasan agroforestri terdapat isolat bakteri yang berperan sebagai PGPR serta tingkat agroforestri yang berbeda dapat mempengaruhi kelimpahan dan keanekaragaman PGPR.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini yaitu sebagai upaya dan landasan pengembangan isolat bakteri rizosfer kawasan agroforestri yang dapat dimanfaatkan sebagai PGPR serta menjadi acuan dalam pengelolaan agroforestri kopi dan pinus.



II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 UB Forest

Kawasan hutan pendidikan Universitas Brawijaya atau UB Forest Malang ditetapkan oleh Menteri Lingkungan Hidup dan Kehutanan pada tanggal 19 September 2016, dengan luas 544,74 ha (Sumarlan, 2017). Dalam hal ini Universitas Brawijaya diberikan hak pengelolaan Kawasan Hutan Dengan Tujuan Khusus (KHDTK). Lahan KHDTK UB akan dikembangkan menjadi hutan multifungsi yaitu sebagai area konservasi, daerah wisata biologi, area penelitian dan pengembangan, area pendidikan dan latihan, area sosiologi masyarakat sekitar hutan dan budaya, area hutan produksi, dan hutan ekonomi. Sasaran capaian KHDTK UB yaitu sebagai sarana penunjang kegiatan akademik mahasiswa yang berbasis lingkungan hidup dan sebagai sarana rekreasi edukasi bagi masyarakat dan mahasiswa (Sumarlan, 2017).

UB Forest terdiri atas hutan konservasi dan hutan produksi. Jenis tanaman pada hutan produksi didominasi oleh pinus. Tanaman bawah tegakan yang diusahakan oleh masyarakat setempat antara lain: kopi, jahe, wortel, sawi dan jenis sayuran lainnya. UB Forest terletak di lereng Gunung Arjuno tepatnya di Dusun Sumbersari, Desa Tawang Argo, Kecamatan Karangploso, Kabupaten Malang, dengan ketinggian 1200 mdpl dan berada di lereng Gunung Arjuno yang memiliki ketinggian 3339 mdpl. Tingkat aksesibilitas ke kawasan UB Forest cukup mudah karena fasilitas jalannya telah diaspal, dengan jarak tempuh kurang lebih 5,3 km dari jalan raya Karangploso-Kota Batu (Sumarlan, 2017).

2.2 Mikroba Tanah

Tanah mempunyai berbagai populasi dan habitat dalam tanah dan akan membentuk populasi yang berbeda. Pada umumnya, mikroba tanah berada di lapisan seresah organik atau lapisan permukaan tanah dan bagian tanah yang lebih dalam. Mikroba dalam tanah akan dipengaruhi oleh tinggi atau rendahnya bahan organik, hal ini juga mempengaruhi aktivitas metabolik mikroba tanah. Dekomposisi bahan organik akan lebih cepat terjadi jika dipengaruhi oleh meningkatnya kegiatan mikroba tanah (Nurmegawati dan Sugandi, 2014).

Area akar tanaman merupakan tempat berkembang biak yang baik bagi pertumbuhan mikroba terutama bagi rhizobakteri, hubungan antara bakteri dan akar

tanaman akan meningkatkan ketersediaan kebutuhan nutrisi bagi keduanya (Marianah, 2015). Permukaan akar tanaman dapat disebut rizoplane, sedangkan rizosfer adalah lapisan tanah yang menyelimuti permukaan akar tanaman yang masih dipengaruhi oleh aktivitas akar (Sumarsih, 2003). Tebal dan tipisnya lapisan rizosfer setiap tanaman berbeda-beda. Rizosfer merupakan habitat yang sangat baik bagi pertumbuhan bakteri oleh karena itu, akar tanaman menyediakan berbagai bahan organik yang umumnya menjadi tempat pertumbuhan mikroba (Sumarsih, 2003).

Kualitas biologi (bahan organik) tanah meningkat dengan adanya mikroba tanah terutama pada area rizosfer. Menurut Marianah (2015) rizosfer merupakan bagian tanah yang berada di area sekitar perakaran tanaman. Populasi mikroba di area rizosfer umumnya lebih banyak dan beranekaragam dibandingkan pada tanah non-rizosfer. Aktivitas mikroba rizosfer dipengaruhi oleh nutrisi yang dihasilkan oleh perakaran tanaman budidaya. Beberapa mikroba rizosfer berperan dalam siklus hara, kualitas tanah, proses pembentukan tanah, pertumbuhan tanaman, serta sebagai pengendali hayati terhadap penyakit pada akar. Berdasarkan biografinya, area rizosfer dicirikan dengan aktivitas biologi yang paling tinggi pada tanah (Patkowska, 2002). Lingkungan rizosfer ditentukan oleh interaksi dari tanah, tanaman, dan organisme yang berhubungan dengan akar (Pinton *et al.*, 2001).

Hubungan antara mikroba seperti rhizobakteri dan akar dapat menguntungkan, maupun merusak, atau tidak berdampak apapun tetapi seiring pengaruhnya tergantung pada kondisi tanah. Menurut Marianah (2015) aktivitas rhizobakteri berperan penting dalam kesuburan tanah dan produktifitas tanaman, dimana aktivitasnya selalu berubah-ubah. Kemampuan tanah untuk meningkatkan pertumbuhan tanaman didasarkan pada keberadaan dan keseimbangan banyak senyawa seperti Fosfat (P), Kalsium (K), Sulfur (S), dan Natrium (Na) (Patkowska, 2002). Jumlah bakteri di dalam tanah dipengaruhi oleh berbagai faktor yang dapat mempengaruhi pertumbuhannya, seperti suhu, kelembaban, aerasi dan sumber energi atau nutrisi berupa bahan organik. Tetapi secara umum populasi bakteri yang terbesar terdapat di bagian permukaan atau 15 cm – 25 cm dari permukaan tanah (Pinton *et al.*, 2001). Mikroba tanah lebih banyak ditemukan pada permukaan tanah karena banyak tersedia bahan organik. Oleh karena itu, mikroba tanah lebih banyak

berada pada lapisan tanah yang paling atas (Pinton *et al.*, 2001). Distribusi mikroba dalam suatu horizon pada suatu profil tanah dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Distribusi mikroba dalam horizon dari suatu profil tanah (Marianah, 2015)

Kedalaman (cm)	Organisme/gr tanah x10 ³				
	Bakteri aerob	Bakteri anaerob	Actinomycetes	Fungi	Algae
3-8	7.800	1.950	2.080	119	25
20-25	1.800	379	245	50	5
35-40	472	98	49	14	0,5
65-75	10	1	5	6	0,1
135-145	1	0,4	-	3	-

2.3 *Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)*

Rizosfer merupakan suatu zona lingkungan mikro yang berada di sekitar perakaran tanaman dan berperan sebagai pertahanan luar bagi tanaman terhadap serangan patogen akar. Daerah rizosfer dicirikan dengan aktivitas biologinya yang paling tinggi pada tanah. Pada daerah rizosfer terdapat sekitar 10⁶ - 10⁹ sel populasi bakteri, dan fungi sekitar 10⁵ - 10⁶ per gram tanah rizosfer (Sylvia, 2005). Bakteri rizosfer bermanfaat antara lain dalam fiksasi nitrogen, pemanfaatan bakteri fiksasi N₂ baik yang diaplikasikan melalui tanah maupun disemprotkan pada tanaman akan dapat meningkatkan efisiensi pemupukan N hal ini akan mendukung upaya pencapaian pertanian yang ramah lingkungan dan berkelanjutan, penggunaan bakteri fiksasi N₂ berpotensi dalam mengurangi kebutuhan pupuk N sintesis, meningkatkan produksi dan pendapatan usahatani dengan masukan yang lebih murah (Saraswati dan Sumarsono, 2008). Hasil Penelitian Bhattacharyya dan Jha (2012) menyatakan bahwa bakteri yang berperan sebagai penambat nitrogen yang banyak ditemukan, diantaranya genera *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Azocarus*, dan *Rhizobium*.

Bakteri rizosfer dapat berperan untuk pelarut fosfat, alternatif untuk meningkatkan efisiensi pemupukan P untuk mengatasi rendahnya P yang tersedia atau kejenuhan P di dalam tanah yaitu dengan memanfaatkan mikroorganisme pelarut P sebagai pupuk hayati. Bakteri pelarut P dapat melarutkan P yang sukar larut menjadi larut, baik yang berasal dari dalam tanah maupun dari pupuk sehingga akan diserap tanaman (Saraswati dan Sumarsono, 2008). Hasil penelitian

Bhattacharyya dan Jha (2012) menyatakan bahwa bakteri yang berperan sebagai pelarut fosfat pada tanah yang banyak ditemukan, diantaranya genera *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Microbacterium*, *Flavobacterium*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Rhizobium*, dan *Serratia*. Bakteri genera *Pseudomonas* dan *Bacillus* merupakan bakteri pelarut fosfat yang memiliki kemampuan terbesar sebagai biofertilizer dengan cara melarutkan unsur fosfat yang terikat pada unsur lain (Fe, Al, Ca, dan Mg), sehingga unsur P tersebut tersedia bagi tanaman (Widiawati dan Suliasih, 2006).

Peranan rizobakteri akan menjadi lebih baik apabila didukung oleh kondisi lingkungan dan hubungan antara bakteri dengan tanaman sekitarnya, dengan adanya hubungan yang baik, maka akar tanaman akan melepaskan bahan organik dan anorganik berupa eksudat penting ke dalam rizosfer (Salamiah dan Raihani, 2015). Gray dan Smith (2005) menyatakan bahwa tingkat asosiasi PGPR berkisar pada kedekatan bakteri dengan akar. Secara umum, PGPR dapat dipisahkan menjadi ekstraseluler (ePGPR), yang ada di rizosfer, permukaan akar, atau di ruang antara sel-sel root korteks, dan intraseluler (iPGPR), yang ada di dalam sel-sel akar, umumnya dalam struktur nodular khusus (Figueiredo *et al.*, 2011). Beberapa contoh dari ePGPR, diantaranya genera *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, dan *Serratia* (Bhattacharyya dan Jha, 2012). Beberapa contoh dari iPGPR, diantaranya genera *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, dan *Rhizobium* yang berasal dari family Rhizobiaceae (Bhattacharyya dan Jha, 2012).

Secara umum, peran PGPR mendorong pertumbuhan tanaman secara langsung dengan memfasilitasi sumber daya (nitrogen, fosfat dan mineral esensial) atau tingkat terbentuknya hormon tanaman, atau secara tidak langsung dengan mengurangi efek penghambatan berbagai patogen terhadap pertumbuhan dan perkembangan tanaman sebagai bentuk agen biokontrol (Glick, 2012). Menurut GarcõÂasalamanca *et al.* (2013) berpendapat bahwa PGPR dapat membatasi atau menghambat pertumbuhan patogen potensial tanaman dengan memproduksi antibiotik, serta bahan kimia fungisida dan insektisida. PGPR merangsang pertumbuhan tanaman melalui mobilisasi nutrisi di tanah, menghasilkan banyak

regulator pertumbuhan tanaman, melindungi tanaman dari fitopatogen dengan mengendalikan atau menghambat, memperbaiki struktur tanah dan bioremediasi tanah yang tercemar dengan menghilangkan logam berat beracun dan menghilangkan senyawa xenobiotik (seperti pestisida) (Ahemad dan Kibret, 2014).

Kemampuan PGPR sebagai biokontrol dapat dilihat dari kemampuannya menghasilkan siderofor dan *hydrogen cyanide* (HCN). Siderofor adalah senyawa yang mampu mengikat besi (Fe^{3+}), dan responsif untuk pelarutan serta pengangkutan ke dalam sel bakteri (Sharma dan Johri, 2003). Kelompok bakteri yang mampu menghasilkan siderofor menguntungkan untuk tanaman karena dapat menekan patogen (Nudel *et al.*, 2001). Terjadinya kekurangan Fe^{3+} yang dibutuhkan oleh patogen karena Fe^{3+} sudah terikat oleh siderofor (Sharma dan Johri, 2003). Selain itu besi merupakan elemen penting dalam perkembangan penyakit, sehingga dengan terikatnya besi oleh siderofor maka patogen kurang mampu menginfeksi, sehingga menghambat perkembangan penyakit (Prihatiningsih *et al.*, 2017). Produksi HCN memiliki peran penting dalam aktivitas biokontrol terhadap patogen, karena berperan sebagai antifungal. Menurut hasil dari penelitian Michelsen dan Stougaard (2012) menunjukkan bahwa *Pseudomonas fluorescens* (isolat In5) memproduksi HCN secara *in vitro* memiliki tingkat yang sama terhadap agen biokontrol bakteri *Pseudomonas* secara *in vivo* dan bakteri *Pseudomonas fluorescens* yang mampu memproduksi HCN dapat menghambat pertumbuhan miselia jamur *Rhizoctonia solani* dan jamur *Pythium aphanidermatum*.

Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) mampu menginduksi ketahanan tanaman melalui perakaran tanaman. Penelitian Van Peer *et al.* (1991) mendapatkan hasil bahwa ketika menguji aktivitas antagonis *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417 terhadap *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi* pada tanaman anyelir, ditemukan bahwa bakteri ketika dalam keadaan terbatas pada sistem perakaran tanaman, tetap mampu melindungi tanaman ketika patogen melakukan inokulasi ke dalam batang. Fenomena tersebut yang dinamakan *Induced Systemic Resistance* (ISR) (Van Loon dan Bakker, 2005). Induksi rhizobacteria memicu reaksi di akar tanaman yang memunculkan sinyal yang menyebar secara sistematis di seluruh jaringan tanaman dan meningkatkan kapasitas pertahanan diseluruh jaringan untuk infeksi berikutnya oleh patogen, dengan demikian ISR

yang dilakukan oleh PGPR memperluas tindakan melindungi tanaman dari aktivitas antagonistik terhadap patogen tular tanah di rizofe hingga stimulasi pertahanan pada jaringan atas permukaan tanah terhadap foliar patogen (Van Loon dan Bakker, 2005).

2.4 Pengaruh Kerapatan Vegetasi Terhadap Mikroba Tanah

Mikroba tanah memiliki peran sebagai salah satu indikator kesuburan tanah. Adanya mikroba tanah menandakan kualitas tanah tersebut subur, karena kelompok mikroba tanah umumnya bertindak sebagai dekomposer dalam suatu ekosistem. Menurut Allison (2013) mikroba tanah bertanggung jawab terhadap sebagian besar proses-proses biologis yang berkaitan dengan siklus unsur hara dan dekomposisi bahan organik.

Kelimpahan mikroba khususnya bakteri rizosfer sangat dipengaruhi adanya kerapatan vegetasi yang menyebabkan kondisi lingkungan berbeda pada setiap lahan pertanian. Tanah hutan mampu memberikan sumber karbon organik dan sumber energi untuk mikroba yang berasal dari serasah-serasah. Kerapatan vegetasi atau jumlah vegetasi mampu mengikat material organik dan nutrisi melalui serasah atau sisa tanaman dan eksudat akar yang dihasilkan oleh tanaman untuk pertumbuhan mikroba sehingga akan berpengaruh terhadap jumlah populasi mikroba dalam tanah (Widawati dan Suliasih, 2006). Waksman dan Starkey (1981) melaporkan bahwa bakteri rizosfer dapat meningkat dengan cepat berdasarkan adanya hubungan kelompok yang menguntungkan, kelompok merugikan, dan kelompok netral.

Menurut Subagiyo *et al.* (2015) pertumbuhan merupakan hasil metabolisme yang berlangsung didalam sel yang dipengaruhi oleh enzim, peningkatan suhu akan menyebabkan peningkatan pertumbuhan (optimum) hingga suatu saat peningkatan suhu tidak diikuti dengan meningkatnya pertumbuhan. Menurut Elias *et al.* (2014) suhu merupakan faktor fisik yang berpengaruh pada laju pertumbuhan melalui pengaruhnya terhadap reaksi kimia dan stabilitas struktur molekul protein didalam sel bakteri. Selain itu, Nedwell (1999) menyatakan bahwa pengaruh suhu terhadap jumlah nutrisi tersedia terjadi melalui perubahan asosiasi mikroba terhadap penyerapan nutrisi yang menyebabkan pertumbuhan optimum mikroba pada suhu tertentu.

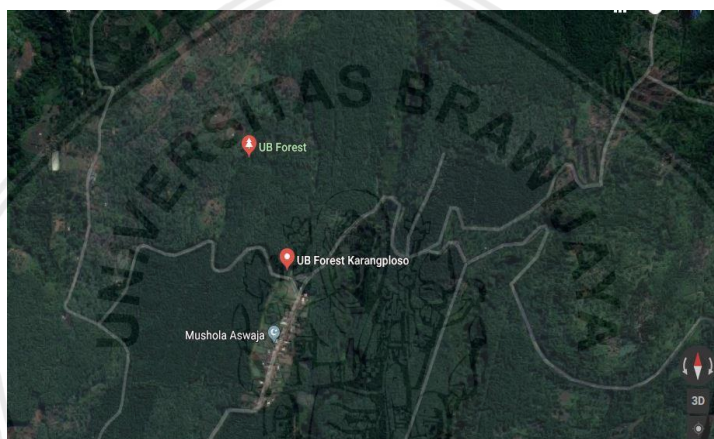
Pertumbuhan bakteri pelarut fosfat sangat dipengaruhi oleh kemasaman tanah, pertumbuhan kelompok bakteri optimum pada pH sekitar netral dan meningkat seiring dengan meningkatnya pH tanah, secara umum bakteri pelarut fosfat hidup pada kisaran pH 5,0–10,6 (Illmer dan Schinner, 1995). Bakteri penambat nitrogen sangat sensitif terhadap pH rendah, secara umum pertumbuhan optimum bakteri penambat nitrogen terjadi pada pH 5,5–7,0 (Saraswati *et al.*, 1994). Mikroba tanah memberikan hasil paling baik pada tanah dengan kandungan bahan organik tinggi (Smith *et al.*, 1961), semakin banyak bahan organik yang diberikan pada tanah akan diikuti dengan peningkatan total mikroba pada tanah (Junita *et al.*, 2014).



III. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Plot penelitian berada di hutan pendidikan Universitas Brawijaya (*UB Forest*) yang terletak pada geoposisi 7°53'35" LS dan 112°53'41" BT, tepatnya berada di Desa Sumpersari, Kecamatan Karangploso, Kabupaten Malang, Jawa Timur. Isolasi, purifikasi, dan karakterisasi dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya (LSIH UB) dan Laboratorium Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya. Penelitian dimulai pada bulan Desember 2018 hingga bulan Juni 2019.



Gambar 1. Citra Google Earth lokasi pengamatan

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: GPS, Termometer (HOBO MX2200), meteran, tali raffia, label, cetok, kantong plastik, spidol permanen, Handsprayer ukuran 75 ml, pH meter, cawan petri diameter 9 cm, tabung reaksi, stick L, jarum ose, tube ukuran 2 ml, gelas ukur 50 ml, tabung Erlenmeyer ukuran 250 ml, Beaker Glass ukuran 500 ml, botol media (*schott*) ukuran 500 ml dan 1000 ml, batang pengaduk, Object Glass, Cover Glass, micropipette ukuran 100 μ m, bunsen, korek api, Autoclave, *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC), oven, pipet tetes, kertas label, timbangan analitik, mikroskop Compound perbesaran 1000 x (100 x 10).

Bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain sampel tanah rizosfer, alkohol 70% dan 95%, aquades steril, media Nutrient Agar (NA), media Pikovskaya, media Burk, *Aluminium Foil*, plastik *Wrapping*, kapas, *Tissue*,

larutan kristal violet, larutan safranin, larutan iodine, larutan KOH 3%, dan spirtus yang didapatkan dari toko kimia.

3.3 Metode Penelitian

Metode pelaksanaan yang dilakukan yaitu terdiri dari metode survei, eksplorasi, uji aktivitas PGPR pada media agar, dan uji korelasi. Metode survei dilakukan untuk mendapatkan informasi terkait kondisi lahan. Eksplorasi dan uji aktivitas PGPR dilakukan dengan cara pengambilan sampel tanah dari 3 plot yang berbeda pengelolaan agroforestri sebagai bahan isolasi, purifikasi, analisa, dan karakterisasi isolat bakteri tanah. Uji korelasi dilakukan dengan melihat hubungan antara iklim mikro dengan keanekaragaman PGPR yang didapat pada setiap plot pengamatan.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Penentuan Plot dan Pengambilan Sampel Tanah

1. Penentuan Plot Pengamatan

Kegiatan pencarian plot pengamatan dilakukan dengan sengaja (*purposive sampling*) yaitu dengan mencari lokasi tanaman kopi yang sesuai kriteria yang telah ditentukan. Pencarian plot dipilih pada lokasi yang terdapat tanaman kopi dan tanaman pinus sebagai tanaman penanungnya. Dalam penelitian ini terdapat 3 plot pengamatan, yaitu (a) plot LC (*Low density Coffee*) merupakan plot dengan manajemen tanaman kopi dengan kepadatan populasi rendah yang memiliki kriteria tanaman kopi tidak dilakukan pemangkasan bentuk dan tidak ada pengelolaan tanaman setiap tahunnya kecuali hanya pada saat awal penanaman dahulu, (b) plot MC (*Medium density Coffee*) merupakan plot dengan manajemen tanaman dengan kepadatan populasi sedang yang memiliki kriteria tanaman kopi dilakukan pemangkasan bentuk sekali, adanya pengelolaan tanaman kopi seperti pemupukan walaupun jarang dilakukan, (c) plot HC (*High density Coffee*) merupakan plot dengan manajemen tanaman kopi dengan kepadatan populasi yang tinggi yang memiliki kriteria tanaman kopi dilakukan pemangkasan bentuk sekali, adanya pemupukan secara rutin setiap tahunnya, tanaman kopi dilakukan pewiwilan atau pembuangan tunas air pada tanaman kopi, pengendalian gulma dilakukan secara manual disekitar tanaman kopi.

Selanjutnya, dilakukan penandaan lokasi menggunakan tali rafia pada lahan yang digunakan sebagai plot pengamatan. Tiap plot sampel pengamatan berukuran 40 m x 60 m. Setiap plot pengamatan terdiri dari 24 sub plot dengan ukuran masing-masing 10m x 10m.

Tabel 2. Komposisi dan kerapatan pohon

Penggunaan Tanaman	Plot Pengamatan (2400 m ²)		
	LC	MC	HC
Kopi	171	172	179
Pinus	329	411	543
Total (individu/2400 m ²)	500	583	722
Total (individu/ha)	2083	2429	3008
Persentase Kopi (%)	34	30	25
Persentase Pinus (%)	66	70	75

LC (Manajemen tanaman dengan kepadatan populasi rendah)

MC (Manajemen tanaman dengan kepadatan populasi sedang)

HC (Manajemen tanaman dengan kepadatan populasi tinggi)

Gambar 2. Denah plot pengamatan, *Low density Coffee* (LC), *Medium density Coffee* (MC), dan *High density Coffee* (HC).

2. Pengambilan Sampel Tanah

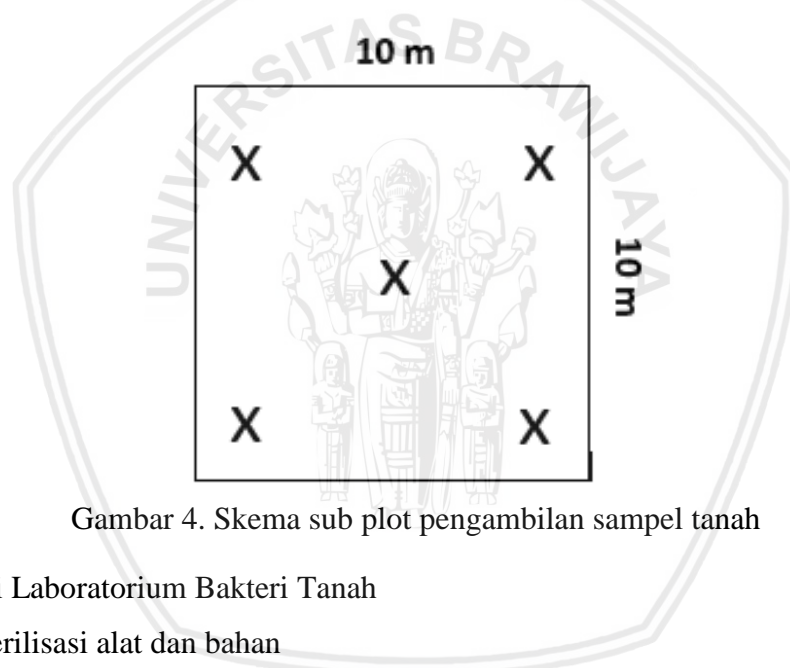
Sampel tanah diambil dari rizosfer tanaman kopi dengan pinus pada lahan agroforestri di UB Forest. Tanah diambil di ke tiga plot pengamatan, yaitu LC, MC, dan HC. Pengambilan sampel tanah dilakukan pada 5 sub plot yang berada ditengah plot pengamatan. Hal ini bertujuan untuk menghindari kemungkinan terjadinya pengaruh dari faktor lain. Pengambilan sampel tanah rizosfer dilakukan dengan metode diagonal (Ervayenri *et al.*, 1999).

Pengambilan tanah diambil pada kedalaman 0–20 cm di rizosfer tanaman kopi. Tanah diambil pada perpotongan diagonal sehingga akan didapatkan 5 sampel tanah per plot. Sampel tanah diambil dengan bobot masing-masing 100 g sehingga total berat sampel tanah per plot 500 g. sampel tanah tersebut selanjutnya dicampur menjadi satu dan dikompositkan menjadi satu dan dimasukkan ke dalam kantong

plastik, kemudian sampel tanah dibawa ke Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya untuk dilakukan isolasi.

A1	A2	A3	A4	A5	A6
B1	B2	B3	B4	B5	B6
C1	C2	C3	C4	C5	C6
D1	D2	D3	D4	D5	D6

Gambar 3. Denah sub plot tiap plot pengamatan (A, B, C, dan D) dan titik pengambilan sampel tanah yang ditandai dengan warna kuning.



Gambar 4. Skema sub plot pengambilan sampel tanah

3.4.2 Uji Laboratorium Bakteri Tanah

1. Sterilisasi alat dan bahan

Sterilisasi merupakan kegiatan yang bertujuan untuk membebaskan semua bahan dari mikroba perusak. Sterilisasi yang cepat dan efektif dilakukan pada tekanan tinggi agar tidak merusak bahan dalam kaleng, selama 15 menit pada suhu 121°C pada tekanan 1 atm (Anton, 2008).

Sterilisasi yang dilakukan yaitu dengan mencuci peralatan dengan air mengalir. Selanjutnya peralatan dibungkus dengan kertas dan dibungkus dengan plastik tahan panas. Kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C pada tekanan 1 atm.

2. Isolasi bakteri dari sampel tanah

Isolasi bakteri tanah dengan metode *Dillusion plate* atau metode pengenceran bertingkat dengan cara mengambil sampel tanah pada masing-masing lahan. Sampel tanah yang telah dihomogenkan, diambil sebanyak 1 gram kemudian diletakkan pada tabung reaksi dengan menambahkan aquades steril hingga mencapai 10 ml. Tanah dan aquades dicampur dan dikocok hingga homogen. Suspensi yang didapat diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan menambahkan aquades steril 9 ml dan diencerkan hingga mencapai tingkat pengenceran 10^{-7} cfu per gram. Pengambilan tingkat pengenceran 10^{-5} – 10^{-7} cfu per gram dikarenakan bakteri pada tingkat pengenceran tersebut dapat tumbuh dengan baik dan tidak berdekatan. Hasil pengenceran diambil 100 μ l dituang ke dalam cawan Petri yang berisi media Pikovskaya padat dengan diratakan menggunakan Stick L dan cawan petri direkatkan menggunakan plastik wrapping dan diinkubasi pada suhu ruang 30 °C selama 5-7 hari untuk mendapatkan kelimpahan bakteri berupa koloni tunggal (Chung *et al.*, 2005).

3. Purifikasi

Purifikasi atau pemurnian dilakukan pada setiap bakteri yang dianggap berbeda berdasarkan morfologi bakteri dalam cawan petri yang meliputi warna dan bentuk koloni bakteri yang ditemukan dengan menggunakan jarum ose. Bakteri yang terambil diletakkan di cawan petri berisi media NA. Purifikasi dilakukan dalam LAFC (*Laminar Air Flow Cabinet*) untuk mencegah kontaminasi dari mikroorganisme lain. Hasil isolasi diinkubasi pada suhu ruang 27 °C-28°C dan dilakukan pengamatan pada koloni.

4. Seleksi *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR)

Sifat bakteri sebagai PGPR dapat ditentukan melalui kemampuannya sebagai *biofertilizer* (kemampuan meningkatkan ketersediaan unsur hara atau nutrisi bagi tanaman). Kemampuan biofertilizer dapat diketahui melalui aktivitas PGPR dalam menambat nitrogen dan melarutkan fosfat. Berikut beberapa seleksi bakteri rizosfer yang akan dilakukan:

a. Seleksi bakteri penambat nitrogen

Seleksi penambatan nitrogen dilakukan secara kualitatif yaitu dengan menumbuhkan seluruh isolat bakteri hasil eksplorasi pada media Burk. Media

Burk merupakan media yang mengandung garam anorganik yang bersumber dari karbohidrat namun tidak mengandung nitrogen di dalamnya. Komposisi media Burk terdiri dari MgSO_4 (0,2 g), K_2HPO_4 (0,8 g), KH_2PO_4 (0,2 g), CaSO_4 (0,13 g), FeCl_3 (0,00145 g), Na_2MoO_4 (0,000253), Sukrosa (20 g), Agar (15g), dan Aquades (1 L). Bakteri hasil purifikasi yang terdapat pada media NA dipindahkan pada media Burk melalui metode *streak plate*. Pengamatan pertumbuhan koloni bakteri dilakukan setelah diinkubasi selama 5-7 hari pada suhu 30°C . Isolat yang mampu tumbuh pada media Burk menunjukkan bahwa isolat mampu menambat nitrogen (Himedia, 2015).

b. Seleksi bakteri pelarut fosfat

Seleksi pelarut fosfat dilakukan dengan cara bakteri hasil purifikasi diinkubasi selama 24 jam kemudian diambil dengan jarum ose lalu dibuat suspense dalam aquades steril 1 ml di dalam *tube eppendorf*, kemudian disiapkan kertas saring steril dengan diameter 5 mm dimasukkan ke dalam suspense selama ± 1 menit dan ditiriskan selama 3 jam (Kawaguci *et al.*, 2008), selanjutnya kertas saring ditanam di media Pikovskaya dan diinkubasi selama 5-7 hari pada suhu 30°C (Chung *et al.*, 2005). Komposisi media Pikovskaya terdiri dari Glukosa (10 gr), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (5 gr), NaCl (0,2 g), KCl (0,2 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g), MnSO_4 (2,5 mg), FeSO_4 (2,5 mg), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,5 g), ekstrak yeast (0,5 g), dan Akuades (1 L). Kemampuan isolat dalam melarutkan fosfat ditandai oleh terbentuknya zona bening (*halozone*) di sekitar pertumbuhan koloni (Chung *et al.*, 2005).

5. Karakterisasi bakteri

Karakterisasi bakteri dilakukan dengan cara pengecatan Gram, uji KOH 3% dan pengamatan secara makroskopis dengan mengamati kenampakan morfologi bakteri meliputi warna koloni, bentuk koloni, pola persebaran. Pengamatan secara mikroskopis dengan mengamati kenampakan morfologi koloni bakteri menggunakan mikroskop.

Karakterisasi morfologi sel bakteri menggunakan beberapa uji yang dapat dilakukan, diantaranya yaitu:

a. Pengecatan Gram

Dengan metode ini bakteri dapat dikelompokkan menjadi dua yaitu, bakteri gram positif dan bakteri gram negatif didasarkan dari reaksi atau sifat bakteri

terhadap cat tersebut. Pengujian dilakukan dengan menyediakan isolat bakteri yang akan digunakan dan diletakkan pada cover glass kemudian ditetesi dengan aquades 1 tetes setelah itu mengambil isolat bakteri dengan jarum ose lalu meletakkan diatas cover glass dan diayunkan diatas bunsen agar kering kemudian ditetesi dengan kristal violet 1 tetes dan disiram dengan air mengalir kemudian diikeringkan kembali diatas bunsen dan diberi iodine 1 tetes dan disiram dengan air mengalir kemudian diikeringkan lagi diatas bunsen dan disemprot dengan alkohol dan dibilas dengan air mengalir dan diikeringkan lagi diatas bunsen setelah itu diberi safranin 1 tetes dan dibilas dengan air mengalir dan diikeringkan lagi diatas bunsen. Apabila isolat berwarna merah maka termasuk gram negatif dan apabila berwarna ungu termasuk kedalam gram positif.

b. Uji KOH 3%

Uji ini dilakukan dengan mencampurkan satu lup isolat bakteri pada gelas obyek yang telah ditetesi KOH 3%, kemudian diamati terbentuk tidaknya lendir. Jika terbentuk lendir maka bakteri tersebut dikelompokkan ke dalam gram negatif dan sebaliknya jika tidak terbentuk lendir maka bakteri tersebut tergolong gram positif (Schaad *et al.*, 2001).

3.5 Variabel Pengamatan

a. Aktivitas PGPR

Kemampuan bakteri hasil seleksi dalam menambat nitrogen dapat dilihat dari tumbuhnya bakteri pada media Burk. Kemampuan bakteri sebagai pelarut fosfat dapat dilihat dari terbentuknya zona bening (*halozone*) pada media Pikovskaya. Hasil seleksi kemudian didata dan didokumentasikan dengan kamera.

b. Kelimpahan bakteri

Variabel pengamatan pada pengujian ini merupakan data kuantitatif. Total koloni bakteri dihitung setelah masa inkubasi bakteri pada media NA selama 48 jam pada suhu ruang. Sampel yang dihitung yaitu pada bakteri yang dibiakan pada media NA dan hasil pengenceran. Total koloni yang dapat dihitung pada media NA adalah koloni dengan jumlah 30-300. Perhitungan total koloni dapat dihitung berdasarkan rumus Dwidjoseputro (2005):

$$\text{Kelimpahan bakteri (cfu/g)} = \frac{\sum \text{koloni terhitung} \times Y}{\text{Berat tanah}}$$

Keterangan: Y = Faktor pengenceran x volume sampel

c. Indeks keanekaragaman bakteri

Keanekaragaman bakteri rizosfer sebagai PGPR dihitung berdasarkan morfologi koloni yang berbeda. Perbedaan morfologi koloni dianalisis menggunakan indeks keanekaragaman berdasarkan Magurran (1988):

$$H' = - \sum_{i=1}^n p_i \ln p_i$$

Keterangan : H' = Indeks keanekaragaman Shannon

p_i = Jumlah individu di bandingkan jumlah seluruh populasi ($\sum n_i/N$)

i = Jumlah individu spesies ke- i

Tabel 3. Nilai tolak ukur indeks keanekaragaman (Magurran, 1988)

Nilai Tolak Ukur	Keterangan
$H' < 1,5$	Keanekaragaman rendah
$1,5 < H' < 3,5$	Keanekaragaman sedang
$H' > 3,5$	Keanekaragaman tinggi

d. Pengamatan lingkungan meliputi beberapa pengamatan, yaitu:

1. Suhu tanah ($^{\circ}\text{C}$)

Pengamatan suhu dilakukan dengan mengukur suhu lingkungan disekitar tanaman menggunakan alat termometer (HOB0 MX2200) dengan meletakkan sensor diantara rizosfer tanaman kopi dan pinus.

2. pH

Timbang 10 g sampel tanah yang sudah kering udara dan yang sudah lolos ayakan 2 mm kemudian masukkan dalam botol plastic. Tambahkan 10 ml aquades (untuk penetapan pH H_2O). Timbang 10 g tanah kering udara yang sudah lolos ayakan 2 mm kemudian masukkan ke dalam botol plastic, tambahkan 10 ml LCl 1 N (untuk penetapan pH KCl 1N). kocok dengan mesin pengocok selama 60 menit kemudian diukur menggunakan pH meter yang sudah dikalibrasi dengan larutan penyangga pH= 4 dan pH= 7 (catat pH yang ditampilkan pada pH meter).

3. Bahan organik (%)

Pengukuran bahan organik menggunakan metode Walkey – Black yaitu timbang 0,5 g tanah yang telah lolos ayakan 0,5 mm (0,25 g untuk tanah yang organikya tinggi dan 0,1 g tanah untuk bahan organik) masukkan ke labu Erlenmeyer 500 ml. Tambahkan 10 ml $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1N ke

dalam labu Erlenmeyer. Tambahkan 20 ml H_2SO_4 ke dalam labu Erlenmeyer dan kemudian digoyangkan supaya tanah bereaksi sempurna. Biarkan campuran tersebut selama 30 menit, lalu tambahkan H_2SO_4 dilakukan di ruang asam. Sebuah blanko (tanpa tanah) dikerjakan dengan cara yang sama. Kemudian campuran tadi diencerkan dengan H_2O 200ml dan tambahkan 100 ml H_3PO_4 85%, tambahkan indikator Difenilamina 30 tetes. Setelah itu larutan dapat dititrasi dengan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1N melalui buret. Titrasi dihentikan ditandai perubahan warna gelap menjadi hijau terang. Demikian dengan juga dengan blanko. Perhitungan bahan organik dapat diketahui berdasarkan rumus Walkey dan Black (1934):

Perhitungan C. organik:

$$\text{C.org (\%)} = \frac{\text{ml.Blanko} - \text{ml.Sampel} \times 3 \times \text{Fka}}{\text{ml.Blanko} \times \text{Brt. Sampel}}$$

Perhitungan bahan organik:

$$\text{Bhn. Org (\%)} = \% \text{ C.org} \times 1.73$$

3.6 Analisa Data

Data hasil pengamatan yang didapatkan dianalisis menggunakan uji korelasi untuk mengetahui pengaruh dan hubungan antar parameter pengamatan. Uji korelasi bertujuan untuk mengukur derajat kedekatan suatu hubungan yang terjadi antar variabel serta untuk mengetahui kekuatan hubungan tersebut dalam nilai koefisien korelasi (r).

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Seleksi Bakteri Rizosfer Sebagai *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*

Hasil eksplorasi bakteri rizosfer yang dilakukan pada tanaman kopi dengan naungan pinus di kawasan UB Forest dari semua plot sampel pengamatan diperoleh 54 isolat bakteri berdasarkan morfologi koloni tunggal bakteri yang berbeda. Selanjutnya isolat bakteri rizosfer diseleksi untuk mengetahui perannya sebagai *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR).

a. Bakteri penambat nitrogen

Bakteri hasil eksplorasi sebanyak 54 isolat ditumbuhkan pada media Burk. Bakteri yang mampu berperan sebagai penambat nitrogen dapat diketahui dari kemampuan bakteri yang tumbuh dengan baik pada media Burk. Hasil seleksi bakteri sebagai penambat nitrogen disajikan dalam tabel 4.

Tabel 4. Kemampuan bakteri sebagai penambat nitrogen pada media Burk

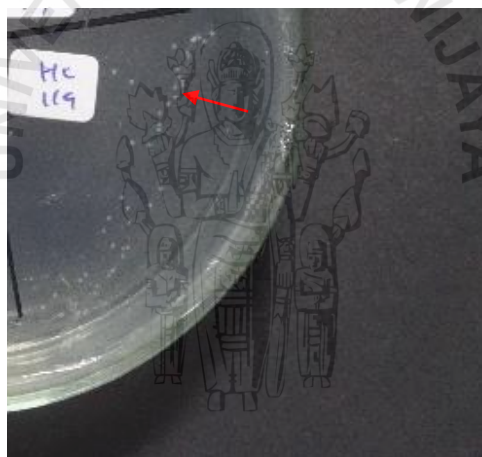
Kode Isolat	Keterangan	Kode Isolat	Keterangan	Kode Isolat	Keterangan
LC101	+	MC101	-	HC101	+
LC102	+	MC102	-	HC102	-
LC103	+	MC103	-	HC103	+
LC104	+	MC104	-	HC104	+
LC105	-	MC105	+	HC105	+
LC106	-	MC106	+	HC106	-
LC107	-	MC107	+	HC107	+
LC108	-	MC108	-	HC108	-
LC109	+	MC109	-	HC109	+
LC110	+	MC110	+	HC110	-
LC111	-	MC111	+	HC111	+
LC112	+	MC112	+	HC112	-
LC113	+	MC113	+	HC113	+
LC114	-	MC114	+	HC114	+
LC115	+	MC115	+	HC115	+
LC116	+	MC116	+	HC116	+
LC117	+	MC117	-	HC117	-
LC118	+	MC118	+	HC118	+

Keterangan: (+) beraksi positif/tumbuh, (-) beraksi negatif/tidak tumbuh

Data pada tabel 4 menunjukkan bahwa 65% atau terdapat 35 isolat bakteri dari 54 isolat bakteri hasil eksplorasi mampu tumbuh pada media Burk. Sebagian besar bakteri hasil eksplorasi mampu menambat nitrogen. Handayanto dan Hairiah

(2007) menyatakan bahwa salah satu jenis bakteri yang dapat menambat nitrogen dari atmosfer adalah bakteri yang berada disekitar perakaran tanaman. Bakteri penambat nitrogen lebih banyak ditemukan di daerah rizosfer dibandingkan non-rizosfer (Franche *et al.*, 2009).

Bakteri rizosfer merupakan bakteri yang hidup di daerah perakaran tanaman yang dapat mengikat N_2 bebas di udara yang kemudian mereduksinya menjadi senyawa ammonia. Marroqui *et al.* (2001) menyatakan bahwa kemampuan bakteri dalam melakukan penambatan nitrogen disebabkan oleh aktivitas nitrogenase. Dua molekul ion NH_3^+ yang dapat diserap oleh tanaman dihasilkan oleh bakteri pengikat nitrogen yang dapat mengikat nitrogen di udara dengan bantuan enzim nitrogenase yang dihasilkan oleh bakteri selama proses penambatan nitrogen (Giordano dan Hirsch, 2004).



Gambar 5. Kemampuan tumbuh isolat bakteri media Burk

b. Bakteri pelarut fosfat

Bakteri hasil eksplorasi sebanyak 54 isolat ditumbuhkan pada media Pikovskaya. Bakteri yang mampu berperan sebagai pelarut fosfat dapat diketahui dari kemampuan bakteri yang dapat membentuk zona bening disekitar bakteri. Hasil seleksi bakteri sebagai pelarut fosfat dapat disajikan dalam tabel 5.

Tabel 5. Kemampuan bakteri sebagai pelarut fosfat pada media Pikovskaya

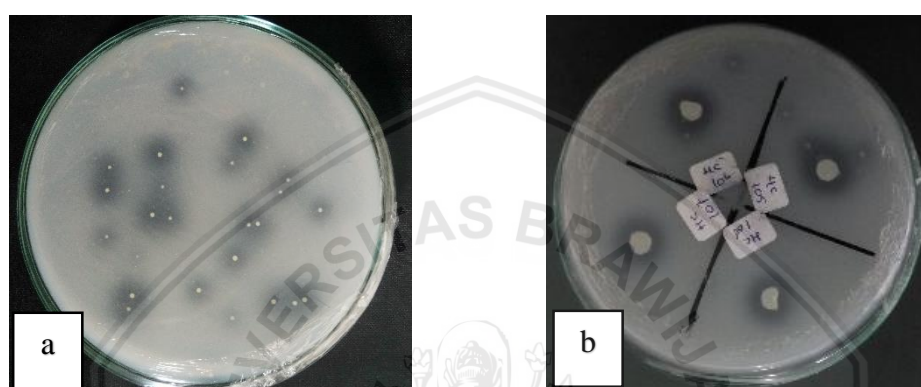
Kode Isolat	Lebar Zona Bening (cm)	Kode Isolat	Lebar Zona Bening (cm)	Kode Isolat	Lebar Zona Bening (cm)
LC101	1,24	MC101	0,86	HC101	1,30
LC102	1,29	MC102	1,01	HC102	1,24
LC103	1,24	MC103	0,94	HC103	1,36
LC104	1,24	MC104	1,03	HC104	1,21
LC105	1,00	MC105	1,19	HC105	1,24
LC106	0,99	MC106	1,23	HC106	1,17
LC107	1,10	MC107	1,14	HC107	1,20
LC108	1,07	MC108	1,23	HC108	1,11
LC109	1,29	MC109	1,09	HC109	1,20
LC110	1,33	MC110	1,20	HC110	1,17
LC111	1,21	MC111	-	HC111	1,24
LC112	1,29	MC112	1,06	HC112	1,21
LC113	-	MC113	1,29	HC113	1,23
LC114	1,26	MC114	1,26	HC114	1,34
LC115	1,21	MC115	1,17	HC115	1,24
LC116	1,20	MC116	1,24	HC116	-
LC117	-	MC117	1,29	HC117	1,20
LC118	1,33	MC118	-	HC118	1,24

Keterangan: (-) beraksi negatif/tidak tumbuh

Data pada tabel 5 menunjukkan bahwa 91% atau terdapat 49 isolat bakteri dari 54 isolat bakteri hasil eksplorasi mampu membentuk zona bening pada media Pikovskaya yang berarti berperan sebagai bakteri pelatur fosfat (BPF). Isolat LC110 dan isolat LC118 yang termasuk kedalam plot LC mampu menghasilkan lebar zona bening yang lebih tinggi dibandingkan dengan isolat yang lain pada plot LC yaitu sebesar 1,33 cm serta tampak jelas. Isolat MC117 dan isolat MC113 yang termasuk kedalam plot MC mampu menghasilkan lebar zona bening yang lebih tinggi dibandingkan dengan isolat yang lain pada plot MC yaitu sebesar 1,29 cm serta tampak jelas. Isolat HC103 dan isolat HC114 yang termasuk kedalam plot HC mampu menghasilkan lebar zona bening yang lebih tinggi dibandingkan dengan isolat yang lain pada plot HC secara berurutan yaitu sebesar 3,36 cm dan 3,34 cm serta tampak jelas.

Adanya *halozone* (zona bening) yang muncul disekitar tempat bakteri ditumbuhkan pada media Pikovskaya menandakan kemampuan bakteri melarutkan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (kalsium fosfat) menjadi ortofosfat (Widawati dan Suliasih., 2006). Bakteri hasil seleksi pada media Pikovskaya mampu menghasilkan enzim fosfatase. Illmer dan Schiner (1992) menyatakan bahwa bakteri pelarut fosfat dapat

menambah aktivasi penyerapan unsur P pada tumbuhan, melarutkan mineral-mineral fosfat melalui sekresi asam organik dan melibatkan enzim fosfatase serta berperan dalam mentransfer energi, menyusun protein, koenzim, asam nukleat, dan senyawa-senyawa metabolik lain. Bakteri pelarut fosfat yang berbeda dapat melarutkan mineral-mineral fosfat secara berbeda. Zaidi *et al.* (2009) menyatakan bahwa pelarutan dan mineralisasi fosfat dapat berasosiasi dalam strain bakteri yang sama.



Gambar 6. Kemampuan isolat bakteri pada media Pikovskaya, (a) hasil isolasi, (b) isolat bakteri mampu menghasilkan zona bening

4.2 Karakteristik *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*

Bakteri hasil eksplorasi sebanyak 54 isolat dilakukan karakterisasi fungsinya sebagai panambat nitrogen maupun pelarut fosfat, morfologi koloni tunggal isolat bakteri, dan morfologi sel serta pewarnaan Gram isolat bakteri. Hasil karakteristik 54 isolat bakteri dapat disajikan dalam tabel 6.

Tabel 6. Karakteristik isolat bakteri hasil eksplorasi

Isolat	Karakteristik		Morfologi Koloni				Morfologi Sel	
	N	P	Bentuk	Warna	Tepi	Elevasi	Bentuk	Gram
LC101	+	+	Lonjong	Putih	Bergelombang	Cembung	Basil	Negatif
LC102	+	+	Bulat	Putih	Licin	Cembung	Coccus	Positif
LC103	+	+	Bulat	Putih	Bergelombang	Cembung	Coccus	Positif
LC104	+	+	Lonjong	Putih	Licin	Cembung	Coccus	Positif
LC105	-	+	Lonjong	Putih	Bergelombang	Cembung	Coccus	Positif
LC106	-	+	Bulat	Putih	Bergelombang	Cembung	Coccus	Positif
LC107	-	+	Bulat Keriput	putih	Tak beraturan	Timbul	Coccus	Positif
LC108	-	+	Bulat Keriput	putih	Tak Beraturan	Timbul	Coccus	Positif
LC109	+	+	Bulat	Putih	Licin	Cembung	Coccus	Positif
LC110	+	+	Bulat	Putih	Tak Beraturan	Timbul	Coccus	Positif
LC111	-	+	Bulat	Putih	Licin	Cembung	Coccus	Negatif
LC112	+	+	Bulat	Putih	Tak Beraturan	Timbul	Coccus	Negatif

Isolat	Karakteristik		Morfologi Koloni				Morfologi Sel	
	N	P	Bentuk	Warna	Tepi	Elevasi	Bentuk	Gram
LC113	+	-	Bulat Keriput	Putih	Tak Beraturan	Timbul	Coccus	Positif
LC114	-	+	Lonjong	Putih	Licin	Cembung	Coccus	Positif
LC115	+	+	Bulat Keriput	Putih	Tak Beraturan	Timbul	Coccus	Positif
LC116	+	+	Bulat	Putih	Seperti Wol	Seperti Tombol	Basil	Negatif
LC117	+	+	Lonjong	Putih	Licin	Cembung	Coccus	Negatif
LC118	+	+	Lonjong	Putih	Licin	Cembung	Coccus	Positif
MC101	-	+	Bulat	Putih	Tak Beraturan	Timbul	Coccus	Negatif
MC102	-	+	Bulat	Putih	Licin	Cembung	Coccus	Negatif
MC103	-	+	Lonjong	Putih	Licin	Cembung	Coccus	Negatif
MC104	-	+	Bulat	Putih	Seperti wol	Seperti Tombol	Coccus	Negatif
MC105	+	+	Bulat	Putih	Licin	Cembung	Coccus	Positif
MC106	+	+	Bulat Keriput	Putih	Licin	Timbul	Coccus	Negatif
MC107	+	-	Lonjong	Putih	Licin	Cembung	Coccus	Negatif
MC108	-	+	Bulat	Putih	Licin	Cembung	Coccus	Negatif
MC109	-	+	Lonjong	Putih	Licin	Cembung	Coccus	Positif
MC110	+	+	Lonjong	Putih	Licin	Timbul	Coccus	Negatif
MC111	+	-	Tak Beraturan	Putih	Tak Beraturan	Datar	Basil	Positif
MC112	+	+	Bulat	Putih	Bergelombang	Timbul	Coccus	Negatif
MC113	+	+	Bulat Keriput	Putih	Tak Beraturan	Timbul	Coccus	Positif
MC114	+	+	Bulat	Putih	Tak Beraturan	Timbul	Coccus	Negatif
MC115	+	+	Lonjong	Putih	Licin	Cembung	Coccus	Positif
MC116	+	+	Bulat	Putih	Licin	Cembung	Coccus	Negatif
MC117	-	+	Bulat	Putih	Licin	Cembung	Coccus	Negatif
MC118	+	-	Tak Beraturan	Putih	Tak Beraturan	Datar	Basil	Positif
HC101	+	+	Bulat	Putih	Licin	Cembung	Coccus	Positif
HC102	-	+	Bulat	Putih	Licin	Cembung	Coccus	Negatif
HC103	+	+	Bulat	Putih	Licin	Cembung	Coccus	Negatif
HC104	+	+	Bulat	Putih	Berombak	Cembung	Coccus	Negatif
HC105	+	+	Bulat	Putih	Berombak	Cembung	Coccus	Negatif
HC106	-	+	Bulat	Putih	Licin	Cembung	Coccus	Negatif
HC107	+	+	Konsentris	Putih	Licin	Cembung	Coccus	Negatif
HC108	-	+	Bulat	Putih	Licin	Cembung	Coccus	Negatif
HC109	+	+	Lonjong	Putih	Licin	Cembung	Coccus	Negatif
HC110	-	+	Konsentris	Putih	Licin	Cembung	Coccus	Negatif
HC111	+	+	Konsentris	Putih	Berombak	Cembung	Coccus	Negatif
HC112	-	+	Lonjong	Putih	Licin	Cembung	Coccus	Negatif
HC113	+	+	Bulat	Putih	Licin	Datar	Coccus	Positif
HC114	+	+	Bulat	Putih	Licin	Datar	Coccus	Negatif
HC115	+	+	Bulat	Putih	Licin	Cembung	Coccus	Negatif
HC116	+	-	Tak Beraturan	Putih	Tak Beraturan	Datar	Coccus	Negatif
HC117	-	+	Bulat	Putih	Berombak	Timbul	Coccus	Negatif
HC118	+	+	Bulat	Putih	Licin	Timbul	Coccus	Negatif

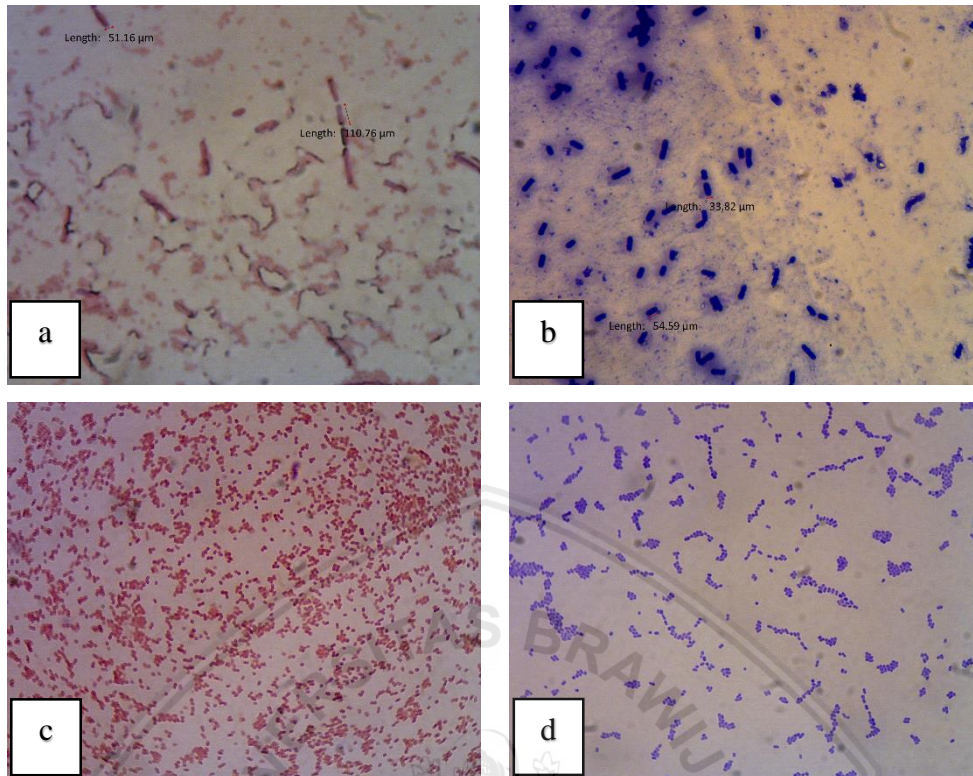
Keterangan: (+) beraksi positif/tumbuh, (-) beraksi negatif/tidak tumbuh, (N) Nitrogen, (P) Phospat

Data pada tabel 6 menunjukkan bahwa 56% atau 30 isolat bakteri dari 54 isolat bakteri hasil eksplorasi mampu menambat nitrogen dan melarutkan fosfat. Dengan demikian, sebagian besar bakteri hasil eksplorasi berpotensi sebagai PGPR.

Pada plot LC ditemukan sebanyak 11 isolat bakteri yang mampu menambat nitrogen dan melarutkan fosfat, pada plot MC ditemukan sebanyak 8 isolat bakteri yang mampu menambat nitrogen dan melarutkan fosfat, serta pada plot HC ditemukan sebanyak 11 isolat bakteri yang mampu menambat nitrogen dan melarutkan fosfat. Perbedaan jumlah isolat bakteri yang ditemukan disebabkan oleh iklim mikro dan pengolahan yang berbeda pada setiap plot pengamatan.

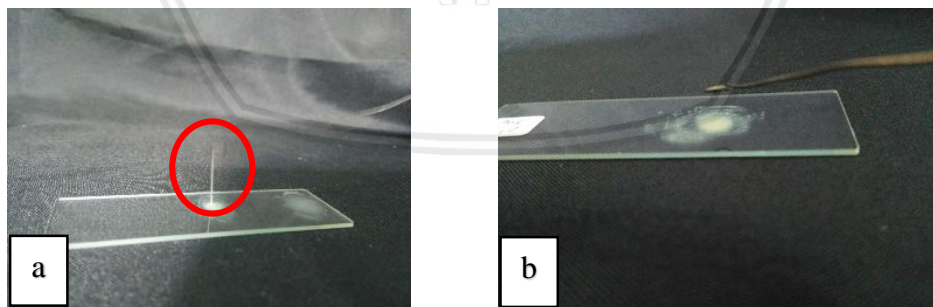
Menurut Pelczar dan Chan (1986) menyebutkan bahwa aktivitas bakteri penambat nitrogen dan pelarut fosfat dipengaruhi oleh ketersediaan senyawa nitrogen dan senyawa fosfat didalam tanah, ketersediaan nutrisi anorganik, bahan organik, pH, kelembaban tanah, suhu tanah, dan senyawa kimia. Jumlah tanaman serta keanekaragaman tanaman yang ada dalam suatu kegiatan pertanian dapat mengubah kuantitas dan kualitas sumber energi, sehingga akan berdampak terhadap komposisi dan fungsi komunitas dari mikroba tanah (Zak *et al.*, 2003, Nilson *et al.*, 2008). Pengaplikasian bahan kimia dapat mengganggu pembentukan enzim dan metabolisme mikroba didalam tanah. Menurut Husain *et al.* (2009) menyebutkan bahwa senyawa asing seperti pupuk kimia dan pestisida dapat menghambat pertumbuhan mikroba tertentu dengan mengganggu aktivitas enzimatis misalnya, salah satu jenis pestisida organofosfat dapat menghambat aktivitas nitrogenase yang terlibat dalam fiksasi nitrogen didalam tanah.

.Pengujian Gram dilakukan dengan dua cara yaitu pewarnaan Gram dan uji KOH 3%. Pada pewarnaan Gram, Gram negatif akan menunjukkan warna merah sedangkan Gram positif akan menunjukkan warna ungu ketika isolat bakteri diamati dibawah mikroskop.



Gambar 7. Bentuk sel bakteri dan pewarnaan Gram, (a) Basil - Gram negatif (isolat LC116), (b) Basil – Gram positif (isolat MC111), (c) Coccus – Gram negatif (MC106), (d) Coccus - Gram positif (HC116)

Uji KOH 3% pada Gram negatif akan menunjukkan adanya lendir ketika masa bakteri diangkat keatas menggunakan jarum Ose sedangkan Gram positif menunjukkan tidak adanya lendir.



Gambar 8. Hasil uji KOH 3%, (a) berlendir atau Gram negatif, (b) tidak berlendir atau Gram positif

Data pada tabel 6 menunjukkan bahwa sebanyak 61% atau 33 isolat bakteri bersifat Gram negatif dan 39% atau 21 isolat bakteri bersifat Gram positif, hal ini ditunjukkan oleh terbentuk atau tidaknya lendir pada saat uji KOH 3% serta

ditunjukkan oleh warna biru keunguan atau merah hingga merah muda pada saat pengecatan Gram.

Hal tersebut sesuai dengan Hadioetomo (1993) bahwa bakteri Gram positif ditandai dengan warna ungu yang berarti bakteri tersebut mampu mengikat warna kristal violet, sedangkan bakteri Gram negatif ditandai dengan warna merah muda yang berarti bahwa bakteri tersebut tidak mampu mengikat warna kristal violet dan hanya terwarnai oleh safranin. Schaad *et al.* (2000) menyatakan bahwa bakteri Gram negatif ditandai adanya lendir yang lengket dan seperti benang, sedangkan bakteri Gram positif bersifat lebih encer dan tidak tampak adanya lendir. Beberapa contoh PGPR yang bersifat Gram negatif adalah bakteri dari genus *Pseudomonas*, *Azotobakter*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Rhizobium*, *Serratia*, dan *Azospirillum*, sedangkan bakteri Gram positif yaitu genus *Micrococcus*, *Bacillus*, *Microbacterium*, dan *Burkholderia* (Holt *et al.*, 1994)

4.3 Kelimpahan *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*

Hasil kelimpahan koloni bakteri yang didapatkan pada ketiga plot yang berada dikawasan UB forest disajikan dalam tabel 7.

Tabel 7. Nilai kelimpahan PGPR

Plot	Kelimpahan Bakteri (cfu/g)		Suhu Tanah (°C)	pH	Bahan Organik (%)
	Penambat Nitrogen	Pelarut Fosfat			
LC	6,10 x 10 ⁷	9,00 x 10 ⁷	19,43	5,83	9,41
MC	7,00 x 10 ⁷	9,70 x 10 ⁷	19,73	5,87	9,81
HC	6,50 x 10 ⁷	9,20 x 10 ⁷	19,36	5,77	9,06

Keterangan: LC (*Low density Coffee*), MC (*Medium density Coffee*), HC (*High density Coffee*)

Data pada tabel 7 menunjukkan bahwa dari semua plot pengamatan didapatkan hasil nilai kelimpahan bakteri pelarut fosfat lebih tinggi daripada bakteri penambat nitrogen. Selain itu, plot MC memiliki nilai kelimpahan tertinggi yaitu pada bakteri penambat nitrogen sebesar 7,00 x 10⁷ cfu/g dan bakteri pelarut fosfat sebesar 9,70 x 10⁷ cfu/g, kemudian diikuti plot HC dengan nilai kelimpahan bakteri penambat nitrogen sebesar 6,50 x 10⁷ cfu/g dan bakteri pelarut fosfat sebesar 9,20 x 10⁷ cfu/g, kemudian yang terakhir plot LC dengan nilai kelimpahan bakteri penambat nitrogen sebesar 6,10 x 10⁷ cfu/g dan bakteri pelarut fosfat sebesar 9,00 x 10⁷ cfu/g.

Menurut Dobereiner dan Day (1975) menyatakan bahwa bakteri pelarut fosfat lebih banyak ditemukan didaerah dengan kisaran suhu 10⁰C-20⁰C. Tanah hutan mampu memberikan sumber karbon organik dan sumber energi untuk mikroba yang berasal dari seresah-serasah. Kerapatan vegetasi atau jumlah vegetasi mampu mengikat material organik dan nutrisi melalui seresah atau sisa tanaman dan eksudat akar yang dihasilkan oleh tanaman untuk pertumbuhan mikroba sehingga akan berpengaruh terhadap jumlah populasi mikroba dalam tanah (Widawati dan Suliasih, 2006). Waksman dan Starkey (1981) melaporkan bahwa bakteri rizosfer dapat meningkat dengan cepat berdasarkan adanya hubungan kelompok yang menguntungkan, kelompok merugikan, dan kelompok netral.

Menurut Subagiyo *et al.* (2015) peningkatan suhu akan menyebabkan peningkatan kinerja enzim didalam sel bakteri yang akan berpengaruh terhadap pertumbuhan. Pengaruh suhu terhadap jumlah nutrisi tersedia terjadi melalui perubahan asosiasi mikroba terhadap penyerapan nutrisi yang menyebabkan pertumbuhan optimum mikroba pada suhu tertentu (Nedwell, 1999). Pertumbuhan bakteri pelarut fosfat sangat dipengaruhi oleh kemasaman tanah, pertumbuhan kelompok bakteri optimum pada pH sekitar netral dan meningkat seiring dengan meningkatnya pH tanah, secara umum bakteri pelarut fosfat hidup pada kisaran pH 5,0–10,6 (Illmer dan Schinner, 1995). Bakteri penambat nitrogen sangat sensitif terhadap pH rendah, secara umum pertumbuhan optimum bakteri penambat nitrogen terjadi pada pH 5,5–7,0 (Saraswati *et al.*, 1994).

Beberapa contoh bakteri yang berperan sebagai penambat nitrogen yang banyak ditemukan, diantaranya genera *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Azocarus*, *Rhizobium* dan *Bacillus*, sedangkan bakteri yang berperan sebagai pelarut fosfat pada tanah yang banyak ditemukan, diantaranya genera *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Microbacterium*, *Flavobacterium*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Rhizobium*, dan *Serratia* (Bhattacharyya dan Jha, 2012).

4.4. Keanekaragaman *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*

Hasil keanekaragaman bakteri yang didapatkan pada ketiga plot pengamatan yang berada dikawasan UB forest disajikan dalam tabel 8.

Tabel 8. Nilai indeks keanekaragaman PGPR berdasarkan Shannon-Wiener (H')

Plot	Keanekaragaman (H')		Suhu Tanah ($^{\circ}\text{C}$)	pH	Bahan Organik (%)
	Bakteri Penambat Nitrogen	Bakteri Pelarut Fosfat			
LC	2,37 (sedang)	2,73 (sedang)	19,43	5,83	9,41
MC	2,39 (sedang)	2,74 (sedang)	19,73	5,87	9,81
HC	2,22 (sedang)	2,64 (sedang)	19,36	5,77	9,06

Keterangan: LC (*Low density Coffee*), MC (*Medium density Coffee*), HC (*High density Coffee*)

$H' < 1,5$ = Keanekaragaman rendah

$1,5 < H' < 3,5$ = Keanekaragaman sedang

$H' > 3,5$ = Keanekaragaman tinggi

Data pada tabel 8 menunjukkan bahwa nilai keanekaragaman pada semua plot sampel pengamatan termasuk sedang dan kondisi ekosistem cukup seimbang. Menurut Magurran (1988) menyatakan bahwa apabila nilai indeks keanekaragaman lebih dari 1,5 dan kurang dari 3,5 maka keanekaragaman dapat dikatakan sedang, apabila nilai keanekaragaman dibawah 1,5 maka keanekaragaman rendah, dan apabila nilai keanekaragaman diatas 3,5 maka keanekaragaman termasuk tinggi. Hal ini disebabkan suhu, pH, dan bahan organik disetiap plot sampel pengamatan terlihat hampir sama.

Menurut Rao (1994) melaporkan bahwa kemampuan dari masing-masing bakteri dalam melarutkan fosfat organik beragam dan tergantung pada lingkungan optimal bagi pertumbuhan bakteri tersebut. Menurut Tortora *et al.* (2001) menyatakan bahwa pada umumnya bakteri hanya mampu tumbuh kisaran suhu maksimum dan minimumnya sekitar 10°C - 30°C . Suhu dibawah batas minimum atau diatas batas maksimum dapat menghambat pembentukan enzim yang diperlukan sel bakteri untuk berkoloni (Pelczar dan Reid, 1958).

Bakteri pelarut fosfat dominan hidup pada kisaran pH 5,0–10,6 (Illmer dan Schinner, 1995), bakteri penambat nitrogen dominan hidup pada kisaran pH 5,5-7,0 (Saraswati *et al.*, 1994). Premono (1994) melaporkan bahwa bakteri pelarut fosfat mampu meningkatkan P terekstrak pada tanah masam sampai 50%. Mikroba tanah memberikan hasil paling baik pada tanah dengan kandungan bahan organik tinggi (Smith *et al.*, 1961), semakin banyak bahan organik yang diberikan pada tanah akan diikuti dengan peningkatan total mikroba pada tanah (Junita *et al.*, 2014).

4.4.1 Hubungan Iklim Mikro dengan Keanekaragaman *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR)

Hasil uji korelasi iklim mikro dengan keanekaragaman PGPR ketiga plot pengamatan yang berada dikawasan UB forest disajikan dalam tabel 9.

Tabel 9. Nilai koefisien korelasi iklim mikro dengan keanekaragaman PGPR

Variabel	Nilai Koefisien Korelasi	
	Bakteri Penambat Nitrogen	Bakteri Pelarut Fosfat
Suhu tanah ($^{\circ}\text{C}$)	0,72	0,71
pH	0,90	0,89
Bahan organik (%)	0,96	0,95
Keterangan:	0,00-0,19	= sangat rendah
	0,20-0,39	= rendah
	0,40-0,59	= sedang
	0,60-0,79	= kuat
	0,80-1,00	= sangat kuat

Data pada tabel 9 menunjukkan bahwa suhu tanah, pH, dan bahan organik memiliki hubungan positif terhadap tingkat keanekaragaman *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR). Sutedjo *et al.* (1996) menyatakan bahwa faktor yang berpengaruh atas berlimpahnya populasi mikroba dalam tanah, yang paling penting yaitu zat/bahan organik, pH, temperatur tanah, dan keadaan alami pertumbuhan tanaman. Keadaan berlimpahnya mikroba didalam tanah dan juga komposisi populasi pada tipe-tipe tanah yang berbeda, terutama dipengaruhi oleh penambahan bahan organik (Rao, 1994).

Suhu tanah memiliki hubungan yang kuat terhadap tingkat keanekaragaman PGPR yaitu sebesar 0,72 bakteri penambat nitrogen, sedangkan pada bakteri pelarut fosfat sebesar 0,71. Hal tersebut disebabkan suhu tanah setiap plot pengamatan berkisar 19°C . Pada suhu tersebut bakteri mampu tumbuh secara optimal. Tortora *et al.* (2001) melaporkan bahwa pada umumnya bakteri hanya mampu tumbuh kisaran suhu maksimum dan minimum sekitar 10°C - 30°C . Bakteri pelarut fosfat tumbuh optimum ketika suhu 15°C - 25°C (Pereira *et al.*, 2018), bakteri penambat nitrogen tumbuh optimum pada suhu 26°C - 28°C (Trolldenier, 1982). Menurut Weber dan Miller (1972) menyatakan bahwa beberapa strain bakteri penambat nitrogen tumbuh optimum pada suhu 10°C sampai 20°C , sebagai contoh strains *Bradyrhizobium japonicum*.

Hubungan pH tanah dengan keanekaragaman PGPR termasuk sangat kuat yaitu sebesar 0,90 pada bakteri penambat nitrogen, sedangkan pada bakteri pelarut fosfat sebesar 0,89. Pertumbuhan bakteri pada umumnya sangat dipengaruhi oleh kemasaman tanah yaitu pada pH sekitar netral. Tirtora *et al.* (2001) melaporkan bahwa pada umumnya bakteri tumbuh pada kisaran pH 5,5-7,5. Bakteri penambat nitrogen dominan hidup pada kisaran pH 5,5-7,0 (Saraswati *et al.*, 1994), sedangkan bakteri pelarut fosfat dominan hidup pada kisaran pH 5,0-10,6 (Illmer dan Schinner, 1995).

Bahan organik memiliki hubungan yang sangat kuat terhadap tingkat keanekaragaman PGPR yaitu sebesar 0,96 pada bakteri penambat nitrogen, sedangkan pada bakteri pelarut fosfat sebesar 0,95. Bahan organik merupakan faktor yang paling berpengaruh terhadap keanekaragaman PGPR. Hal ini disebabkan bahan organik merupakan sumber energi serta habitat bagi mikroba. Mikroba akan memberikan hasil paling baik pada tanah dengan kandungan bahan organik tinggi (Smith *et al.*, 1961), semakin banyak bahan organik yang diberikan pada tanah akan diikuti dengan peningkatan total mikroba pada tanah (Junita *et al.*, 2014). Sumber utama bahan organik tanah adalah jaringan tanaman, baik berupa seresah atau sisa-sisa tanaman serta kotoran-kotoran dan bangkai-bangkai hewan (Sutedjo *et al.*, 1996). Menurut Burchia *et al.* (2007) menyatakan bahwa kerapatan vegetasi penutup tanah secara langsung berpengaruh terhadap distribusi bahan organik tanah dan aktivitas mikroba tanah.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa hasil eksplorasi dari semua plot sampel pengamatan ditemukan sebanyak 54 isolat bakteri, sebanyak 35 isolat bakteri mampu menambat nitrogen, 49 isolat bakteri mampu melarut fosfat serta sebanyak 30 isolat bakteri mempunyai sifat keduanya. Kelimpahan dan keanekaragaman bakteri pelarut fosfat lebih tinggi dibandingkan bakteri penambat nitrogen disetiap plot sampel pengamatan. Kelimpahan bakteri penambat nitrogen dan bakteri pelarut fosfat tertinggi terdapat pada plot MC. Keanekaragaman pada semua plot sampel pengamatan termasuk sedang dan kondisi ekosistem cukup seimbang. Selain itu, Uji korelasi menunjukkan bahwa suhu tanah, pH, dan bahan organik memiliki hubungan yang kuat hingga sangat kuat dengan keanekaragaman *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR).

5.2 Saran

Dari penelitian yang telah dilakukan diharapkan pada penelitian selanjutnya perlu dilakukan identifikasi, uji efektivitas, serta uji hipersensitif terkait isolat bakteri yang berpotensi sebagai PGPR yang telah ditemukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahemad, M., dan Kibret M. 2014. Mechanisms and Applications of Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Current Perspective. *Journal of King Saud University Science*, 26(1):1–20.
- Allison, S. D., Lu Y, Weihe C, Goulden M. L., Martiny A. C., Treseder K. K., dan Martiny J. B. 2013. Microbial Abundance and Composition Influence Litter Decomposition Response to Environmental Change. *Ecology* 94:714-725.
- Anton, W. 2008. *Mikrobiologi Umum*. Malang: Universitas Brawijaya Press.
- Ariani, N. 2018. Kelimpahan Bakteri Rizosfer Pada Pertanaman Polikultur Kopi dan Pinus dengan Penggunaan Herbisida dan Tanpa Herbisida di Hutan Pendidikan UB Forest. Skripsi Program Sarjana. Malang: Universitas Brawijaya.
- Bhattacharyya, P. N., dan Jha D. K. 2012. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Emergence in Agriculture. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 28:1327–1350.
- Burchia, F., Aini N., dan Prawito P. 2007. Bahan Organik dan Respirasi di Bawah Beberapa Tegakan Pada DAS Musi Bagian Hulu. *Jurnal Akta Agrosia*, 2:172-175.
- Chung, H., Park M., Madhaiyan M., Seshadri S., Song J., Cho H., dan Sa T. 2005. Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing Bacteria from the Rhizosphere of Crop Plants of Korea. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(10):1970–1974.
- Delgado-Baquerizo, M., Reich P.B., Khachane A.N., Campbell C.D., Thomas N., Freitag T.E., Abu Al-Soud W., Sørensen S., Bardgett R.D., dan Singh B.K. 2017. It is Elemental: Soil Nutrient Stoichiometry Drives Bacterial Diversity. *Environmental Microbiology*, 19:1176–1188.
- Dobereiner, J. dan Day, J.M. 1976. Associative Symbioses in Tropical Grasses: Characterization of Microorganisms and Dinitrogen Fixing Sites. In *Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation*, Washington, U.S.A.: Washington State University Press.
- Dwidjoseputro, D. 2005. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Djambatan: Jakarta
- Elias, M., Wiczorek G., Rosenne S., dan Tawfik D. S. 2014. The Universality of Enzymatic Rate Temperature Dependency. *Trends in Biochemical Sciences*, 39:1-7.
- Ervayenri, S., Sukarno N., dan Kusuma C. 1999. Arbuskula Mycorrhiza Fungi (AMF) Diversity in Peat Soil Influenced by Vegetation: Types Proceedings of International Conference on Mycorrhiza in Sustainable Tropical Agriculture and Forest Ecosystem 27-30 Oktober 1997 Bogor, Indonesia.
- Figueiredo, M.V.B., Seldin, L., Araujo, F.F., dan Mariano, R.L.R. 2011. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications*. Berlin: Springer-Verlag, Inc.

- Franche, C., Lindström K., dan Elmerich C. 2009. Nitrogen-Fixing Bacteria Associated with Leguminous and non-Leguminous Plants. *Plant and Soil*, 321:35–59.
- García-Palacios, P., Prieto I., Ourcival J. M., dan Heattenschwiler S. 2016. Disentangling the Litter Quality and Soil Microbial Contribution to Leaf and Fine Root Litter Decomposition Responses to Reduced Rainfall. *Ecosystems*, 19:490-503.
- García-Aasalamanca, A., Molinahunares MA, Dillewijn PV, Solano J., dan PizarrotobõÃas P. 2013. Bacterial Diversity in the Rhizosphere of Maize and the Surrounding Carbonate-Rich Bulk Soil. *Microbiology and Biotechnology*, 6(1):36-44.
- Giordano, W., dan Hirsch, A.M. 2004. The Expression of MaEXP1, a *Melilotus alba* Expansin Gene, is Upregulated During the Sweet Clover *Sinorhizobium meliloti* Interaction. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 17:613 – 622.
- Glick, B. R. 2012. *Plant Growth Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*. Egypt: Hindawi Publishing Corporation.
- Gomes, N. C. M., Heuer H, SchoÈnfeld J, Costa R, MendoncËa-Hagler L, dan Smalla K. 2001. Bacterial Diversity of the Rhizosphere of Maize (*Zea mays*) Grown in Tropical Soil Studied by Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Plant Soil*, 232(1):167-180.
- Gray, E.J., dan Smith, D.L. 2005. Intracellular and Extracellular PGPR: commonalities and Distinctions in the Plant Bacterium Signaling Processes. *Soil Biology. Biochemistry*, 37:395–412.
- Hadioetomo, R. S. 1993. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek: Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Handayanto, E., dan Hairiah K. 2007. *Biologi Tanah Landasan Pengelolaan Tanah Sehat*. Yogyakarta: Pustaka Adipura.
- Hardarson, G. dan Jones, D.G. 1979. Effect of Temperature on Competition Amongst Strains of *Rhizobium trifolii* for Nodulation of Two White Clover Varieties. *Annals Applied Biology*, 92: 229-236.
- Himedia. 2015. Burk Medium M707. Himedia Laboratories Pvt. Ltd. A-516 Swastik Disha Business Park, Via Vadhani Ind. Est., LBS Marg, Mumbai-400086, India. <http://himedialabs.com>. Diakses pada tanggal 13 Januari 2019.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Stanley, J. T., dan Williams, S. T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9th Edition. Baltimore: The Williams and Wilkins Company.
- Huot, H., Joyner J., Córdoba A., Shaw R. K., Wilson M. A., Walter R., Muth T. R., dan Cheng Z. 2017. Characterizing Urban Soils in New York City: Profile Properties and Bacterial Communities. *Journal of Soils and Sediments*, 17:393–407.

- Hussain, S., Siddique T., Siddique M., Arshad M., dan Khalid A. 2009. Impact of Pesticides on Soil Microbial Diversity, Enzymes, and Biochemical Reactions. *Advances in Agronomy*, 102: 159-200.
- Illmer, P., dan Schinner F. 1995. Solubilization of Organik Calcium phosphates Solubization Mechanisms. *Soil Biology Biochemistry*, 27(3):257-263.
- Junita, F., Muhartini S., dan Kastono D. 2014. Pengaruh Frekuensi Penyiraman dan Takaran Pupuk Kandang Terhadap Pertumbuhan dan Hasil Pakchoi. *Jurnal Ilmu Pertanian*, 9(1):37-45.
- Kawaguchi, A., Inoue K., dan Ichinose Y. 2008. Biological Control of Crown Gall of Grapevine, Rose, Tomato by Non-patogenic *Agrobacterium vitis* Strain VAR03-1. *Journal Phytopathology*, 98(11):1218-1225.
- Kim, W. I., Cho W. K., Kim S. N., Chu H., Ryu K. Y., Yun J. C., dan Park C. S. 2011. Genetic Diversity of Cultivable Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21:777-790.
- Marianah, L. 2015. <http://www.bppjambi.info/dwnpublikasi.asp?id=157>. Di unduh pada tanggal 3 Januari 2019.
- Magurran, A. E. 1988. *Ecological Diversity and Its Measurement*. London: Croom Helm.
- Marroqui, S., Zorreguieta, A., dan Santamaria, C. 2001. Enhanced Symbiotic Performance by *Rhizobium tropici* Glycogen Synthasemutants. *Journal Bacteriology*, 183:854-864.
- Michelsen, C. F., dan Stougaard P. 2012. Hydrogen Cyanide Synthesis and Antifungal Activity of the Biocontrol Strain *Pseudomonas fluorescens* In5 from Greenland is Highly Dependent on Growth Medium. *Canadian Journal of Microbiology*, 58:381-390.
- Nannipieri, P., Ascher J., Ceccherini M. T., Landi L., Pietramellara G., dan Renella G. 2003. Microbial Diversity and Soil Functions. *European Journal of Soil Science*, 54:655-670.
- Nedwell, D.B. 1999. Effect of Low Temperature on Microbial Growth: Lowered Affinity for Substrates Limits Growth at Low Temperature. *FEMS Microbiology Ecology*, 30:101-111.
- Nilsson, M. C., Wardle D. A., dan DeLuca T. H. 2008. Belowground and Aboveground Consequences of Interactions Between Live Plant Species Mixtures and Dead Organic Substrate Mixtures. *Oikos Journal* 117:439-449.
- Nudel, C., Gonzales R., Castaneda N., Mahler G., dan Actis L. A. 2001. Influence of Iron Growth, Production of Siderophore Compound, Membrane Protein, and Lipase Activity in *Acinetobacter calcoaceticus* BD 413. *Microbiological Research*, 155(4):263-269.
- Nurmegawati, A. dan Sugandi, D. 2014. Kajian Kesuburan Tanah Perkebunan Karet Rakyat di Provinsi Bengkulu. *Jurnal Littri Puslitbang Perkebunan*. 20(1):17-26.

- Patkowska, E. 2002. The Role of Rhizosphere Antagonistic Microorganism in Limiting the Infection of Underground Parts of Spring Wheat. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 5(2):04.
- Pelczar, JR. M. J. dan Chan E. C. S. 1986. *Microbiology*. 5th edition. USA: McGraw-Hill, Inc.
- Pelczar, JR. M. J. dan Roger D. R. 1958. *Microbiology*. London: McGraw-Hill Book Company, Inc.
- Pereira, F., Amarakoon I., Zvomuya F., dan Jeke N. 2017. Kinetics and Thermodynamics of Phosphorus Sorption on Goethites: Effects of Biochar Application. *Canadian Journal of Soil Science*, 98(1):1–25.
- Pinton, R., Zeno V., dan Paolo N. 2001. *The Rhizosphere*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Prastyo, W. E. 2018. Eksplorasi PGPR dari Rizosfer Tumbuhan Famili Cyperaceae di UB Forest Serta Potensinya Sebagai Agens Antagonis Terhadap *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Skripsi Program Sarjana. Malang: Universitas Brawijaya.
- Premono, M. E. 1994. *Jasad Renik Pelarut Fosfat Pengaruhnya Terhadap P-Tanah dan Efisiensi Pemupukan P Tanaman Tebu*. Tesis Program Pascasarjana. Bogor: IPB.
- Prihatiningsih, N., Heru D. A., dan Puji L. 2017. Aktivitas Siderofor *Bacillus subtilis* Sebagai Pemacu Pertumbuhan dan Pengendali Patogen Tanaman Terung. *Jurnal HPT Tropika*, 17(2): 170-178
- Rao, N.S.S. 1994. *Mikroorganisme Tanah dan Pertumbuhan Tanaman*. Edisi ke 2. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Salamiah dan Raihani W. 2015. Pemanfaatan Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) Dalam Pengendalian Penyakit Tungro Pada Padi Lokal Kalimantan Selatan. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia*, 1(6): 1448-1456.
- Saraswati, R., dan Sumarsono. 2008. Pemanfaatan Mikroba Penyubur Tanah sebagai Komponen Teknologi Pertanian. *Iptek Tanaman Pangan*, 3(1): 44-48.
- Saraswati, R., Kobayasi M., Matoh T., dan Sekiya J. 1994. Characterization of Rhizobium and Azorhizobium a Root and Stem-nodulating Nitrogen-Fixing Bacterium Isolatd from Sesbania spesies. *Central Research Institute for Food Crops, Agency for Agricultural Research and Development, Bogor, Indonesia*, 82:1–11.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., dan Chun, W. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. America: APS Press, the American Phytopathological Society, St Paul Minnesota.
- Sharma, A., dan Johri B. N. 2003 Growth Promoting Influence of Siderophore-Producing *Pseudomonas* Strains GRP3A and PRS₉, in Maize (*Zea mays* L.) Under Iron Limiting Conditions. *Microbiological Research*, 158(3): 243-248.

- Smith, J. H., Allison F. E., dan Soulides D. A. 1961. Evaluation of Phosphobacterin as Soil Inoculant. *Soil Science Society of America, Proceedings* 25: 109 – 111.
- Subagiyo, Sebastian M., Triyanto, dan Wilis A.S. 2015. Pengaruh pH, Suhu dan Salinitas Terhadap Pertumbuhan dan Produksi Asam Organik Bakteri Asam Laktat yang di Isolasi dari Intestinum Udang Penaeld. Tesis Program Pascasarjana. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Sumarlan. 2017. Sekeping Informasi dari "UB Forest" Malang (Online). <http://bp2sdm.menlhk.go.id/pusrenbang/index.php/profil/renbang-sdm-aparatur/24-sekeping-informasi-dari-ub-Forest-malang>. (Diakses 20 Januari 2019).
- Sumarsih, S. 2003. Mikrobiologi Dasar. Yogyakarta: Universitas Pembangunan Nasional Veteran.
- Sutedjo, M. M., Kartasapoetra A. G., dan Sastroatmodjo R. D. S. 1996. Mikrobiologi Tanah. Jakarta: PT. Rineka Cipta.
- Sylvia, D., Fuhrmann, J., Hartel, P., dan Zuberer, D. 2005. Principles and Applications of Soil Microbiology. New Jersey: Pearson Education Inc.
- Tortora, G.J., Berdell R.F., dan Christine L.C. 2001. Microbiology an Introduction. U.S.A.: Addison Wesley Longman, Inc.
- Trolldenier, G. 1982. Effect of Soil Temperature on Nitrogen Fixation on Roots of Rice and Reed. *Plant and Soil*, 68: 217-221.
- Van Loon, L. C., dan Bakker P. A. H. M. 2005. Induced Systemic Resistance as a Mechanism of Disease Suppresion by Rhizobacteria. The Netherlands: Utrecht University.
- Van Peer, R., Niemann G. J., dan Schippers B. 1991. Induced Resistance and Phytoalexin Accumulation in Biological Control of Fusarium Wilt of Carnation by Pseudomonas sp. Strain WCS417r. *Phytopathology*, 81:728-734.
- Waksman, S. A., dan Starkey R. L. 1981. The Soil and the Microbe. New York: John Wiley and Sons, inc.
- Walkey, A. dan Black I. A. 1934. An Examination of the Degtjareff Method for Determining Soil Organic Matter and a Proposed Modification of the Chromic Acid Titration Method. *Soil Science*, 37: 29-38.
- Weber, D.F. dan Miller, V.L. 1972. Effect of Soil Temperature on *Rhizobium japonicum* Serogroup Distribution in Soybean Nodules. *Agronomy Journal*, 64: 796-798.
- Widawati dan Suliasih. 2006. Populasi Bakteri Pelarut Fosfat (BFF) di Cikaniki, Gunung Botol, dan Ciptarasa, Serta Kemampuannya Melarutkan P Terikat di Media Pikovskaya Padat. *Biodiversitas*. 7: 109-113.
- Zaidi, A., Khan M.S., Ahemad M., Oves M. 2009. Plant Growth Promotion by Phosphate Solubilizing Bacteria. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 56, 263–284.

Zak, D. R., W. E., Holmes D. C., White A. D., Peacock, dan Tilman D. 2003. Plant Diversity, Soil Microbial Communities, and Ecosystem Function: Are there any links?. *Ecology*, 84: 2042–2050.

