

**EKSPLORASI BAKTERI RHIZOSFER TANAMAN KOPI (*Coffea spp.*)
DI AGROFORESTRI UB *FOREST* KABUPATEN MALANG SEBAGAI
AGEN *PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA* (PGPR)**

TESIS

oleh

ERVINDA YULIATIN

186090100111006



**PROGRAM MAGISTER BIOLOGI
JURUSAN BIOLOGI**

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2020



**EKSPLORASI BAKTERI RHIZOSFER TANAMAN KOPI (*Coffea spp.*)
DI AGROFORESTRI UB *FOREST* KABUPATEN MALANG SEBAGAI
AGEN *PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA* (PGPR)**

TESIS

oleh

ERVINDA YULIATIN

186090100111006



**PROGRAM MAGISTER BIOLOGI
JURUSAN BIOLOGI**

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2020

**EKSPLORASI BAKTERI RHIZOSFER TANAMAN KOPI (*Coffea spp.*)
DI AGROFORESTRI UB *FOREST* KABUPATEN MALANG
SEBAGAI AGEN *PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA* (PGPR)**

TESIS

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

oleh
ERVINDA YULIATIN
186090100111006



**PROGRAM MAGISTER BIOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2020**



HALAMAN PENGESAHAN TESIS

**EKSPLORASI BAKTERI RHIZOSFER TANAMAN KOPI (*Coffea spp.*)
DI AGROFORESTRI UB *FOREST* KABUPATEN MALANG
SEBAGAI AGEN *PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA* (PGPR)**

**ERVINDA YULIATIN
186090100111006**

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji

Pada tanggal 08 Juni 2020

dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar

Magister Sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Suharjono, MS

NIP. 196302231988021001

Dra. Tri Ardyati, M.Agr., Ph.D

NIP. 196712131991032001

Mengetahui

Ketua Program Studi Magister Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Prof. Amin Setyo Leksono, S.Si., M.Si, Ph.D

NIP. 197211172000121001

SUSUNAN KOMISI PEMBIMBING DAN PENGUJI TESIS

Judul Tesis:

EKSPLORASI BAKTERI RHIZOSFER TANAMAN KOPI (*Coffea* spp.) DI AGROFORESTRI UB *FOREST* KABUPATEN MALANG SEBAGAI AGEN *PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA* (PGPR)

Nama : Ervinda Yuliatin

NIM : 186090100111006

KOMISI PEMBIMBING

Pembimbing I : Dr. Suharjono, MS

Pembimbing II : Dra. Tri Ardyati, M.Agr., Ph.D

TIM DOSEN PENGUJI

Dosen Penguji I : Irfan Mustafa, S.Si., M.Si., Ph.D

Dosen Penguji II : Dian Siswanto, S.Si., M.Sc., M.Si, Ph.D

Tanggal Ujian Proposal : 05 April 2019

Tanggal Ujian Seminar Hasil : 17 April 2020

Tanggal Ujian Akhir Tesis : 08 Juni 2020

HALAMAN PERNYATAAN ORISINILITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah Tesis ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam Naskah Tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur plagiasi, saya bersedia Tesis (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 2 dan pasal 70).

Malang, 22 Juni 2020

Yang menyatakan



Nama : **Ervinda Yuliatin**

NIM : **186090100111006**



PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS

Tesis 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 seijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



RINGKASAN

Eksplorasi Bakteri Rhizosfer Tanaman Kopi (*Coffea* spp.) di Agroforestri UB Forest Kabupaten Malang sebagai Agen *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR)

Ervinda Yuliatin, Tri Ardyati, Suharjono
Program Magister Biologi, Jurusan Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya
2020

Kopi (*Coffea* sp.) berperan penting dalam sektor perekonomian secara global. Universitas Brawijaya Forest (UB Forest) mengelola dan mengembangkan kopi sebagai produk utama. Produksi kopi dari tahun ke tahun mengalami penurunan disebabkan oleh faktor kesuburan tanah dan cuaca yang kurang mendukung. Intensifikasi produksi kopi di UB Forest dilakukan dengan memanfaatkan pupuk organik sebagai penyubur tanah perkebunan kopi namun memerlukan proses yang cukup lama untuk mengembalikan kesuburan tanah. Alternatif untuk mengatasi permasalahan ini yaitu dengan memanfaatkan mikrobia tanah rhizosfer tanaman kopi sebagai agen biofertilizer penghasil hormon IAA, pemfiksasi N₂, dan pelarut fosfat untuk mendukung pertumbuhan tanaman. Aktivitas bakteri tersebut kemudian dapat dimanfaatkan sebagai pelengkap nutrisi pupuk organik. Oleh karena itu isolasi, analisis keragaman, uji potensi, dan identifikasi bakteri tanah rhizosfer yang berperan sebagai agen *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) perlu diteliti guna mendukung sistem perkebunan kopi berkelanjutan, produktivitas tinggi, dan ramah lingkungan.

Tujuan penelitian ini untuk menganalisis pengaruh parameter lingkungan terhadap bakteri rhizosfer, mempelajari struktur komposisi bakteri rhizosfer, potensi bakteri rhizosfer sebagai kandidat PGPR dalam menambat nitrogen, melarutkan fosfat, memproduksi *Indole Acetic Acid* (IAA), dan mengidentifikasi isolat yang berpotensi tertinggi sebagai agen PGPR berdasarkan sekuen 16S rDNA. Penelitian ini meliputi analisis fisikokimia tanah, analisis metagenomik 16S rDNA bakteri tanah, isolasi bakteri rhizosfer kandidat PGPR, uji kemampuan isolat bakteri rhizosfer sebagai agen PGPR, dan identifikasi isolat terpilih. Isolat-isolat PGPR diisolasi menggunakan metode seri pengenceran secara *pour plate* dalam media TSA, Nfb dan Pikovskaya, secara berurutan untuk penghasil IAA, penambat nitrogen, dan pelarut fosfat. Densitas setiap isolat kandidat PGPR dienumerasi secara TPC dan dianalisis indeks diversitas bakteri kandidat PGPR dari setiap sampel. Data parameter lingkungan, diversitas dan densitas isolat kandidat PGPR dianalisis multivariat (PCA) untuk menentukan hubungan parameter lingkungan dan densitas isolat kandidat PGPR. Setiap isolat kandidat PGPR diuji potensinya sebagai penghasil IAA, penambat nitrogen, dan pelarut fosfat. Konsentrasi hormon IAA diukur secara kolorimetri dengan uji Salkowski, konsentrasi amonium secara kolorimetri diukur dengan *Sera Ammonia Test Kit* dan Reagen Nessler, sedangkan konsentrasi fosfat diukur secara kolorimetri dengan Reagen Amoniummolibdat dan asam Klorostan. Potensi setiap isolat kandidat PGPR dalam menghasilkan IAA, menambat nitrogen, dan melarutkan fosfat diuji menurut percobaan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga kali ulangan. Data dianalisis ragam menggunakan program *Windows SPSS software v. 20*. Isolat PGPR unggul diidentifikasi berdasarkan similaritas sekuen 16S rDNA hasil amplifikasi dengan primer 27f (5'-GAG AGT TTG CTG GCT CAG-3') dan 1429r (5'-CTA CGG CTA TGT TAC GA-3').

Berdasarkan analisis korelasi Pearson dan multivariat bahwa parameter lingkungan seperti rasio C/N dan bahan organik yang tinggi memengaruhi peningkatan densitas dan indeks diversitas bakteri kandidat PGPR sedangkan faktor N-total, diameter pohon dan

ketinggian tempat yang rendah berdampak pada peningkatan densitas bakteri kandidat PGPR. Faktor P-tersedia yang minimal dapat menstimulasi peningkatan densitas bakteri penghasil IAA dan penambat nitrogen. Namun, pH tanah yang semakin meningkat hanya meningkatkan densitas bakteri pelarut fosfat di rhizosfer tanah kopi. Berdasarkan analisis metagenomik 16S rDNA bakteri tanah, struktur komunitas bakteri rhizosfer tanaman kopi Robusta dan Arabika masing-masing memiliki kelimpahan Filum Proteobacteria (49,27% dan 39%), Kelas Alphaproteobacteria (30,1% dan 42,9%), Ordo Rhizobiales (26,8% dan 17,0%), Famili Xanthobacteraceae (12,5% dan 7,5%), Genus *Bradyrhizobium* (3,1% dan 6,1%) dan Spesies *Bradyrhizobium elkanii* (62,5% dan 75,0%). Indeks diversitas bakteri rhizosfer tanaman kopi Arabika dan Robusta masing-masing 0,990 dan 0,995 dikategorikan sebagai diversitas yang tinggi. Berdasarkan konstruksi filogenetik, isolat bakteri PGPR potensial S1.6.3.2 (Robusta) dan W2.4.4.1 (Arabika) secara berurutan menghasilkan IAA 104,6 µg/mL dan 88,12 µg/mL. Isolat bakteri potensial penambat nitrogen adalah W1.2 (Arabika) dan S3.4.2 (Robusta) secara berurutan mampu menghasilkan amonium 21,54 µg/mL dan 2,07 µg/mL. Isolat bakteri W3.5 (Arabika) dan S1.3.1 (Robusta) mampu melarutkan fosfat masing-masing 4,5 µg/mL dan 2,3 µg/mL. Isolat terpilih sebagai kandidat PGPR S1.6.3.2 dan S1.3.1 teridentifikasi *Bacillus subtilis* DSM 10^T, isolat W1.2 merupakan *Bacillus methylotropicus* SY2, isolat S3.4.2 sebagai *Bacillus wiedmannii* FSL W8-0169, isolat W3.5 sebagai *Pseudomonas putida* S18, sedangkan isolat W2.4.4.1 sebagai *Bacillus* sp. W2.4.4.1. Hasil identifikasi isolat hanya ditemukan genus *Pseudomonas* sebesar 2-2,5% dan genus *Bacillus* sebesar 0,6-1,2% berdasarkan analisis metagenomik 16S rDNA tanah. Informasi jenis bakteri yang melimpah berdasarkan metode isolasi dan analisis metagenomik dapat dijadikan acuan untuk mengoleksi berbagai jenis bakteri PGPR dari rhizosfer tanah kopi Robusta dan Arabika guna memperoleh kandidat bakteri PGPR terbaik yang dapat dikembangkan menjadi biofertilizer tanaman kopi di UB Forest.



SUMMARY

Exploration of Coffee Plantation Rhizospheric Bacteria in UB Forest Agroforestry Malang District as Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) Agent

Ervinda Yuliatin, Tri Ardyati, Suharjono

Biology Master Program, Biology Department, Faculty of Mathematics and Natural Sciences,
Universitas Brawijaya

2020

Coffee (*Coffea* sp.) has an important role in the economic sector in global countries. As the fourth rate of coffee production in the world, Indonesia, especially in East Java. Universitas Brawijaya Forest (UB Forest) manage and develop the coffee plantation as primary product. The coffee production in UB Forest decreased because of climate change and soil fertility. Organic fertilizer was used to improve soil fertility, however the coffee production was not increase significantly. For solving this problem, rhizospheric soil bacteria such as Indole Acetic Acid (IAA)-producing bacteria, nitrogen-fixing bacteria and phosphate-solubilizing bacteria could be applied to support plant growth. Therefore, isolation of bacteria, analysis of bacterial diversity, metagenomic analysis, potency assay and identification of selected rhizosphere bacteria are necessary to investigate the indigenous Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) candidates which is support biofertilizer information, sustainable coffee agroforestry (high productivity), and eco-friendly environment of the coffee plantation production.

The aims of this study were to analyze the correlation between environmental factors and density also diversity index of rhizospheric bacteria of coffee plantation as PGPR candidates, to investigate the structure composition of rhizospheric bacteria, to performe the potency of rhizospheric bacteria for producing IAA, fixing nitrogen, and solubilizing phosphate, and to identify the selected rhizospheric bacteria as PGPR candidates based on 16S rDNA sequencing. The steps of research were soil physicochemical analysis, 16S rDNA metagenomic analysing soil bacteria, isolation of rhizospheric bacteria, screening and identifying of selected rhizospheric bacteria. The PGPR was isolated using serial dilution and poured plate method on TSA, Nfb Agar, and Pikovskaya Agar medium for producing IAA, fixing nitrogen, and solubilizing phosphate respectively. The density of PGPR isolate candidates was enumerated by TPC and diversity index of PGPR isolate candidates was measured based on the morphological characteristics of bacteria. The environmental factors, density and diversity of PGPR isolate candidates were performed by multivariate analysis using PCA to determine their relationships. Each of PGPR isolates was screened its potency for IAA-producing, nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing activity. IAA hormone concentration was measured by colorimetri method using Salkowski reagent, Ammonium was quatified by colorimetri method using Sera Ammonia Test Kit and Nessler Reagent, and Phosphate solubilizing were screened by Ammoniummolibdat Reagen and Chlorostand acid. These treatment were performed using completely randomized design (CRD) experiment with triplicates and the data analyzed using SPSS software v.20. The highest concentration of IAA-production, nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing from PGPR isolates on both of rhizospheric coffee plantation of each screening were identified using the similarity of 16S rDNA sequencing using amplification primers such as 27f (5'-GAG AGT TTG CTG GCT CAG-3') and 1429r (5'-CTA CGG CTA TGT TAC GA-3').

The results showed that based on Person Correlation and multivariate analysis, environmental factors such as C/N ratio and organic matter increased the density of PGPR bacteria. Otherwise, the minimum number of total-N, diameter of tree, water holding capacity

and altitude factors increased PGPR density. Other factors, phosphate-availability in small quantity decreased the density of IAA-producing and nitrogen-fixing bacteria and the higher of soil pH increased the density of phosphate solubilizing bacteria. Whereas, metagenomic soil analysis showed that the structure composition of rhizospheric bacteria on Robusta and Arabica coffee soil performed the Phylum was Proteobacteria (49,27% dan 39%), the Class was Alphaproteobacteria (30,1% dan 42,9%), the Ordo was Rhizobiales (26,8% dan 17,0%), the Family was Xanthobacteraceae (12,5% dan 7,5%), the Genus was *Bradyrhizobium* (3,1% dan 6,1%) dan the Species was *Bradyrhizobium elkanii* (62,5% dan 75,0%) respectively. The diversity index of rhizospheric bacteria were 0,990 (Arabica) dan 0,995 (Robusta), showed the high diversity index on both rhizospheric coffee. The potency of S1.6.3.2 (Robusta) and W2.4.4.1 (Arabica) produced IAA-hormone 104.6 µg/mL and 88.12 µg/mL, W3.5 (Arabica) and S1.3.1 (Robusta) were able to dissolve phosphate 4.5 µg/mL and 2.3 µg/mL, while W1.2 (Arabica) and S3.4.2 (Robusta) produced the ammonia up to 21.54 µg/mL and 2.07 µg/mL respectively. The PGPR selected isolates S1.6.3.2 and S1.3.1 were identified as *Bacillus subtilis* DSM 10^T. Isolate W1.2, S3.4.2, W3.5, and W2.4.4.1 were *Bacillus methylotropicus* SY2, *Bacillus wiedmannii* FSL W8-0169, *Pseudomonas putida* S18, and *Bacillus* sp, respectively. Based on 16S rDNA metagenomic soil analysis result, the identification found population of *Pseudomonas* and *Bacillus* 2-2.5% and 0.6-1.2% respectively. It was small quantity rather than *Bradyrhizobium elkanii* abundant almost 60-75% in the rhizospheric soil. Further, both methods culturing and metagenomic analysis can be helpful for exploring and collecting the PGPR bacteria from rhizospheric soil Robusta and Arabica coffee. It will be useful to develop the biofertilizer for improving the coffee plantation production in UB Forest.



DAFTAR ISI

Halaman

RINGKASAN	viii
SUMMARY	x
KATA PENGANTAR	xii
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	xix

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Potensi dan Produksi Tanaman Kopi	4
2.2 Karakteristik dan Pengelolaan Tanaman Kopi	5
2.3 Peran Diversitas Mikroba Tanah daam Produktivitas Tanaman	7
2.4 Potensi <i>Plant Growth Promoting Rhizobacteria</i> sebagai Biofertilizer	9
2.5 Kerangka Konsep Penelitian	17

BAB III METODE PENELITIAN

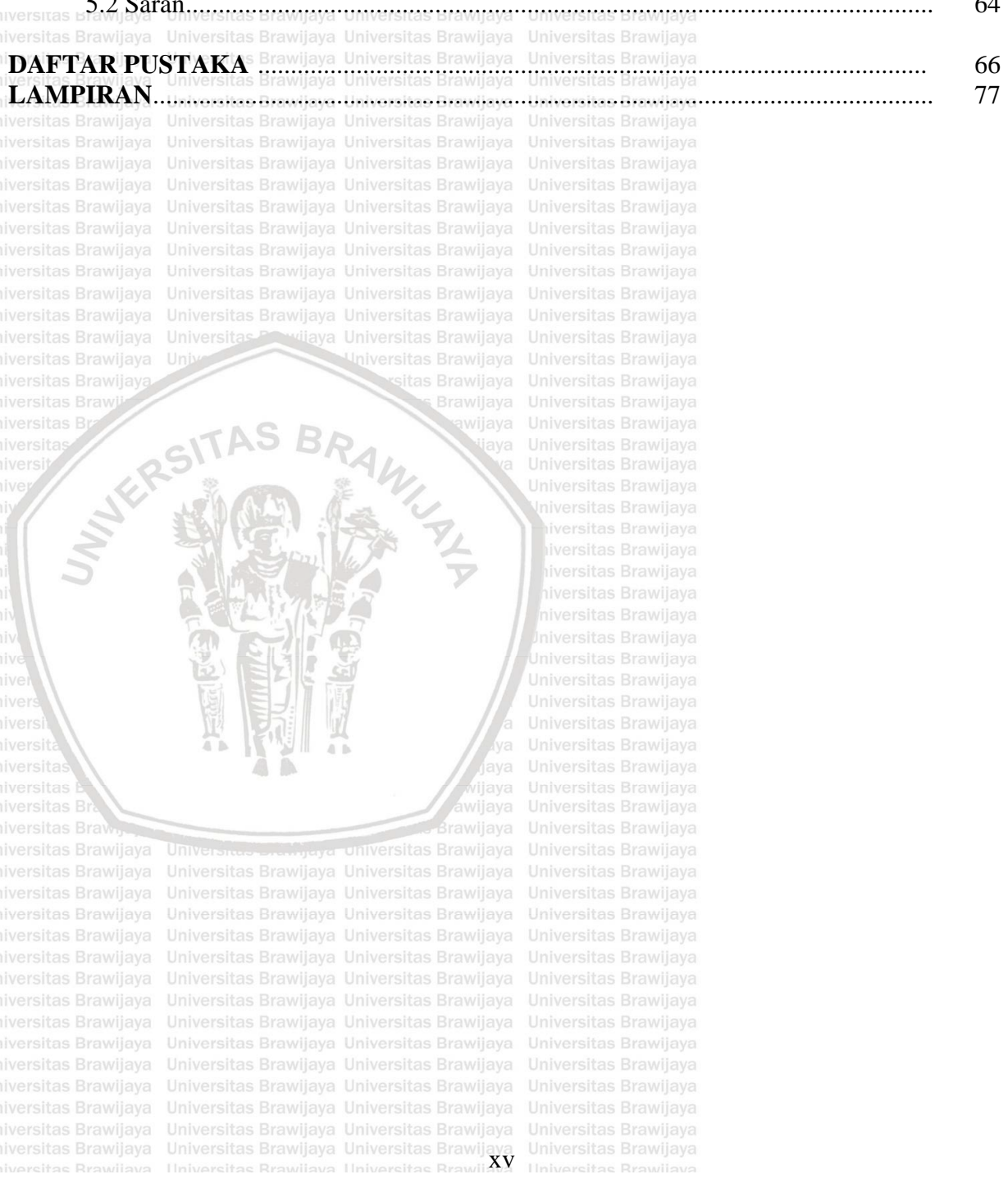
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	19
3.2 Deskripsi Lokasi Pengambilan Sampel	19
3.3 Kerangka Operasional Penelitian	20
3.4 Pengambilan Sampel Tanah	21
3.5 Pengukuran Sifat Kimia Tanah	22
3.6 Analisis Metagenomik	23
3.6.1 Optimasi pH tanah	23
3.6.2 Ekstraksi DNA	24
3.6.3 Analisis Genome DNA	25
3.7 Isolasi Bakteri Rhizosfer Tanaman Kopi	26
3.7.1 Isolasi Rhizobakteri Penghasil IAA	26
3.7.2 Isolasi Rhizobakteri sebagai Pelarut Fosfat	26
3.7.3 Isolasi Rhizobakteri sebagai Penambat Nitrogen	27
3.8 Uji Kemampuan Isolat PGPR	27
3.8.1 Uji kemampuan isolat PGPR penghasil IAA	27
3.8.2 Uji kemampuan isolat PGPR sebagai pelarut fosfat	28
3.8.3 Uji kemampuan isolat PGPR sebagai penambat nitrogen	29
3.9 Karakterisasi Fenotip Identifikasi dan Konstruksi Filogenetik Isolat PGPR	29
3.9.1 Karakterisasi fenotip bakteri PGPR	29
3.9.2 Identifikasi dan konstruksi pohon filogenetik bakteri berdasarkan sekuen 16S rDNA	30

BAB HASIL DAN PEMBAHASAN.....	33
4.1 Karakterisasi Parameter Lingkungan Rhizosfer Tanaman Kopi.....	33
4.2 Hubungan Parameter Lingkungan terhadap Densitas Bakteri PGPR dari..... Rhizosfer Tanaman Kopi	36
4.3 Diversitas Bakteri Rhizosfer dari Tanaman Kopi	40
4.4 Potensi Bakteri PGPR dari Rhizosfer Tanaman Kopi.....	50
4.4.1 Potensi bakteri pengasil IAA	50
4.4.2 Potensi bakteri pelarut fosfat.....	54
4.4.3 Potensi bakteri penambat nitrogen	57
4.5 Identifikasi Bakteri PGPR Terpilih berdasarkan Sekuen 16S rDNA.....	58

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan	64
5.2 Saran.....	64

DAFTAR PUSTAKA.....	66
LAMPIRAN.....	77



DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1	Komposisi <i>master mix</i> PCR untuk amplifikasi 16S rDNA.....	31
2	Program reaksi PCR 16S rDNA.....	31
3	Parameter lingkungan di lokasi perkebunan kopi	35
4	Hubungan antara parameter lingkungan terhadap densitas PGPR	37
5	Data analisis statistik konstruksi OTU.....	41
6	Struktur komunitas dan diversitas bakteri rhizosfer dari kopi Arabika dan Robusta	49
7	Potensi kualitatif bakteri rhizosfer tanaman kopi penghasil IAA.....	51
8	Potensi kualitatif bakteri rhizosfer tanaman kopi sebagai pelarut fosfat	55
9	Potensi semikuantitatif fiksasi nitrogen bakteri rhizosfer tanaman kopi.....	57



DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1	Kabupaten sentra produksi kopi Robusta perkebunan rakyat di Jawa Timur.....	4
2	Ilustrasi mekanisme PGPR meningkatkan kesuburan tanah.....	10
3	Interaksi eksudat akar tanaman, patogen, PGPR dan manfaat mikroba di Rhizosfer	12
4	Mekanisme penambatan nitrogen secara molekular oleh bakteri	13
5	Diagram alir penambat nitrogen oleh bakteri penambat nitrogen non simbiosis....	14
6	Skema pelarutan fosfor tanah oleh bakteri PGPR.....	16
7	Alur <i>Tryptophan-dependent</i> dalam biosintesis auksin oleh bakteri	17
8	Bagan kerangka konsep penelitian.....	18
9	Lokasi pengambilan sampel.....	20
10	Kerangka operasional penelitian	21
11	Korelasi faktor lingkungan tanah rhizosfer tanaman kopi UB <i>Forest</i> berdasarkan analisis multivariat	39
12	Jumlah <i>sekuen tag</i> yang terdiri dari Kingdom Bakteri dan Archaea	42
13	Komposisi filum mikroba tanah rhizosfer tanaman Kopi Robusta dan Arabika	42
14	Komposisi kelas, ordo, dan famili bakteri tanah rhizosfer tanaman Kopi Robusta dan Arabika di UB <i>Forest</i>	43
15	Komposisi genus bakteri pada tanah rhizosfer tanaman Kopi Robusta dan Arabika.....	45
16	Pohon filogeni bakteri rhizosfer Kopi Robusta dan Arabika di UB <i>Forest</i>	46
17	Kelimpahan relatif spesies bakteri rhizosfer Kopi Robusta dan Arabika di UB <i>Forest</i>	47
18	Profil komunitas bakteri rhizosfer Kopi Arabika dan Robusta.....	50
19	Skoring warna pada membran nutriselulose yang diteteskan reagen Salkowski....	51
20	Konsentrasi hormon IAA yang diproduksi oleh bakteri rhizosfer Kopi Arabika dan Robusta pada variasi waktu inkubasi	53
21	Konsentrasi fosfat terlarut yang dihasilkan bakteri rhizosfer kopi Arabika dan Robusta pada variasi waktu inkubasi.....	56
22	Konsentrasi amonia dihasilkan bakteri rhizosfer kopi Arabika dan Robusta pada variasi waktu inkubasi.....	58
23	Pohon filogeni <i>Bacillus subtilis</i> S1.6.3.2 dan S1.3.1, <i>Bacillus methylotropicus</i> W1.2 dn <i>Bacillus wiedmanii</i> S3.4.2 serta isolat-isolat bacuan berdasarkan kemiripan sekuen 16S rDNA	59
24	Pohon filogeni <i>Pseudomonas putida</i> W3.5 serta isolat-isolat acuan berdasarkan kemiripan sekuen 16S rDNA	61
25	Pohon filogeni isolat W2.4.4.1 dan isolat-isolat acuan berdasarkan kemiripan sekuen 16S rDNA	62
26	Pohon filogeni isolat W2.4.4.1 menurut metode <i>Fast Minimum Evolution</i> berdasarkan <i>MUSCLE multiple alignment computed for MOLE-BLAST</i>	62

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Analisis statistik	77
1.1 Analisis statistik faktor biotik dan abiotik lingkungan	77
1.2 Analisis statistik faktor fisikokimia tanah.....	77
1.3 Analisis statistik faktor densitas bakteri PGPR.....	77
2 Uji perbandingan faktor fisikokimia dan biologi tanah, densitas dan indeks diversitas bakteri PGPR	78
3 Uji korelasi antara faktor abiotik lingkungan, fisikokimia tanah dan densitas bakteri PGPR	79
4 Uji analisis multivariat faktor fisikokimia dan biologi tanah, densitas dan diversitas bakteri PGPR	80
5 Hasil Uji Nanodrop ekstraksi DNA tanah kopi Arabika dan Robusta.....	81
6 Kurva standar produksi IAA, pelarut fosfat dan penambat nitrogen	81
7 Analisis Potensi Bakteri PGPR	82
8 Hasil Uji Nanodrop isolat PGPR terpilih dari rhizosfer kopi Arabika dan Robusta	89
9 Karakteristik morfologi isolat PGPR terpilih dari rhizosfer kopi Arabika dan Robusta	89
10 Hasil purifikasi sekuen isolat terpilih berdasarkan 16S rDNA	90
11 Isolat PGPR dan panjang sekuen DNA	90
12 Data urutan basa nukleotida 16S rDNA.....	90
13 Tabel similaritas.....	93
14 Tabel parameter yang diamati dan metode yang digunakan.....	97
15 Tabel jadwal penelitian.....	98

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
ACC	<i>1-aminocyclopopane-1-carboxylate</i>
ACE	<i>Rarefaction</i>
ACS	<i>arabica coffee soil</i>
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
BT	bujur timur
CFU	<i>colony forming unit</i>
CO ₂	karbon dioksida
CTAB	<i>cetyl trimethylammonium bromide</i>
DES	DNase
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dpl	di atas permukaan laut
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EPS	Eksopolisakarida
Fe	iron/besi
g	Gram
GPS	<i>global positioning system</i>
ha	Hektar
HCN	hidrogen sianida
IAA	<i>Indole-3-acetic-acid</i>
IAM	<i>indole-3-acetamide</i>
IpuA	<i>indole-3-pyruvic-acid</i>
LS	lintang selatan
ML	<i>maximum-likelihood</i>
Mo	Molibdenum
N	Nitrogen
N ₂	Dinitrogen
NCBI	<i>national center for biotechnology information</i>
Nfb	<i>nitrogen free bromothymol blue</i>
NH ₃	Amonia
OD	<i>optical density</i>
OTU	<i>operating taxonomy unit</i>
P	Fosfor
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PGPR	<i>plant growth promoting rhizobacteria</i>
PPS	<i>protein precipitation solution</i>
RCS	<i>robusta coffee soil</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i>
SOC	<i>soil organic carbon</i>
TBE	<i>tris boric EDTA</i>
TCO	trikalsium fosfat
TPC	<i>total plate count</i>
TSA	<i>tryptic soy agar</i>
TSB	<i>tryptic soy broth</i>

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Nama unit</u>
μL	Mikroliter
cm	Centimeter
M	Molar
mL	Mililiter
mm	Milimeter
N	Normal
nm	Nanometer
$^{\circ}\text{C}$	derajat Celcius
λ	panjang gelombang



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kopi berperan secara signifikan dalam ekonomi global bagi sekitar 80 negara (Musoli dkk., 2009) dan sebagai mata pencaharian sekitar 125 juta penduduk di Amerika Latin, Afrika, dan Asia (Osorio, 2002). Tantangan produksi kopi dunia yang berkembang sejak lebih 50 tahun lalu adalah biaya produksi meningkat disebabkan oleh dampak negatif perubahan iklim dan tingginya serangan hama dan penyakit terhadap produksi kopi (International Coffee Organization, 2014). Tahun 2050, dunia akan membutuhkan jumlah kopi dua kali lipat sedangkan lahan yang tersedia akan mengalami penurunan hingga separuhnya. Kopi sebagai komoditas pertanian menghadapi krisis sehingga diperlukan dukungan dari industri kopi agar dapat mengatur dan menentukan produksi kopi yang berkualitas di masa depan (World Coffee Research, 2017).

Di Indonesia, kopi menjadi sumber tanaman potensial dalam sektor perekonomian. Hal ini didukung juga dengan tradisi dan budaya serta kesadaran masyarakat Indonesia mengonsumsi kopi menyebabkan adanya peningkatan konsumen. Produsen kopi terbesar ketiga di Jawa Timur berada di Kabupaten Malang. Selain Dampit sebagai produsen kopi terbesar di Malang, Hutan UB *Forest* mengelola tanaman dan produksi kopi berbasis hutan dan ramah lingkungan. Sejak tahun 2017-2018 produksi kopi menurun disebabkan oleh curah hujan tinggi dan kesuburan tanah menurun di seluruh Indonesia termasuk di UB *Forest*. Peneliti di UB *Forest* sedang giat melakukan penelitian terkait kesuburan tanah, produksi dan pengolahan hasil kopi yang ditanam secara organik. Hal ini dikarenakan oleh kesuburan tanah merupakan parameter penting dalam pengelolaan agroekosistem untuk memperoleh produktivitas secara berkelanjutan. Penilaian kualitas, kesehatan, dan kesuburan tanah dapat menggunakan indikator mikrobiologi. Indikator ini diperankan oleh mikroba tanah yang mampu mendeteksi secara dini perubahan kualitas tanah. Mikroba tanah tersebut yaitu bakteri rhizosfer yang berperan dalam meningkatkan kesuburan tanah dan produktivitas tanaman. Keberadaan bakteri menjadi faktor penting bagi tanaman karena memengaruhi ketersediaan unsur hara tanaman. Berdasarkan peranan tersebut, maka bakteri rhizosfer disebut sebagai *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) (Verma dkk., 2010; Moe, 2013). Bakteri PGPR hidup bersaing dengan bakteri patogen dan mampu mengkoloni akar tanaman, dapat bertindak sebagai biofertilizer, dan biopestisida (Kumar dkk., 2011; Amutha dkk., 2014). Bakteri PGPR

diprediksi dapat menjadi alternatif mengatasi permasalahan penurunan produktivitas kopi karena kesuburan tanah yang rendah.

Biofertilizer sebagai produk PGPR menjadi alternatif pengganti pupuk kimiawi yang ramah lingkungan. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa biofertilizer meningkatkan 20-30 % hasil panen dan dapat menggantikan pupuk N dan P sintetis sebesar 25 %. Bakteri PGPR yang berperan antara lain, *Azotobacter* sp., *Pseudomonas* sp., dan *Bacillus* sp. (Amutha dkk., 2014). Keberadaan bakteri PGPR di tanah berperan sebagai perantara untuk memproduksi senyawa-senyawa bagi pertumbuhan tanaman antara lain hormon IAA, melarutkan fosfat, dan menambat nitrogen. Aktivitas metabolisme bakteri PGPR berdampak positif bagi lingkungan karena meningkatkan ketersediaan nutrisi pada tanaman dan menjaga stabilitas kesuburan tanah (Barriuso dkk., 2008). Penelitian sebelumnya telah mengevaluasi pertumbuhan akar bibit Kopi Arabika di India menggunakan konsorsium bakteri PGPR yang terdiri dari *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus megaterium*, dan *Azospirillum* telah memberikan pengaruh positif pada pertumbuhan akar (De Bashan dkk., 2008; Ines dkk., 2014; Srigandha dkk., 2017).

Informasi pemanfaatan bakteri PGPR sebagai pendukung pertumbuhan tanaman kopi di Indonesia terutama di UB *Forest* Karangploso, Malang belum diketahui sehingga penting untuk dilakukan penelitian dan kajian khusus terkait bakteri rhizosfer yang berasosiasi dengan tanaman kopi sebagai agen PGPR. Selain untuk memperoleh bakteri indigenus rhizosfer kopi, juga diharapkan hasil penelitian ini dapat berkontribusi dalam mendukung agroforestri kopi secara berkelanjutan, ramah lingkungan, dan produktivitas tinggi. Penelitian ini mengeksplorasi bakteri rhizosfer indigenus yang berpotensi sebagai agen PGPR dan teradaptasi dengan lahan di UB *Forest*.

1.1 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka dapat dirumuskan masalah yang dikaji dalam penelitian ini yaitu:

1. Bagaimana pengaruh parameter lingkungan terhadap densitas dan diversitas bakteri kandidat PGPR di tanaman kopi di UB *Forest*?
2. Bagaimana struktur komunitas dan diversitas bakteri rhizosfer kopi berdasarkan analisis metagenomik 16S rDNA bakteri tanah?
3. Bagaimana potensi bakteri kandidat PGPR dalam menambat nitrogen, melarutkan fosfat, dan menghasilkan *Indole Acetic Acid* (IAA)?

4. Spesies bakteri kandidat PGPR apakah yang memiliki potensi tinggi sebagai agen PGPR dari tanaman kopi berdasarkan sekuen 16S rDNA?

1.2 Tujuan Penelitian

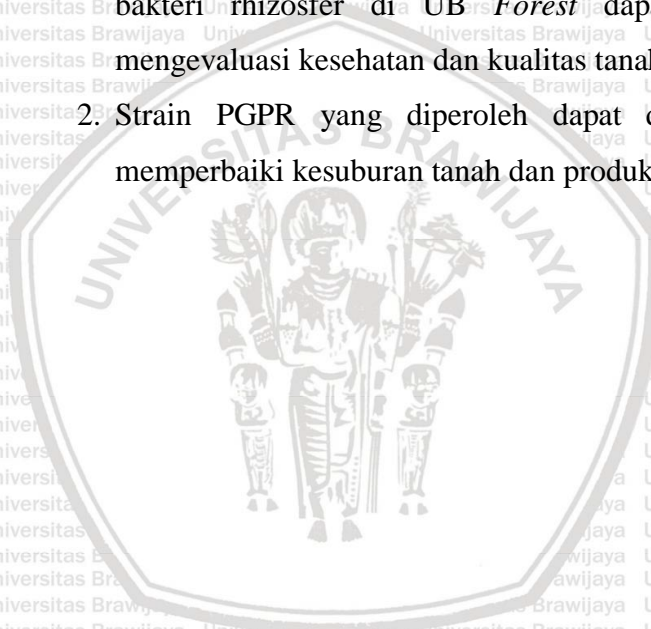
Adapun tujuan penelitian ini yaitu:

1. Menganalisis pengaruh parameter lingkungan terhadap densitas dan diversitas bakteri kandidat PGPR di tanaman kopi di UB *Forest*.
2. Mempelajari struktur komunitas dan diversitas bakteri rhizosfer kopi berdasarkan analisis metagenomik 16S rDNA bakteri tanah.
3. Mempelajari potensi bakteri kandidat PGPR dalam menambat nitrogen, melarutkan fosfat, dan menghasilkan *Indole Acetic Acid* (IAA).
4. Mengidentifikasi bakteri kandidat PGPR yang berpotensi tinggi sebagai agen PGPR tanaman kopi berdasarkan sekuen 16S rDNA.

1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini antara lain:

1. Dengan diketahuinya diversitas PGPR dan pengaruh lingkungan terhadap densitas bakteri rhizosfer di UB *Forest* dapat digunakan sebagai *biomarker* untuk mengevaluasi kesehatan dan kualitas tanah.
2. Strain PGPR yang diperoleh dapat dimanfaatkan sebagai biofertilizer untuk memperbaiki kesuburan tanah dan produktivitas tanaman kopi di UB *Forest*.

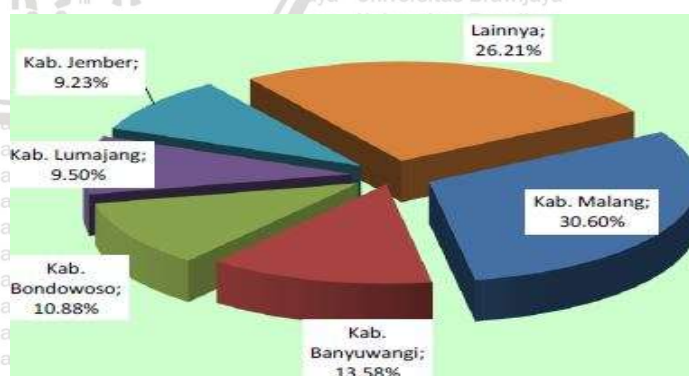


BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Potensi dan Produksi Tanaman Kopi

Kopi merupakan komoditas utama dan strategis tanaman tahunan perkebunan Indonesia. Budidaya tanaman kopi berkembang pesat di wilayah tropis dan subtropis seperti Amerika Selatan, Afrika, dan Asia Tenggara. Indonesia menduduki peringkat empat sebagai produsen dan mengekspor kopi terbesar di dunia pada musim tanam tahun 2016-2017 sebanyak secara berurutan 11.491.000 ton dan 6.891.000. Luas lahan perkebunan kopi di Indonesia sebesar 933 ha (Robusta) dan 307 ha (Arabika). Namun, sebanyak 90 % perkebunan kopi dibudidayakan oleh petani yang memiliki perkebunan relatif kecil yaitu 1-2 hektar. Indonesia tidak memiliki perkebunan kopi yang besar sehingga terkendala dalam mempertahankan jumlah produksi dan kualitas kopi. Oleh sebab itu, kopi membutuhkan inovasi produksi agar dapat bersaing di pasar internasional (Indonesia Investments, 2017).

Produksi kopi di Indonesia mengalami fluktuasi pada periode 2003-2012 kemudian perkembangan produksinya cenderung mengalami stagnansi. Produksi kopi Indonesia pada tahun 2017 mencapai 1.792.724 ton, luas areal 1.179.769 ha dengan rata-rata produksi 692 Kg/ha. Berdasarkan data kategori provinsi dan status perusahaan kopi tahun 2015 menunjukkan bahwa produksi Kopi Robusta di Jawa Timur mencapai 50.009 ton dengan luas area 84.178 ha sedangkan produksi Kopi Arabika 15.953 ton dengan luas area 13.320 ha (Dirjen Perkebunan, 2016). Menurut Kementerian Pertanian (2016) Kabupaten Malang merupakan sentra produksi Kopi Robusta perkebunan rakyat yang mampu memproduksi kopi tertinggi sebesar 30,60 % dibandingkan daerah lainnya di Jawa Timur (Gambar 1). Jumlah produksi kopi di Kabupaten Malang pada tahun 2016 mencapai 17.547 ton.



Gambar 1. Kabupaten sentra produksi Kopi Robusta perkebunan rakyat di Jawa Timur

Faktor curah hujan yang tinggi menurunkan ekspor kopi pada tahun 2017-2018 sebesar 20 %, sedangkan permintaan biji kopi di pasar semakin meningkat (Indonesia Investments, 2017). Inovasi olahan kopi semakin giat dikembangkan oleh para petani dan peneliti untuk mendapatkan jumlah produksi stabil dan pengolahan produksi kopi yang berkualitas. Sejak 60 tahun terakhir, kopi semakin digemari oleh berbagai kalangan masyarakat. Menurut Gulland (2017) dan Mei (2018) mengonsumsi kopi sebanyak tiga cangkir atau 708 mL/hari dapat mengurangi risiko penyakit jantung koroner. Selain karena faktor kesehatan, cita rasa kopi yang semakin bervariasi menarik simpati anak muda untuk berkreasi dan berinovasi dengan kopi.

Kajian terbaru terkait kopi yaitu budidaya kopi secara intensif untuk meminimalisir dampak kerusakan lingkungan yang berisiko pada kesehatan manusia dan menurunnya biodiversitas (Caldwell dkk., 2015). Hal ini menunjukkan bahwa kopi memiliki prospek ekonomi di masa depan. Pemanfaatan dan pengelolaan budidaya tanaman kopi yang tepat guna, akan mendorong majunya produksi kopi lokal secara global. Kondisi ini tentu akan berpotensi meningkatkan pendapatan perekonomian negara. Pengembangan terbaru mengenai sistem penanaman kopi secara organik dengan melibatkan mikroba tanah diketahui dapat memberikan dampak positif untuk pertumbuhan tanaman kopi.

2.2 Karakteristik dan Pengelolaan Tanaman Kopi

Kualitas kopi memiliki karakteristik yang kompleks bergantung pada faktor genetik seperti varietas tanaman, kondisi lingkungan seperti iklim, ketinggian, curah hujan, dan fisikokimia tanah; faktor budidaya, sistem pascapanen, kondisi pengolahan, proses industri, dan proses penyajian produk kopi kepada konsumen. Iklim, ketinggian tempat, dan naungan memengaruhi suhu lingkungan tanaman kopi sedangkan intensitas cahaya dan ketersediaan air merupakan faktor penting pada masa pematangan buah. Curah hujan dan distribusi sinar matahari sangat memengaruhi pada masa berbunga, berbuah, dan pematangan buah (Moreno dkk., 1995; Decasy dkk., 2003, dan Damanu, 2008).

Tanaman kopi (*Coffea* sp.) kurang toleran terhadap sinar matahari penuh sehingga membutuhkan tanaman penayang untuk mengurangi intensitas cahaya menjadi sekitar 30-70 % disesuaikan dengan umur tanaman kopi. Jenis penayang tanaman kopi terbagi atas dua macam yaitu penayang sementara dan penayang tetap. Tanaman kopi dinaungi oleh penayang sementara pada kondisi penayang tetap belum berfungsi. Contoh penayang sementara yaitu dari Famili Leguminosae (*Moghania macrophylla*, *Crotalaria* sp.) tumbuhan penangan untuk Kopi Robusta di dataran rendah sedangkan *Tephrosia* sp.

tumbuhan penaungan untuk Kopi Arabika di dataran tinggi. Tanaman penaung juga berperan dalam mengendalikan erosi unsur hara. Tanaman kopi tanpa penaungan lebih banyak mengalami kehilangan unsur nitrogen setiap tahunnya (Abdoellah, 2013). Manfaat dari penaungan tanaman kopi yaitu memperoleh buah segar yang lebih banyak, biji besar, warna hijau pada biji dan lebih asam, serta tanaman lebih tinggi (Muschler, 2001). Selain itu, penaungan juga mengurangi pertumbuhan gulma sehingga menekan kompetisi unsur hara dengan tanaman kopi. Sistem kopi-penaung dapat membentuk mekanisme daur ulang unsur hara dan mengurangi kebergantungan suplai unsur hara dari luar sistem. Selain itu, perakaran tanaman penaung pada tanaman kopi dapat menstabilkan partikel tanah sehingga dapat mengurangi erosi (Faminow & Rodriguez, 2001).

Jumlah produksi panen kopi yang menurun membutuhkan inovasi dalam sistem pengelolaan tanaman kopi. Di Afrika *African Fine Coffees Association* melakukan penilaian dan evaluasi penurunan produksinya di tahun 2015 menetapkan strategi teknologi untuk memulihkan produksi kopi. Kolaborasi antara petani dan peneliti di bidang pengelolaan produksi kopi menemukan bahwa faktor penyebab penurunan produksi adalah tanah yang tidak subur, usia tanaman dan potensi genetik tanaman kopi terhadap serangan penyakit. Dua fokus penting yaitu varietas kopi dan kondisi tanah.

1. Varietas kopi

Renovasi hutan kopi dapat dilakukan secara efektif dan menguntungkan jika produsen mengadopsi lebih banyak varietas yang resisten terhadap penyakit yang memiliki tingkat kualitas yang baik dan cocok untuk sistem pertaniannya (World Coffee Research, 2015). Teknologi yang dikembangkan saat ini yaitu konservasi dan penggunaan diversitas genetik tanaman kopi yang tersedia di *genebank* dan meningkatkan koleksi persilangan kopi, identifikasi gen sebagai target untuk persilangan kopi secara molekular dan menciptakan peralatan untuk mencapai target yang berkualitas secara kimia dan analisis sensorik (World Coffee Research, 2016).

2. Kondisi tanah

Variasi kopi yang berpotensi tinggi untuk diproduksi dan buah melimpah tidak akan diproduksi secara konsisten jika tidak mendapatkan nutrisi yang cukup. Oleh sebab itu, kesuburan tanah, konservasi, dan nutrisi merupakan komponen penting dari solusi teknologi yang menguntungkan. Adapun permasalahan tanah yang terjadi disebabkan tanah tercemar oleh aktivitas pertambangan yang telah terakumulasi bertahun-tahun menyebabkan masalah baru bagi kesehatan dan kesuburan tanah. Input organik seperti

kompos dan mulsa dapat digunakan hingga saat ini, akan tetapi ketersediaannya terbatas, ketersediaan lahan terbuka berkurang dan keasaman tanah yang tinggi (World Coffee Research, 2015).

Pada aspek unsur hara, tanaman kopi bersimbiosis dengan bakteri penambat nitrogen. Mineralisasi sisa tanaman membebaskan nitrogen dari bentuk organik yang tidak dapat diserap akar tanaman menjadi bentuk mineral seperti amonium dan nitrat agar dapat diserap oleh tanaman. Kondisi suhu dan bahan organik memengaruhi aktivitas mikroba. Bahan organik dengan nisbah C/N lebih dari 30 akan membebaskan nitrogen lebih lambat. Kondisi ini dapat memicu meningkatnya populasi mikroba di tanah. Bahan organik dengan nisbah C/N antara 20-30 menunjukkan mineralisasi yang lambat karena adanya proses imobilisasi oleh mikroba (Abdoellah, 2013). Menurut Reddy (2017) pemanfaatan mikroba tanah untuk pengelolaan pertanian berkelanjutan menjadi alternatif yang penting untuk dikembangkan. Hal ini dikarenakan mikroba tanah tersebut dapat mendukung pertumbuhan tanaman dan perbaikan kondisi tanah. Prioritas utama dalam sistem produksi kopi yaitu kualitas kopi dan penanamannya secara organik dalam rangka menurunkan penggunaan pupuk kimiawi.

2.3 Peran Diversitas Mikroba Tanah dalam Produktivitas Tanaman

Tanah merupakan bagian dari komponen ekosistem mikroba berperan memengaruhi struktur komunitas dan aktivitas mikroba tanah. Komunitas mikroba terdistribusi secara heterotropik dengan jaringan interaksi siklus mikro dan makro nutrisi yang kompleks di ekosistem tanah. Hubungan yang dinamis antara komponen biotik dan abiotik bervariasi berperan sebagai kontrol agroekosistem. Diversitas komunitas mikroba yang bervariasi salah satunya dipengaruhi oleh bahan organik tanah karena memberikan asupan nutrisi pada tanaman. Kandungan kimia dari eksudat akar tanaman memberikan mineral sebagai tambahan nutrisi bagi tanah, tanaman dan dimanfaatkan mikroba sebagai sumber energi di tanah. Keterkaitan populasi mikroba tanah dan kesuburan tanah penting untuk dipahami karena berpeluang dalam mengatasi permasalahan pertanian dan lingkungan. Konsep ini dapat diaplikasikan dengan mengisolasi dan menginokulasikan mikroba tanah untuk diaplikasikan ke tanah. Interaksi mikroba tanah dengan tumbuhan, dan mikroba lainnya menjadi menarik untuk dikaji (Kuramae dkk., 2012; Baliyarsingh dkk., 2017).

Habitat tanah memengaruhi populasi, komposisi, dan aktivitas mikroba tanah. Lahan budidaya yang mengandung bahan organik tinggi memiliki populasi mikroba yang tinggi dibandingkan di tanah berpasir. Hal ini dikarenakan adanya aktivitas mikroba seperti

berespirasi, berkompetisi untuk memperoleh makanan dan bersinergi untuk merespon perubahan lingkungan di tempat tinggalnya. Selain habitat, tekstur dan tipe tanah juga memengaruhi komposisi dan populasi komunitas mikroba tanah. Pada tanah humus, mikroba berperan penting dalam pembentukan substansi struktur tanah yang terdiri dari asam uronat, protein bakteri yang dihasilkan dari aktivitas litik, dan *lysate* dari fungi yang disintesis oleh bakteri tanah. Diversitas mikroba tanah juga dipengaruhi oleh parameter seperti suhu, kelembaban, variasi musim, pH tanah, kadar oksigen, dan ketersediaan nutrisi tanah (Baliyarsingh dkk., 2017).

Kesuburan tanah secara tidak langsung dapat berhubungan dengan biomassa mikroba bergantung pada ketersediaan dan kualitas karbon, seperti *soil organic carbon* (SOC). Kesuburan tanah sebagai salah satu parameter yang signifikan untuk pengelolaan agroekosistem guna mencapai produktivitas berkelanjutan. Perubahan kualitas tanah secara kimia, fisika, dan biologi dapat dievaluasi dan dimonitoring secara langsung dengan mengukur produktivitas dan diversitas tanaman di tanah tersebut. Indikator biologi digunakan untuk menilai kualitas tanah yang terdapat biomassa mikroba, respirasi tanah, aktivitas enzim tanah, jumlah cacing tanah dan sebagainya. Indikator mikrobiologi bermanfaat dalam mendeteksi lebih awal perubahan kualitas tanah sebagai perubahan kecil di ekosistem. Keunikan setiap ekosistem tanah disebabkan oleh tipe aktivitas komunitas mikroba dan multi interaksi dengan habitatnya.

Kehadiran mikroba tanah berdasarkan ketersediaan karbon dapat diketahui melalui kedalaman tanah. Semakin ke dalam tanah (*subsoil*) jumlah mikroba tanah semakin sedikit sebab jumlah nutrisi dan oksigen semakin berkurang. Mikroba tersebut secara spesifik berlimpah di area dekat akar tanaman disebut sebagai bakteri rhizosfer. Mikroba tanah memberikan makroelemen nutrisi seperti karbon, nitrogen, dan fosfor untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Mikroba mengontrol secara tidak langsung produksi dan regulasi pada tanaman seperti memproduksi fitohormon. Meskipun demikian, tidak semua mikroba tanah memberikan interaksi positif, beberapa diantaranya memberikan efek berbahaya bagi tanaman. Efek ini muncul sebagai akibat adanya kompetisi mikroba satu dengan mikroba lainnya untuk memperoleh nutrisi dari tanah atau menjadi parasit pada tanaman dengan mengeluarkan zat toksiknya (Baliyarsingh dkk., 2017).

Diversitas dan struktur komunitas bakteri dipengaruhi oleh fisikokimia tanah, termasuk diantaranya ukuran pori, partikel, kadar karbon, dan air. Aktivitas biologis yang umum seperti amonifikasi, nitrifikasi, denitrifikasi, dan fiksasi nitrogen digunakan untuk

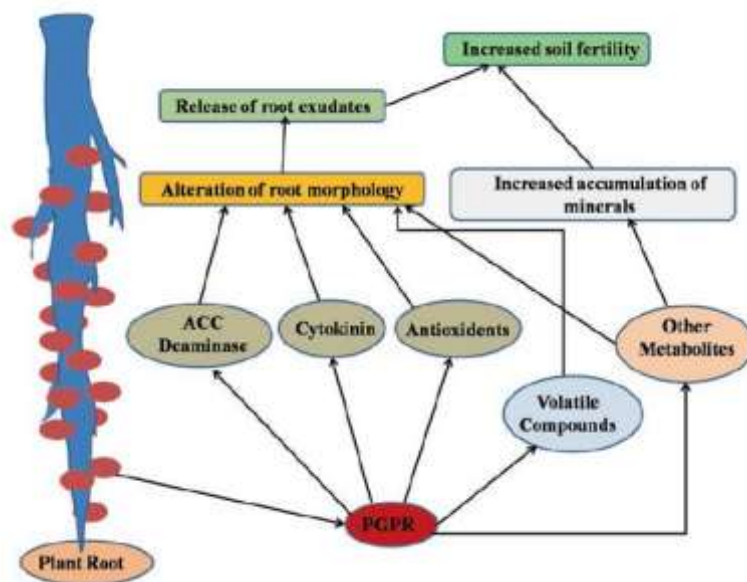
analisis kesuburan tanah. Kelimpahan mikroba tanah dan kehadiran mikroba lainnya dapat diuji dengan metode kultur. Pengukuran perubahan konsentrasi nutrisi tanaman pada tanah dapat dilakukan dengan mengamati aktivitas dan kelimpahan mikroba (Baliyarsingh dkk., 2017).

Diversitas tanaman memengaruhi populasi mikroba di ekosistem tanah. Hal ini dibuktikan melalui berbagai eksperimen untuk menilai pengaruhnya terhadap mikroba tanah. Umumnya, efek tanaman pada mikroba dipelajari secara tidak langsung melalui pengukuran jumlah mikroba, kemampuan nitrifikasi dan denitrifikasi tanah, dan sumber oksidasi aerasi tanah atau produksi CO₂. Pertumbuhan tanaman struktur dan fungsi mikroba tanah berdampak sebagai berikut.

1. Pertumbuhan bakteri tanah dan fungi didominasi oleh komponen pelarut organik dan anorganik seperti format, oxalat, asam malat, gula, fosfat, dan berbagai komponen nitrogen yang disekresikan oleh tanaman.
2. Tanaman dapat membentuk ujung akar dan rambut akar, sel epidermis dan produk lainnya membantu pertumbuhan mikroba.
3. Tanaman dibantu oleh mikroba berperan dalam mineralisasi tanah seperti penambat nitrogen, pelarut fosfat, dan potasium (Baliyarsingh dkk., 2017).

2.4 Potensi *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* sebagai Biofertilizer

Rhizosfer merupakan tanah di sekitar akar tanaman dengan jumlah populasi bakteri yang tinggi. Akar tanaman mengeluarkan suatu eksudat yang memicu meningkatnya populasi bakteri tanah. Eksudat akar mengandung karbon dan sumber energi yang mengatur terjadinya pertumbuhan mikroba di rhizosfer. Bakteri tanah berinteraksi dengan akar tanaman disebut bakteri rhizosfer. Populasi bakteri rhizosfer mampu meningkatkan pertumbuhan tanaman sehingga disebut sebagai *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR). Bakteri PGPR berkoloni di rhizosfer, permukaan akar, atau di interselular sel tanaman inang (Lugtenberg & Bloemberg, 2004). Aplikasi PGPR dengan menginokulasikan konsorsium bakteri rhizosfer pada tanah mampu meningkatkan hasil produksi tanaman pertanian (Gambar 2). Strain bakteri rhizosfer dibuat dalam inokulum konsorsium guna meningkatkan kemampuannya saat diaplikasikan di tanah sehingga nutrisi yang diperlukan tanaman dapat tercukupi dan memicu pertumbuhan tanaman target (Chourasiya dkk., 2017).



Sumber: Sharma dkk., 2017

Gambar 2. Ilustrasi mekanisme PGPR meningkatkan kesuburan tanah

Berdasarkan lokasi, fungsi, dan aktivitasnya, PGPR diklasifikasikan menjadi tiga kelompok sebagai berikut:

1. Berdasarkan lokasi PGPR di rhizosfer

Menurut Gray dan Smith (2005) dan Martinez-Viveros dkk. (2010) PGPR dibedakan menjadi dua macam yaitu:

a. PGPR ekstraselular (ePGPR)

Plant Growth Promoting Rhizobacteria ekstraselular ditemukan di rhizosfer, rhizoplane, atau di antara sel korteks akar akan tetapi bakteri tidak ditemukan di dalam sel, contohnya *Pseudomonas*, *Bacillus*, dan lain-lain yang ada di tanah dan juga terdapat di interselular sel korteks sebagai endofit.

b. PGPR intraselular (iPGPR)

Plant Growth Promoting Rhizobacteria intraselular terdapat di dalam struktur sel nodul, contohnya *Rhizobia* dan *Frankia*, yang berasosiasi dengan tanaman tingkat tinggi dan berada di dalam sel yang membantu menambat nitrogen dari atmosfer.

2. Berdasarkan fungsi PGPR

Berdasarkan fungsinya PGPR dibagi menjadi tiga yaitu pemicu pertumbuhan tanaman, biokontrol, dan homeregulasi stress pada bakteri.

a. *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*

Beberapa rhizobakteri secara langsung menginduksi tanaman dengan cara menambat nitrogen, memproduksi fitohormon seperti IAA, sitokinin, GA3, dan produksi siderofor, serta pelarut fosfat (Meena dkk., 2016).

b. Biokontrol bakteri

Bakteri secara tidak langsung memicu pertumbuhan tanaman dengan cara menghasilkan fitotoksik seperti HCN (hidrogen sianida), kitinase, pektinase, selulase, etilen, antibiotik, dan lain-lain yang bermanfaat untuk memproteksi tanaman dari patogen (Sharma dkk., 2016).

c. Homeregulasi *stress* bakteri

Bakteri ini dapat membantu pertumbuhan tanaman secara langsung atau tidak langsung dalam tekanan biotik dan abiotik. Bakteri bekerja secara langsung dalam memicu pertumbuhan tanaman dengan cara menghasilkan fitohormon seperti asam absisat, asam salisilat, dan asam jasmonat, meregulasi pertumbuhan tanaman dan mengaktifkan sinyal molekuler seperti 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase (Sharma dkk., 2017).

3. Berdasarkan aktivitas PGPR

Menurut Somers dkk. (2004) berdasarkan aktivitasnya PGPR dapat sebagai:

a. Biofertilizer yaitu bakteri berperan dalam meningkatkan kesuburan dan produktivitas serta siklus nutrisi di tanah. Biofertilizer yang digunakan antara lain:

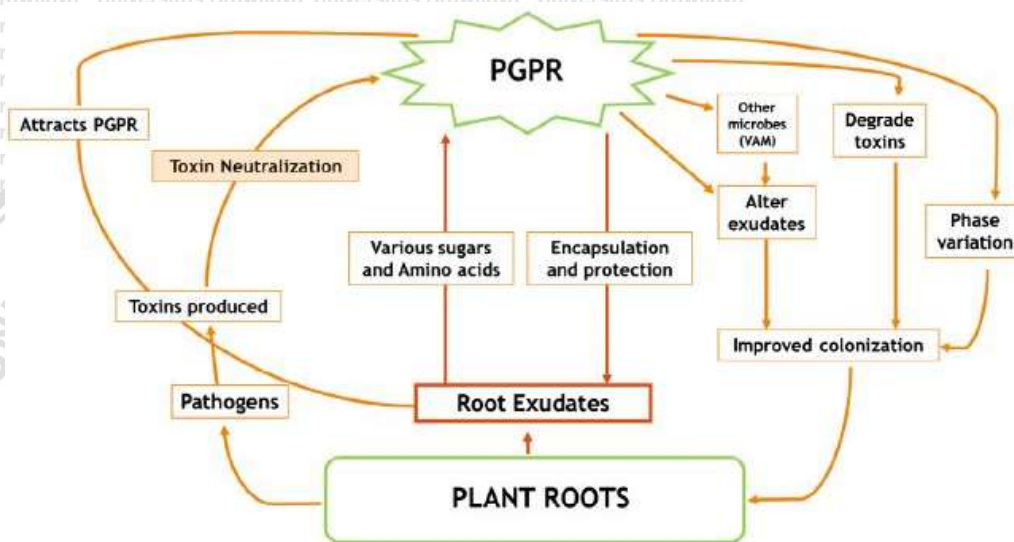
1. Penambat nitrogen seperti *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Nitromonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter* dan lain-lain.
2. Pelarut fosfat dan mobilisasi fosfat seperti *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Mycorrhiza* dan lain-lain.
3. Pemicu pertumbuhan tanaman seperti *Pseudomonas*, *Bradyrhizobium* dan lain-lain.

b. Fitostimulator yaitu bakteri yang menstimulasi pertumbuhan tanaman melalui produksi fitohormon, contohnya *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, dan lain-lain.

c. Rhizoremediator yaitu bakteri yang digunakan untuk mendegradasi herbisida, pestisida, dan komponen organik berbahaya lainnya atau polutan di tanah untuk mengembalikan kesuburan tanah.

- d. Biopestisida yaitu bakteri yang memproduksi antibiotik dan komponen toksik lainnya untuk membunuh patogen, contohnya *Pseudomonas* dan *Bacillus* spp.
- e. Bioprotektan yaitu bakteri dalam jumlah banyak digunakan untuk menekan penyakit tanaman secara langsung dan tidak langsung untuk meningkatkan pertumbuhan tanaman.

Biofertilisasi dan fitostimulan merupakan dua proses utama. Biofertilisasi berfungsi untuk meningkatkan akses nutrisi tanaman sedangkan fitostimulan meregulasi pertumbuhan tanaman dengan menghasilkan fitohormon. Proses fitostimulasi dalam pertumbuhan tanaman secara langsung seperti menghasilkan *Indole acetic acid* (IAA), auksin, sitokinin, giberelin, dan etilen. Hormon tersebut dapat disekresikan mikroba dan berasosiasi dengan tanaman, contohnya *Azospirillum* sp. yang berpotensi menambat nitrogen. *Pseudomonas* dan *Bacillus* memproduksi stimulator pertumbuhan pada tanaman pertanian untuk meningkatkan kuantitas akar tanaman yang memperluas permukaan area penyerapan air dan nutrisi di sekitar tanah. Akar lateral meningkat memicu peningkatan kemampuan penyerapan nutrisi penting untuk tumbuhan (Gambar 3).



Sumber : Dutta & Podile, 2010

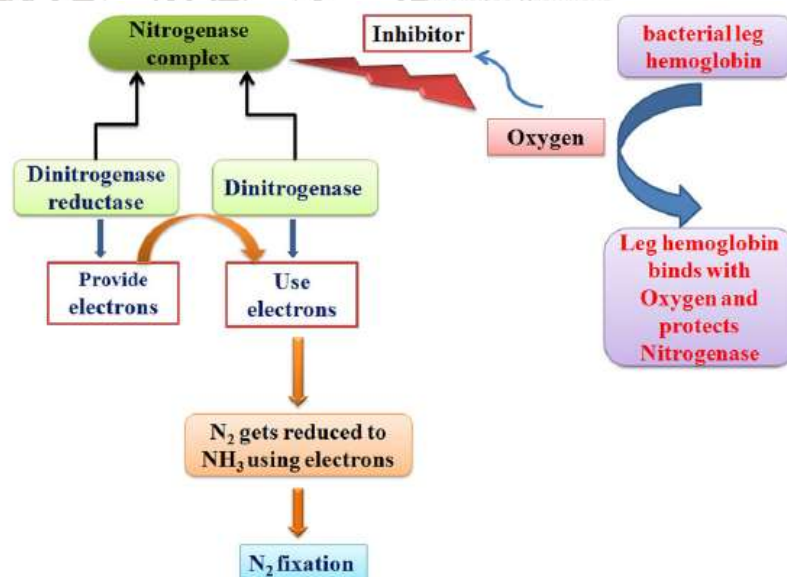
Gambar 3. Interaksi eksudat akar tanaman, patogen, PGPR dan manfaat mikroba di rhizosfer

Eksplorasi dan pemanfaatan mikroba sebagai biofertilizer menjadi hal yang penting dalam sektor pertanian untuk keberlanjutan produksi tanaman. Aplikasi PGPR yang ramah lingkungan dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan asupan nutrisi, pertumbuhan tanaman, dan toleransi tanaman terhadap stres abiotik dan biotik (Gambar 3). Interaksi beberapa bakteri dan fungi digunakan sebagai inokulan seperti *Rhizobium*, *Azotobacter*, dan jamur mikoriza. Mikroba tersebut digunakan untuk meningkatkan nutrisi N dan P

pada tanaman yang sangat terbatas dalam nutrisi tanaman, contohnya pada *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* (Chourasiya dkk., 2017). Komunitas mikroba rhizosfer sangat menarik untuk dikaji dalam bidang pertanian dan program *biosafety*. Mikroba tanah seperti *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Fusarium*, *Sclerotium*, *Aspergillus*, dan *Penicillium* dilaporkan positif sebagai pelarut fosfat.

2.4.1 Bakteri penambat nitrogen

Nitrogen berperan penting dalam pertumbuhan dan produktivitas tanaman. Ketersediaan nitrogen di udara mencapai 78% akan tetapi tidak dapat dimanfaatkan secara langsung oleh tanaman. Nitrogen terlebih dahulu diubah menjadi ammonia melalui proses asimilasi oleh tanaman. Aktivitas penambatan nitrogen tersebut diubah oleh bakteri yang menghasilkan enzim nitrogenase sehingga dikenal sebagai bakteri penambat nitrogen (Tairo dan Nakidemi, 2013; Smith dkk., 2013). Proses penambatan nitrogen oleh enzim nitrogenase yang terdiri atas dinitrogenase reduktase Iron (Fe) dan dinitrogenase Iron (Fe) serta Molibdenum (Mo). Dinitrogenase reduktase menghasilkan elektron yang dimanfaatkan oleh dinitrogenase untuk mereduksi N_2 menjadi NH_3 . Mo-nitrogenase, V-nitrogenase dan Fe-nitrogenase merupakan variasi dari kofaktor dinitrogenase. Gen pengkode penambat nitrogen dikenal sebagai gen *nif* yang ditemukan di bakteri penambat nitrogen simbiosis dan non simbiosis. Struktur gen tersebut terdiri atas aktivasi protein Fe, biosintesis kofaktor Fe-Mo, elektron positif dan gen regulator untuk proses sintesis dan fungsional enzim (Mahanty dkk., 2017).

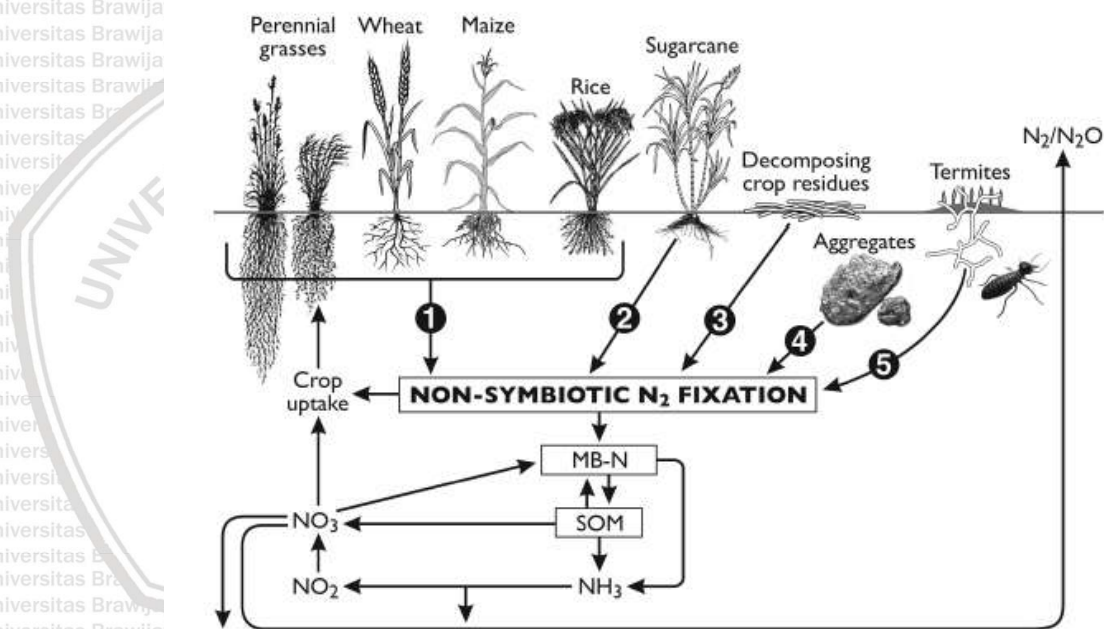


Sumber: Mahanty dkk., 2017

Gambar 4. Mekanisme penambatan nitrogen secara molekular oleh bakteri

Bakteri penambat nitrogen menambahkan nitrogen dalam tanah dan mengurangi ketergantungan pada pupuk nitrogen sintetik. Interaksi rhizobakteri dengan akar tanaman legum menunjukkan adanya peningkatan efektivitas *N₂-fixing symbiosis*. Dalam proses ini, *Rhizobia* menambat N_2 atmosfer menjadi amonium menggunakan enzim nitrogenase sehingga menyuplai nutrisi bagi tanaman inang. *Azotobacter* spp. merupakan bakteri aerob obligat yang dapat tumbuh pada konsentrasi oksigen yang rendah. Bakteri ini mampu menambat nitrogen secara bebas/non simbiotik. Bakteri dari Genus *Azospirillum* dikenal sebagai penambat nitrogen asosiatif yang tersebar di tanah tropis dan subtropis. Bakteri ini membangun hubungan yang erat dengan berbagai macam akar tanaman indigenus dan tanaman pertanian (Goswami dkk., 2016).

Nitrogen non simbiotik oleh bakteri penambat nitrogen yang hidup bebas di tanah baik yang bersifat autotropik maupun heterotropik yang tidak bersimbiosis secara langsung dengan tanaman namun tetap berasosiasi dengan rhizosfer tanaman. Selain itu, nitrogen non simbiotik berasosiasi juga dengan residu tanaman yang telah terdekomposisi, serta beragregasi dengan partikel dekomposisi bahan organik tanah dan habitat rayap (Gupta & Ropper, 2016).



Sumber: Gupta & Ropper, 2016

Gambar 5. Diagram alir penambat nitrogen oleh bakteri penambat nitrogen non simbiosis

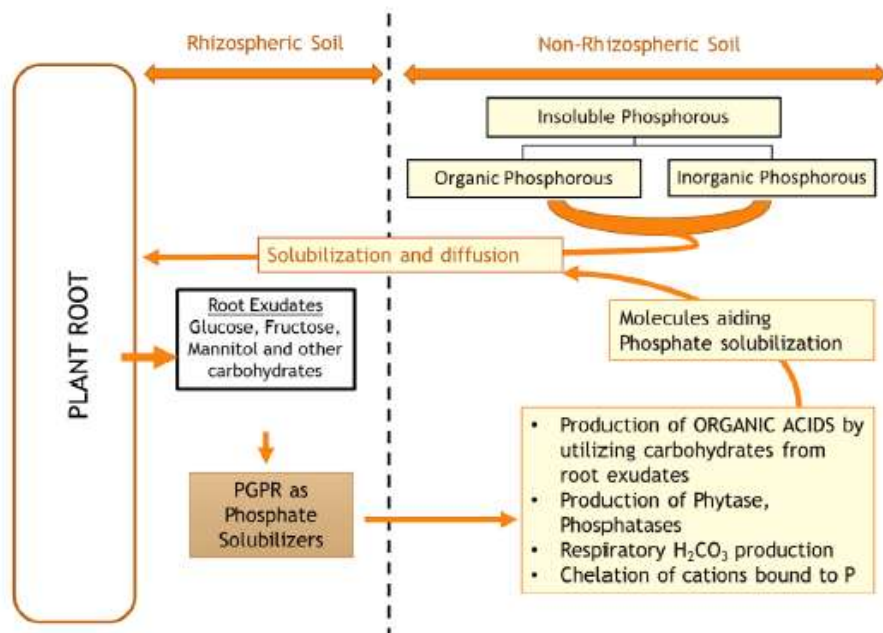
Keragaman genus bakteri ditemukan pada rhizosfer dan endofit berbagai jenis tanaman sereal dan tanaman pangan lainnya, jumlah penambatan nitrogen belum dapat diketahui jumlahnya. Sisa dekomposisi pada tanah mendukung terbentuknya rasio C/N

yang berpotensi mengoptimalkan kondisi penambatan nitrogen. Selain itu, kestabilan agregasi tanah tidak hanya menyediakan proteksi untuk bakteri penambat nitrogen yang hidup bebas akan tetapi juga mendukung kondisi rendah oksigen yang berperan penting dalam aktivitas enzim nitrogenase. Keberadaan keragaman mikroflora dalam usus rayap memiliki gen *nifH* (struktur gen pengkode enzim reduktase nitrogenase) yang berpotensi untuk menambatkan nitrogen di alam terutama di ekosistem yang semi kering dan kering (Gupta & Roper, 2016).

2.4.2 Bakteri pelarut fosfat

Fosfor merupakan nutrisi tanaman yang penting namun ketersediaannya terbatas di tanah. Bakteri pelarut fosfat memproduksi asam organik, asam fosfat, dan transfer proton (Gambar 3). Penyebab tingginya fosfor di tanah karena penggunaan fosfor dari pupuk sintetis. Pemanfaatan mikroba pelarut fosfat sebagai inokulan dapat meningkatkan asupan fosfor di tanah melalui perantara tanaman. Contoh bakteri pelarut fosfat yaitu dari Genus *Anthrobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, dan *Rhodococcus* (Zaidi dkk., 2009a, 2009b). Penggunaan pupuk sintetis untuk meningkatkan ketersediaan fosfat di tanah dapat membantu menambah produksi tanaman. Namun, penggunaan pupuk sintetis menimbulkan permasalahan yang kompleks seperti krisis energi global, harga pupuk sintetis semakin meningkat, tidak ramah lingkungan, dan membahayakan kesehatan manusia. Permasalahan ini dapat diatasi oleh bakteri tanah yang mampu memineralisasi fraksi fosfor organik dan anorganik sehingga dapat dimanfaatkan sebagai agen penyubur tanaman secara alami (Pradhan dkk., 2017).

Biofertilizer sebagai produk PGPR pengganti pupuk kimiawi dan ramah lingkungan dapat meningkatkan 20-30 % hasil panen tanaman dan menggantikan 25 % pupuk N dan P sintetis. *Azotobacter* diazotrof bebas dan fosfobakteri sebagai komponen utama pada biofertilizer berperan untuk penambat nitrogen, pelarutan fosfat, dan mengurangi makro nutrisi dalam tanah serta memacu pertumbuhan tanaman (Amutha dkk., 2014). Contoh bakteri pelarut fosfat yaitu *Bacillus* sp. dan *Bacillus subtilis* mampu melarutkan dan menyediakan senyawa fosfat sebagai nutrisi tanaman (Gambar 4), tetapi Genus *Pseudomonas* dan *Bacillus* lebih banyak diteliti sebagai bakteri pelarut fosfat (Gray & Smith, 2005).



Sumber: Goswami dkk., 2016

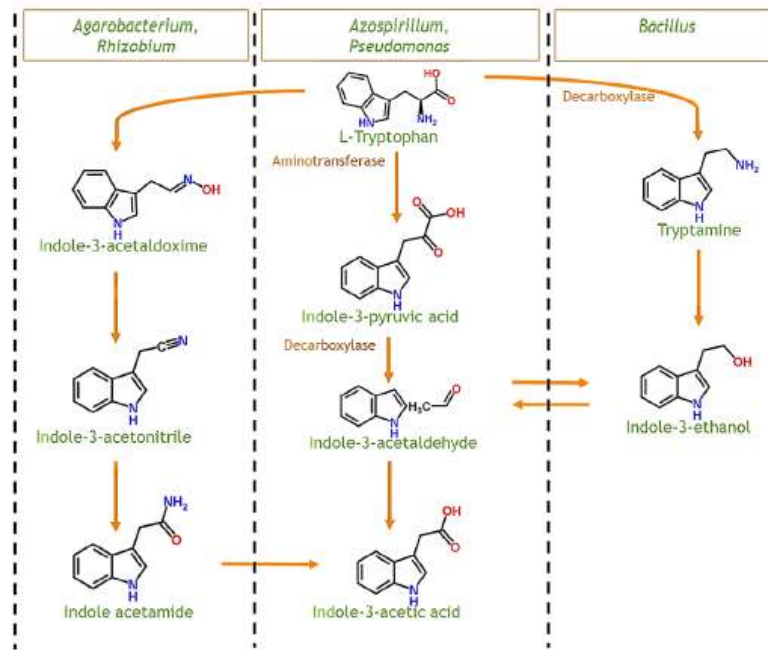
Gambar 6. Skema pelarutan fosfor tanah oleh bakteri PGPR

2.4.3 Bakteri penghasil *Indole-3-Acetic Acid* (IAA)

Fitohormon terdiri atas beberapa kelas yaitu auksin, giberelin, sitokinin, etilen, dan asam absisat. Bakteri rhizosfer juga berpotensi untuk menghasilkan hormon tersebut. Tanaman merespon fitohormon yang dihasilkan mikroba di rhizosfer. Fitohormon tersebut dapat menjadi perantara perluasan sel tanaman, pembelahan, dan memperpanjang akar baik secara simbiosis maupun non simbiosis.

Auksin diproduksi oleh PGPR berperan sebagai pengatur pertumbuhan tanaman dan perkembangan seperti perpanjangan sel, pembelahan sel, diferensiasi jaringan, dan membantu dominansi apikal. *Indole-3-Acetic-Acid* (IAA) merupakan fitohormon penting yang diproduksi oleh strain PGPR. Sekitar 80 % bakteri rhizosfer memproduksi IAA dan produksinya semakin tinggi di tanah dekat akar tanaman indigenus. Hormon IAA tersebut mampu meningkatkan aktivitas penyerapan nutrisi dan pertumbuhan akar yang lebih baik sehingga mampu memicu pertumbuhan tanaman (Aeron dkk., 2011; Amara dkk., 2015; Etesami dkk., 2015). Mekanisme biosintesis auksin yang dilakukan oleh tanaman dan mikroba berbeda, bergantung pada tanaman dan atau mikroba (Gambar 5). Bakteri penghasil hormon auksin terdiri dari Genus *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, dan *Rhizobium* (Mia dkk., 2010). Bakteri yang memproduksi IAA yaitu *Aeromonas*,

Bacillus, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Kocuria varians*, dan *Rhizobium* (Jha & Saraf 2015).



Sumber: Goswami, 2016

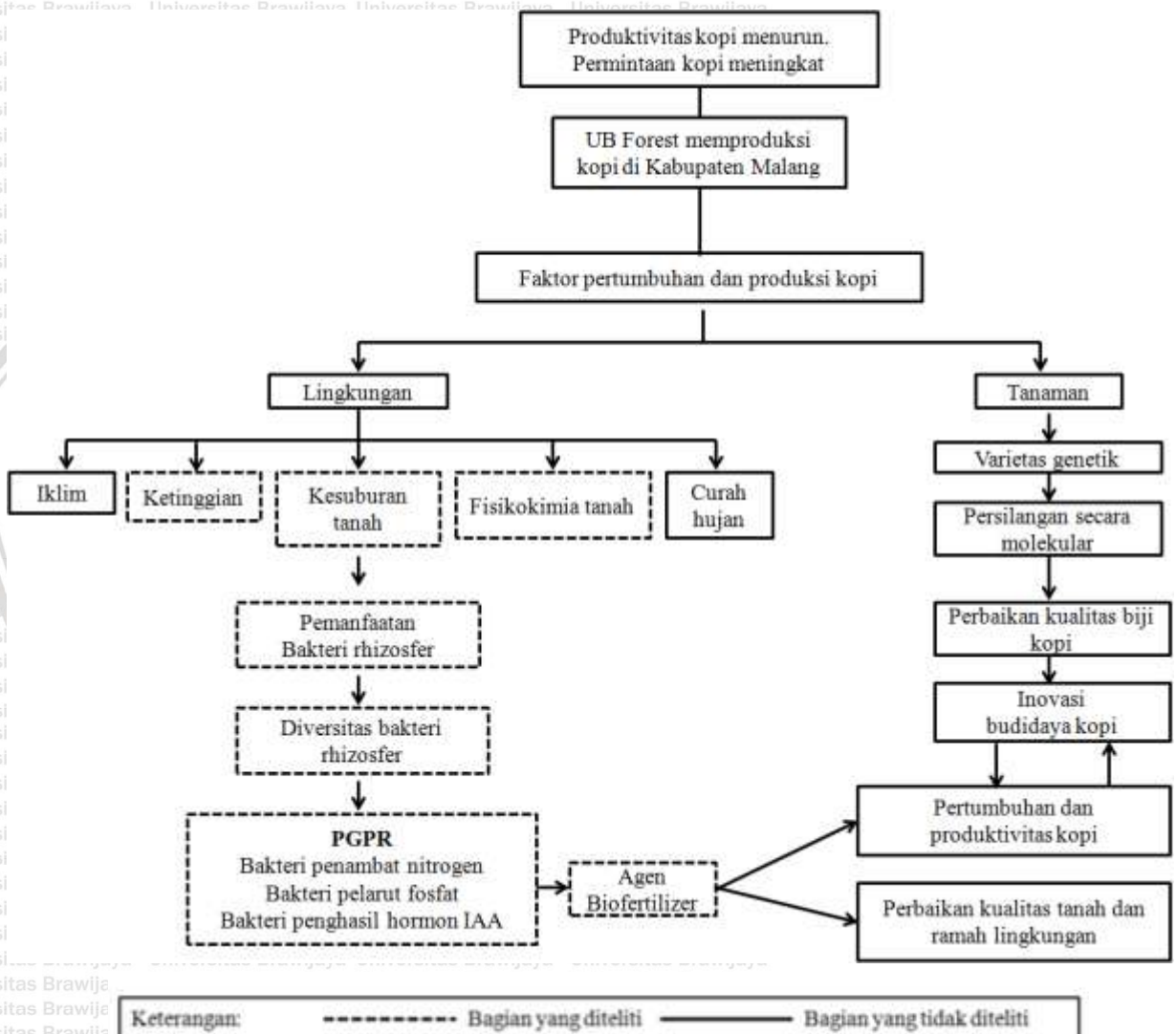
Gambar 7. Alur *Tryptophan-dependent* dalam biosintesis auksin oleh bakteri

Setiap PGPR memiliki perbedaan jalur siklus dalam mensintesis IAA oleh tanaman yang berasosiasi dengan mikroba. Pada umumnya PGPR menggunakan L-triptofan yang disekresikan akar sebagai prekursor untuk memproduksi IAA. Beberapa contoh IAA diproduksi melalui L-triptofan secara independen oleh *Azospirillum brasilense* sebagai bakteri yang paling banyak diteliti (Jha & Saraf, 2015). Siklus L-triptofan alami pada gambar 5 menunjukkan siklus biosintesis yang berbeda. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, dan *Azospirillum* mensintesis IAA melalui jalur *Indole-3-pyruvic acid* (IpyA) (Burdman dkk., 2000). Bakteri patogen seperti *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringe*, *Pantoea agglomerans*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, dan *Erwinia herbicola* mensintesis IAA melalui jalur *Indole-3-Acetamide* (IAM) (Dobbelaera dkk. 2003) sedangkan jalur triptamin digunakan oleh *Bacillus substilis*, *B. Licheniformis*, dan *B. Megaterium* (Goswami dkk., 2016).

2.5 Kerangka Konsep Penelitian

Produktivitas kopi nasional mengalami penurunan akan tetapi permintaan produksi olahan kopi semakin meningkat. Kabupaten Malang merupakan daerah penghasil kopi dengan jumlah panen tertinggi ketiga di Jawa Timur. Salah satu sentra produsen kopi di Kabupaten Malang adalah UB *Forest* memproduksi “Kopi Arjuna” sebagai kopi

unggulan Universitas Brawijaya juga mengalami permasalahan yang sama. Faktor-faktor penentu peningkatan produktivitas kopi terdiri atas faktor tanaman dan lingkungan. Pada faktor tanaman ditentukan oleh varietas genetik kopi yang unggul dan sehat, sedangkan faktor lingkungan dipengaruhi oleh iklim, ketinggian tempat, curah hujan, fisikokimia tanah dan kesuburan tanah. Tanah di UB *Forest* kurang subur karena adanya alih fungsi lahan dari hutan menjadi lahan perkebunan. Upaya memperbaiki kualitas tanah agro*Forestri* kopi secara alami dapat memanfaatkan bakteri tanah yang hidup di sekitar perakaran tanah (bakteri rhizosfer). Bakteri tersebut berperan sebagai penambat nitrogen, pelarut fosfat, dan penghasil fitohormon IAA yang bermanfaat untuk ketersediaan unsur hara tanah dan dapat memicu pertumbuhan tanaman, sehingga disebut sebagai *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* (PGPR). Guna memperbaiki kualitas tanah dapat memanfaatkan bakteri PGPR dalam upaya perbaikan produktivitas tanaman kopi di UB *Forest* (Gambar 6).



Gambar 8. Kerangka konsep penelitian

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada Bulan Maret hingga November 2019. Sampel diambil dari dua lokasi lahan tanaman kopi di UB *Forest* yaitu di lahan tanaman kopi Dusun Sumberwangi dan di Dusun Sumbersari, Kecamatan Karangploso, Kabupaten Malang. Parameter tanah dianalisis di Laboratorium Tanah, Jurusan Tanah, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya. Parameter mikrobiologi dan uji potensi PGPR dianalisis di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.

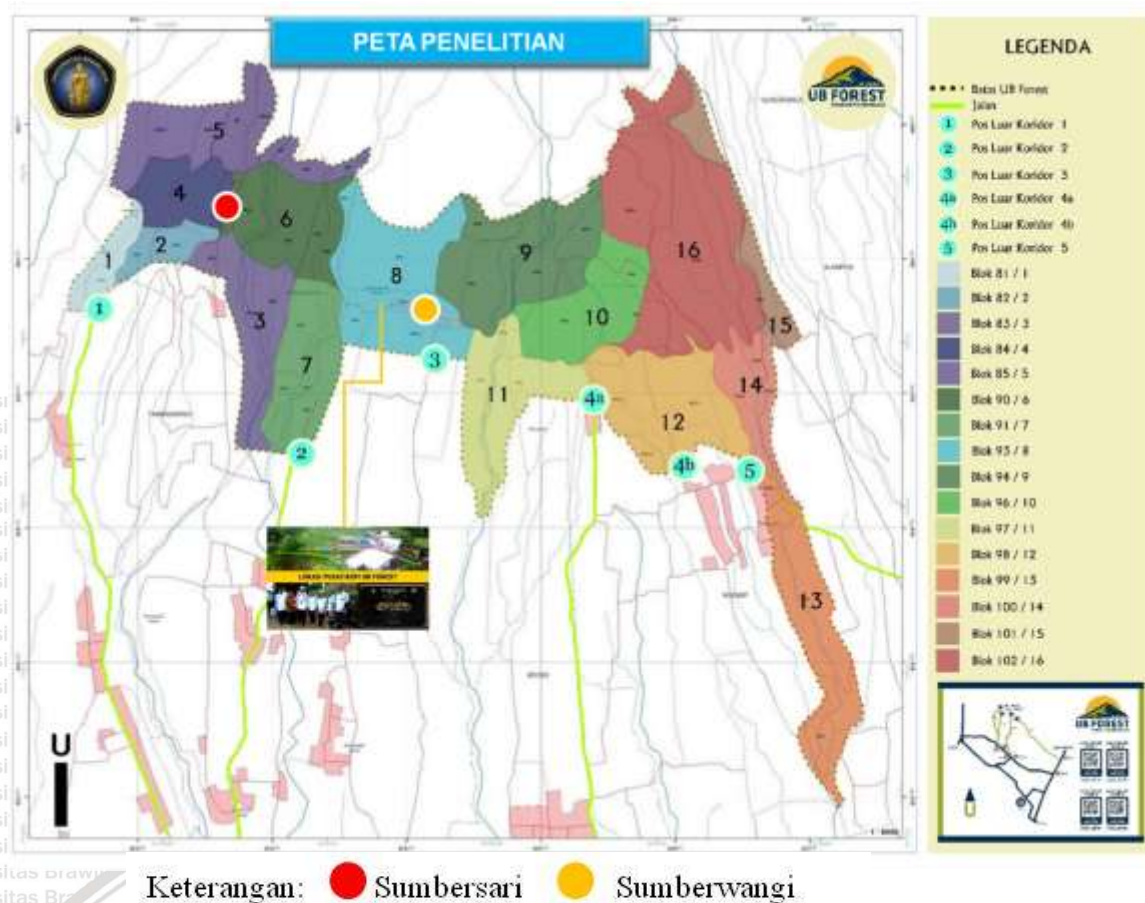
3.2 Deskripsi Lokasi Pengambilan Sampel Tanah

Lokasi UB *Forest* terletak di kaki Gunung Arjuna, Kecamatan Karang Ploso, Kabupaten Malang terdiri dari hutan produksi dan hutan lindung dengan total luas area 554 ha. Hutan produksi didominasi oleh tanaman pinus, mahoni, dan kopi berada pada 7,8219° LS dan 112.5772 ° BT dengan ketinggian 1000-1200 dpl sedangkan hutan lindung seluas 42 ha atau sekitar 7,6 % dari total luas UB *Forest* (Azzahra dkk., 2018). Kondisi topografi UB *Forest* terbagi atas tiga kelas yaitu kemiringan 0-8 % seluas 40,97 ha, > 8-15 % seluas 484,89 ha, dan > 15 % seluas 23,81 ha. Curah hujan rata-rata pertahun 250 mm dengan keadaan suhu rata-rata 27° C. Kawasan komoditas tanaman kopi berada pada ketinggian 500-1000 m dpl, bersuhu 22-24° C, kelembaban 60-70 %, intensitas cahaya 41-58 %, dan curah hujan 1700-2700 mm pada periode Juli-Oktober 2017 (Prakoswo dkk., 2018) sedangkan jenis tanahnya terdiri dari aluvial coklat, latosol coklat, dan regosol kelabu (Oktadiani, 2018).

Lokasi UB *Forest* terdiri atas empat area yaitu hutan pinus; agroforestri pinus dan kopi; agroforestri pinus dan sayur-sayuran; serta agroforestri mahoni dan kopi (Prakoswo dkk., 2018). Selain itu terdapat berbagai jenis tanaman berdasarkan kategorinya yaitu tanaman tegakan, tanaman pertanian dan tanaman tahunan serta musiman. Tanaman bawah tegakan naungan pohon pinus dan mahoni terdiri atas kopi, jahe, wortel, sawi, dan jenis sayuran lainnya (Oktadiani, 2018; Saputra, 2018).

Area studi penelitian di Dusun Sumberwangi, Desa Donowarih dan Dusun Sumbersari, Desa Tawangargo, Kecamatan Karangploso, Kabupaten Malang (Gambar 7). Dusun Sumberwangi merupakan kawasan tanaman kopi Robusta dinaungani oleh pohon

mahoni dan pohon pinus sedangkan Dusun Sumberwangi sebagai kawasan tanaman kopi Arabika dinaungi pohon pinus dan tanaman pertanian.

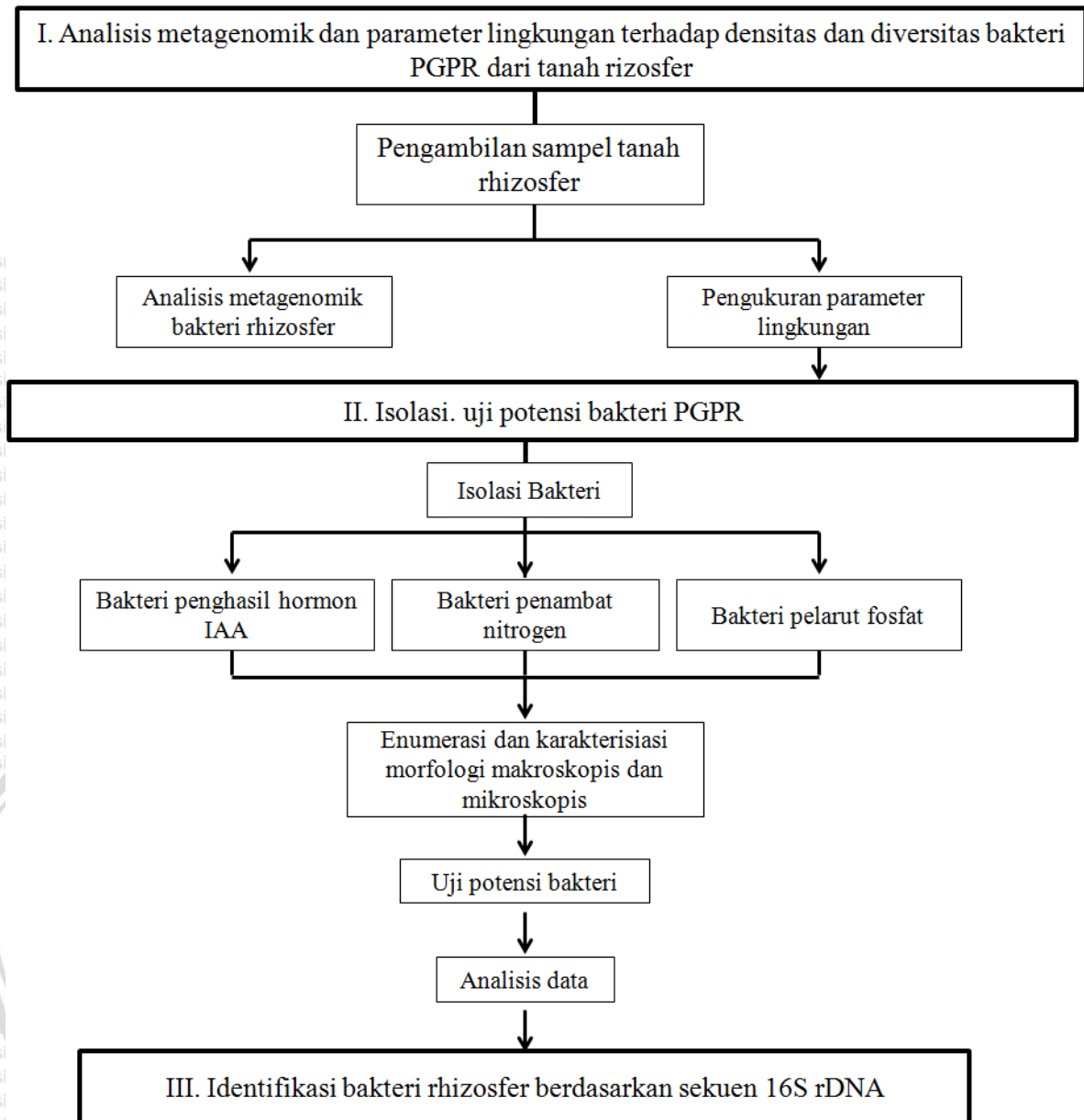


Gambar 9. Lokasi pengambilan sampel (Sumber: UB Forest)

3.3 Kerangka Operasional Penelitian

Penelitian ini terdiri atas tiga tahapan (Gambar 8) meliputi isolasi, uji potensi, dan identifikasi bakteri rhizosfer. Sampel tanah diperoleh dari sekitar ujung akar tanaman kopi Robusta dan Arabika di kedua area (Gambar 7). Tanah diambil secara komposit sebanyak ± 300 gram dan diukur faktor abiotik lingkungan meliputi suhu, intensitas cahaya, diameter pohon, elevasi, kelembaban udara relatif dan faktor fisikokimia tanah. Sampel tanah rhizosfer dianalisis metagenomik untuk menentukan diversitas bakteri rhizosfer kemudian PGPR tanah rhizosfer diisolasi menggunakan media *Tryptic Soy Agar*, *Pikovskaya Agar*, *NFb (Nitrogen-free Bromothymol Blue) Agar* untuk memperoleh secara berurutan bakteri penghasil IAA, pelarut fosfat, dan penambat nitrogen. Densitas sel bakteri dihitung secara *Total Plate Count (TPC)* sedangkan diversitas koloni bakteri rhizosfer ditentukan berdasarkan Indeks Diversitas Simpson. Korelasi faktor fisikokimia tanah terhadap densitas bakteri rhizosfer ditentukan berdasarkan multivariat analisis

(PCA). Isolat bakteri PGPR diuji potensinya sebagai agen biofertilizer meliputi produksi IAA, produksi amonia, dan pelarut fosfat. Bakteri potensial sebagai agen PGPR diidentifikasi berdasarkan sekuen 16S rDNA.



Gambar 10. Kerangka operasional penelitian

3.4 Pengambilan Sampel Tanah

Sampel tanah diambil di sekitar perakaran dua jenis tanaman Kopi Robusta dan Arabika. Setiap sampel tanah diambil dari sembilan pohon sebanyak tiga ulangan secara komposit yaitu setiap satu lokasi sampel tanah diambil dari lima titik berbeda. Setiap titik berjarak lima meter kemudian dikompositkan di dalam plastik yang sama. Setiap sampel

di setiap area studi diambil sebanyak tiga ulangan pada lokasi dan waktu yang sama. Sampel tanah diambil menggunakan bor tanah berdiameter $\pm 5,2$ cm dengan kedalaman 10 cm dari permukaan tanah sekitar ujung akar tanaman. Sampel dimasukkan dalam plastik, diberi label, diikat dan disimpan dalam kotak isothermis bersuhu 4-10° C. Selain itu parameter fisikokimia diukur di setiap lokasi yang diambil sampelnya. Parameter fisikokimia digunakan untuk mengevaluasi pengaruh kondisi lahan pengambilan sampel terhadap densitas bakteri yang berpotensi sebagai PGPR. Parameter lingkungan yang diukur meliputi titik koordinat dan ketinggian lokasi ditentukan menggunakan GPS (*Global Positioning System*), kelembaban udara menggunakan *Psychrometer*, suhu udara dan tanah menggunakan termometer, diameter pohon diukur dengan meteran dan intensitas cahaya diukur menggunakan luxmeter (Salla, 2009).

3.5 Pengukuran Parameter Kimiawi Tanah

Parameter kimiawi tanah meliputi pH, kandungan C-organik dan bahan organik, N-total, P-tersedia, dan kadar air diukur di laboratorium. Keasaman atau pH tanah diukur menggunakan elektroda gelas dengan perbandingan larutan tanah dan air (1:1). Kadar C-organik ditentukan menggunakan metode *Walkley and Black* yaitu sampel tanah yang telah disaring ditimbang sebanyak 0,5 gram ditambahkan 10 mL $K_2Cr_2O_7$ 1 N dan ditambahkan 20 mL H_2SO_4 dihomogenkan hingga dingin. Larutan diencerkan hingga volume 250 mL menggunakan aquades dan ditambahkan 6-7 tetes feroin 0,025 M. Larutan dititrasi dengan $FeSO_4$ 0,5 N hingga berwarna merah anggur, dihitung volume $FeSO_4$ yang terpakai. Konsentrasi karbon organik dihitung menurut rumus 1 (Walkley & Black, 1934).

$$\text{Nilai \% C-organik} = \frac{(\text{me } K_2Cr_2O_7 - \text{me } FeSO_4) \times 0,003 \times f}{\text{BKM}} \times 100\% \dots (1)$$

Keterangan:

- me** = Normalitas (N) \times Volume (V)
- BKM** = bobot kering mutlak 105° C
- 0,003** = valensi Cr yang teroksidasi, $3 \times 0,001$ (mg ke gram)

Konsentrasi N-total diukur menggunakan metode Kjeldahl terdiri dari tiga tahapan yaitu destruksi, destilasi, dan titrasi. Sampel tanah ditimbang 0,5 g dituangkan ke dalam tabung reaksi. Sampel tanah ditambahkan selenium *mix*, 5 mL larutan H_2SO_4 dan parafin cair 5 tetes kemudian dimasukkan dalam alat destruksi selama 1,5 jam. Ekstrak dipindahkan ke labu destilasi dengan penambahan aquades hingga ekstrak di labu destruksi habis. Penampung destilat disiapkan menggunakan 10 mL asam borat 4 % ditambahkan indikator konway sebanyak 5 tetes pada Labu Erlenmeyer. Ekstrak

ditambahkan aquades hingga 1/3 labu ukur dan ditambahkan 20 mL NaOH 50 %. Penampung destilat dipasang, perubahan warna pada destilat menjadi hijau muda. Proses destilasi selesai saat destilat yang tertampung mencapai 75 mL. Pada tahap titrasi menggunakan HCl 0,05 N, volume awal HCl dicatat. Perubahan warna diamati hingga larutan warna dari hijau muda menjadi merah muda dan volume akhir dicatat. Konsentrasi N total dihitung menurut rumus 2 (PanReac, 2018).

$$\text{Nilai \% N-total} = \frac{(\text{mL HCl contoh} - \text{me HCl blanko}) \times \text{N HCl} \times 14}{\text{BKM}} \times 100\% \dots \dots (2)$$

Konsentrasi P-tersedia diukur menggunakan metode Bray-i dengan cara membuat larutan standar fosfor konsentrasi 0, 1, 2, 3, 4, dan 5 mg/L dengan cara mengambil 1, 2, 3, 4, dan 5 mL larutan fosfor baku 100 mg/L. Sampel tanah ditimbang 0,5 gram dan ditambahkan 15 mL larutan Bray-i, dihomogenkan selama 30 menit. Sampel disaring dan ekstrak sampel diambil 5 mL ditambahkan 5 mL larutan PB dan ditambahkan 5 tetes larutan PC, kemudian dihomogenkan. Konsentrasi P-tersedia diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 889 nm (Bray & Kurtz, 1945).

Kadar air diukur menggunakan metode gravimetri (Reynolds, 1970; Blazka & Fischer, 2014) dengan cara cawan porselin berisi sampel tanah 2 gram dan cawan porselin kosong ditimbang. Cawan berisi sampel tanah dipanaskan dalam oven pada suhu 105 °C selama 24 jam. Cawan berisi sampel tanah dimasukkan dalam desikator kemudian ditimbang untuk mendapatkan berat tanah kering. Kadar air dalam tanah ditentukan dengan rumus 3 (Blazka & Fischer, 2014).

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{(\text{Berat cawan} + \text{tanah}) - (\text{berat cawan})}{\text{BKM}} \times 100\% \dots \dots (3)$$

Keterangan:

BKM = Bobot kering mutlak (berat cawan+tanah setelah dioven) – berat cawan

3.6 Analisis Metagenomik

3.6.1 Optimasi pH tanah

Komposit tanah 0,3 gram dimasukkan ke dalam masing-masing tabung mikrosentrifus 2 mL sebanyak 6 buah ditambahkan 300 µL buffer fosfat (0,1 M NaH₂PO₄-Na₂HPO₄, pH 6,6). Setiap tabung ditambahkan AlCl₃ dengan 100 µL, 200 µL,

300 μ L, 400 μ L, 500 μ L, dan 600 μ L. Setiap suspensi sampel ditera hingga 900 μ L menggunakan buffer fosfat. Suspensi divorteks dengan kecepatan maksimum selama dua menit. Suspensi ditambahkan NaOH hingga pH 8,0. Tabung berisi suspensi diinvert sebanyak 10 kali. Campuran suspensi tanah siap digunakan untuk ekstraksi DNA (Mustafa dkk., 2017).

3.6.2 Ekstraksi DNA bakteri

Kromosom DNA bakteri sampel tanah rhizosfer diekstraksi mengacu pada protokol FastDNA kit (mpbio) dengan modifikasi Mustafa dkk. (2017). Suspensi tanah dipindahkan pada tabung *Lysing Matrix* dan ditambahkan larutan SDS lisis sebanyak 250 μ L. Suspensi divorteks dengan kecepatan maksimum selama 10 menit. Homogenat disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit. Supernatan 700 μ L dipindahkan ke tabung mikrosentrifus baru kemudian ditambahkan 250 μ L *protein precipitation solution* (PPS) dan diinvert 10 kali. Homogenat disentrifugasi 14.000 rpm selama lima menit kemudian supernatan ditransfer ke tabung mikrosentrifus 5 mL.

Supernatan ditambahkan Larutan *Binding Matrix* 1 mL, kemudian diresuspensi, DNA akan terikat pada larutan melalui proses *invert* pada *tube* selama dua menit, diinkubasi pada suhu ruang selama 6 menit. Supernatan dibuang dari mikrotube sebanyak 500 μ L, kemudian larutan dalam mikrotube dicampur kembali dengan meresuspensi larutan *binding matrix*. Supernatan dipindahkan ke *Spin filter* sebanyak 700 μ L dan disentrifugasi pada 14.000 rpm selama satu menit. *Catch tube* pada *Spin filter* dikosongkan kemudian sisa supernatan dipindahkan pada mikrotube 5 mL dalam *Spin filter*, kemudian disentrifugasi pada 14.000 rpm selama satu menit, kemudian *catch tube* dikosongkan. Proses ini dilakukan berulang hingga seluruh supernatan habis (ukuran 5 mL). Larutan SEWS-M sebanyak 500 μ L ditambahkan dan diresuspensi pada tabung *Spin filter*, kemudian disentrifugasi pada 14.000 rpm (1 menit), *catch tube* dikosongkan dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 14.000 rpm (2 menit). Tabung *Spin filter* dipisahkan dan diganti *catch tube* baru. Tabung *Spin filter* dibuka selama lima menit diresuspensi dengan 60 μ L DES (DNase/Pyrogen-Free Water) dan disentrifugasi pada 14.000 rpm selama satu menit.

Sampel DNA diverifikasi dan dideteksi dengan elektroforesis gel agarosa 1 %. Gel agarosa 1 % (0,2 gram bubuk agarosa pada 20 mL larutan TBE). Gel agarosa dipanaskan dalam *microwave* hingga larut dan mendidih (ditandai dengan larutan gel menjadi bening). Suspensi gel ditambahkan 1 μ L *gel red*, diaduk dan dituang ke dalam cetakan yang telah diberi sisir. Setelah cetakan gel padat, gel agarosa dipindahkan dalam *chamber*

elektroforesis yang telah digenangi TBE. Marker DNA sebanyak 2 μ L, sampel DNA 3 μ L dan *loading dye* 2 μ L dimasukkan ke dalam sumuran sesuai peta *running*. Sampel kemudian *dirunning* dengan arus listrik 100 volt selama 30 menit. Pita DNA pada gel divisualisasi dengan *UV transilluminator* dan *Gel Doc* (Fatchiyah dkk., 2011). Sampel DNA dianalisis secara bioinformatik untuk memperoleh informasi metagenomik bakteri PGPR.

3.6.3 Analisis Genom bakteri

Genom DNA sampel diekstrak menggunakan metode CTAB/SDS. Konsentrasi dan kemurnian DNA dimonitoring pada gel agarosa 1%. Konsentrasi DNA kemudian disamakan menjadi 1 ng/ μ L menggunakan pelarut aquades steril. Sekuen 16S rRNA dari *distinct region* 16SV3-16SV4 (41F: 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') (Klindworth et al., 2013) diamplifikasi menggunakan primer spesifik *barcode*. Semua reaksi PCR diproses menggunakan *Phusion High-Fidelity PCR Master Mix* (New England Biolabs). *Loading buffer* mengandung *SYB green* sebanyak 1x dicampurkan dengan produk PCR dan dielektroforesis pada gel agarosa 2 % untuk deteksi. Sampel yang berpendar pada *main strip* antara 400-450 bp dipilih untuk diteliti lebih lanjut. Produk PCR dicampurkan pada rasio yang sama kemudian produk PCR tersebut dipurifikasi menggunakan *Qiagen Gel Extraction Kit* (Qiagen, Germany). Data sekuen DNA dihasilkan menggunakan *NEBNext Ultra DNA Library Pre Kit for Illumina* dengan metode mengikuti protokol dan ditambahkan juga kode indeksnya. Kualitas pustaka data dievaluasi pada *Qubit@ 2.0 Fluorometer* (Thermo Scientific) dan *Agilent Bioanalyzer 2100 system*. Pustaka data sekuen dianalisis menggunakan *Illumina platform* pada 250 bp. Untuk memperoleh *data split*, urutan basa awal-akhir yang terbaca ditandai pada sampel berdasarkan keunikan *barcode*, pemendekan *barcode* dan sekuen primer. Urutan basa awal-akhir kemudian *dimerge* menggunakan FLASH (V1.2.7) untuk penggabungan sekuen DNA yang disebut sebagai *raw tags* (Magoc & Salzberg, 2011). Kualitas filter data pada *tag raw* ditampilkan dalam kondisi filter yang spesifik untuk memperoleh kualitas tinggi *tags* (Bokulich & Nicholas, 2013) menggunakan QIIME (V1.7.0) (Caporaso dan Gregory, 2010). Tag dibandingkan dengan referensi *database* menggunakan *UCHIME alghoritm* (Edgard & Robert, 2011) untuk mendeteksi sekuen chimera (Haas dkk., 2011) dan sekuen tersebut dipindahkan untuk memperoleh tag yang efektif.

Pengelompokan takson dan anonasi spesies diawali dengan sekuen dianalisis menggunakan *software* (Uparse v7.0.1001) (Edgar, 2013). Sekuen dengan kesamaan

lebih dari 97 % ditandai sebagai OTU yang sama. Sekuen representatif dari setiap OTU diskriming untuk proses anonasi selanjutnya. Sekuen yang representatif pada *Green Gene Database* (DeSantis & Todd, 2006) diklasifikasi menggunakan *RDP classifier* (Version 2.2) (Wang dkk., 2007) untuk menginformasikan anonasi taksonominya. Konstruksi kekerabatan filogenetik dari OTU yang berbeda dan perbedaan dominasi spesies di setiap grup sampel maka *multiple sequence* dianalisis menggunakan *MUSCLE software* (versi 3.8.3.1) (Edgar, 2004). Informasi kelimpahan OTU dinormalisasi menggunakan standar koresponden jumlah sekuen sampel dengan sekuen terakhir. Analisis subsekuen diversitas alfa dan beta ditunjukkan berdasarkan *output* normalisasi data.

3.7 Isolasi Bakteri Rhizosfer Tanaman Kopi

3.7.1 Isolasi bakteri penghasil hormon IAA

Bakteri penghasil IAA diisolasi dengan menggunakan metode modifikasi Khalid dkk. (2004). Sampel tanah rhizosfer 25 g disuspensikan dalam 225 mL larutan garam fisiologis (NaCl 0,85 %) sebagai pengenceran 10^{-1} . Suspensi tanah tersebut dibuat seri pengenceran dalam garam fisiologis hingga 10^{-6} . Suspensi tanah diambil 0,1 mL pada setiap tingkat pengenceran diinokulasikan secara *spread plate* dalam media *Tryptic Soy Agar* (TSA) mengandung L-triptofan 200 $\mu\text{g/mL}$. Kultur diinkubasi pada suhu 28° C selama 72 jam (Sukmadewi dkk., 2015). Densitas sel bakteri dihitung secara TPC (*Total Plate Count*) (Sutton, 2011), kemudian isolat bakteri dimurnikan menggunakan metode *spread plate*. Morfologi koloni dikarakterisasi berdasarkan bentuk, warna, permukaan, dan tepi koloni serta dihitung indeks diversitas bakteri menggunakan indeks diversitas Simpson. Koloni tunggal yang diperoleh disimpan sebagai stok kultur dalam media TSA dan diinkubasi pada suhu 28° C selama 24 jam.

3.7.2 Isolasi bakteri pelarut fosfat

Sampel tanah rizosfer diperlakukan hal yang sama seperti isolasi bakteri penghasil hormon IAA 3.7.1 dengan membuat seri pengenceran dari 10^{-1} hingga 10^{-6} dalam garam fisiologis. Suspensi tanah diambil 0,1 mL dari setiap pengenceran diinokulasikan secara *spread plate* pada media *Pikovskaya Agar*. Kultur diinkubasi pada suhu 28° C selama 72 jam. Densitas sel bakteri dihitung secara TPC (*Total Plate Count*) (Sutton, 2011) dan koloni bakteri dimurnikan menurut metode *spread plate*. Morfologi koloni dikarakterisasi bentuk, warna, permukaan, dan tepi koloni serta dihitung indeks diversitas bakteri

menggunakan indeks diversitas Simpson. Koloni tunggal yang diperoleh disimpan sebagai stok kultur dalam media NA pada suhu 28° C selama 24 jam (Atlas, 2010).

3.7.3 Isolasi bakteri penambat nitrogen

Sampel tanah rhizosfer 25 g dibuat seri pengenceran 10^{-1} hingga 10^{-6} dalam larutan garam fisiologis. Suspensi setiap pengenceran diambil 0,1 mL diinokulasikan dengan metode *spread plate* dalam media Nfb Agar. Kultur diinkubasi pada suhu 28° C selama tujuh hari. Densitas sel bakteri dihitung secara TPC (*Total Plate Count*) (Sutton, 2011) kemudian koloni dikarakterisasi berdasarkan bentuk warna, permukaan, dan tepi koloni serta dihitung indeks diversitas bakteri menggunakan indeks diversitas Simpson. Koloni tunggal yang diperoleh disimpan sebagai stok kultur dalam media NA dan diinkubasi pada suhu 28° C selama 24 jam (Baldani dkk., 2014).

3.8 Uji Kemampuan Isolat PGPR

3.8.1 Uji kemampuan isolat PGPR penghasil IAA

Potensi isolat PGPR memproduksi IAA diuji berdasarkan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan tiga kali ulangan. Percobaan uji kualitatif kemampuan produksi IAA berdasarkan modifikasi metode Brick dkk. (1991) dan Sukmadewi dkk. (2015) menggunakan media *Tryptic Soy Borth* sebanyak 25 mL mengandung triptofan 200 µg/mL. Media tersebut diinokulasikan 1 ose isolat bakteri penghasil IAA dan diinkubasi pada suhu 28° C selama 48 jam. Suspensi bakteri (OD = 0,5 pada λ : 550 nm) diambil 0,1 mL diinokulasikan pada media TSA padat secara *spread plate*. Membran nitroselulose diletakkan di atas permukaan media terinokulasi suspensi bakteri dan diinkubasi selama 48 jam. Membran nitroselulose direndam dalam 1 mL reagen Salkowski selama 1 jam di ruang gelap. Perubahan warna membran dari putih menjadi merah atau merah muda mengindikasikan adanya IAA yang diproduksi oleh bakteri. Setiap membran yang berubah warna diberi skor berdasarkan tingkatan warnanya.

Percobaan uji kuantitatif kemampuan bakteri penghasil IAA, variabel bebas yang digunakan yaitu jenis isolat dan waktu inkubasi. Percobaan produksi IAA berdasarkan modifikasi metode Khalid dkk. (2004) menggunakan media *Tryptic Soy Borth* sebanyak 25 mL mengandung triptofan 200 µg/mL. Media tersebut diinokulasikan 2,5 mL suspensi bakteri umur 15 jam pada media TSB yang telah disamakan densitasnya (OD = 0,5 pada λ : 550 nm). Kontrol pembandingan dibuat dengan menggunakan media uji IAA tanpa ditambahkan inokulum PGPR. Suspensi bakteri dan kontrol diinkubasi pada suhu 28° C

selama 72 jam. Konsentrasi IAA yang diproduksi setiap isolat diukur pada waktu inkubasi 0, 24, 48, dan 72 jam. Suspensi bakteri sebanyak 3 mL disentrifugasi 10.000 rpm selama 10 menit, supernatan sebanyak 2 mL direaksikan dengan 4 mL Reagen Salkowski, kemudian diinkubasi selama satu jam di ruang gelap. Hasil positif IAA ditandai dengan adanya perubahan warna media menjadi merah muda. Suspensi diukur intensitas warna yang terbentuk menggunakan spektrofotometer ($\lambda = 535 \text{ nm}$). Konsentrasi IAA yang diproduksi masing-masing isolat dihitung berdasarkan persamaan pada kurva standar IAA. Data dianalisis menggunakan *Two-way ANOVA* univariat untuk mengetahui interaksi antarperlakuan pada taraf kepercayaan 95 % kemudian diuji *Tukey* menggunakan program *SPSS for Windows release v.22* untuk menentukan isolat PGPR dengan kemampuan paling tinggi menghasilkan IAA secara kuantitatif.

3.8.2 Uji kemampuan isolat PGPR sebagai pelarut fosfat

Setiap isolat PGPR dievaluasi kemampuannya dalam melarutkan fosfat. Percobaan potensi isolat dalam melarutan fosfat berdasarkan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan tiga kali ulangan. Percobaan uji kualitatif kemampuan pelarut fosfat, sebanyak 20 μL suspensi bakteri (OD dan usia sama) diteteskan ke *blank disc* dan diinokulasikan pada media *Pikovskaya Agar* kemudian diinkubasi pada 30° C selama 5 hari. Isolat dapat melarutkan fosfat apabila terdapat zona bening disekitar *blank disc* (Israwan dkk., 2015).

Percobaan uji kuantitatif kemampuan pelarut fosfat, variabel bebas yang digunakan yaitu jenis isolat bakteri pelarut fosfat dan waktu inkubasi. Kemampuan bakteri pelarut fosfat diuji secara kuantitatif menggunakan metode Chauhan dkk. (2014) yang dimodifikasi. Kultur bakteri pada media agar sebanyak satu ose ditumbuhkan pada 100 mL media *Pikovskaya* cair kemudian diinkubasi pada 30° C, kecepatan 120 rpm selama 72 jam. Kultur bakteri disamakan densitasnya pada $\lambda = 540 \text{ nm}$, sebanyak 10 % diinokulasikan ke 100 mL media *Pikovskaya* cair mengandung 0,5 % trikalsium fosfat (TCP). Keasaaman pH media sebelum diinokulasi, dinetralkan dan dibuat juga kontrol tanpa inokulum. Kedua perlakuan diinkubasi pada suhu 30° C kecepatan 120 rpm selama 72 jam. Kultur bakteri sebanyak 3 mL disentrifugasi 10.000 rpm selama 20 menit, kemudian 1 mL supernatan ditambahkan 10 mL larutan amoniummolibdat dan 0,1 mL asam klorostan dan ditera hingga volume menjadi 50 mL. Suspensi dihomogenkan dan diinkubasi selama 10 menit, setelah itu diukur intensitas warna biru media pada panjang gelombang 660 nm. Konsentrasi fosfat terlarut ditentukan menggunakan persamaan kurva

standar fosfat dan diukur setiap 24 jam selama tiga hari (inkubasi 0, 24, 48, dan 72 jam) serta diukur pH akhir media PGPR setiap isolat (Chauhan dkk., 2014). Data dianalisis *Two-way ANOVA* univariat untuk mengetahui interaksi antarperlakuan pada taraf kepercayaan 95 % kemudian diuji *Tukey* menggunakan program *SPSS for Windows release v.22* untuk menentukan isolat PGPR dengan kemampuan paling tinggi dalam melarutkan fosfat.

3.8.3 Uji kemampuan isolat PGPR sebagai penambat nitrogen

Isolat PGPR diuji kemampuannya dalam menambat nitrogen melalui dua tahap yaitu berdasarkan uji kolorimetri menggunakan *Sera Ammonia Test Kit* dan metode Nesslerisasi. Masing-masing uji dilakukan berdasarkan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan tiga kali ulangan. Variabel bebas yang digunakan yaitu jenis isolat dan waktu inkubasi. Uji kolorimetri dilakukan berdasarkan modifikasi metode Latt dkk. (2013). Kultur setiap isolat disetarakan umur biakan, volume kultur, dan densitas selnya dengan densitas optik 0,5. Suspensi isolat 5 mL diinokulasi dalam 100 mL NFb cair tanpa penambahan *Bromothymol Blue* dan kontrol (media tanpa penambahan inokulum). Kontrol dan kultur uji diinkubasi dalam *shaker* inkubator 120 rpm, 30° C, selama tujuh hari. Kultur diambil 2 mL dan disentrifugasi pada 10.000 rpm, 28 ° C, selama 15 menit. Supernatan diambil 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kandungan amonia supernatan ditentukan berdasarkan *Sera Ammonia Test Kit*. Indikasi aktivitas penambat nitrogen dari setiap isolat yaitu dengan adanya perubahan warna media dari bening menjadi hijau.

Uji selanjutnya yaitu menggunakan metode Nesslerisasi dengan tiga kali ulangan. Kultur starter sebanyak 5 mL dari setiap isolat (10^7 sel/mL) ditumbuhkan dalam 50 mL media NFb cair tanpa penambahan *Bromothymol Blue*. Media tanpa penambahan inokulum digunakan sebagai kontrol. Kontrol dan kultur uji diinkubasi dalam inkubator *shaker* pada suhu 30° C, kecepatan 120 rpm, selama tujuh hari. Amonia yang diproduksi setiap isolat diukur pada inkubasi 0, 1, 3, 5, dan 7 hari. Kultur diambil 2 mL dan ditambah larutan 0,01 mL $ZnSO_4$, dan 2,5 μ L NaOH 2N, diinkubasi pada suhu ruang hingga terbentuk endapan pada dasar tabung dan kultur berubah menjadi bening. Kultur disentrifugasi pada suhu 28° C, 10.000 rpm, selama 15 menit. Supernatan 1 mL direaksikan dengan 1 mL Reagen Nessler dan ditera sampai 10 mL kemudian diinkubasi selama 30 menit hingga supernatan berubah warna menjadi kekuningan dan suspensi diukur intensitas warna yang terbentuk menggunakan spektrofotometer $\lambda = 425$ nm.

Konsentrasi amonia dihitung berdasarkan persamaan kurva standar amonia (Ahmad dkk., 2008). Data dianalisis *Two-way ANOVA* univariat untuk mengetahui interaksi antarperlakuan pada taraf kepercayaan 95 % kemudian diuji *Tukey* menggunakan program *SPSS for Windows release v.22* untuk menentukan isolat dengan kemampuan paling tinggi sebagai penambat nitrogen.

3.9 Karakterisasi Fenotip, Identifikasi dan Konstruksi Filogenetik Isolat PGPR

3.9.1 Karakterisasi fenotip bakteri PGPR

Isolat rizobakteri unggul dikarakterisasi berdasarkan morfologi koloni dan morfologi sel menurut Fawole & Oso (2004). Pewarnaan Gram diawali dengan gelas objek dibersihkan menggunakan etanol 70 %, kemudian diberi sedikit akuades steril menggunakan jarum ose. Biakan rhizobakteria murni diambil menggunakan jarum ose dan diapuskan pada gelas objek yang telah berisi akuades. Preparat difiksasi hingga kering. Preparat dicat dengan cara meneteskan kristal violet selama satu menit, cat dibuang dan preparat dicuci dengan air mengalir. Preparat ditetaskan larutan garam iodin selama satu menit kemudian dicuci kembali dengan air mengalir. Preparat ditetaskan etanol 70 % selama 30 detik, preparat dicuci dengan air mengalir. Preparat ditetaskan safranin selama satu menit, sisa cat dibuang dan preparat dikeringkan. Morfologi sel (jenis Gram, ukuran, dan bentuk sel) diamati menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 1000 kali.

3.9.2 Identifikasi dan konstruksi pohon filogeni PGPR berdasarkan sekuen 16S rDNA

Isolat PGPR unggul diekstraksi DNA kromosomalnya sesuai dengan protokol *Zymo Kit*. Kultur rhizobakteri sebanyak 6 ose disuspensikan dalam 200 μ L akuades steril. Suspensi tersebut dipindahkan ke dalam tabung *sample grinder* dan dilisiskan menggunakan 750 μ L *BashingBeadTM Buffer*. Suspensi divorteks selama lima menit kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama satu menit. Supernatan sebanyak 400 μ L ditransfer ke *Zymo-SpinTM III-F Filter Tube* dan disentrifugasi 8000 rpm selama satu menit. Suspensi ditambahkan *Genomic Lysis Buffer* 1200 μ L. Supernatan ditransfer 800 μ L ke *Zymo-SpinTM III-C Column* pada *collection tube* dan disentrifugasi 10.000 rpm selama satu menit. Supernatan ditransfer ke *collection tube* baru dilakukan tahapan yang sama hingga supernatan pada *Zymo-SpinTM III-C Column* habis. Supernatan ditambahkan 200 μ L *DNA Pre-Wash Buffer* ke *Zymo-SpinTM IIC Column* baru dan disentrifugasi 10.000 rpm selama satu menit. Pada *colection tube* yang sama, suspensi

ditambahkan 500 μL *g-DNA Wash Buffer* dan disentrifugasi 10.000 rpm selama satu menit. Suspensi ditransfer ke tabung mikrosentrifus 1,5 mL baru dan ditambahkan 100 μL *DNA Elution Buffer*. Suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 detik untuk mengendapkan DNA murni. Sampel DNA disimpan pada suhu -20°C . Konsentrasi DNA diukur pada panjang gelombang 260 dan 280 nm menggunakan nanodrop.

Sekuen 16S rDNA bakteri diamplifikasi menggunakan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) *Thermocycler Amplifitron[®]-1* dengan primer universal 27f (5'-GAG AGT TTG CTG GCT CAG-3') dan 1429r (5'-CTA CGG CTA TGT TAC GA-3') (Wilson dkk., 1990, Wang dkk., 2011). Suspensi *Master mix* bakteri sebanyak 40 μL dibuat dengan komposisi pada tabel 2 kemudian suspensi dihomogenkan dengan cara *dispindown*. Tabung PCR dimasukkan ke dalam mesin PCR dan *dirunning* sesuai program tabel 2.

Tabel 1. Komposisi *Master mix* PCR untuk amplifikasi 16S rDNA

Komposisi	Volume (μL)	Konsentrasi
<i>Nuclease-Free Water</i> , Promega	11	-
2x GoTaq [®] Green Master Mix, Promega	20	-
Primer 27f	2	10 pmol/ μL
Primer 1429r	2	10 pmol/ μL
DNA <i>template</i> bakteri	5	15 pmol/ μL

(Promega, 2018)

Tabel 2. Program reaksi PCR untuk amplifikasi 16S rDNA

Tahap	Suhu	Waktu (menit)
Denaturasi awal	94 $^{\circ}\text{C}$	5,0
34 siklus : Denaturasi	94 $^{\circ}\text{C}$	0,5
<i>Annealing</i>	55 $^{\circ}\text{C}$	0,5
Ekstensi	72 $^{\circ}\text{C}$	1,5
Ekstensi akhir	72 $^{\circ}\text{C}$	7,0

(Mihalache dkk., 2015)

Amplikon 16S rDNA diverifikasi menggunakan elektroforesis gel agarosa 1,5 % dengan cara melarutkan 0,2 g agrosa dalam 15 mL buffer *Tris Boric EDTA* (TBE). Suspensi agarosa dipanaskan hingga mendidih selama dua menit kemudian didinginkan pada suhu 50°C . Ethidium bromida sebanyak 1 μL ditambahkan pada suspensi agarosa dihomogenkan dan dituangkan dalam cetakan yang telah dipasang sisir. Gel yang memadat dipindahkan ke dalam tangki. Tangki digenangi TBE hingga gel terendam. Sampel DNA sebanyak 5 μL dimasukkan dalam sumuran, kemudian *dirunning* selama 30 menit pada 100 V kemudian divisualisasikan dengan UV-*box transluminator*. Ukuran pita 16S rDNA ditentukan berdasarkan marker DNA (SizerTM-1000 DNA Marker Solution, Intron Biotechnology) (Fatchiyah dkk., 2011).

Amplikon 16S rDNA dipurifikasi dan disekuensing di *First Base*, Malaysia dengan primer 27f (5'AGAGTTTGATCMTGGC...AG-3') dan 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). Amplikon disekuensing menggunakan *Automatic Sequencer Analyzer* ABI 3130. Sekuen 16S rDNA diedit menggunakan program *Sequencer Scanner V.1* dan digabungkan menggunakan *CAP Contig Assembly* pada program *BioEdit V.7.2.5*. Sekuen 16S rDNA diBLAST menggunakan program NCBI BLASTN dan urutan nukleotida ditentukan berdasarkan *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Oladunni dkk., 2016). Sekuen 16S rDNA isolat hasil isolasi dan strain acuan disejajarkan dengan *ClustalW Multiple Alignment* program MEGA V.6. Pohon filogeni dikonstruksi dan diinferensi menggunakan algoritma *Maximum-Likelihood (ML)*, matriks jarak evolusi dianalisis menggunakan model *Tamura-Nei* dengan menggunakan *bootstrap* 1000 kali (Muthukumarasamy dkk., 2006).



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Karakteristik Parameter Lingkungan Rhizosfer Tanaman Kopi

Sampel tanah diambil dari dua spesies tanaman kopi yang berbeda yaitu kopi Robusta (Dusun Summersari) dan kopi Arabika (Dusun Sumberwangi) pada ketinggian masing-masing 976 dan 1137 m di atas permukaan laut (dpl) (tabel 3). Karakteristik tanah rhizosfer dari kedua jenis kopi tersebut berwarna hitam atau coklat tua mencirikan jenis tanah Andosol. Jenis tanah ini setara dengan Ordo Andisols yang berada pada ketinggian 750-3.000 mdpl dan mengandung bahan vulkanik (Soil Survey Staff, 2010).

Parameter kimia tanah menunjukkan kandungan C-organik $4,33 \pm 0,7$ % pada tanah rhizosfer Kopi Arabika tergolong tinggi sedangkan pada Kopi Robusta $5,11 \pm 0,82$ % digolongkan sangat tinggi. Kandungan bahan organik pada tanah rhizosfer Kopi Arabika $8,85 \pm 1,42$ mg/kg dan pada Kopi Robusta $7,49 \pm 1,21$ mg/kg dikategorikan sangat tinggi. Kandungan nitrogen di tanah rhizosfer kedua jenis tanaman kopi $0,45 - 0,51$ % yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$); akan tetapi kandungan nitrogen $0,51 \pm 0,02$ % pada tanah thizosfer Arabika tergolong tinggi sedangkan pada tanah Kopi Robusta $0,45 \pm 0,06$ % tergolong sedang. Berdasarkan data tersebut, diketahui kandungan unsur karbon organik di tanah rhizosfer kedua jenis tanaman kopi lebih tinggi daripada kandungan nitrogen. Tingginya kadar C organik pada tanah tersebut dipengaruhi oleh bahan organik yang tinggi sehingga terjadi proses dekomposisi. Dalam hal ini proses dekomposisi sumber karbon di tanah masih rendah sehingga kadar nitrogen yang tersedia di tanah juga menjadi rendah (Leloup dkk., 2018).

Ratio C/N pada rhizosfer tanaman Kopi Arabika $11,33 \pm 0,57$ lebih tinggi ($p < 0,05$) dibandingkan dengan rhizosfer tanaman Kopi Robusta $8,66 \pm 1,52$ (Tabel 3). Menurut Pusat Penelitian, Pengembangan Tanah dan Agroklimat (2005), setiap jenis tanah memiliki kandungan C/N ratio yang optimal yang berbeda-beda. Jenis tanah andisol mengandung C/N rasio tinggi pada 6-10. Pada penelitian ini, C/N rasio di kedua tanah jenis kopi tergolong tinggi. Tanah rhizosfer tanaman Kopi Arabika memiliki rasio C/N yang tinggi karena di lokasi tersebut terdapat tegakan pohon pinus di sekitar pohon kopi. Daun-daun tegakan pohon pinus tersebut akan menjadi serasah di tanah. Serasah daun pinus dan daun kopi Arabika menyatu sehingga meningkatkan ketebalan serasah di tanah. Oleh karena serasah tersebut, ketersediaan bahan organik semakin tinggi sehingga berdampak pada tingginya sumber karbon organik dan rasio C/N. Berdasarkan penelitian

Amutha dkk. (2014) dan Khalif dkk. (2014), tanaman Kopi Robusta dan Arabika ditanam di agroforestri dengan tegakan pohon Pinus menghasilkan serasah sebagai penyedia bahan organik yang lebih banyak. Tegakan pohon ini berperan sebagai penjaga keseimbangan ekosistem bagi mikroba dekomposer serasah. Oleh karena itu C organik, N-total, dan bahan organik total tinggi, ditunjukkan dengan tingginya rasio C/N. Tingginya rasio C/N ini dapat menunjukkan kesuburan tanah sehingga tanah di UB Forest dapat dikategorikan sebagai tanah yang subur.

Kandungan fosfor pada tanah rhizosfer kedua jenis tanaman kopi 1,96 - 3,07 mg/kg yang tergolong rendah. Kandungan fosfor yang relatif lebih rendah pada tanah rhizosfer Kopi Robusta kemungkinan disebabkan unsur P di tanah dilepaskan oleh bakteri pelarut fosfat sehingga diameter batangnya relatif lebih besar daripada tanaman Kopi Arabika. Hal ini sesuai dengan Vacheron dkk. (2013) bakteri pelarut fosfat berperan dalam suplai melarutkan fosfat sehingga dapat diserap oleh tanaman sebagai nutrisi untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman.

Keasaman atau pH tanah rhizosfer pada kedua jenis tanaman kopi relatif sama ($p > 0,05$). Berdasarkan kriteria penilaian sifat kimia tanah, $pH 4,0 \pm 0,1$ tanah rhizosfer tanaman Kopi Arabika dikategorikan sangat asam sedangkan $pH 4,5 \pm 0,4$ tanah rhizosfer tanaman Kopi Robusta termasuk asam (Balai Penelitian Tanah, 2005). Kandungan pH tanah yang rendah disebabkan oleh tingginya kandungan bahan organik tanah menyebabkan terjadinya proses dekomposisi bahan organik oleh bakteri sehingga mengeluarkan asam-asam organik (Wicaksono, dkk., 2015).

Faktor ketinggian tempat, tinggi pohon, dan intensitas cahaya di tanah rhizosfer tanaman Kopi Arabika secara berurutan yaitu $976 \pm 1,40$ mdpl, $2,26 \pm 0,06$ m, dan 66 ± 9 lux berbeda nyata ($p < 0,05$) dibandingkan pada Kopi Robusta yaitu $1137 \pm 2,50$ mdpl, $1,8 \pm 0,07$ m, dan $412,38 \pm 14,80$ lux (Tabel 3). Tanaman Kopi Arabika, tinggi pohon mencapai lebih dari dua meter namun berdiameter 0,9 cm relatif lebih kecil dibandingkan diameter pohon Kopi Robusta yaitu 1,8 meter. Intensitas cahaya di lokasi perkebunan Kopi Robusta lebih tinggi daripada di lokasi perkebunan Kopi Arabika. Hal ini disebabkan sampel tanah rhizosfer di lokasi perkebunan Kopi Arabika diambil pada pukul 8.00-10.00 sedangkan di perkebunan Kopi Robusta diambil pada pukul 10.00-12.00. Selain itu di perkebunan Kopi Arabika terdapat tegakan Pinus yang cukup berdekatan yang menaunginya sehingga intensitas cahaya di permukaan tanah menjadi rendah. Suhu udara, diameter pohon, dan jarak antarpohon tidak berbeda nyata antara kedua lokasi

perkebunan kopi ($p>0,05$). Suhu udara pada kedua lokasi berkisar antara 20-22° C lebih rendah dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yaitu 22-24° C (Oktadiani, 2018).

Tabel 3. Parameter lingkungan di lokasi perkebunan kopi

Parameter	Tanah rhizosfer tanaman kopi		
	Arabika	Robusta	<i>P value</i>
C-organik (%)	4,33 ± 0,7 ^a	5,11 ± 0,82 ^a	0,27
Bahan organik	8,85 ± 1,42 ^a	7,49 ± 1,21 ^a	0,14
N-total (%)	0,51 ± 0,02 ^a	0,45 ± 0,06 ^a	0,15
Rasio C/N	11,33 ± 0,57 ^b	8,66 ± 1,52 ^a	0,04*
P-tersedia (mg/kg)	3,07 ± 0,95 ^a	1,96 ± 0,46 ^a	0,27
pH	4,0 ± 0,10 ^a	4,5 ± 0,40 ^a	0,11
Kadar air	99,55 ± 0,05 ^a	99,6 ± 0,0 ^a	0,19
Suhu udara (°C)	20,01 ± 1,60 ^a	22,11 ± 0,91 ^a	0,13
Ketinggian tempat (mdpl)	976 ± 1,40 ^a	1137 ± 2,50 ^b	0,00*
Intensitas cahaya (lux)	66 ± 9,0 ^a	412,38 ± 14,80 ^b	0,00*
Diameter pohon (cm)	7,21 ± 0,84 ^a	8,17 ± 1,50 ^a	0,39
Jarak antarpohon (m)	162,44 ± 19,50 ^a	166,22 ± 6,80 ^a	0,76
Tinggi pohon (m)	2,26 ± 0,06 ^b	1,80 ± 0,07 ^a	0,02*
Densitas PGPR (cfu/g)			
Bakteri pengasil IAA	0,15 × 10 ^{6b}	0,10 × 10 ^{6a}	0,05*
Bakteri pelarut fosfat	0,14 × 10 ^{6a}	0,17 × 10 ^{6a}	0,10
Bakteri penambat N	0,02 × 10 ^{6a}	0,02 × 10 ^{6a}	0,36
Indeks Diversitas			
Bakteri pengasil IAA	0,86 ^a	0,90 ^a	-
Bakteri pelarut fosfat	0,96 ^a	0,90 ^a	-
Bakteri penambat N	0,97 ^a	0,82 ^a	-

Keterangan: huruf yang sama pada setiap nilai parameter tanah menunjukkan tidak berbeda nyata ($p>0,05$) antara rhizosfer tanaman kopi Arabika dan Robusta

Kelimpahan bakteri PGPR di tanah rhizosfer menunjukkan densitas bakteri penghasil IAA, pelarut fosfat, dan penambat nitrogen tidak berbeda nyata ($p>0,05$) antarkedua lokasi perkebunan kopi (Tabel 3). Densitas bakteri penghasil IAA di tanah rhizosfer tanaman Kopi Arabika sebanyak $0,15 \times 10^6$ cfu/g lebih banyak ($p<0,05$) dibandingkan di lokasi Kopi Robusta $0,10 \times 10^6$ cfu/g. Hal ini disebabkan jumlah bahan organik di tanah perkebunan Kopi Arabika 8,85 % relatif lebih tinggi daripada 7,49 % di lokasi Kopi Robusta. Namun demikian, kandungan C organik di tanah rhizosfer Kopi Arabika 4,3 % relatif lebih rendah dibandingkan 5,1 % di lokasi Kopi Robusta. Hal ini kemungkinan disebabkan rendahnya kandungan C-organik di tanah karena proses dekomposisi bahan organiknya yang tinggi sehingga kandungan nitrogen di tanah meningkat. Bakteri penghasil IAA selain membantu proses dekomposisi bahan organik juga menghasilkan hormon pertumbuhan bagi tanaman kopi. Hal ini didukung oleh penelitian Mohite (2013) dan Premachandra dkk. (2016) yaitu bakteri penghasil IAA dari

tanah rhizosfer dengan jumlah yang banyak dapat mensuplai hormon IAA yang berfungsi dalam pemanjangan sel dan pertumbuhan tanaman.

Densitas bakteri pelarut fosfat di tanah rhizosfer Kopi Robusta $0,17 \times 10^6$ cfu/g relatif lebih banyak daripada $0,14 \times 10^6$ cfu/g di lokasi Kopi Arabika. Hal ini menunjukkan bahwa unsur P yang dilepaskan oleh bakteri pelarut fosfat yang berkembang biak pada rhizosfer tanaman Kopi Robusta menyebabkan kelimpahannya relatif lebih tinggi meskipun kandungan P relatif lebih rendah dibandingkan di tanah rhizosfer Kopi Arabika. Densitas bakteri pelarut fosfat dari rhizosfer kopi Robusta juga ditemukan pada penelitian Bagtaraj, dkk. (2015) namun jumlah densitas bakteri pelarut fosfat yang diperoleh lebih rendah yaitu 59×10^2 cfu/g. Hal ini diduga karena jumlah bakteri pelarut fosfat yang tinggi berperan dalam melepaskan fosfor yang terikat pada mineral tanah untuk pertumbuhan dan perkembangan mikrobial serta tanaman (Li dkk., 2017).

Densitas bakteri penambat nitrogen sama yaitu $0,02 \times 10^6$ cfu/g pada tanah rhizosfer kedua jenis tanaman kopi. Hal ini juga didukung dengan kandungan nitrogen tanah di kedua lokasi perkebunan kopi juga relatif sama 0,45 % – 0,51%. Hasil penghitungan densitas tersebut lebih tinggi dari penelitian Bagtaraj, dkk. (2015) yang memperoleh densitas bakteri penambat nitrogen sebesar $27,7 \times 10^3$ cfu/g dan 34×10^3 cfu/g secara berturut-turut dari rhizosfer tanaman kopi Robusta dan Arabika. Perbedaan hasil densitas ini dimungkinkan karena faktor sifat kimia tanah yang berbeda sehingga menghasilkan jumlah densitas bakteri penambat nitrogen yang berbeda meskipun berasal dari rhizosfer tanaman kopi yang sama.

Berdasarkan densitas bakteri PGPR tersebut maka dapat dikategorikan jumlahnya masih rendah. Hal ini dikarenakan densitas bakteri PGPR tersebut hanya lebih rendah dari 10-100 juta (10^6) seperti yang dilaporkan oleh Mukrin, dkk., (2019) bahwa jumlah densitas pada rentang tersebut mengindikasikan populasi bakteri yang tinggi di sekitar rhizosfer tanah. Hasil densitas PGPR penelitian ini berbeda diduga juga karena adanya kompetisi dengan bakteri tanah lainnya yang berada di rhizosfer tanah kedua kopi tersebut.

4.2 Hubungan Parameter Lingkungan terhadap Densitas Bakteri PGPR pada Rhizosfer Tanaman Kopi

Analisis korelasi pada penelitian untuk menunjukkan pengaruh setiap parameter lingkungan rhizosfer tanaman kopi terhadap masing-masing densitas bakteri PGPR berdasarkan analisis korelasi Pearson dengan tingkat kepercayaan 90% ($p \leq 0,1$). Hasil

analisis menunjukkan terdapat parameter lingkungan yang memberikan pengaruh positif maupun negatif terhadap densitas setiap jenis bakteri PGPR. Densitas bakteri penghasil IAA dipengaruhi oleh parameter pH tanah ($p \leq 0,05$) dan diameter pohon ($p \leq 0,08$). Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin rendah pH tanah dan semakin kecil diameter pohon akan meningkatkan jumlah densitas bakteri penghasil IAA di rhizosfer tanaman kopi Arabika dan Robusta. Hal ini menunjukkan juga bahwa apabila diameter pohon tanaman kopi semakin besar menyebabkan meningkatnya jumlah serasah dan bahan organik yang memicu kadar air meningkat sehingga kondisi menjadi anaerob. Kondisi anaerob tersebut berdampak pada penurunan densitas bakteri penghasil IAA.

Tabel 4. Hubungan antara parameter lingkungan terhadap densitas PGPR

Parameter	Densitas Bakteri					
	IAA		Pelarut fosfat		Penambat nitrogen	
	Korelasi	P value	Korelasi	P value	Korelasi	P value
Lingkungan						
pH tanah	-0,79	0,05*	0,06	0,91	-0,77	0,07*
Rasio C/N tanah	0,54	0,26	0,14	0,78	0,69	0,10*
Bahan organik tanah	0,52	0,29	0,40	0,42	0,69	0,11
C-organik tanah (%)	-0,46	0,34	-0,56	0,24	-0,73	0,10*
N-total tanah (%)	-0,08	0,86	-0,34	0,50	-0,03	0,94
P-tersedia tanah	0,46	0,35	-0,67	0,14	0,24	0,63
Suhu tanah	-0,49	0,31	0,69	0,12	-0,27	0,59
Kadar air tanah	-0,14	0,78	-0,47	0,34	-0,47	0,34
Ketinggian tempat	-0,31	0,54	-0,08	0,86	-0,49	0,32
Intensitas cahaya	-0,35	0,49	0,06	0,90	-0,53	0,27
Diameter pohon	-0,76	0,08*	-0,12	0,81	-0,74	0,08*
Jarak pohon	0,38	0,44	-0,17	0,73	0,49	0,31
Tinggi pohon	-0,18	0,73	-0,58	0,22	-0,4	0,42
Densitas PGPR						
Bakteri pengasil IAA	1,00	0,00	0,00	0,99	0,86	0,03*
Bakteri pelarut fosfat	0,00	0,99	1,00	0,00	0,41	0,41
Bakteri penambat N	0,86	0,03*	0,41	0,41	1,00	0,00
Indeks Diversitas PGPR						
Bakteri penghasil IAA	-0,49	0,32	0,26	0,62	-0,51	0,31
Bakteri pelarut fosfat	0,49	0,32	-0,26	0,62	0,51	0,31
Bakteri penambat N	0,49	0,32	-0,26	0,62	0,51	0,31

Keterangan: tanda (*) menunjukkan ada korelasi ($p \leq 0,1$), nilai positif (+) r-hitung (berkorelasi positif), nilai negatif (-) r-hitung (berkorelasi negatif) menurut uji korelasi Pearson

Densitas bakteri pelarut fosfat dari rhizosfer kopi Arabika dan Robusta dipengaruhi oleh ketersediaan P ($p > 0,14$) dan suhu tanah ($p > 0,12$). Meskipun tidak berbeda signifikan, kedua parameter tersebut paling mendekati standar korelasi. Parameter ketersediaan P yang rendah dan kondisi suhu yang tinggi dapat meningkatkan densitas bakteri pelarut fosfat. Hal ini dapat diartikan bahwa jumlah ketersediaan P yang sedikit di tanah memacu bakteri pelarut fosfat di tanah untuk memproduksi P terlarut lebih banyak

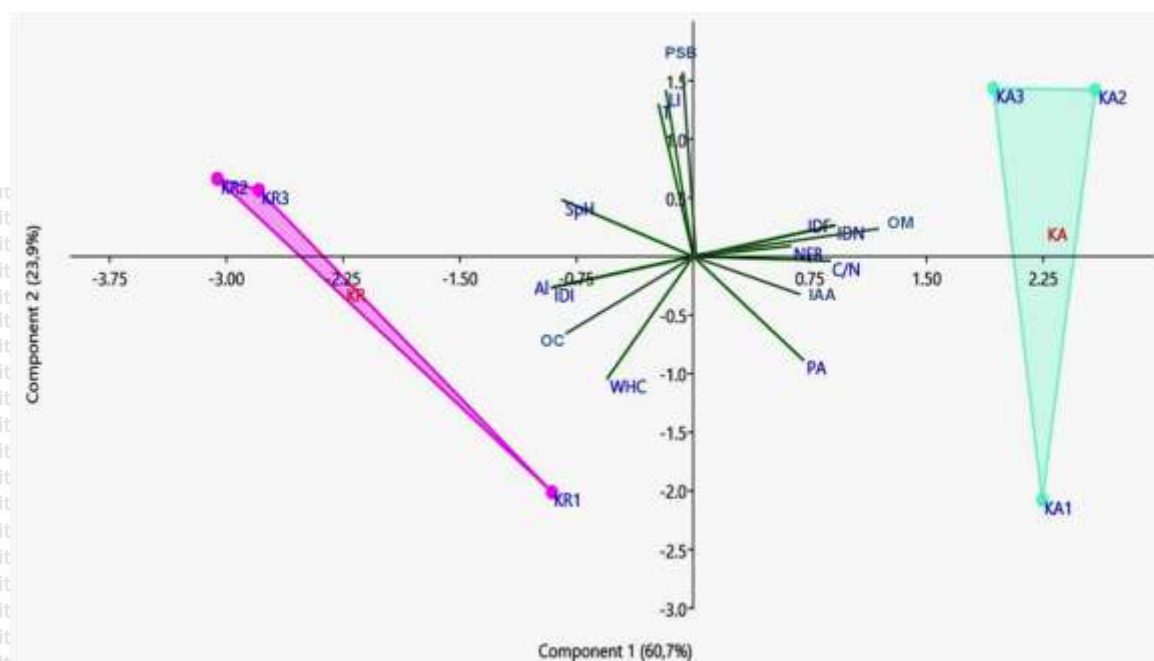
sehingga densitas bakteri pelarut fosfat semakin banyak. Meskipun densitas bakteri pelarut fosfat meningkat pada suhu tanah yang semakin tinggi yaitu hanya pada suhu 20-37° C. Hal ini dikarenakan pada suhu tersebut, densitas bakteri pelarut fosfat memproduksi enzim fosfatase secara optimal untuk melarutkan P. Apabila suhu tanah melebihi 37° C mengakibatkan viabilitas bakteri pelarut fosfat menurun. Penelitian Dewanti, dkk. (2016) menunjukkan bahwa densitas bakteri pelarut fosfat mengalami penurunan dalam melarutkan P ketika diinkubasi pada suhu tinggi (58° C) akibat dari bakteri pelarut fosfat yang tidak mampu menghasilkan asam-asam organik.

Sifat kimia tanah seperti pH ($p \leq 0,07$), rasio C/N ($p \leq 0,10$) dan C organik ($p \leq 0,10$) berpengaruh terhadap densitas bakteri penambat nitrogen. Berdasarkan korelasi Pearson, semakin rendah pH dan C organik tanah akan meningkatkan densitas bakteri penambat nitrogen sedangkan jumlah rasio C/N yang tinggi akan meningkatkan densitas bakteri penambat nitrogen. Bahan organik tanah ($p > 0,10$) meskipun tidak berbeda signifikan juga memiliki pengaruh yang paling dekat dari 3 parameter tanah yang disebutkan sebelumnya. Penelitian Antralina, dkk. (2015) menyebutkan bahwa densitas bakteri penambat nitrogen dipengaruhi oleh suplai ketersediaan sumber energi di tanah seperti jumlah C/N rasio dan bahan organik di tanah. Selain itu disebutkan juga kandungan C organik yang tinggi menyebabkan densitas bakteri penambat nitrogen semakin meningkat. Namun, hasil densitas bakteri penambat nitrogen dari rhizosfer kopi menunjukkan semakin kecil nilai C organik akan meningkatkan densitas bakteri penambat nitrogen. Hal ini diduga karena adanya faktor dekomposisi bahan organik di tanah dari sumber yang berbeda-beda.

Hasil penelitian juga menunjukkan adanya korelasi positif ($r > 0,86$) dan signifikan ($p < 0,05$) antara densitas bakteri penambat nitrogen terhadap densitas bakteri penghasil IAA. Hal ini mengindikasikan bahwa peningkatan densitas bakteri penambat nitrogen juga diikuti dengan meningkatnya densitas bakteri penghasil IAA. Hal ini diduga karena kedua jenis bakteri PGPR tersebut sama-sama dipengaruhi oleh pH, C organik dan N-total dalam jumlah yang rendah serta faktor rasio C/N, ketersediaan P dan bahan organik dalam kadar yang tinggi akan meningkatkan jumlah densitas bakteri penambat nitrogen dan penghasil IAA. Meskipun densitas bakteri penambat nitrogen tidak berbeda signifikan ($p > 0,1$) terhadap densitas bakteri pelarut fosfat, namun penambahan densitas bakteri penambat nitrogen juga diikuti dengan meningkatnya densitas bakteri pelarut fosfat. Hal ini menunjukkan bahwa amonium yang disuplai oleh bakteri penambat N₂

dimanfaatkan oleh bakteri penghasil IAA dan pelarut fosfat untuk sintesis protein dan pertumbuhan selnya.

Penelitian ini juga menganalisis hubungan seluruh parameter lingkungan secara terhadap densitas bakteri PGPR untuk melihat pola karakteristik parameter lingkungan yang mempengaruhi densitas bakteri PGPR di setiap jenis rhizosfer tanaman kopi disajikan berdasarkan analisis multivariat biplot pada Gambar 11.



Gambar 11. Korelasi faktor lingkungan rhizosfer tanaman kopi di UB Forest berdasarkan analisis multivariat

KA1 = tanah kopi Arabika 1, KA2 = tanah kopi Arabika 2, KA3 = tanah kopi Arabika 3, PA = P-tersedia, C/N = rasio C/N, OM= bahan organik, OC= C organik, SpH = pH tanah, LI = intensitas cahaya, T= suhu tanah, WHC = kadar air, Al = ketinggian, NFB = densitas bakteri penambat nitrogen, IAA= densitas bakteri penghasil IAA, PSB= densitas bakteri pelarut fosfat, IDI = indeks diversitas bakteri IAA, IDN = indeks diversitas bakteri penambat nitrogen dan IDF = indeks diversitas bakteri pelarut fosfat

Hasil analisis multivariat menunjukkan bahwa terdapat dua kelompok karakteristik rhizosfer tanaman kopi yaitu KA (kopi Arabika) dan KR (kopi Robusta) yang dicirikan oleh adanya hubungan keterkaitan antara setiap parameter lingkungan terhadap densitas dan diversitas setiap jenis PGPR dari masing-masing jenis tanaman kopi. Rasio C/N (C/N) berpengaruh terhadap peningkatan jumlah densitas bakteri penghasil IAA dan penambat nitrogen (NFB). Hal ini mengindikasikan bahwa rasio C/N rhizosfer Arabika hanya berpengaruh terhadap peningkatan kelimpahan bakteri penghasil IAA dan bakteri penambat nitrogen. Hasil ini sesuai dengan analisis korelasi Pearson bahwa sumber nutrisi tanah mempengaruhi densitas bakteri penghasil IAA dan penambat nitrogen. Dari

berbagai sumber nutrisi tanah yang mempengaruhi, peran rasio C/N yang paling berpengaruh berdasarkan analisis biplot ini. Selain meningkatkan densitas bakteri penghasil IAA dan penambat nitrogen, indeks diversitas bakteri pelarut fosfat dan bakteri penambat nitrogen dipengaruhi oleh faktor rasio C/N tersebut. Meskipun demikian, peningkatan densitas bakteri IAA tidak diikuti dengan meningkatnya indeks diversitas bakteri penghasil IAA di rhizosfer kopi Arabika. Keberagaman jenis spesies bakteri penghasil IAA diduga dipengaruhi oleh faktor jenis tanaman lainnya. Faktor ketinggian tempat rhizosfer (Al) meningkatkan indeks diversitas bakteri penghasil IAA akan tetapi densitas bakteri penghasil IAA dan penambat nitrogen serta indeks diversitas bakteri penambat nitrogen dan pelarut fosfat menurun di rhizosfer kopi Robusta. Penelitian Amutha dkk. (2011) dan Sari dkk. (2013) menyebutkan bahwa faktor ketinggian tempat memengaruhi tingkat keasaman tanah, suhu udara, dan jumlah bahan organik tanah yang cenderung tinggi sehingga kelimpahan bakteri tanah semakin meningkat. Faktor lingkungan lainnya seperti ketersediaan P (PA) dan kadar air (WHC) menunjukkan pengaruh yang lemah terhadap kelimpahan densitas dan indeks diversitas PGPR.

Berdasarkan analisis korelasi dan multivariat dapat disimpulkan bahwa parameter lingkungan seperti pH tanah, rasio C/N, bahan organik, C-organik, N-total, P-tersedia, diameter pohon dan ketinggian tempat penanaman kopi berpengaruh terhadap tinggi rendahnya densitas dan indeks diversitas bakteri PGPR dari rhizosfer tanaman kopi sedangkan.

4.3 Diversitas Bakteri Rhizosfer Tanaman Kopi Di UB Forest

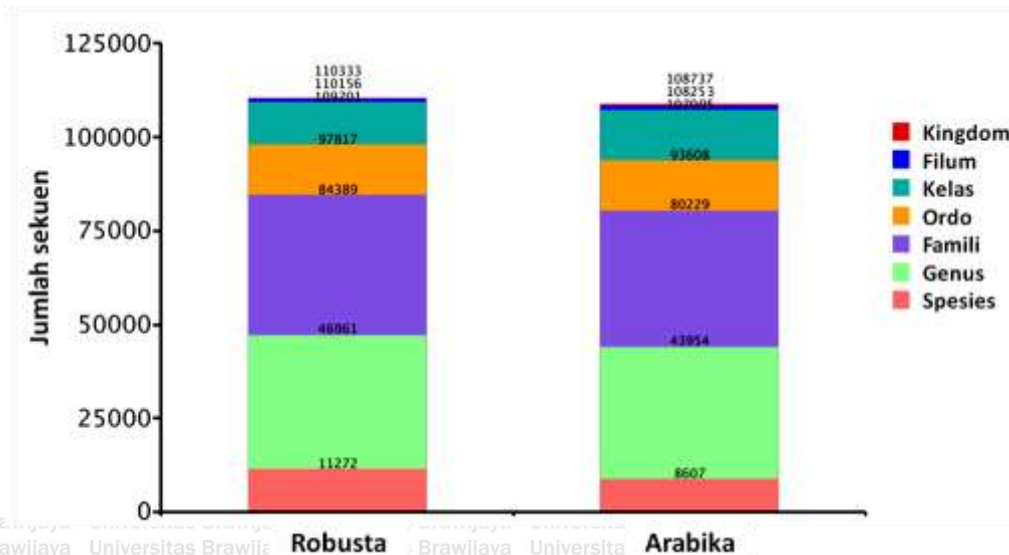
Metode analisis metagenomik digunakan untuk memperoleh profil struktur dan komunitas bakteri di rhizosfer tanaman kopi. Berdasarkan analisis *Operating Taxonomy Unit* (OTU) diperoleh 314.568 sekuen yang terdiri dari 159.658 sekuen pada tanah rhizosfer tanaman Kopi Robusta dan 155.910 sekuen pada tanah rhizosfer tanaman Kopi Arabika. Data sekuen (*effective tag*) DNA dikelompokkan berdasarkan tingkat kemiripan 97 % ke dalam OTU. Pada konstruksi OTU diperoleh informasi dari kedua sampel tanah rhizosfer tanaman kopi yang terdiri dari *total tags*, *taxon tags*, *unclassified tags*, dan *unique tags* (Tabel 5).

Tabel 5. Data analisis statistik konstruksi OTU

Informasi	Tanah rhizosfer tanaman kopi	
	Robusta	Arabika
<i>Total tags</i>	133.619	134.784
<i>Taxon tags</i>	110.333	108.737
<i>Unclassified tags</i>	0	0
<i>Unique tags</i>	24.451	24.882
<i>OTUs</i>	2.174	2.225

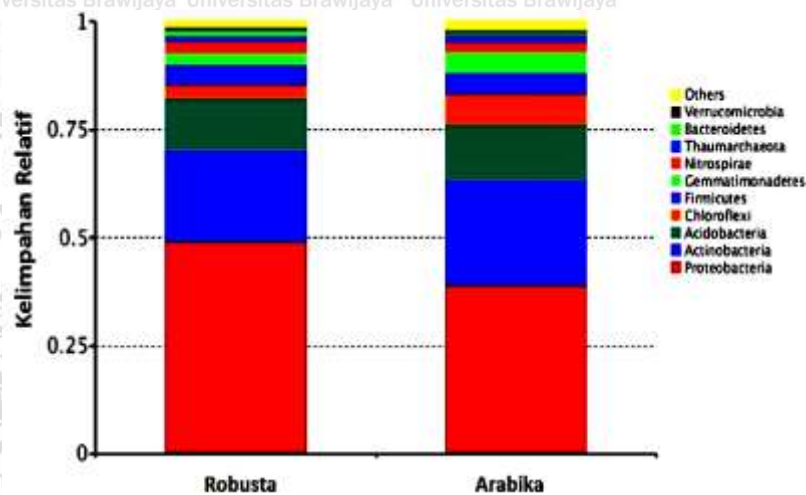
Keterangan: *Total tags*: jumlah tag efektif, *taxon tags*: jumlah tag anonasi, *unclassified tags*: jumlah tag tidak teranonasi, *unique tags*: jumlah tag dengan frekuensi lebih dari 1 yang ada pada satu sampel, OTU: identifikasi jumlah OTU pada sampel yang berbeda

Jumlah takson setiap sampel menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata. Meskipun demikian, jumlah 110.333 takson pada tanah rhizosfer tanaman Kopi Robusta lebih banyak dibandingkan 108.737 takson pada Tanaman Kopi Arabika. Kingdom Bakteria dan Archaea jumlahnya mendominasi dibandingkan kingdom lainnya (Gambar 12), dan diperoleh 4.399 OTU pada tingkat kemiripan 97 % pada kedua jenis tanah rhizosfer tanaman kopi. Jumlah OTU pada tanah rhizosfer tanaman Kopi Arabika yaitu 2.225 OTU sedangkan pada tanah rhizosfer Kopi Robusta diperoleh 2.174 OTU. Informasi struktur komunitas bakteri dari rhizosfer tanaman kopi Arabika dan Robsuta di UB *Forest* sangat diperlukan. Hasil informasi tersebut dapat dimanfaatkan untuk memperbaiki sistem pengelolaan lahan kopi dengan cara memperbanyak bakteri tanah yang melimpah. Hal ini juga dilakukan oleh Meena dkk., (2017) bahwa keberadaan mikroba *indigenus* di tanah menjadi fokus yang penting bertujuan untuk mengeksplorasi keragaman ekologi pada lahan pertanian. Meskipun demikian, untuk memahami secara keseluruhan terkait struktur komunitas bakteri tanah berkaitan erat dengan faktor lingkungan tanah, hewan tanah dan jenis tanaman. Menurut Wallenstein & Hall, (2012) dan Shi, dkk. (2014) struktur komunitas bakteri tanah sangat dipengaruhi oleh iklim, ketersediaan nutrisi tanah, diversitas tanaman, suhu, dan kelembaban tanah. Selain itu, ketersediaan mikronutrisi juga berperan penting pada tanaman yang dapat mensuplai lingkungan sehat bagi pertumbuhan komunitas bakteri di area tanah rhizosfer (Ghosh dkk., 2017).



Gambar 12. Jumlah *sekuen tag* yang terdiri dari Kingdom Bakteri dan Archaea

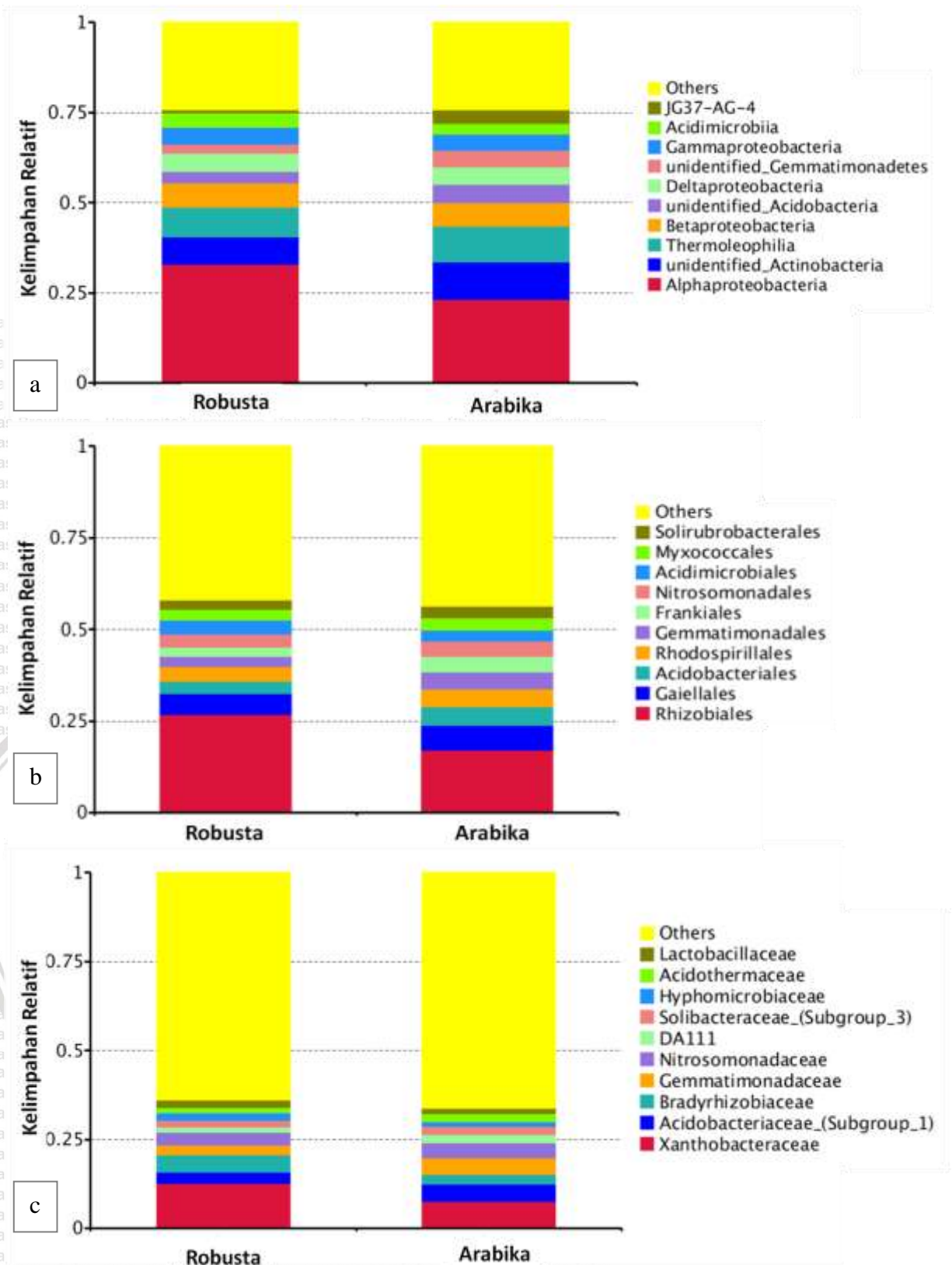
Dalam penelitian ini juga dianalisis komposisi 10 filum dengan kelimpahan relatif tertinggi pada masing-masing tanah rhizosfer tanaman kopi (Gambar 13). Filum Proteobacteria mendominasi di kedua tanah rhizosfer tanaman kopi dengan komposisi 39 % pada Kopi Arabika dan 49,27 pada Kopi Robusta.



Gambar 13. Komposisi filum mikroba tanah rhisofer tanaman Kopi Robusta dan Arabika

Tujuh filum lainnya menunjukkan kelimpahan yang relatif rendah yaitu Chloroflexi, Firmicutes, Gennatimonadetes, Nitrospirae, Rhaumarchaeota, Bacteroidetes, dan Verrucomicrobia. Kelimpahan relatif filum mikroba pada tanah rhizosfer Kopi Robusta yaitu Actinobacteria 20,76 %, Acidobacteria 12,21 %, Chloroflexi 3,02 %, Firmicutes 4,85 %, Gemmatinonadetes 2,65 %, Nitrospirae 2,82 %, Thaumarchaeota 1,21 %, Bacteroidetes 1,27 %, dan Verrucomicrobia 0,69 %. Kelimpahan relatif filum mikroba pada tanah rizosfer tanaman Kopi Arabika yaitu Actinobacteria 24,25 %, Acidobacteria 13,08 %, Chloroflexi 6,91%, Firmicutes 5,05 %, Gemmatinonadetes 4,77 %, Nitrospirae 2,42 %, Thaumarchaeota 1,61 %, Bacteroidetes 0,5 %, dan

Verrucomicrobia 0,65 %. Filum Proteobacteria yang mendominasi tanah rhizosfer juga didapatkan oleh Rasche, dkk. (2011), Dai, dkk. (2018) dan Wang, dkk. (2018).



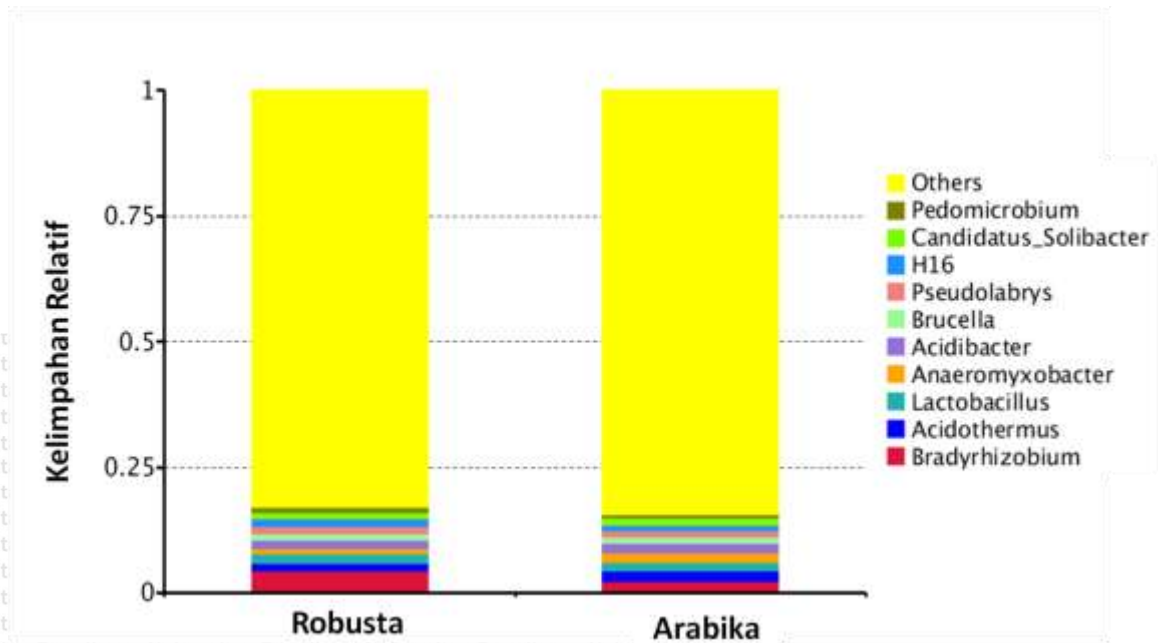
Gambar 14. Komposisi kelas (a), ordo (b), dan famili (c) bakteri tanah rhizosfer tanaman Kopi Robusta dan Arabika di UB Forest

Kelimpahan relatif Kelas Alphatobacteria dominan pada kedua jenis tanah rhizosfer tanaman kopi meskipun persentase distribusi berbeda yaitu 42,90 % pada Kopi Robusta dan 30,07 % pada Kopi Arabika. Kelimpahan relatif kelas mikroba pada tanah rhizosfer Kopi Robusta antara lain: Thermoleophilia 10,52 %, *Unidentified* Actinobacteria 9,96 %, Betaprotobacteria 8,82 %, Deltaprotobacteria 6,49 %, Gammaproteobacteria 5,94 %, Acidimicrobiia 5,15 %, *unidentified* Acidobacteria 4,25 %, *unidentified* Gemmatimonadetes 3,43 %, dan JG-AG-4 1,17 %. Secara umum, komposisi kelimpahan relatif taksa kelas dari rhizosfer Kopi Arabika tidak jauh berbeda dengan rhizosfer Kopi Robusta. Kelimpahan relatif Kelas *Unidentified* Actinobacteria 13,2 % dan Thermophilia 13,06 % cenderung lebih tinggi dibandingkan kedua kelas tersebut pada tanah rhizosfer Kopi Robusta. Kelimpahan relatif Kelas Betaproteobacteria pada rhizosfer Kopi Arabika 0,4 % sedangkan kelimpahan relatif *Unidentified* Acidobacteria, Deltaprotobacteria, dan *Unidentified* Gemmatimonadetes pada rhizosfer tersebut mencapai 6 % hampir sebanding dengan kelimpahan relatif Deltaproteobacteria pada rhizosfer Kopi Robusta. Tiga takson yang kelimpahan relatifnya paling rendah pada rhizosfer Kopi Robusta yaitu Gammaproteobacteria 5,79 %, JG37-AG-4 4,9 %, dan Acidimicrobiia 3,8%.

Kelimpahan relatif pada level ordo, Rhizobiales mendominasi tanah rhizosfer kedua jenis tanaman kopi meskipun kelimpahan relatif ordo tersebut lebih tinggi di tanah rhizosfer Kopi Robusta. Kelimpahan relatif Ordo Gaiellales, Acidobateriales, Rhodospirillales, Gemmatimonadales, Frakiales, Nitrosomonadales, Acidimicrobiales, Myxococcales, dan Solirubrobactiales pada tanah rhizosfer kedua jenis tanaman kopi hampir sama (Gambar 14b). Berdasarkan taksa famili, tanah rhizosfer kedua jenis tanaman kopi didominasi oleh Famili Xanthobacteraceae yang kelimpahan relatifnya lebih tinggi pada rhizosfer Kopi Robusta sebesar 10%. Famili Acidobacteriaceae (Subgroup 1) dan Gemmatimonadaceae memiliki komposisi yang hampir sama dengan Famili Xanthobacteraceae pada rhizosfer Kopi Arabika (Gambar 14c).

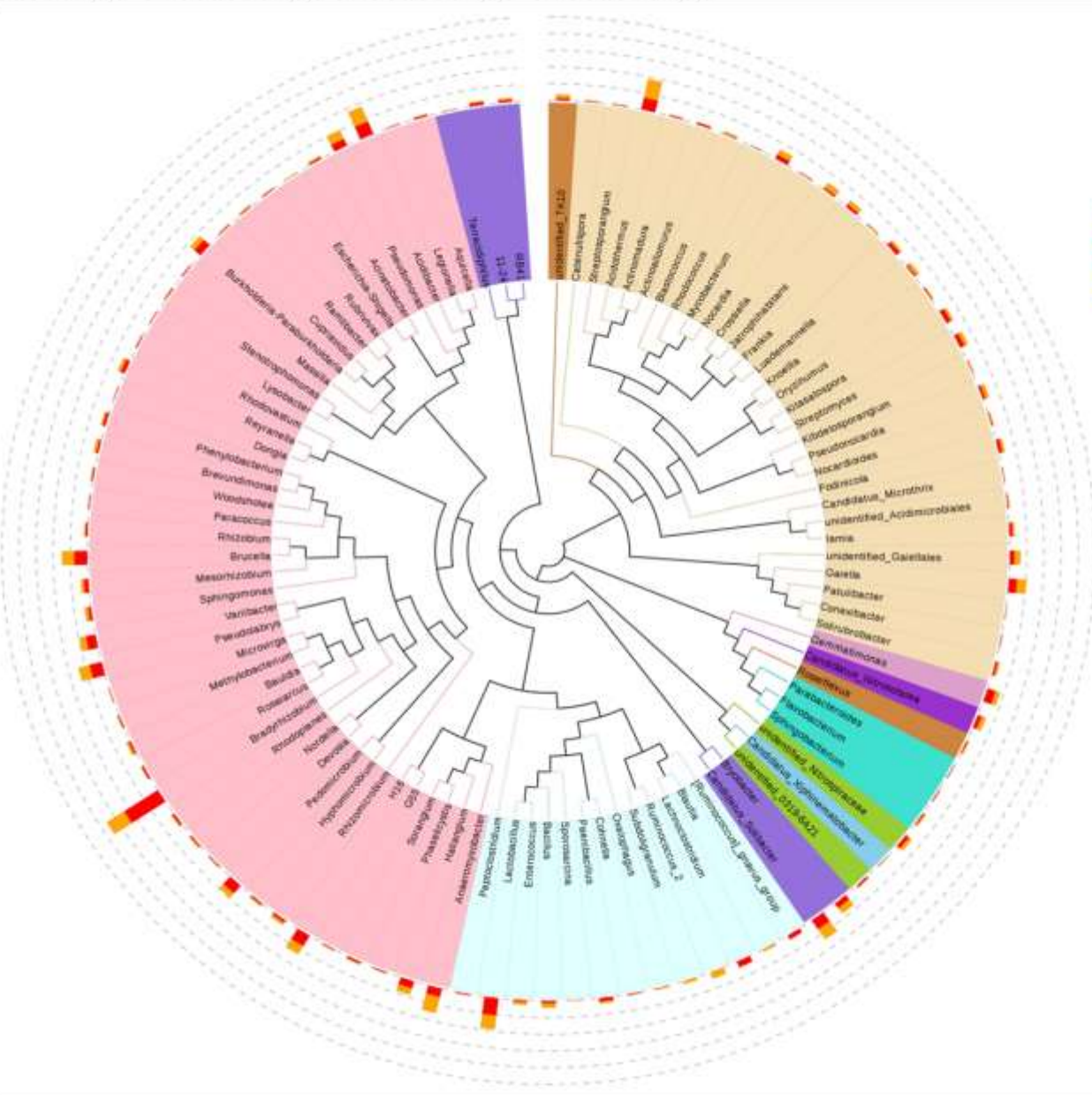
Pada level genus, terdapat lima genus bakteri dominan yaitu *Bradyrhizobium*, *Acidothermus*, *Lactobacillus*, *Anaeromyxobacter*, dan *Acidibacter*. Meskipun pada tanah rhizosfer kedua jenis tanaman kopi ditemukan genus bakteri yang sama, tetapi genus-genus tersebut kelimpahan relatifnya berbeda. Pada rhizosfer Kopi Arabika tiga genus bakteri dengan kelimpahan relatif paling tinggi yaitu *Bradyrhizobium* 3,12 %, *Acidothermus* 2,91 %, dan *Anaeromyxobacter* 2,55 %; sedangkan pada rhizosfer Kopi Robusta yaitu *Bradyrhizobium* 6,14 %, *Lactobacillus* 2,72 %, dan *Acidibacter* 2,16 %

(Gambar 15). Hasil ini menunjukkan bahwa Genus *Bradyrhizobium* dominan pada rhizosfer kedua jenis tanaman kopi meskipun kelimpahan relatifnya lebih tinggi terdapat di rhizosfer Kopi Robusta.



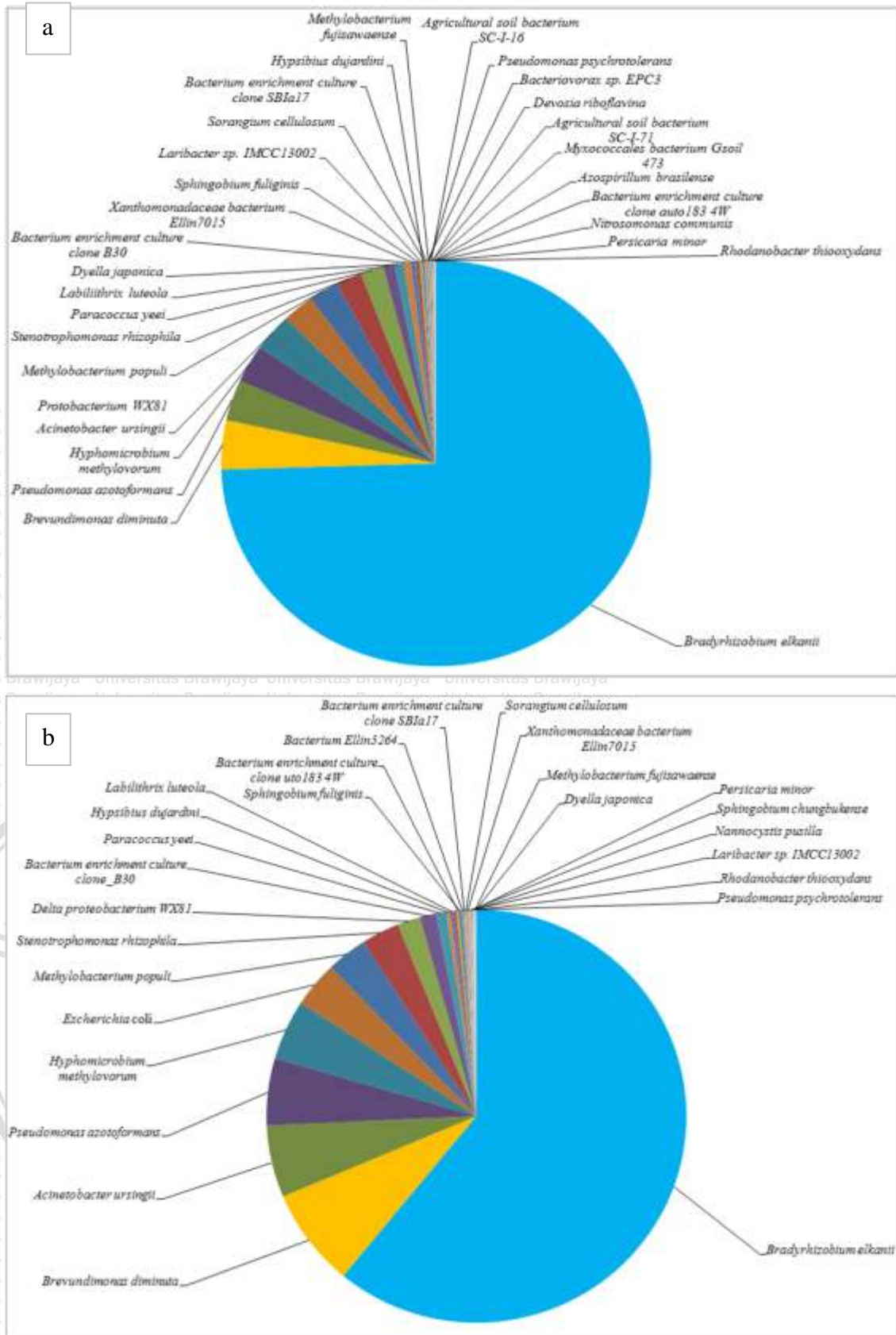
Gambar 15. Komposisi genus bakteri pada tanah rhisofer Kopi Robusta dan Arabika





Gambar 16. Pohon filogeni bakteri rhizosfer Kopi Robusta dan Arabika di UB Forest

Perbedaan warna setiap cabang menunjukkan filum yang berbeda. Kelimpahan relatif setiap genus masing-masing sampel ditampilkan di luar lingkaran berbentuk diagram batang



Gambar 17. Kelimpahan relatif spesies bakteri rhizosfer Kopi Robusta (a) dan Arabika (b) di UB Forest

Pohon filogeni (Gambar 16) dibuat menggunakan sekuen terbaik 16S rDNA dari 100 genus bakteri tanah rhizosfer tanaman kopi. Berdasarkan pohon filogeni tersebut, informasi setiap tingkat taksa dibedakan berdasarkan cabang warna sedangkan diagram batang di luar lingkaran menunjukkan jumlah kelimpahan relatif genus bakteri pada tanah rhizosfer masing-masing jenis tanaman kopi. Warna oranye menunjukkan kelimpahan relatif bakteri pada tanah rhizosfer Kopi Robusta sedangkan warna merah pada tanah rhizosfer tanaman Kopi Arabika. Berdasarkan gambar (Gambar 16) menunjukkan spesies bakteri yang dominan adalah *Bradyrhizobium elkanii* dengan kelimpahan relatif bakteri pada tanah rhizosfer Kopi Robusta dan Arabika secara berurutan 75 % dan 62,5 % (Gambar 17). Empat spesies bakteri selain *Bradyrhizobium elkanii* dengan kelimpahan relatif tinggi pada rhizosfer Kopi Robusta adalah *Lactobacillus fermentum*, *Nitrospira japonica*, *Bacteria* Ellin6517, dan *Brevundimonas diminuta* sedangkan pada rhizosfer Kopi Arabika yaitu *Nitrospira japonica*, *Bacterium* Ellin6517, *Brevundimonas diminuta*, dan *Bacillus drentensis*.

Pada umumnya *Bradyrhizobium elkanii* hidup bersimbiosis dengan tanaman leguminosa (Reeve dkk., 2017). Namun pada penelitian ini, *B. elkanii* berada di rhizosfer tanaman kopi yang diketahui sebagai tanaman non simbiosis. Hal ini diduga keberadaan bakteri tersebut melimpah dipengaruhi oleh jenis tanaman kacang-kacangan oleh petani setempat atau jenis tanaman lain yang termasuk dalam kelompok Fabaceae yang tumbuh liar di sekitar tanaman kopi. Meskipun belum ada informasi dan tidak ditemukan tanaman polong-polongan di kedua lokasi pengambilan sampel, namun terdapat tanaman invasif dari Famili Fabaceae di agroforestri UB Forest. Menurut Rahma, dkk. (2017) tanaman invasif dari jenis tanaman Fabaceae yaitu *Kaliandra (Kaliandra perturicensis)*. Diduga tanaman invasif tersebut berperan sebagai penyebab melimpahnya *Bradyrhizobium elkanii* dari rhizosfer kedua jenis tanaman kopi. Penelitian terkait struktur komunitas bakteri rhizosfer dari tanaman kopi menggunakan analisis metagenomik 16S bakteri tanah belum ditemukan oleh penelitian lain sehingga spesies bakteri ini hanya khas didapatkan dari rhizosfer tanaman kopi Arabika dan Robusta di UB Forest.

Bradyrhizobium elkanii merupakan bakteri aerob, motil, Gram negatif, dan tidak membentuk spora. Bakteri tersebut berperan sebagai biofertilizer alami pada tanaman leguminosa (Rumjanek dkk., 1993; Zhang dkk., 2008; Perrineau dkk., 2011) karena berpotensi sebagai asimilasi amonia. Selain itu memiliki gen penyandi sintesis auksin pada tanaman, mampu mengasimilasi sulfur, melarutkan fosfat, dan menghasilkan asam organik. Aktivitas metabolisme rhizobakteri tersebut yaitu mampu memproduksi IAA,

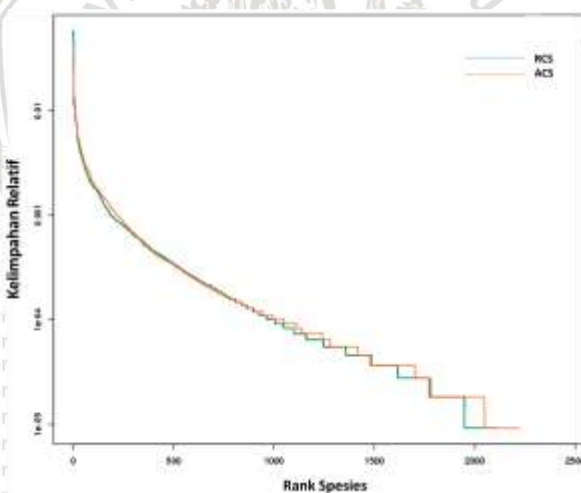
siderofor, HCN, dan amonium yang dapat mendukung pertumbuhan tanaman (Ahemed & Kibert, 2014; Crovadore dkk., 2016; Sprent dkk., 2017). Senyawa metabolit tersebut juga dipengaruhi dari oleh jenis tanaman karena tanaman mengeluarkan eksudat berupa senyawa kimia dan biologi melalui perakaran tumbuhan ke tanah disekitarnya. Hasil eksudat tersebut dimanfaatkan juga oleh bakteri untuk memperbanyak jumlah koloni bakteri rhizosfer (Jha & Saraf, 2015).

Komunitas bakteri rhizosfer tanaman kopi dianalisis berdasarkan diversitas alfa dan beta serta Indeks Shannon-Wiener dan Simpson. Hal ini bertujuan untuk mengamati profil keseimbangan bakteri rhizosfer di setiap sampel, mendeteksi ada tidaknya spesies yang mendominasi, dan kelimpahan bakteri rhizosfer. Diversitas alfa mendeteksi jumlah spesies yang berbeda pada setiap sampel. Berbeda dengan diversitas alfa, diversitas beta mengidentifikasi perbedaan komposisi bakteri rhizosfer antarsampel yaitu antara tanah rhizosfer Kopi Robusta dan Arabika (Tabel 6). Pada tabel 6 menunjukkan struktur komunitas bakteri relatif sama antara rhizosfer Kopi Arabika dan Robusta.

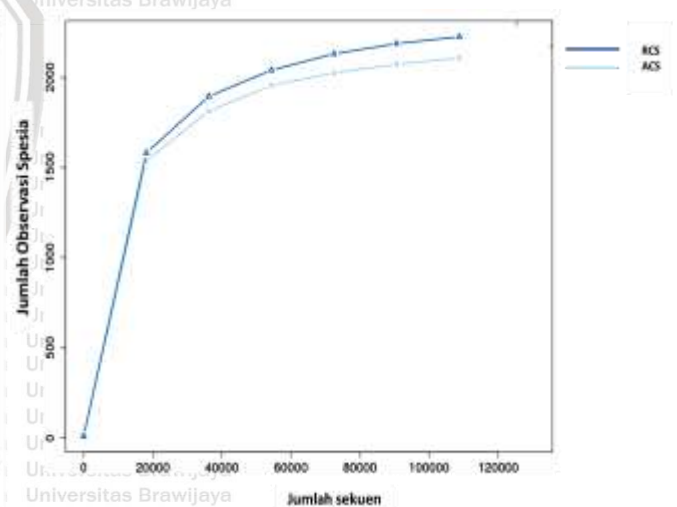
Tabel 6. Struktur komunitas dan diversitas bakteri rhizosfer Kopi Arabika dan Robusta

Jenis kopi	OTU	Chao1	ACE	Shannon-Wiener	Simpson
Robusta	2107	2.177.073	2.170.569	8,692	0,990
Arabika	2225	2.282.249	2.305.395	8,964	0,995

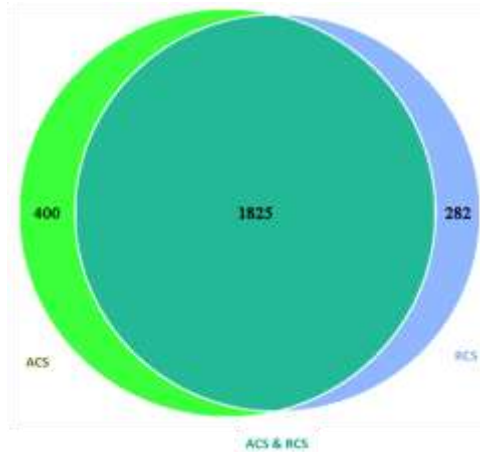
Keterangan: kekayaan dan diveristas komunitas bakteri dianalisis berdasarkan tingkat kesamaan 97 % sekuen 16S rDNA, dengan Chao1 richness estimator: jumlah total OTU dari setiap sampel. Jumlah tertinggi mengindikasikan kekayaan spesies yang tinggi. Indeks Shannon dan Simpson menunjukkan diveristas spesies bedasarkan kekayaan spesies dan kelimpahan relatif spesies, nilai yang tinggi menunjukkan diveristasnya tinggi.



(a)



(b)



(c)

Gambar 18. Profil komunitas bakteri rhizosfer Kopi Arabika (ACS) dan Robusta (RCS) Kurva kelimpahan relatif spesies bakteri (a), kurva jumlah spesies yang diamati (b), jumlah spesies pada masing-masing jenis tanaman kopi (c)

Berdasarkan kurva *rarefaction* (Gambar 18a) kelimpahan relatif spesies bakteri antara tanah rhizosfer Kopi Arabika (ACS) dan Kopi Robusta (RCS) relatif tidak berbeda pada rank spesies 1000. Pada rentang spesies 1000-2300 kelimpahan relatif spesies mulai berbeda, rank spesies tanah rhizosfer Kopi Arabika (ACS) dan Kopi Robusta sebanyak 2225 OTU. Hal ini juga didukung dengan nilai kekayaan spesies, jumlah spesies yang dapat diamati pada kedua jenis rhizosfer tersebut sebanyak 1500 spesies berdasarkan 20.000 sekuen 16S rDNA yang dianalisis (Gambar 18b). Namun demikian jumlah spesies bakteri pada tanah rhizosfer Kopi Robusta (RCS) lebih banyak dibandingkan rhizosfer Kopi arabika (ACS). Berdasarkan jumlah OTU menunjukkan adanya spesies bakteri yang berbeda pada kedua jenis rhizosfer Kopi Arabika dan Kopi Robusta, tetapi diduga juga terdapat spesies yang sama pada kedua jenis rhizosfer tersebut. Berdasarkan analisis diagram *venn-flower* (Gambar 18c) menunjukkan 400 spesies yang hanya ada di rhizosfer Kopi Arabika (ACS), sedangkan 282 spesies hanya terdapat di rhizosfer Kopi Robusta (RCS). Spesies bakteri yang sama dan ditemukan pada tanah rhizosfer kedua jenis tanaman kopi tersebut sebanyak 1825.

4.4 Potensi PGPR Rhizosfer Tanaman Kopi UB Forest

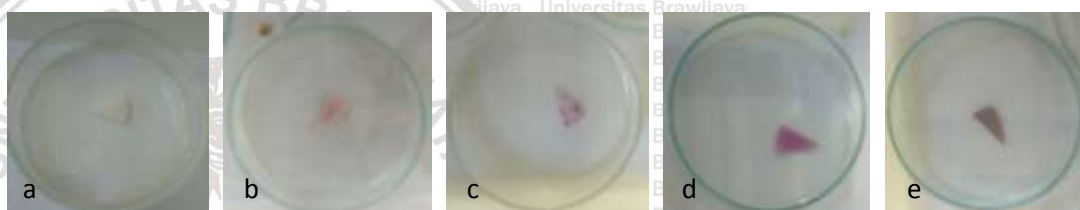
4.4.1 Potensi bakteri penghasil IAA

Isolat bakteri penghasil IAA di tanah rhizosfer Kopi Arabika dan Kopi Robusta secara berurutan berjumlah 33 isolat dan 12 isolat. Berdasarkan hasil penelitian secara kualitatif menunjukkan bahwa isolat S1.6.3.2 bakteri dari rhizosfer Kopi Robusta memiliki nilai tertinggi 4 sedangkan isolat W2.4.4.1, W2.4.4.2, W1.5.2, dan W2.4.3.1

memiliki rata-rata nilai tertinggi 1,67 sebagai penghasil IAA (Gambar 19). Isolat-isolat W1.3.4, W1.3.3, W1.4.5.3, W1.4.1, W3.3.3, W2.2.2, dan W1.4.5.2. secara kualitatif tidak menunjukkan potensi memproduksi hormon IAA, sehingga perlu diuji potensinya secara kuantitatif. Isolat yang menunjukkan warna merah muda pada membran nutriselulosa saat direaksikan dengan Reagen Salkowski mengindikasikan potensinya memproduksi hormon IAA. Terjadinya warna merah muda pada membran nitroselulosa karena adanya interaksi antara IAA dan Fe yang terdapat dalam Reagen Salkowski membentuk senyawa kompleks $[Fe_2(OH)_2(IA)_4]$ (Kovacs, 2009).

Tabel 7. Potensi kualitatif bakteri rhizosfer tanaman kopi penghasil IAA

Jenis Kopi	Isolat	Skor IAA	Isolat	Skor IAA	Isolat	Skor IAA
Robusta	S1 4.3	2,67	S1 4	1,33	S2 3.4	3,33
	S2 2.2	2,00	S3 4.2	0,67	S1 6.2	0,67
	S2 2.3	2,00	S1 6.1	2,67	S1 6.3.1	2,67
	S1 4.1	1,67	S1.1	0,67	S1 6.3.2	4,00
	Arabika	W1 6.2	0,33	W3 3.4	0,33	W2 4.4.2
W2 2.3		0,67	W1 4.3	0,33	W2 3.4.1	0,33
W1 3.4		0	W1 4.5.1	0,67	W1 5.2	1,67
W2 4.3.2		1,33	W3 3.2	0,33	W3 4.2	0,67
W2 3.1		0,33	W2 4.2	1,33	W1 4.1	0
W3 3.1		0,33	W1 4.6	1	W3 3.3	0
W3 4.3		0,67	W2 3.2	0,67	W2 4.3.1	1,67
W1 3.3		0	W2 6.2	1,33	W3 4.1	1
W1 4.5.3		0	W2 6.1.1	0,33	W2 2.2	0
W2 2.1		0,67	W1 3.1.2	1,33	W1 4.5.2	0
W2 6.1		0,33	W2 4.4.1	1,67	W1 4.2	0,67



Gambar 19. Skoring warna pada membran nutriselulosa yang ditetaskan Reagen Salkowski (a) putih skor 0-0,99 (b) pink muda 1,0-1,9 (c) pink tua 2 (d) merah sedang 2,1-3,0 dan (e) merah 3,1-4,0

Semua isolat bakteri penghasil IAA kemudian diuji secara kuantitatif dalam memproduksi hormon IAA pada media *Tryptic Soy Broth* yang mengandung 200 µg/mL tritofan. Hasil analisis menunjukkan ada perbedaan signifikan ($p < 0,05$) potensi antarisolat dalam memproduksi hormon IAA (Gambar 20). Isolat-isolat bakteri rhizosfer Kopi Arabika dan Robusta secara berurutan mampu memproduksi IAA rata-rata antara 11,13-88,12 µg/mL dan 13,94-104,46 µg/mL. Isolat W2.4.4.1 yang memiliki nilai tertinggi pada uji kualitatif juga memiliki potensi tertinggi memproduksi hormon IAA 88,12 µg/mL sedangkan isolat W1.4.5.3 dari rhizosfer Kopi Arabika skor warna nol juga memiliki

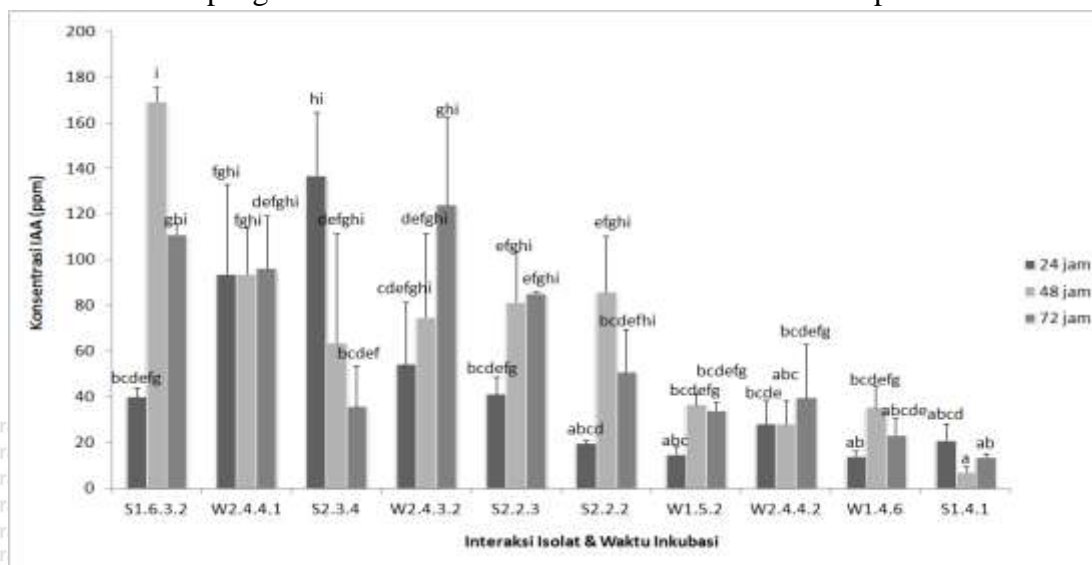
potensi terendah dalam produksi hormon IAA. Berdasarkan penelitian Muleta dkk. (2013) produksi IAA tertinggi 57,08 µg/mL dihasilkan oleh bakteri rhizosfer dari tanah Kopi Arabika di Hutan Ethiopia. Hal ini menunjukkan bahwa hormon IAA yang dihasilkan oleh bakteri rhizosfer Kopi Arabika di UB Forest 31,04 µg/mL lebih tinggi daripada isolat dari hutan Ethiopia. Selain isolat W1.4.5.3, enam isolat bakteri penghasil IAA lainnya dengan skor 0 pada uji kualitatif, yaitu W1.3.3, W2.2.2, W1.4.5.2, W1.4.1, W3.3.3, dan W1.3.4 secara berurutan mampu memproduksi hormon IAA 15,65 µg/mL, 31,30 µg/mL, 15,14 µg/mL, 65,16 µg/mL, 25,52 µg/mL, dan 48,87 µg/mL.

Isolat S1.4.1 bakteri rhizosfer Kopi Robusta memiliki potensi paling rendah 13,94 µg/mL dalam memproduksi IAA. Isolat-isolat bakteri S3.4.2, S1.1, dan S1.6.2 pada uji kualitatif dengan skor terendah 0,67 dapat memproduksi hormon IAA rata-rata cukup tinggi secara berurutan 41,72 µg/mL, 68,38 µg/mL, dan 63,23 µg/mL; sedangkan isolat S1.6.3.2 dengan skor tertinggi 4 juga memiliki potensi paling tinggi menghasilkan hormon IAA rata-rata 104,46 µg/mL. Oleh karena deteksi hormon IAA secara kualitatif pada membran nitroselulosa dan Reagen Salkowski kurang akurat, maka perlu dilakukan uji kuantitatif.

Dalam penelitian ini, 78 % isolat rhizosfer tanaman Kopi Arabika dan 100 % isolat rhizosfer Kopi Robusta mampu memproduksi hormon IAA. Hal ini sesuai dengan penelitian Khalid dkk. (2004) yang menyebutkan bahwa sekitar 80 % isolat-isolat bakteri rhizosfer mampu memproduksi hormon IAA. Produksi IAA akan meningkat pada saat kondisi pertumbuhan menurun, ketersediaan karbon yang terbatas dan terjadi dalam kondisi lingkungan dengan pH asam (Ona dkk., 2005).

Kemampuan bakteri dalam menghasilkan hormon IAA (Gambar 20) dipengaruhi oleh interaksi faktor perbedaan isolat dan waktu inkubasi ($p < 0,05$). Hasil penelitian menunjukkan isolat W2.4.4.1 pada inkubasi 24 dan 48 jam menghasilkan hormon IAA tertinggi masing-masing sebesar 93,66 µg/mL dan 93,7 µg/mL ($p < 0,05$) dan pada waktu 72 jam meningkat menjadi 96,04 µg/mL ($p < 0,05$), sedangkan pada inkubasi 72 jam isolat W2.4.3.2 mampu memproduksi IAA tertinggi 120 µg/mL (Gambar 20). Dalam penelitian ini, bakteri potensial ditentukan berdasarkan potensinya menghasilkan IAA tertinggi dalam waktu yang cepat dan produksinya stabil. Bakteri penghasil IAA yang memenuhi kriteria tersebut yaitu isolat W2.4.4.1. Penelitian sebelumnya, *Erwinia* sp. bakteri rhizosfer Kopi Arabika di Ethiopia dapat memproduksi hormon IAA tertinggi 57,08 µg/mL sedangkan *Bacillus subtilis* tidak dapat memproduksi IAA dengan baik (Muleta dkk., 2009). Rhizobakteria yang berasosiasi dengan tanaman Kopi Arabika secara

universal didominasi oleh bakteri Gram negatif (Vega dkk., 2005). Pada penelitian ini isolat-isolat bakteri penghasil IAA isolat W2.4.4.1 adalah bakteri Gram positif.



Gambar 20. Konsentrasi hormon IAA yang diproduksi oleh bakteri rhizosfer Kopi Arabika dan Robusta pada variasi waktu inkubasi. Notasi yang berbeda di atas histogram menunjukkan berbeda nyata antarisolat dan antarwaktu inkubasi ($p < 0,05$)

Isolat bakteri rhizosfer Kopi Robusta pada inkubasi 24 jam, konsentrasi IAA tertinggi 136,74 $\mu\text{g/mL}$ diproduksi oleh isolat S2.3.4, sedangkan pada inkubasi 48 dan 72 jam konsentrasinya menurun hingga mencapai 35,75 $\mu\text{g/mL}$. Konsentrasi tertinggi kedua hormon IAA pada inkubasi 24 jam dihasilkan isolat S1.6.3.2 dan S2.2.3, tetapi pada inkubasi 48 dan 72 jam konsentrasi tertinggi diproduksi oleh isolat S1.6.3.2, sedangkan konsentrasi hormon IAA yang diproduksi isolat S2.2.3 mengalami penurunan pada inkubasi 48 dan 72 jam. Isolat S1.6.3.2 dipilih sebagai bakteri penghasil IAA potensial dari rhizosfer Kopi Robusta, karena memproduksi hormon IAA maksimal pada inkubasi 48 jam. Menurut penelitian Tallapragada dkk. (2015) dan Hanh dkk. (2017), IAA disintesis pada fase stasioner sebagai metabolit sekunder secara optimal setelah 24 jam dan setelah 48 jam produksi IAA akan menurun. Bakteri penghasil IAA dari rhizosfer memiliki kemampuan untuk mensintesis dan memproduksi IAA sebagai metabolit sekunder karena memiliki asupan nutrisi yang banyak (Widowati dkk., 2018; Patel dkk., 2020). Selain itu, kondisi tanah yang asam menurut Sukmadewi (2015) dapat memicu bakteri memproduksi IAA dengan konsentrasi tinggi. Hal ini sesuai dengan kondisi tanah rhizosfer Kopi Arabika dan Robusta di UB Forest yang asam.

Indole-3-Acetic-Acid (IAA) merupakan fitohormon penting yang diproduksi oleh strain PGPR. Rhizobakteria yang dikultur secara *invitro* dapat menghasilkan IAA yang

mampu meningkatkan pertumbuhan akar sehingga membantu penyerapan nutrisi lebih baik dan mampu memicu pertumbuhan tanaman (Joshi dkk., 2019). Sekitar 80 % bakteri rhizosfer memproduksi IAA yang membantu tanaman menghasilkan akar tanaman yang lebih panjang serta jumlah rambut akar dan akar lateral lebih banyak yang membantu penyerapan nutrisi. Selain itu, hormon IAA merangsang pemanjangan sel dengan memodifikasi kondisi seperti peningkatan tekanan osmosis dalam sel, peningkatan permeabilitas air dalam sel, penurunan tekanan dinding sel, meningkatkan sintesis dinding sel, dan induksi sintesis protein (Mohite, 2013).

4.4.2 Potensi bakteri pelarut fosfat

Isolat bakteri pelarut fosfat dari rhizosfer Kopi Arabika dan Robusta yang berhasil diisolasi secara berurutan 21 isolat dan 26 isolat. Secara kualitatif (Tabel 8) isolat-isolat bakteri yang mampu melarutkan fosfat (ditunjukkan zona bening) pada media Pikovskaya Agar untuk rhizosfer Kopi Robusta 2 isolat dan 7 isolat untuk Kopi Arabika atau hanya 18,75 % isolat yang potensial. Hal ini berbeda dengan penelitian Muleta dkk. (2013) yang menyebutkan 72 % bakteri rhizosfer Kopi Arabika mampu melarutkan fosfat. Terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri pada media Pikovskaya Agar membuktikan isolat bakteri tersebut menghasilkan enzim fosfatase untuk melepaskan ikatan fosfat dan kalsium dalam media yang digunakan bagi pertumbuhan bakteri (Appanna, 2002; Aarab dkk., 2015). Pelepasan fosfat berkaitan dengan terbentuknya asam amino oleh bakteri untuk melarutkan fosfat dalam tanah sehingga fosfat terlepas dengan membentuk ion H_2PO_4^- dan HPO_4^{2-} yang dapat diserap oleh tanaman. Asam amino tersebut dapat menurunkan pH dan memecah ikatan beberapa bentuk senyawa fosfat sehingga meningkatkan ketersediaan fosfat bagi tanaman (Israwan dkk., 2015).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tanah rhizosfer Kopi Arabika memiliki lebih banyak isolat bakteri pelarut fosfat dibandingkan Kopi Robusta tetapi densitasnya lebih sedikit. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah yang sedikit isolat bakteri pelarut fosfat pada rhizosfer Kopi Robusta disebabkan bahan organik yang sedikit (Tabel 3).

Sembilan isolat bakteri yang membentuk zona bening kemudian diuji secara kuantitatif dalam melarutkan fosfat pada media Pikovskaya cair yang mengandung 0,5 % trikalsium fosfat (TCP). Isolat bakteri rhizosfer Kopi Arabika mampu melarutkan fosfat rata-rata sebanyak 3,2-4,5 $\mu\text{g/mL}$ lebih banyak dibandingkan isolat dari rhizosfer Kopi Robusta yaitu 1,7-2,3 $\mu\text{g/mL}$. Isolat W3.5 dari rhizosfer Kopi Arabika dan S131 dari Kopi Robusta memiliki kemampuan tertinggi melarutkan fosfat (Gambar 21), tetapi

potensinya lebih rendah dibandingkat isolat bakteri yang ditemukan Muleta dkk. (2013) yang mampu melarutkan fosfat sebesar 43,18 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini diduga dipengaruhi oleh kandungan fosfat yang rendah pada tanah rhizosfer kedua jenis tanaman kopi di UB *Forest*. Fosfat berperan penting dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman tetapi jumlahnya yang terlarut sangat rendah (Richardson & Simpson, 2011). Fosfat terlarut tidak dapat diserap dengan cepat di tanah dan menjadi tidak dapat dimanfaatkan oleh tanaman, proses fiksasinya bergantung pada pH dan jenis tanah. Oleh sebab itu, pada tanah yang cenderung basa, fosfor diendapkan oleh kalsium. Bakteri rhizosfer dapat menyediakan fosfat terlarut di tanah sehingga fosfat dapat dimanfaatkan oleh tumbuhan (Muhammad dkk., 2018).

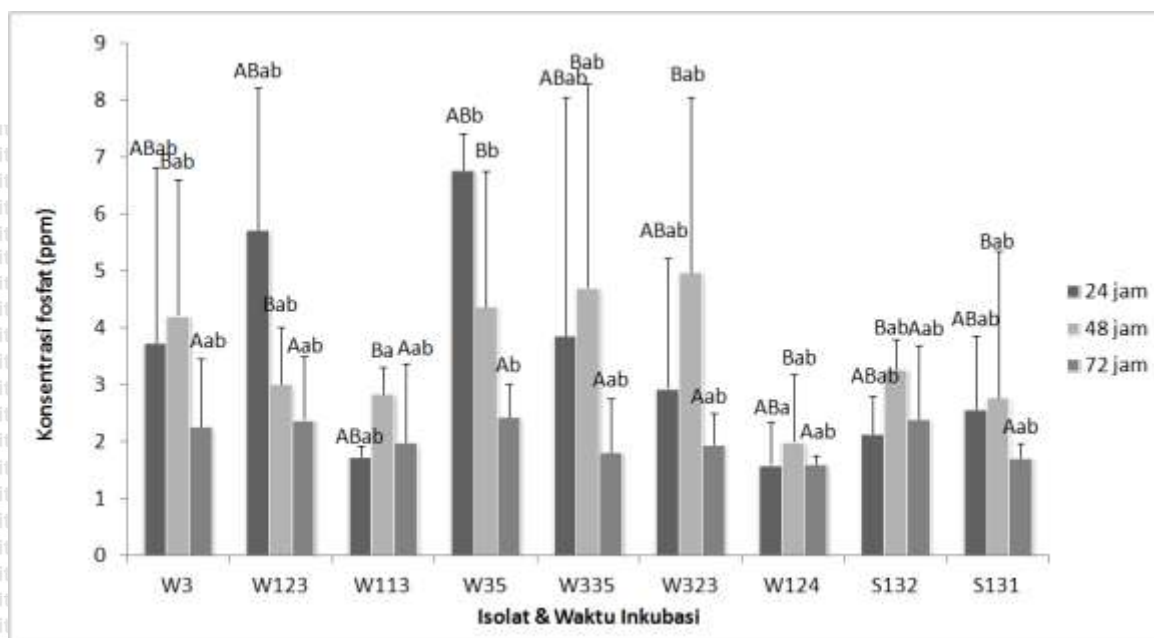
Tabel 8. Potensi kualitatif bakteri rhizosfer tanaman kopi sebagai pelarut fosfat

Jenis kopi	Isolat	Zona bening	Isolat	Zona bening	Isolat	Zona bening	
Robusta	S1.3.1	+	S2.4.2	-	S3.3.1	-	
	S1.3.2	+	S3.5.1	-	S1.4.1	-	
	S2.2.2	-	S3.2.3	-	S2.4.1	-	
	S2.5.1	-	S2.3.2.3	-	S3.3	-	
	S1.3.3.1	-	S2.3.2.1	-	S3.2.1	-	
	S1.2.2	-	S2.3.2.4	-	S3.3.3.2	-	
	S1.2.1	-	S2.3.1	-	S3.5.2	-	
	S1.2.3	-	S2.3.2.2	-	S2.2.3	-	
	Arabika	W1.2.4	+	W3.3.5	+	W1.2.3	+
		W3	+	W3.2.3	+	W1.1.3	+
W3.5		+	W2.5.1	-	W3.2.2	-	
W1.1.1		-	W2.3.2	-	W3.3.1	-	
W1.1.2		-	W2.3.1	-	W3.3.2	-	
W1.2.2		-	W2.4.1	-	W3.3.3	-	
W2.2.2		-	W3.3.4	-	W3.4.1	-	

Keterangan: + membentuk, - tidak membentuk zona bening

Kemampuan bakteri dalam melarutkan fosfat dipengaruhi oleh interaksi faktor perbedaan isolat dan waktu inkubasi ($p < 0,05$) pada rhizosfer Kopi Robusta sedangkan pada rhizosfer Kopi Arabika potensinya dipengaruhi interaksi antarisolat dan waktu inkubasi ($p > 0,05$). Hasil penelitian menunjukkan isolat W3.5 pada inkubasi 24 menghasilkan konsentrasi fosfat terlarut paling tinggi mendekati 7 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$) meskipun pada inkubasi 48 dan 72 jam konsentrasinya menurun. Hampir semua isolat menunjukkan penurunan konsentrasi fosfat setelah inkubasi 48 jam karena digunakan untuk pertumbuhan bakteri. Isolat bakteri S131 dari rhizosfer Kopi Robusta menghasilkan konsentrasi fosfat tertinggi pada inkubasi 24 jam dan meningkat konsentrasinya pada inkubasi 48 jam kemudian turun pada 72 jam. Berdasarkan hasil penelitian, isolat W3.5 (Arabika) dan S1.3.1 (Robusta) dipilih berdasarkan kemampuannya melarutkan fosfat

paling cepat dengan konsentrasi tertinggi. Penelitian Muleta (2007) menunjukkan 72 % rhizobakteri Gram positif dan Gram negatif yang berasosiasi dengan tanaman Kopi Arabika mampu melarutkan fosfat. Keasaman tanah bukanlah satu-satunya mekanisme pelarutan fosfat, karena pada bakteri tertentu menghasilkan enzim fosfatase untuk melarutkan fosfat, yang tidak berkorelasi dengan penurunan pH. Sebagai contoh fragmen DNA dari *Enterobacter agglomerans* yang disisipkan pada *E.coli* JM109 menunjukkan aktivitas pelarutan fosfat meskipun pH medium tidak berubah.



Gambar 21. Konsentrasi fosfat terlarut yang dihasilkan bakteri rhizosfer Kopi Arabika dan Robusta pada variasi waktu inkubasi

Keterangan: Huruf kecil untuk isolat yang berbeda pada waktu yang sama
Huruf besar untuk isolat yang sama pada waktu yang berbeda

Pandey dkk. (2006) menemukan bakteri sub-alpin di Pegunungan Himalaya India membentuk zona bening pada Medium Pikovskaya agar setelah 12 hari. Bakteri tersebut melarutkan fosfat dengan konsentrasi sebesar 247 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pada inkubasi 15 hari kemudian konsentrasinya menurun setelah 16 hari sampai 30 hari. Pada penelitian ini bakteri rhizosfer Kopi Arabika dan Robusta hanya mampu melarutkan fosfat maksimal sebesar 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dalam inkubasi 24 jam. Rendahnya potensi bakteri tersebut kemungkinan selain karena faktor ketersediaan fosfat yang rendah, diduga juga karena jenis bakteri yang berbeda. Jenis tanah rhizosfer dari kedua jenis tanaman kopi merupakan tanah andisol yang cenderung memiliki ketersediaan fosfor yang rendah meskipun didukung pemberian pupuk fosfor secara intensif. Penelitian Fitriatin dkk. (2018) menunjukkan tanah andisol rhizosfer tanaman teh memiliki konsentrasi fosfor terlarut 0,997 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

4.4.3 Potensi bakteri penambat nitrogen

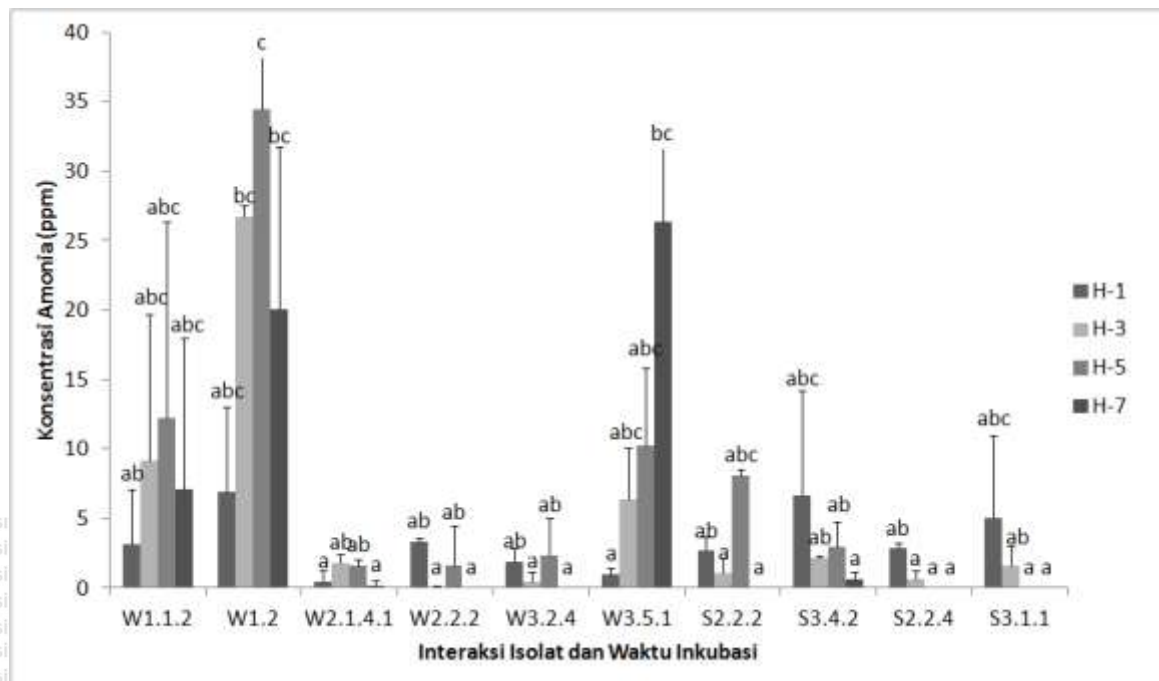
Hasil isolasi bakteri penambat nitrogen dari tanah rhizosfer Kopi Arabika dan Robusta diperoleh 21 isolat (11 isolat dari rhizosfer Kopi Arabika dan 10 isolat dari Kopi Robusta). Hasil uji potensi fiksasi N₂ secara semikuantitatif menggunakan Sera *Test Kit* disajikan pada tabel 9. Dari total 21 isolat bakteri penambat nitrogen, terdapat 13 isolat yang dapat memproduksi amonia dengan konsentrasi antara 0,1- >1 mg/L yang terdiri dari empat isolat rhizosfer Kopi Robusta dan sembilan isolat rhizosfer Kopi Arabika. Isolat dengan konsentrasi amonia tersebut diuji lebih lanjut secara kuantitatif menggunakan metode Nesslerisasi. Rata-rata konsentrasi amonia yang diproduksi setiap isolat menunjukkan hasil yang bervariasi. Secara keseluruhan, isolat bakteri dari rhizosfer Kopi Arabika rata-rata mampu memproduksi amonia dengan konsentrasi 0,11-21,54 µg/mL lebih tinggi dibandingkan konsentrasi amonia yang dihasilkan bakteri rhizosfer Kopi Robusta yaitu 0,9-2,07 µg/mL. Isolat W1.2 dan S3.4.2 dari masing-masing rhizosfer Kopi Arabika dan Robusta potensinya paling tinggi memfiksasi N₂.

Tabel 9. Potensi semikuantitatif fiksasi nitrogen bakteri rhizosfer tanaman kopi

Jenis Kopi	Isolat	Produksi Amonia	Isolat	Produksi Amonia	Isolat	Produksi Amonia
Robusta	S3.4.2	++++	S2.2.4	++++	S2.5.1	+
	S2.2.3	+	S2.2.2	+++	S3.4.3	+
	S2.1.5.1	+	S3.1.1	+++	S3.4.1	+
Arabika	W1.1.2	++	W3.4.2	++	W2.2.2	++
	W1.2	++++	W3.5.1	+++	W.3.1	+
	W2.1.4.1	++	W3.2.2	++	W3.1.1	+
	W2.1.5.2	+++	W3.2.1	++		

Keterangan: ++++ = >1 mg/L warna hijau gelap, +++ = 0,5 – 1 mg/L warna hijau, ++ = 0,1 – 0,4 mg/L warna hijau muda, + = < 0,1 mg/L warna kuning; akumulasi amonia dalam kultur.

Konsentrasi ammonia hasil fiksasi masing-masing isolat bakteri pemfiksasi N₂ dipengaruhi interaksi perbedaan jenis isolat dan waktu inkubasi ($p < 0,05$). Konsentrasi amonia tertinggi 34,48 µg/mL diproduksi oleh isolat W1.2 dari rhizosfer Kopi Arabika pada inkubasi lima hari. Isolat ini mampu memproduksi amonia hingga inkubasi tujuh hari meskipun konsentrasinya menurun menjadi 20 µg/mL karena digunakan untuk pertumbuhannya. Konsentrasi amonia yang dihasilkan oleh isolat S3.4.2 bakteri rhizosfer Kopi Robusta pada inkubasi hari pertama dan ketiga masing-masing 6,68 dan 2,0 µg/mL dan meningkat menjadi 2,9 µg/mL pada inkubasi lima hari (Gambar 22). Berdasarkan hasil penelitian, diketahui bahwa hampir semua isolat mengalami penurunan konsentrasi amonia pada inkubasi lima dan tujuh hari, kecuali isolat W3.5.1 yang memproduksi amonia dengan konsentrasi meningkat sampai inkubasi tujuh hari.



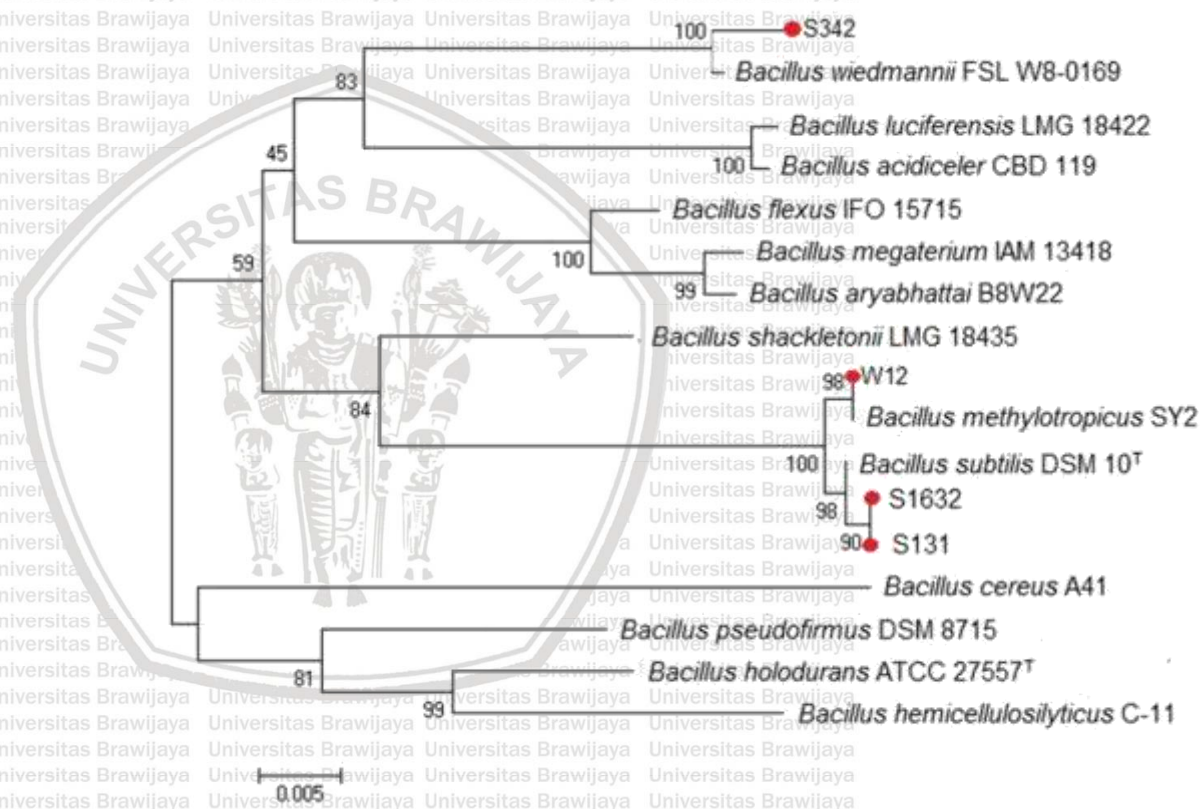
Gambar 22. Konsentrasi amonia dihasilkan bakteri rhizosfer Kopi Arabika dan Robusta pada variasi waktu inkubasi. Notasi yang berbeda di atas histogram menunjukkan berbeda nyata antarisolat dan antarwaktu inkubasi ($p < 0,05$)

Perbedaan konsentrasi amonia tersebut kemungkinan disebabkan oleh kondisi fisik, kimia, dan biologi tanah. Ketersediaan C-organik rhizosfer tanaman kopi memengaruhi jumlah nitrogen yang difiksasi dan ammonia yang dihasilkan. Jumlah C-organik tinggi yang berasal dari serasah kopi, pinus, dan tanaman gulma di area UB Forest menjadi bahan utama dalam proses dekomposisi serasah. Kondisi karbon tersebut memacu pertumbuhan dan perkembangan populasi bakteri penambat nitrogen. Hal ini dapat mendeskripsikan bahwa setiap lokasi memengaruhi kemampuan bakteri dalam menambat nitrogen. Bakteri penambat nitrogen mengkonversi N_2 di udara menjadi amonia menggunakan enzim nitrogenase. Hasil penelitian ini menunjukkan isolat rhizosfer Kopi Arabika cenderung memiliki kemampuan lebih tinggi memfiksasi N_2 dibandingkan isolat bakteri rhizosfer Kopi Robusta. Isolat penambat nitrogen dari kedua jenis rhizosfer tanaman kopi ini merupakan bakteri non simbiosis, yang tumbuh bebas di alam. Berdasarkan kemampuan produksi amonia dengan kriteria stabil dan tertinggi, maka isolat W1.2 (Arabika) dan S3.4.2 (Robusta) terpilih untuk diidentifikasi.

4.5 Spesies Bakteri PGPR Tanaman Kopi dari UB Forest

Hasil identifikasi filogenetik berdasarkan similaritas sekuen 16S rDNA, isolat S1.6.3.2 dan S1.3.1 diidentifikasi sebagai *Bacillus substillis* DSM 10^T, isolat S3.4.2

sebagai *Bacillus wiedmannii* FSL W8-0169, isolat W1.2 sebagai *Bacillus methylotropicus* SY2 (Gambar 23), isolat W3.5 merupakan *Pseudomonas putida* S18 (Gambar 24), dan isolat W2.4.4.1 diduga sebagai strain baru *Bacillus* sp. W2441 (Gambar 25). Isolat S1.6.3.2 merupakan bakteri penghasil IAA dan S1.3.1 sebagai pelarut fosfat. Hasil analisis sekuen 16S rDNA menunjukkan kekerabatan kedua isolat tersebut terhadap *Bacillus substilis* DSM 10^T sebesar 99,9 %. Berdasarkan penelitian Swain dkk. (2007) *Bacillus substilis* merupakan bakteri kandidat PGPR yang memproduksi IAA dipengaruhi oleh konsentrasi L-triptofan. Selain itu, penelitian Yousef (2018) juga melaporkan *Bacillus subtilis* rhizosfer tanaman gandum dapat memproduksi IAA 25,5 mg/L dan mampu menstimulasi germinasi serta perkecambahan tanaman, sedangkan Meena-Violante Forest & Olalde (2007) menunjukkan spesies bakteri tersebut mampu mendukung pertumbuhan tanaman tomat. Berdasarkan morfologi koloni dan sel, isolat bakteri S1.6.3.2 dan S1.3.1 memiliki beberapa karakteristik yang sama yaitu bentuk koloni tidak teratur, permukaan elevasi koloni datar, permukaan tekstur berkontur, ciri optik pudar, sel berbentuk basil dan Gram positif.

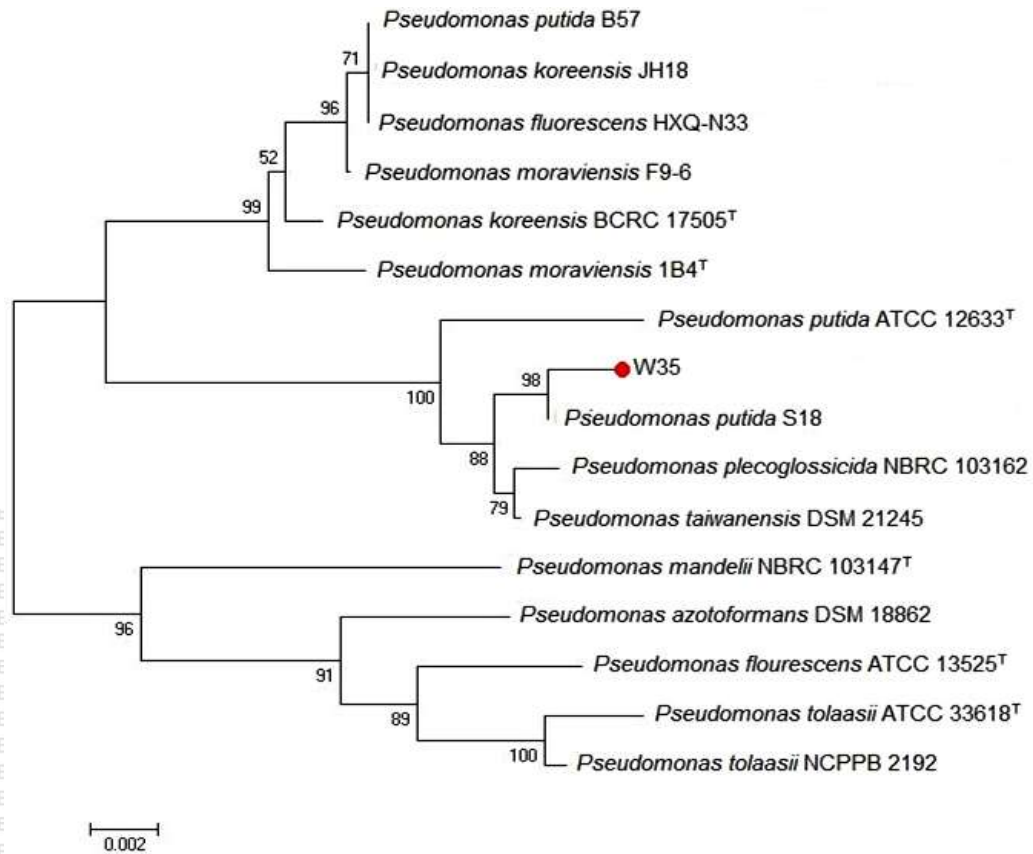


Gambar 23. Pohon filogeni *Bacillus subtilis* isolat S16.3.2 dan S1.3.1, *Bacillus methylotropicus* isolat W1.2 dan *Bacillus wiedmannii* isolat S3.4.2 serta isolat-isolat acuan berdasarkan kemiripan sekuen 16S rDNA menurut metode *Maximum-Likelihood* dengan algoritma Tamura-Nei dan bootstrap 1000 kali

Pohon filogeni menunjukkan isolat S3.4.2 memiliki similaritas sekuen 16S rDNA 99,4 % identik dengan *Bacillus wiedmannii* FSLW8-0169. Penelitian Osman & Yin (2018) menemukan *Bacillus wiedmannii* FSL W8-0169 rhizosfer bawang merah dan kentang mampu memproduksi IAA, menambat nitrogen, dan melarutkan fosfat serta meningkatkan pertumbuhan tanaman. Bakteri ini memiliki bentuk koloni bulat, tepi koloni *erose*, permukaan elevasi menaik, permukaan tekstur berkontur, konsistensi permukaan lekit dan ciri optik pudar sedangkan selnya berbentuk basil dan Gram positif.

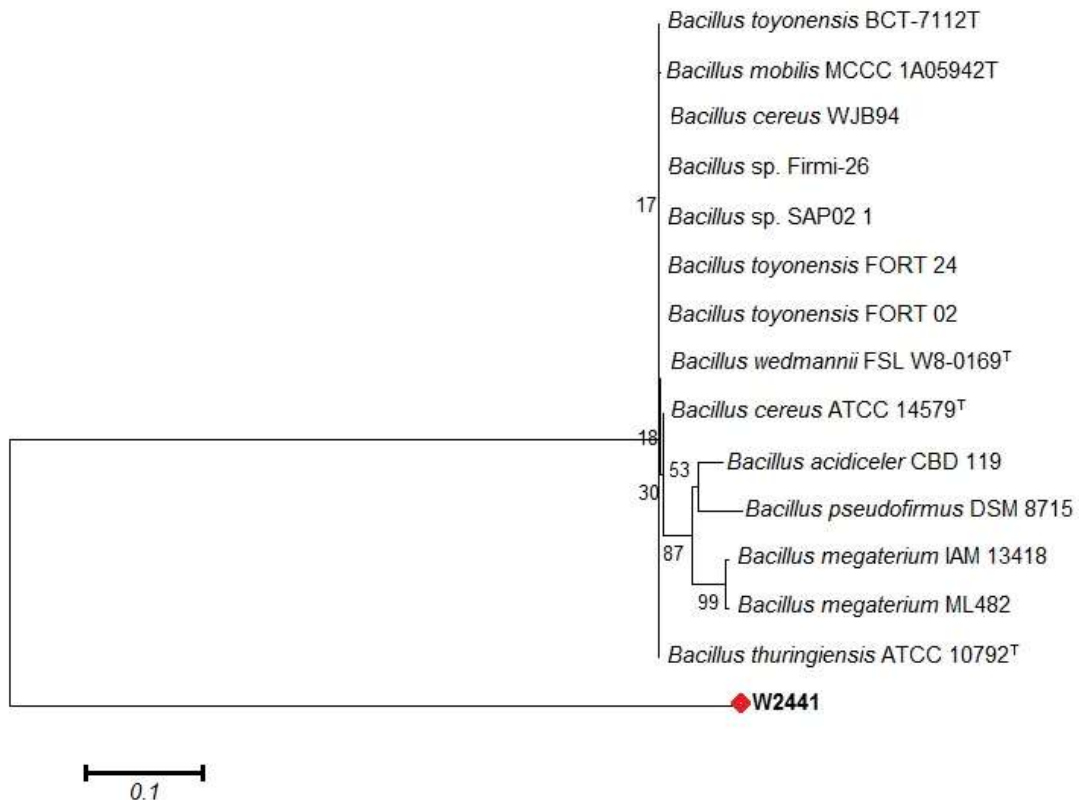
Isolat W1.2 sebagai bakteri penambat nitrogen memiliki similaritas sekuen 16S rDNA 100 % dengan *Bacillus methylophilus* SY2. Penelitian Mehta dkk. (2014) menemukan *Bacillus methylophilus* rhizosfer tanaman jagung meningkatkan pertumbuhan perakaran dan tunas, sedangkan Perez-Flores dkk. (2017) menunjukkan bakteri tersebut mampu memberikan ketersediaan hormon auksin pada tanaman *Arabidopsis thaliana*. Bakteri *B. methylophilus* SY2 mampu menambat nitrogen sedangkan *B. methylophilus* CKAM mampu melarutkan fosfat, dan strain NKG-1 dapat membantu persemaian tomat; sehingga dijadikan kandidat biofertilizer (Ge dkk., 2016). Morfologi sel bakteri isolat W1.2 berbentuk basil dan Gram positif, sedangkan koloni bulat, tepi koloni menyeluruh, elevasi permukaan cembung, lekit dan berwarna putih pudar. Permukaan koloni sangat lekit menandakan isolat W1.2 menghasilkan Eksopolisakarida (EPS) yang juga memiliki potensi sebagai agen biofertilizer. Produksi EPS ini mengandung ion-ion yang berperan sebagai pengikat mineral dan meningkatkan agregasi tanah.

Isolat W3.5 memiliki similaritas sekuen 16S rDNA 99,8 % dengan *Pseudomonas putida* S18 (Gambar 24). Penelitian Ahemad & Kibret (2014) menunjukkan *Pseudomonas putida* S18 mampu memproduksi IAA, siderofor, HCN, amonia, eksopolisakarida (EPS), dan sebagai pelarut fosfat. Selain itu aplikasi *Pseudomonas putida* sebagai PGPR mampu meningkatkan pertumbuhan sawi dan menghambat toksisitas fungisida di tanah (Ahemad dan Khan, 2011; Bharucha dkk., 2013). Koloni isolat W3.5 berbetuk tidak beraturan, tepi koloni menyeluruh, elevasi permukaan datar, permukaan tipis, warna putih pudar, sel berbentuk basil dan Gram positif.

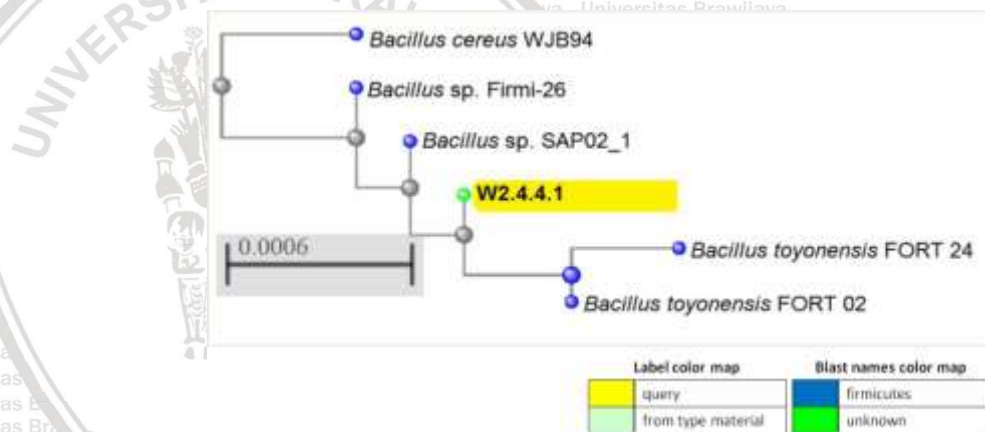


Gambar 24. Pohon filogeni *Pseudomonas putida* isolat W3.5 dan isolat-isolat acuan berdasarkan similitas sekuen 16S rDNA menurut metode *Maximum-Likelihood* dengan algoritma Tamura-Nei dan bootstrap 1000 kali

Berdasarkan hasil BLAST, isolat W2.4.4.1 memiliki similaritas sekuen 16S rDNA 98 % dengan *Bacillus toyonensis*, tetapi berdasarkan pohon filogeni isolat tersebut memiliki similaritas yang rendah dengan berbagai spesies anggota Genus *Bacillus* (Gambar 25) dengan nilai *distance* mencapai 1,2-1,3. Untuk mendeteksi kemiripan sekuen digunakan *Neighbour search tool* dari MOLE-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/moleblast/moleblast.cgi>). Menggunakan mesin pencarian ini dapat dideteksi secara otomatis evolusi sekuen DNA isolat W2.4.4.1. Sekuen 16S rDNA bakteri yang memiliki kemiripan atau yang jaraknya hampir mendekati sekuen W2.4.4.1 secara langsung teralign dan *output* yang diperoleh berupa tampilan pohon filogeni sederhana yang sekaligus menunjukkan status isolat W2.4.4.1 yang sekuennya belum diketahui (unknown). Metode MOLE-BLAST yang digunakan yaitu *Fast Minimum Evolution* berdasarkan *MUSCLE multiple alignment*.



Gambar 25. Pohon filogeni isolat W2.4.4.1 dan isolat-isolat acuan berdasarkan similitas sekuen 16S rDNA menurut metode *Maxium-Likehood* dengan algoritma Tamura-Nei dan bootstrap 1000 kali



Gambar 26. Pohon filogeni isolat W2.4.4.1 menurut metode *Fast Minimum Evolution* berdasarkan *MUSCLE multiple alignment computed for MOLE-BLAST*

Berdasarkan pohon filogeni yang dikonstruksi dengan Program MEGA dan MOLE-BLAST, isolat W2.4.4.1 memiliki similaritas sekuen 16S rDNA yang rendah dengan *Bacillus toyonensis* FORT 24 dan *Bacillus toyonensis* FORT 02. Menurut label warna filogenetik MOLE-BLAST, isolat W2.4.4.1 berada dalam kladogram Firmicutes

(biru). Dengan demikian, isolat W2.4.4.1 sebagai *Bacillus* sp. diduga sebagai strain baru dari rhizosfer tanaman Kopi Arabika yang mampu memproduksi hormon IAA.

Berdasarkan identifikasi 16S rDNA bakteri tanah dan identifikasi 16S rDNA sekuen isolat terpilih menunjukkan hasil yang berbeda pada level spesies. Isolat W2.4.4.1, S1.6.3.2, W1.2, S1.3.1, W3.5 dan S3.4.2 yang teridentifikasi sebagai *Bacillus subtilis*, *Bacillus methylotropicus*, *Bacillus wiedmanii* dan *Pseudomonas putida* tidak ditemukan dalam level spesies pada analisis metagenomik. Namun, pada level genus, *Pseudomonas* diketahui berada pada urutan ke 12 besar sedangkan *Bacillus* berada di bawah 20 besar berdasarkan data OTU dari kedua rhizosfer tanah kopi. Bila dipresentasikan pada level genus, kehadiran *Pseudomonas* di rhizosfer kopi Robusta dan Arabika masing-masing sebesar 2% dan 2,5%. Presentase kelimpahan *Bacillus* di rhizosfer kedua jenis kopi hanya 0,6% (kopi Robusta) dan 1,2% (kopi Arabika). Hal ini terjadi diduga karena metode isolasi bakteri dapat mengisolasi bakteri-bakteri yang tumbuh bebas di perakaran tanah sedangkan metode analisis metagenomik dapat menemukan informasi lebih detail jenis bakteri yang tidak mudah diisolasi secara langsung di laboratorium. Selain itu juga diduga karena perbedaan pada database sekuen DNA yang berbeda sehingga hasil informasi yang diperoleh juga berbeda. Penelitian ini, urutan nukleotida metagenomik berdasarkan pada *Green Gene Database* (DeSantis & Todd, 2006) sedangkan sekuen DNA isolat terpilih urutan nukleotidanya ditentukan berdasarkan *GenBank* (Oladunni dkk., 2016). Karena perbedaan database yang digunakan sehingga menimbulkan perbedaan yang signifikan.

Keterkaitan antara analisis 16S rDNA metagenomik bakteri tanah dan 16S rDNA isolat terpilih dapat membuktikan bahwa metode isolasi bakteri PGPR dengan menggunakan medium spesifik tidak menunjukkan hasil yang sama. Untuk memperoleh kandidat bakteri PGPR yang benar-benar potensial, informasi kelimpahan bakteri terbaik secara metagenomik juga dapat digunakan guna mendukung eksplorasi bakteri PGPR dari rhizosfer tanaman kopi di kawasan agroforestri UB Forest. Salah satu cara yang dapat digunakan yaitu mengisolasi dan menguji potensi bakteri *Bradhyrhizobium elkanii* menggunakan medium spesifik. Isolat-isolat yang diperoleh dapat dioptimasi kemampuannya untuk dapat dijadikan sebagai bakteri kandidat PGPR sebagai pendukung pertumbuhan tanaman kopi di UB Forest.

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Parameter lingkungan yang memengaruhi peningkatan densitas dan indeks diversitas bakteri kandidat PGPR dari rhizosfer tanaman kopi yaitu rasio C/N dan bahan organik yang tinggi. Faktor N-total, diameter pohon dan ketinggian tempat yang rendah, memicu peningkatan densitas bakteri kandidat PGPR. Akan tetapi jumlah P-tersedia yang minimal dapat menstimulasi peningkatan densitas bakteri penghasil IAA dan penambat nitrogen sedangkan pH tanah yang semakin meningkat menyebabkan densitas bakteri pelarut fosfat meningkat.
2. Struktur komunitas bakteri rhizosfer dari kopi Arabika dan Robusta yaitu secara berurutan Filum Proteobacteria (39% dan 49,27%), Kelas Alphaproteobacteria (30,1% dan 42,9%), Ordo Rhizobiales (26,8% dan 17,0%), Famili Xanthobacteraceae (12,5% dan 7,5%), Genus *Bradyrhizobium* (3,1% dan 6,1%) dan Spesies *Bradyrhizobium elkanii* (62,5% dan 75,0%) sedangkan indeks diversitas bakteri rhizosfer tanaman kopi Arabika dan Robusta masing-masing 0,99 dan 0,95 mengindikasikan diversitas bakteri yang tinggi.
3. Isolat potensial kandidat PGPR dari rhizosfer kopi Arabika yaitu W.2.4.41, W3.5 dan W1.2 masing-masing secara berurutan berpotensi menghasilkan IAA (88,12 µg/mL), melarutkan fosfat (4,5 µg/mL) dan memproduksi amonia (21,54 µg/mL) sedangkan isolat potensial kandidat PGPR dari rhizosfer kopi Robusta yaitu S1.6.3.2 menghasilkan IAA 104,6 µg/mL, S1.3.1 melarutkan fosfat 2,3 µg/mL dan S3.4.2 memproduksi amonia 2,07 µg/mL.
4. Isolat unggul bakteri rhizosfer tanaman kopi di UB Forest yang berpotensi sebagai kandidat PGPR yaitu S1.6.3.2 dan S1.3.1 teridentifikasi sebagai *Bacillus subtilis* DSM 10^T, W1.2 sebagai *Bacillus methylotropicus* SY2, S3.4.2 sebagai *Bacillus wiedmannii* FSL W8-0169, W3.5 sebagai *Pseudomonas putida* S18 dan W2.4.4.1 merupakan *Bacillus* sp. W2.4.4.1.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini, diberikan beberapa saran sebagai berikut:

1. Penelitian Lanjutan

- a. Mengisolasi dan menguji potensi *Bradirhizobium elkanii* menggunakan medim spesifik berdasarkan informasi spesies dominan yang melimpah dari rhizosfer tanah kopi berdasarkan analisis metagenomik bakteri tanah.
- b. Analisis sekuen DNA W2.4.4.1 lebih lanjut untuk mendeteksi filogeni kekerabatan isolat dan penamaan resmi sebagai strain baru di daftar NCBI.
- c. Analisis potensi konsorsium bakteri PGPR dibandingkan dengan potensi setiap bakteri PGPR dalam memproduksi IAA, amonia dan fosfat terlarut.

d. Analisis potensi konsorsium bakteri PGPR terhadap perbaikan kualitas tanah dan pertumbuhan tanaman kopi (biji, akar dan daun).

e. Formulasi biofertilizer dari isolat-isolat terpilih untuk meningkatkan kesuburan tanaman kopi

2. Pengelola dan Praktisi Petani Kopi

Pengelola dan praktisi petani kopi dapat memanfaatkan konsorsium bakteri PGPR sebagai biofertilizer yang diaplikasikan dengan membuat kompos (dalam bentuk padat) atau sebagai biofertilizer cair.

3. Pemerintah Pengambilan Kebijakan di Bidang Pertanian

Penelitian ini diharapkan pemerintah dapat mendukung pengembangan produksi biofertilizer bagi petani kopi dalam rangka mencegah penurunan kesuburan tanah dan peluang investasi dana bagi peneliti dan pengusaha biofertilizer dalam mewujudkan produk unggulan dalam negeri terbarukan di bidang pertanian khususnya dalam meningkatkan produktivitas tanaman kopi.

DAFTAR PUSTAKA

- Aarab, S., F.J Ollero, M. Megias, A. Laglaoui, M. Bakkali & A. Arakrak. 2015. Isolation and screening of bacteria from rhizospheric soils of rice fields in Northwestern Morocco for different plant growth promotion (PGP) activities: An in vitro study. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 4(1): 260-269
- Abdoellah, S. 2013. pengelolaan nutrisi tanaman terpadu di perkebunan Kopi. *Review Penelitian Kopi da Kakao.* 1(1): 24-39.
- Aeron, A., S. Kumar, P. Pandey, & D.K Maheshwari. 2011. **Emerging role of plant growth promoting rhizobacteria in agrobiologi. Bacteria in agrobiologi: crop ecosystems.** In D. K. Maheshwari (Ed). Springer. Berlin. Heidelberg. 1-36
- Ahemad, M & M. Kibret. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *J. King Saud Univ Sci.* 26:1–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>.
- Ahemad, M & M.S Khan. 2011. Effect of fungicides of plant growth promoting activities of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* isolated from mustard (*Brassica campestris*) rhizosphere. *Chemosphere.* 89(9): 945-950.
- Ahmad, F., I. Ahmad, & M.S. Khan. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research* 163:173-181.
- Amara, U., R. Khalid, & R. Hayat. 2015. **Soil bacteria and phytohormones for sustainable crop production. Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem.** In D. K. Maheshwari (Ed). Springer International. 87-103
- Amutha, R., S. Karunakaran, S. Dhanasekaran, K. Hemalatha, R. Monika, P. Shanmugapriya & T. Sornalatha. 2014. Isolation and mass production of biofertilizer (*Azotobacter* and *Phosphobacter*). *International Journal of Latest Research in Science and Technology* 3(1): 79-81.
- Amutha, K & K. J. Priya 2011 Effect of pH, temperature and metal ions on amylase activity from *Bacillus Subtilis* Kcx 006. *Int. J. Pharma and Bio Sci.* 2(2): 407-413.
- Antralina, M., D. Kania, J. Santoso. 2015. Pengaruh pupuk hayati terhadap kelimpahan bakteri penambat nitrogen dan pertumbuhan tanaman kina (*Cinchona legeriana* Moens) klon Cib.5. *Jurnal Penelitian Teh dan Kina.* 18(2): 177-185.
- Appanna, V. 2002. Efficacy of phosphate solubilizing bacteria isolated from vertisols on growth and yield parameter of sorghum. *Research Journal of Microbiology* 2(7): 550-559.
- Atlas, RM. 2010. **Handbook of Microbiological Media** 4th edn. CRC and ASM Press. Washington DC. USA.
- Azzahra, A.K., M. Yusuf & E. Arisoelaningsih. 2018. Characteristic of epiphytes host trees in protected area of UB Forest. *AIP Conference Proceedings.* <https://doi.org/10.1063/1.5061888>
- Bagtaraj, D.J., G. Thilagar, C. Ravisha, C.G. Kushalappa, K.N. Krishnamurthy. 2015. Below ground microbial diversity as influenced by coffee agroforest systems in the Western Ghats, India. *Agriculture, Ecosystems and Environment.* 202: 198-202

Balai Penelitian Tanah. 2005. **Analisis Kimia Tanah, Tanaman, Air dan Pupuk**. Balai Penelitian Tanah. Bogor.

Baldani, J.I., V.M. Reis, S.S. Videira, L.H. Boddey, & V.L.D. Baldani. 2014. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using n-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant Soil*. 384:413 – 431.

Baliyarsingh, B, S.K Nayak, B. B. Mishra. 2017. Soil microbial diversity: an ecophysiological study and role in plant productivity. **An Ebook: advances in soil microbiology: recent trends and future prospects volume 2 soil-microbe-plant interaction**. Springer Nature.Singapore.

Barriuso, J., B.R. Solano, J.A Lucas, A.P Lobo, A. Garcia-Villaraco & F.J. G. Manero. 2008. Ecology, genetic diversity and screening strategies of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). **A review: Plant-bacteria interactions, strategies and techniques to promote plant growth**. WILEY-VCH.

Bharucha, U., K. Patel & U.B Trivedi. 2013. Optimazation of indole acetic acid production by *Pseudomonas putida* and its effect as PGPR on mustard (*Brassica nigra*). *National Academy of Agricultural Sciences*. DOI 10.1007/s40003-013-0065-7

Blazka & Fischer. 2014. Moisture, water holding, drying and wetting in forest soils. *Journal of Soil Science*. 4: 174-184.

Bokulich & A. Nicholas. 2013. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from illuminaamplicon sequencing. *Nature Methods* 10.1: 57-59.

Bray, R.H., & L.T Kurtz. 1945. Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil Science*. 59: 39-45.

Bric, J. M.,R. M. Bostock, & S. E. Silverstone. 1991. Rapid in situ assay for indole acetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 535–538.

Burdman, S., E. Jurkevitch, Y. Okon., N.S Subba-Rao & Y.R Dommergues. 2000. Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture. *Microbial Interaction in Agriculture and Forestry*. 2: 229-250.

Caldwell, A.C., L.C.F Silva, C.C da Silva & C.C Ouverney. 2015. Prokaryotic diversity in the rhizosphere of organic, intensive, and transitional coffee farms in Brazil. *PLoS ONE*. 10 (6): 1-17.

Caporaso & J. Gregory. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7.5: 335-336.

Chauhan, A., P.P. Balgir & C.K. Shirkot. 2014. Characterization of *Aneurinibacillus aneurinilyticus* strain CKMV1 as a plant growth promoting rhizobacteria. *International Jornal of Agricultural Environmental and Biotechnology* 7: 37–45.

Chourasiya, D., M.P Sharma, H.S Maheswari, A.K Ramesh, S.K Sharma & T.K Adhya. 2017. Microbial Diversity and Soil Health in Tropical Agroecosystems. **An Ebook: Advances in Soil Microbiology. Recent Trends and Future Prospects Volume 2 Soil-Microbe-Plant Interaction**. Springer Nature. Singapore.

College of Food, Agultural and Natural Resource Sciences. 2019. Extractable phosphorus bray 1 method. *Soil Testing Laboratory*. Department of Soil, Water and Climate. University of Minnesota. <http://soiltest.cfans.umn.edu/extractable-phosphorus>

- Crovadore, J., G. Calmin, R. Chablais, B. Cochard, T. Schulz & F. Lefort. 2016. Whole-genome sequence of *Bradyrhizobium elkanii* strain UASWS1016, a potential symbiotic biofertilizer for agriculture. *American Society for Microbiology*. 4(5): 5-16.
- Dai, Z., W. Su, H. Chen, A. Barberán, H. Zhao & M. Yu. 2018. Longterm nitrogen fertilization decreases bacterial diversity and favors the growth of Actinobacteria and Proteobacteria in agro-ecosystems across the globe. *Glob. Change Biol.* 24: 3452–3461 doi: 10.1111/gcb.14163
- Damanu, T. 2008. Coffee production and marketing in Oromia Regional State. In: proceedings of a national work shop four decades of coffee research and development in Ethiopia. *EIAR, Addis Ababa, Ethiopia*. pp. 382-389.
- De Bashan, L.E., H. Antoun, & Y. Bashan. 2008. Involvement of indole-3-acetic acid produced by the growth promoting bacterium *Azospirillum* spp. in promoting growth of *Chlorella vulgaris*. *J. Phycol of America*. 44:938 – 947.
- Decasy, F., J. Avelino, B. Guyot, J.I. Perriot, C. Pineda & C. Cilas. 2003. Quality of different honduran coffees in relation to several environments. *Journal Food Science*. 68:2356-2361.
- DeSantis & Z. Todd. 2006. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*. 72.7: 5069-5072.
- Dewanti, A.W., E. Pratiwi, Y. Nuraini. 2016. Viabilitas dan aktivitas enzim fosfatase serta produksi asam organik bakteri pelarut fosfat pada beberapa suhu simpan. *Jurnal Tanah dan Sumberdaya Lahan*. 3(1): 311-318.
- Direktorat Jenderal Perkebunan. 2016. *Statistik Perkebunan Indonesia 2015-2017 Kopi*. Sekretariat Direktorat Jendral Perkebunan.
- Dobbelaere, S., J. Vanderleyden & Y. Okon. 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Review in Plant Sciences*. 22:107-149.
- Dutta, S. & A.R Podile. 2010. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): The bugs to debug the root zone. *Critical Review in Microbiology*. 36: 232-244
- Edgar & C. Robert. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*. 27.16: 2194-2200.
- Edgar, R C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*. 32.5: 1792-1797.
- Edgar, R. C. 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*. 10.10: 996-998.
- Etesami, H., H.A Alikhani & H.M Hosseini. 2015. Indole-3-acetic-acid and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase: bacterial traits required in rhizosphere, rhizoplane and/or endophytic competence by beneficial bacterai. **Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem**. In D.K. Maheshwari (Ed.). Springer International. 183-258
- Faminow, M.D. & E.A. Rodriguez. 2001. Biodiversity of flora and fauna in shaded coffee systems. *International Centre for Research in AgroForestry Latin American Regional Office*. Lima. Peru.

Fatchiyah, E.L. Arumningtyas & S. Widyarti. 2011. **Teknik analisis biologi molekuler**. Erlangga. Jakarta.

Fawole, M.O & B.A Oso. 2004. **characterization of bacteria:laboratory manual of microbiology**. Spectrum Book Ltd. Ibadan. Nigeria.

Fitriatin, B.N., A. Widyasmara, M. Arifin, R. Devnita, A. Yuniarti & R. Haryanto. 2018. Isolation and screening of phosphate solubilizing bacteria from rhizosphere of tea (*Camellia sinensis* L) on andisols. *International Journal of Sustainable Agricultural Research*. 4(4): 95-100.

Ge, B. B. Liu, T.T Nwet., W. Zhao, L. Shi & K. Zhang. 2016. *Bacillus methylotrophicus* strain NKG-1, isolated from Changbai Mountain, China, has potential applications as a biofertilizer od biocontrol agent. *PLoS ONE*. 11(11): 60-79. doi:10.1371/journal.pone.0166079

Ghosh A, K. Dey, N. Bhowmick, P.S Medda, A.N Dey, A. Ghosh. 2017. Reproductive behavior of lemon (*Citrus limon* Burm.) affected by different pruning intensities and integrated nutrient management under various growing season. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*. 6(4): 606—614.

Goswarni, D., J.N Thankker & P.C Dhandhukia. 2016. Potraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *A Review Journal Soil and Crop Sciences*. 2:1127500

Gray, E.J. & D.L Smith. 2005. Intracellular and Extracellular PGPR: Commonalities and Distinctions in the Plant-bacterium Signaling Processes. *Soil Biology and Biochemistry*. 37: 395-412.

Gulland, A. 2017. Scientists wake up to coffee's benefits. *BMJ*. : <http://www.bmj.com>. doi.org/10.1136/bmj.j5381

Gupta, V.V.S.R & M.M Roper. 2016. Enhancing Non-symbiotic N₂ fixation in agriculture. *Article Review. The Open Agriculture Journal*. 10, 7-27. DOI: 10.2174/1874331501610010007.

Haas & J. Brian. 2011. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Research*. 21.3: 494-504.

Hanh, T.T.H & W. Mongkoltharuk. Correlation of growth and IAA production of *Lysinibacillus fusiformis* UD 270. *Journal of Applied and Physical Sciences*. 3(3): 98-106.

Indonesia Invements, 2017. Produksi domestik, ekspor dan konsumsi Kopi Indonesia. <https://www.indonesiainvestments.com/id/bisnis/komoditas/kopi/item186?searchstring=kopi>. Diakses pada 14 Januari 2019

Ines, M., T. Yousra, B.R. Asma, K. Sana, & H. Abdennasser. 2014. Muti-traits of non-pathogenic fluorescent *Pseudomonas* and evaluation of their potential as biocontrol agent. *American Journal of Enviromental Science*. 10 (2): 199-209.

International Coffee Organization. 2014. World Coffee Trade (1963-2013). *A Review of The Markets Challenges and Opportunities Facing The Sector*.

Israwan, R.F., T. Ardyati, Suharjono. 2015. Eksplorasi bakteri pemfiksasi nitrogen non simbiotik penghasil IAA dan pelarut fosfat asal rhizosfer tanamn apel kota Batu, Jawa Timur. *Journal of Tropical Biology*. 3(2): 55-59

Jha, C. K & M. Saraf. 2015. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *A Review of Journal Agricultural Research Development*. Vol 5(2) 0108-0119.

Joshi, S., V. Jaggi, S. Tiwari, V.K Sah & M. Sahgal. 2019. Multitrate phosphate solubilizing bacteria from *Dalbergia sissoo* Roxb. rhizosphere in natural forest of India Central Himalaya. *Environment and Ecology*. 37(3A): 894-908

Kementrian Pertanian. 2016. *Outlook Kopi Komoditas Pertanian Subsektor Perkebunan*. Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian Sekretariat Jendral.

Khalid, A., M. Arshad, & Z.A. Zahir. 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Applied Microbiology*. 96: 473 – 480.

Khalif, U., S.R Utami, & Z. Kusuma. 2014. Pengaruh penanaman sengon (*Paraserianthes falcataria*) terhadap kandungan C dan N tanah di Desa Slamparejo, Jabung, Malang. *Jurnal Tanah dan Sumberdaya Lahan*. 1(1) : 9-15.

Klindworth, A., E. Pruesse, T. Schweer, J. Peplies, C. Quast, M. Horn, F.O. Glockner. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing based diversity studies. *Nucleic Acids Res*. 41:e1. doi:10.1093/nar/gks808

Kovacs, K. 2009. **Applications of mossbauer spectroscopy in plant physiology**. Ph.D Dissertation. ELTE Chemistry Doctoral School, ELTE Institute of Chemistry, Budapest.

Kumar, A., A. Prakash & B.N. Johri. 2011. **Bacillus as PGPR in Crop Ecosystem, in: Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems**. D.K. Maheshwari (ed.). Springer. Verlag Berlin Heidelberg.

Kuramae, E.E., E. Yergeau, L.C Wong, A.S Pijl, J.A.V Veen & G.A Kowalchuk. 2012. Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. *FEMS Microbiol Ecol*. 79:12–24

Latt, Z.K., S.S Yu & T.M Lynn. 2013. Enhancement of cellulolytic nitrogen fixing activity of *Alcaligenes* sp. by MNNG mutagenesis. *International Journal Innovation Applied Study*. 4(3): 979-986.

Leloup, J., M. Baude, N. Nunan, J. Meriguet, I. Dajoz, X.L. Roux & X. Raynaud. 2018. Unravelling the effects of plants species diversity and aboveground litter input on soil bacterial communities. *Geoderma*. 317: 1-7

Li, Y., X. Liu, T. Hao & S. Chen. 2017. Colonization and maize growth promotion induced by phosphate solubilizing bacterial isolates. *International Journal of Molecular Sciences*. 18: 1-16.

Lugtenberg, B.J.J & G.V Bloemberg. 2004. Life in the rhizosphere. In: Ramos JL (ed) **Pseudomonas Vol 1**. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York. USA. 403-430.

Magoč T & S.L Salzberg. 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*. 27.21: 2957-2963.

Mahanty, T., S. Bhattacharjee, M. Goswami, P. Bhattacharyya, B. Das, A. Ghosh & P. Tribedi. 2017. Biofertilizers: A potential approach for sustainable agriculture development. *Environmental Science Pollution Research*. 24: 3315-3335. DOI 10.1007/s11356-016-8104-0

- Martinez-Viveros, O., M.A. Jorquera, D.E. Crowley, G. Gajardo & M.L. Mora. 2010. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal Soil Science Plant Nutrion*. 10:293–319.
- Meena, V.S., S.K. Meena, J.K. Bisht & A. Pattanayak. 2016. Conservation agricultural practices in sustainable food production. *Journal Clean Production* 137:690–691
- Meena, VS., S.K Meena, J.P Verma, A. Kumar, A. Aeron, P.K Mishra & M.L Dotaniya. 2017. Plant beneficial rhizospheric microorganism (PBRM) strategies to improve nutrients use efficiency. *Ecol Engg*. 107 : 8—32.
- Meena-Violante, H.G. & V. Olalde-Portugal. 2007. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. *Scientia Horticult*. 113: 103-106.
- Mehta, P., A. Walia, N Kakkar & C.K Shirkot. 2014. Tricalcium phosphate solubilisation by new endophyte *Bacillus methylothrophicus* CKAM isolated from apple root endosphere and its plant growth-promoting activities. *Acta Physiol Plant*. 36: 2033+2045.
- Mei. 2018. Berkat Anak Muda, Tren Ngopi Akan Terus Eksis. <https://www.inibaru.id/coffreak/tren-kopi-hitam-di-kalangan-milenial>. Diakses 18 Desember 2018
- Mihalache, G., M. Zamfirache, M. Mihasan, I. Ivanov, M. Stefan & L. Raus. 2015. Phosphate-solubilizing bacteria associated with runner bean rhizosphere. *Arch. Biological Science. Belgrade*. 67(3):793-800.
- Moe, L. A. 2013. Amino acids in the rhizosphere: from plants to microbes. *American Journal of Botany* 100: 1692 – 1705.
- Mohite, B. 2013. Isolation and characterization of Indole Acetic Acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. Vol. 13, no. 3, pp. 638–649. DOI: 10.4067/S0718-95162013005000051
- Moreno, G., E. Moreno & G. Cadena. 1995. Bean characteristics and cup quality of the colombian variety (*Coffea arabica*) as judged by international tasting panels. In: *the proceedings of the 16th International*.
- Muhammad, N., B. Samina, K. Yasmin, M. Roqayya, K.S Zabta, L.K Abdul, K. Ajmal, & A.H Ahmed. 2018. Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for sal tolerance in plants: a review. *Microbiological Research*. 209 (21-32).
- Mukrin, Yusran, B. Toknok. 2019. Populasi fungi dan bakteri terhadap tanah pada lahan agroforestri dan kebun campuran di Ngata, Katuvua Dong-Dongi, Kecamatan Palopo, Kabupaten Sigi, Sulawesi Tengah. *Journal Forest Sains*. 16 (2): 77-84.
- Muleta, D. 2007. **Microbial inputs in coffee (*Coffea arabica* L) production system, Southwestern Ethiopia**. Doctoral Thesis. Faculty of Natural resources and Agricultural Sciences. Department of Microbiology. Uppsalla.
- Muleta, D., F. Assefa, E. Borjesson & U. Granhall. 2013. Phosphate-solubilizing rhizobacteria associated with *Coffea arabica* L. In natural coffee forest of Southwestern Ethiopia. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 12, 73-84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jssas.2012.07.002>

- Muleta, D., F. Assefa, K. Hjort., S. Roos. & U. Granhall. 2009. Characterization of rhizobacteria isolated from wild coffee arabica L. *Eng. Life Sci.* 9(2): 100-108.
- Muschler, R.G. 2001. Shade improve coffee quality in a sub-optimal coffee zone of Costa Rica. *AgroForestry System.* 85: 131-139.
- Musoli, P., P. Cubry, P. Aluka, C. Billiot, M. Dufour, T. De Bellis, D. Pot, D. Bieysse, A. Charrier & T. Leory. 2009. Genetic differentiation of wild and cultivated population: diversity of *Coffea canephora* Pierre in Uganda. *Genome.* 52: 634-646
- Mustafa, I., Hadiatullah., Sustiyah. 2017. Removal of humic acid from peat soils by using AlCl₃ prior to DNA extraction. *AIP Conference Proceedings.* 1844, 030007. <https://doi.org/10.1063/1.4983434>.
- Muthukumarasamy, R., U.G. Kang, K.D. Park, W.T. Jeon, C.Y. Park, Y.S. Cho, S.W. Kwon, J. Song, D.H. Roh & G. Revathi. 2006. Enumeration, isolation, and identification of diazotrophs from Korean wetland rice varieties grown with long-term application of n and compost and short-term inoculation effect on rice plants. *Journal Applied Microbiology.* 102(4): 981-991.
- Oktadiani, D. 2018. **Interaksi masyarakat yang tinggal di kawasan UB Forest dalam penggunaan lahan hutan (studi kasus di Dusun Sumberwangi, Desa Donowarih dan Dusun Summersari, Desa Tawangargo, Kecamatan Karangploso, Kabupaten Malang).** Fakultas Pertanian. Universitas Brawijaya. Skripsi.
- Oladunni, F.S., M.A. Oyekunle, A.O. Talabi, O.E. Ojo, M.I Takeet, M. Adam & I.A. Raufu. 2016. Phylogenetic analysis of *Dermatophilus congolensis* isolated from naturally infected cattle in Abeokuta and Ilorin, Nigeria. *Journal Veterinary Medicine Science.* 2:136-142.
- Ona, O, J.V. Impe, E. Prinsen, D. Vanderleyden. 2005. Growth and indole-3acetic-acid (IAA) biosynthesis of *Azopirillum brasilense* sp245 is environmentally controlled. *FEMS Microbiol Lett.* 246: 125-132.
- Osman, N.I & S. Yin. 2018. Isolation and characterization of pea plant (*Pisum sativum*) growth-promoting rhizobacteria. *African Journal of Microbiology.* 12(34): 820-828. DOI: 10.5897/AJMR2018.8859
- Osorio, N. 2002. The global coffee crisis: a threat to sustainable development. *International Coffee Organization.* London.
- Pandey, A., P. Trivedi., B. Kumar & L.M.S Palni. 2006. Characterization of a phosphate solubilizing and antagonistic strain of *Pseudomonas putida* (B0) isolated from a aub alpine location in the Indian Central Himalaya. *Current Microbiology.* 53: 102-107.
- PanReac AppliChem. 2018. Nitrogen Determination by Kjeldahl Method. **PanReac AppliChem ITW Reagents.** www.itwreagents.com
- Patel, J.S., S.K. Vadav, R. Bajpai, B. Teli & M. M. Rashid. 2020. PGPR secondary metabolites: an active syrup for improvement of plant health. **Molecular aspect of plant beneficial microbes in agriculture.** Elsevier. 195-208.
- Perez-Flores, P., E. Valencia-Cantero, J. Altamirano-Hernandez, P. Pelagio-Flores, J. Lopez-Bucio, P. Garcia-Juarez & L. Macias-Rodriguez. 2017. *Bacillus methylotrophicus* M4-96 isolated from maiza (*Zea mays*) rhizoplane increases

growth and auxin content in *Arbidopsis thaliana* via emission of volatiles. *Protoplasma*. DOI 10.1007/s00709-017-1109-9

Perrineau, M.M, C. Le Roux, S.M de Faria, F. de Carvalho Balieiro, A. Galiana, Y. Prin, & G. Béna. 2011. Genetic diversity of symbiotic *Bradyrhizobium elkanii* populations recovered from inoculated and noninoculated *Acacia mangium* field trials in Brazil. *Syst Appl Microbiol.* 34: 376–384. <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2011.03.003>.

Pradhan, A.A Pahari, S. Mohapatra, & B.B Mishra. 2017. Phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture: genetic mechanism and application. . microbial diversity and soil health in tropical agroecosystems. **An Ebook: Advances in Soil Microbiology: Recent Trends and Future Prospects Volume 2 Soil-Microbe-Plant Interaction.** Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7380-9_5

Prakoswo, D, Ariffin & S.Y Tyasmoro. 2018. The analyze of agroclimate in UB Forest area Malang District, East Java, Indonesia. *Bioscience Research.* 15(2): 918-923

Premachandra, D., L. Hudek, L. Brau. 2016. Bacterial modes of action for enhancing of plant growth. *Journal of Biotechnology & Biomaterials* 6(3):1-8.

Promega, 2018. GoTaq[®] Green Master Mix (M712) Product Information. <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-green-master-mix-protocol.pdf?la=en>. Diakses 14 Januari 2019

Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanah dan Agroklimat. 2005. **Kinerja pusat penelitian dan pengembangan tanah dan agroklimat 2001-2004.** Puslitbang Tanah dan Agroklimat.

Rahma, A. F., E. Arisoelaningsih. Threatening of invasive species (IAS) on vegetation structure aerial arthropod diversity in protection area of UB Forest. *J-PAL.* 8:2.

Rasche, F., D. Knapp, C. Kaiser, M. Koranda, B. Kitzler & S. Zechmeister- Boltensstern. 2011. Seasonality and resource availability control bacterial and archaeal communities in soils of a temperate beech forest. *ISME J.* 5: 389. doi: 10.1038/ismej.2010.138

Reddy, M.S. 2017. Contribution of Asian PGPR society to the sustainable agriculture development in Asia. *5th Asian Plant Growth-Promoting Rhizobacteria International Conference for Sustainable Agriculture 2017.* Bogor. Indonesia

Reeve, W., P. V Berkum, J. Ardley, R. Tian, M. Gollagher, D. Marinov, P. Elia, T.B.K Reddy, M. Pillay, N. Varghese, R.. Seshadri, N. Ivanova, T. Woyke, M.N. Baeshen, N. A. Baeshen & N. Kyrpides. 2017. High-quality permanent draft genome sequence of the *Bradyrhizobium elkanii* type strain USDA 76T, isolated from *Glycine max* (L.) Merr. *Standards in Genomic Sciences.* 12:26

Richardson, A.E. & R.J Simpson. 2011. Soil microorganism mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. *Plant Physiol.* doi.org/10.1104/pp.111.175448

Rumjanek, N.G, R.C Dobert, P. van Berkum & E.W Triplett. 1993. Common soybean inoculant strains in Brazil are members of *Bradyrhizobium elkanii*. *Appl Environ Microbiol.* 59: 4371–4373.

Salla, M.H. 2009. **Influence of genotype, location and processing methods on the quality of coffee (*Coffea arabica* L).** Hawassa College of Agriculture. Hawassa University. Ethiopia. Thesis

Saputra, E.A.W.H. 2018. **Potensi bakteri serasah tanaman pinus di UB Forest sebagai biodegradator fungisida mancozeb.** Fakultas Pertanian. Universitas Brawijaya. Skripsi.

Sari, N.P., T.I. Santoso, & S. Mawardi. 2013. Sebaran tingkat kesuburan tanah pada perkebunan rakyat kopi arabika di dataran tinggi Ijen-Raung menurut ketinggian tempat dan tanaman penangung. *Pelita Perkebunan* 29(2): 93–107.

Sharma, A., D. Shankhdhar & S.C. Shankhdhar. 2016. Potassium-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in potassium solubilization and uptake. **In: Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture.** Springer. India. pp 203–219. doi:10.1007/978-81-322-2776-2_15

Sharma, I.P, S. Chandra, N. Kumar & D. Chandra. 2017. PGPR: Heart of soil and their role in soil fertility. **A review: Agriculturally important microbes for sustainable agriculture.** Springer. Singapore

Shi, L., P.E Mortimer, J.W Ferry Slik, X. Zou, J. Xu & W. Feng. 2014. Variation in forest soil fungal diversity along a latitudinal gradient. *Fungal Divers.* 64: 305–315. doi: 10.1007/s13225-013-0270-5

Smith, B.E., R.L Richards, & W.E Newton. 2013. Catalysts for nitrogen fixation: nitrogenases, relevant chemical models and commercial processes. *Springer Science & Business Media.* 1:340

Soil Survey Staff. 2010. **Keys to soil taxonomy eleventh edition.** Natural Resources Conservation Service-United States Department of Agricultural. Washington DC.

Somers, E., J.Vanderleijden & M. Srinivasan. 2004. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Critical Review Microbiology.* 30:205–240

Sprent, J.I., J. Ardley & E.K James. 2017. Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytologist.* 215: 50-56.

Srigandha, D.D., J. Venkatesha, G. R. Shetty, I.B Biradar, G. Manjunath & S. Kulkarni. 2017. Study of sustainable of containers and rooting media for growth and rootong of coffee seedlings (*Coffea arabica* cv. Chandragiri). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.* 6(10): 527-530

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

Sutton, S. 2011. Accuracy of plate counts. *Journal of Validation Technology.* 17(3):42-46.

Swain, M.R., S.K. Naskar & R.C. Ray. 2007. Indole 3-acetic acid production and effect on sprouting of *Dioscorea rotundata* L. minisets by *Bacillus subtilis* isolated from culturable cowdung microflora. *Pol J Microb.* 56:103–110.

Tairo, E.V & P.A Ndakidemi. 2013. Possible benefits of rhizobial inoculation and phosphorus supplementation on nutrition, growth and economic sustainability in grain legumes. *American Journal of Research Communication.* 1 (12):532-556

- Tallapragada, T. R. Dikshit & S. Seshagiri. 2015. Isolation and optimization of IAA produce *Burkholderia seminalis* and its effect on seedlings of tomato. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 37(5): 553-559.
- Vacheron, J., G. Desbrosses, M.L Bouffaud, B. Touraine, y. M. Loccoz, D. Muller, L. Legendre, F. W Dye & C. P Combaret. 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*. 4: 1-19
- Vega, F. E., M. Pava-Ripoll, F. Posada & J. S. Buyer. 2005. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. *J. Basic Microbiol.* 45: 371–380.
- Verma, J.P., J. Yadav, K.N. Tiwari, Lavakush & V. Singh. 2010. Impact of plant promoting rhizobacteria on crop production. *International Journal of Agricultural Research* 5(11): 954-983.
- Walkley, A. & I. A. Black. 1934. An Examination of degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37:2937.
- Wallenstein, M. D. & E. K Hall. 2012. A trait-based framework for predicting when and where microbial adaptation to climate change will affect ecosystem functioning. *Biogeochemistry*. 109: 35–47. doi: 10.1007/s10533-011-9641-8
- Wang, H.H., H.L Chu, Q. Dou, Q. Z. Xie, M. Tang, C.K. Sung & C. Y. Wang. 2018. Phosphorus and nitrogen drive the seasonal dynamics of bacterial communities in *pinus Forest* rhizospheric soil of the qinling mountains. *Frontiers in Microbiology*. doi: 10.3389/fmicb.2018.01930
- Wang, Q. 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology*. 73.16: 5261-5267.
- Wang, Q., D. Xiong, P. Zhao, X. Yu, B. Tu & G. Wang. 2011. Effect of applying an arsenic-resistant and plant growth-promoting rhizobacterium to enhance soil arsenic phytoremediation by *Populus deltoides* LH05-17. *Journal Applied Microbiology*. 111: 1065-1074.
- Wicaksono, T., S. Sagiman, I. Umran. 2015. Kajian aktivitas mikroorganisme tanah pada beberapa cara penggunaan lahan di Desa PAL Kecamatan Sungai Kakap Kabupaten Kubu Raya. *Artikel*. Fakultas Pertanian. Universitas Tanjungpura. Pontianak.
- Widowati, T., R.F.W Putrie, S.J.R. Lekatompessy & H. Sukiman. 2018. Peningkatan galur pada bakteri penghasil IAA yang diisolasi dari bintil akar tanaman turi. *Biopropal Industri*. 9(2): 71-77
- Wilson, K.H., R.B Blitchington & R.C Greene. 1990. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *Journal Clin Microbiology*. 28:1942-1946.
- World Coffe Research. 2015. African Coffee renaissance summit. *Summit Proceedings*. Nairobi. Kenya
- World Coffe Research. 2016. The future of Coffee. *Annual Report*. www.worldcoffeeresearch.org. Diakses 29 Desember 2018.
- World Coffe Research. 2017. *World Coffee Research The First Five Years: 2012-2017*. www.worldcoffeeresearch.org. Diakses 29 Desember 2018.

- Yousef, N.M.H. 2018. Capability of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for producing indole acetic acid (IAA) under extreme conditon. *European journal of biological research*. 8(4): 174-182
- Zaidi A, M.S Khan, M. Ahemad & M. Oves. 2009a. Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 56: 263–284
- Zaidi A, M.S Khan, M. Ahemad, M. Oves & P.A Wani. 2009b. Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes. In: Khan MS et al (eds) **Microbial strategies for crop improvement**. Springer. Berlin Heidelberg. 23–50
- Zhang, YF, E.T. Wang, C.F Tian, F.Q Wang, L.L Han, W.F Chen & W.X Chen. 2008. *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium yuanmingense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the main rhizobia associated with *Vigna unguiculata* and *Vigna radiata* in the subtropical region of China. *FEMS Microbiol Lett*. 285: 146 –154. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01169.x>.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Analisis Statistik

Lampiran 1.1 Analisis statistik faktor biotik dan abiotik lingkungan

Uji Normalitas

		Suhu udara	Ketinggian	Diameter pohon	Jarak pohon	Tinggi pohon	Intensitas cahaya
N		6	6	6	6	6	6
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	21,061	1056,5000	7,6946	164,333	164,33	239,1944
	Std. Deviation	1,6743	88,20248	1,21822	13,2329	13,232	190,04323
Most Extreme Differences	Absolute	,279	,316	,213	,244	,244	,308
	Positive	,142	,316	,213	,197	,197	,308
	Negative	-,279	-,311	-,138	-,244	-,244	-,295
Test Statistic		,279	,316	,213	,244	,244	,308
Asymp. Sig. (2-tailed)		,157 ^c	,061 ^c	,200 ^{c,d}	,200 ^{c,d}	,200 ^{c,d}	,077 ^c

Lampiran 1.2 Analisis statistik faktor fisikokimia tanah

Uji Normalitas

		pH Tanah	C organik	N Total	C/N	Bahan organik	P tersedia	Kadar air
N		6	6	6	6	6	6	6
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	4,2633	4,7233	,4833	10,000	8,1733	2,5217	99,5763
	Std. Deviation	,38872	,80852	,05538	1,78885	1,39741	,90685	,04348
Most Extreme Differences	Absolute	,301	,172	,246	,212	,171	,225	,297
	Positive	,301	,172	,207	,132	,171	,225	,239
	Negative	-,197	-,121	-,246	-,212	-,121	-,171	-,297
Test Statistic		,301	,172	,246	,212	,171	,225	,297
Asymp. Sig. (2-tailed)		,096 ^c	,200 ^{c,d}	,200 ^{c,d}	,200 ^{c,d}	,200 ^{c,d}	,200 ^{c,d}	,106 ^c

Lampiran 1.3 Analisis statistik faktor densitas bakteri PGPR

Uji Normalitas

		Kopi Arabika	Kopi Robusta
N		9	9
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	113,1111	101,2222
	Std. Deviation	88,85725	91,81337
Most Extreme Differences	Absolute	,261	,238
	Positive	,261	,238
	Negative	-,155	-,168
Test Statistic		,261	,238
Asymp. Sig. (2-tailed)		,078 ^c	,150 ^c

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

Lampiran 2. Uji perbandingan faktor fisikokimia dan biologi tanah, densitas dan indeks diversitas bakteri PGPR

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Suhu udara	Equal variances assumed	2,277	,206	-1,891	4	,132	-2,100	1,11067	-5,1837	,98370
	Equal variances not assumed			-1,891	3,08		-2,100	1,11067	-5,5802	1,38022
Ketinggian	Equal variances assumed	,720	,444	-95,962	4	,000	-161,00	1,67774	-165,65	-156,341
	Equal variances not assumed			-95,962	3,20	,000	-161,00	1,67774	-166,15	-155,844
Diameter pohon	Equal variances assumed	1,227	,330	-,947	4	,397	-,95188	1,00508	-3,7424	1,83869
	Equal variances not assumed			-,947	3,13	,411	-,95188	1,00508	-4,0722	2,16851
Jarak pohon	Equal variances assumed	1,590	,276	-,317	4	,767	-3,77778	11,93139	-36,904	29,3490
	Equal variances not assumed			-,317	2,48	,776	-3,77778	11,93139	-46,674	39,1188
Tinggi pohon	Equal variances assumed	1,590	,276	-,317	4	,767	-3,77778	11,93139	-36,904	29,3490
	Equal variances not assumed			-,317	2,48	,776	-3,77778	11,93139	-46,674	39,1188
pH Tanah	Equal variances assumed	7,043	,057	-1,985	4	,118	-,50000	,25184	-1,1992	,19921
	Equal variances not assumed			-1,985	2,24	,172	-,50000	,25184	-1,4793	,47935
C organik	Equal variances assumed	,202	,676	-1,260	4	,276	-,78667	,62454	-2,5206	,94732
	Equal variances not assumed			-1,260	3,90	,278	-,78667	,62454	-2,5378	,96450
N Total	Equal variances assumed	4,225	,109	1,754	4	,154	,06667	,03801	-,03885	,17219
	Equal variances not assumed			1,754	2,66	,189	,06667	,03801	-,06335	,19669
C/N	Equal variances assumed	2,571	,184	2,828	4	,047	2,66667	,94281	,04901	5,28432
	Equal variances not assumed			2,828	2,56	,080	2,66667	,94281	-,64770	5,98104
Bahan organik	Equal variances assumed	,205	,674	1,251	4	,279	1,35333	1,08139	-1,6491	4,35576
	Equal variances not assumed			1,251	3,90	,281	1,35333	1,08139	-1,6798	4,38650

P tersedia	Equal variances assumed	2,232	,209	1,807	4	,145	1,11000	,61424	-,59540	2,81540
	Equal variances not assumed			1,807	2,88	,172	1,11000	,61424	-,88805	3,10805
Kadar air	Equal variances assumed	2,674	,177	-1,539	4	,199	-,04840	,03146	-,13574	,03894
	Equal variances not assumed			-1,539	2,10	,258	-,04840	,03146	-,17761	,08081
Intensitas cahaya	Equal variances assumed	,967	,381	-34,517	4	,000	-346,3888	10,03541	-374,25	-318,526
	Equal variances not assumed			-34,517	3,29	,000	-346,3888	10,03541	-376,76	-316,008

Lampiran 3. Uji korelasi antara faktor abiotik lingkungan, fisikokimia tanah dan densitas bakteri PGPR

		Densitas IAA	Densitas BPF	Densitas BPN
Suhu udara	Pearson Correlation	-,497	,695	-,277
	Sig. (2-tailed)	,316	,125	,595
	N	6	6	6
Ketinggian	Pearson Correlation	-,311	,089	-,493
	Sig. (2-tailed)	,549	,867	,320
	N	6	6	6
Diameter pohon	Pearson Correlation	-,760	-,127	-,746
	Sig. (2-tailed)	,080	,810	,088
	N	6	6	6
Jarak pohon	Pearson Correlation	-,181	-,583	-,407
	Sig. (2-tailed)	,731	,224	,423
	N	6	6	6
Tinggi pohon	Pearson Correlation	-,181	-,583	-,407
	Sig. (2-tailed)	,731	,224	,423
	N	6	6	6
pH Tanah	Pearson Correlation	-,799	,060	-,776
	Sig. (2-tailed)	,057	,910	,069
	N	6	6	6
C organik	Pearson Correlation	-,468	-,560	-,735
	Sig. (2-tailed)	,349	,248	,096
	N	6	6	6
N Total	Pearson Correlation	-,089	-,344	-,038
	Sig. (2-tailed)	,866	,505	,944
	N	6	6	6
C/N	Pearson Correlation	,540	,142	,698
	Sig. (2-tailed)	,268	,789	,123
	N	6	6	6
Bahan organik	Pearson Correlation	,520	,407	,693
	Sig. (2-tailed)	,290	,423	,127
	N	6	6	6
P tersedia	Pearson Correlation	,462	-,673	,247
	Sig. (2-tailed)	,357	,143	,637
	N	6	6	6
Kadar air	Pearson Correlation	-,146	-,476	-,470

	Sig. (2-tailed)		,782	,340	,346
	N		6	6	6
Intensitas cahaya	Pearson Correlation		-,354	,061	-,536
	Sig. (2-tailed)		,491	,909	,273
	N		6	6	6
Densitas IAA	Pearson Correlation		1	,001	,865*
	Sig. (2-tailed)			,999	,026
	N		6	6	6
Densitas BPF	Pearson Correlation		,001	1	,414
	Sig. (2-tailed)		,999		,414
	N		6	6	6
Densitas BPN	Pearson Correlation		,865*	,414	1
	Sig. (2-tailed)		,026	,414	
	N		6	6	6
Indeks Diversitas IAA	Pearson Correlation		-,492	,261	-,507
	Sig. (2-tailed)		,321	,617	,305
	N		6	6	6
Indeks Diversitas BPF	Pearson Correlation		,492	-,261	,507
	Sig. (2-tailed)		,321	,617	,305
	N		6	6	6
Indeks Diversitas BPN	Pearson Correlation		,492	-,261	,507
	Sig. (2-tailed)		,321	,617	,305
	N		6	6	6

Lampiran 4. Uji analisis multivariat faktor fisikokimia dan biologi tanah, densitas dan diversitas bakteri PGPR

Summary	Scatter plot	Scores	Loadings plot	Loadings	Scree plot
	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 5
T	-0.09053	0.5259	0.068501	0.66849	-0.18634
LI	-0.070828	0.57387	0.092006	-0.4412	0.061294
AI	-0.3694	-0.10752	-0.22801	-0.079162	-0.12067
SpH	-0.34165	0.19562	0.32176	0.050647	0.25492
C/N	0.35661	-0.014951	-0.17284	0.14181	-0.69152
PA	0.28727	-0.35902	0.30783	-0.17729	0.017895
WHC	-0.22444	-0.42289	0.27374	0.49207	0.17551
NFB	0.25353	0.036544	-0.69318	0.20424	0.54816
IDI	-0.36935	-0.10799	-0.22454	-0.068905	-0.15511
IDF	0.36935	0.10799	0.22454	0.068905	0.15511
IDN	0.36935	0.10799	0.22454	0.068905	0.15511

Summary	Scatter plot	Scores	Loadings plot	Loadings	Scree plot
PC	Eigenvalue	% variance			
1	6.68002	60.727			
2	2.63809	23.983			
3	0.995652	9.0514			
4	0.454064	4.1279			
5	0.232169	2.1106			

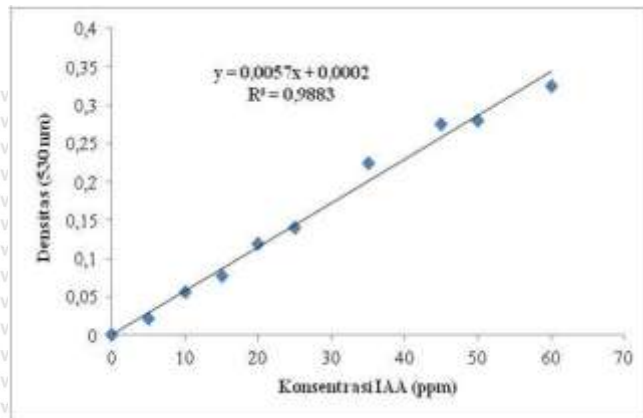
Lampiran 5. Hasil Uji Nanodrop ekstraksi DNA tanah kopi Arabika dan Robusta

Sampel	ng/l	A260	A280	260/280	260/230	Konstanta	Cursor Pos	Cursor Abs	340 raw
SS	65,55	1,311	0,832	1,58	0,10	50,00	230	12,724	0,631
SW	129,40	2,588	1,514	1,71	0,21	50,00	230	12,270	0,692

Lampiran 6. Kurva standar produksi IAA, pelarut fosfat dan penambat nitrogen

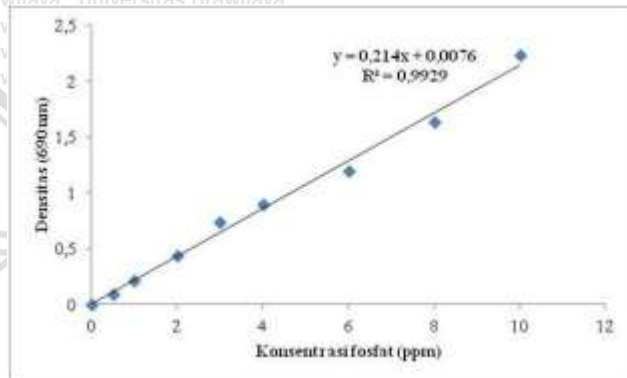
Lampiran 6.1 Kurva standar produksi IAA

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
0	0
5	0,022
10	0,056
15	0,077
20	0,119
25	0,14
35	0,225
45	0,275
50	0,28
60	0,325



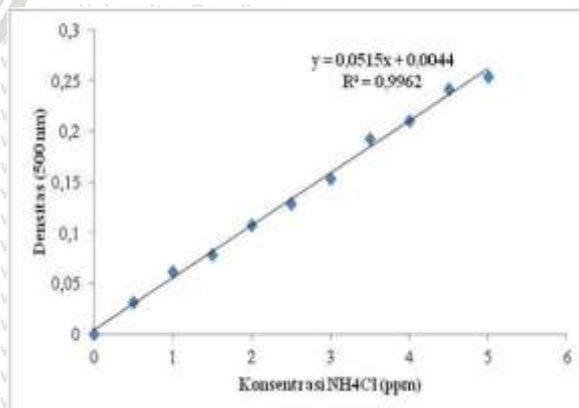
Lampiran 6.2 Kurva standar pelarut fosfat

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
0	0
0,5	0,094
1	0,216
2	0,438
3	0,739
4	0,899
6	1,199
8	1,636
10	2,23



Lampiran 6.3 Kurva standar produksi amonia

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
0	0
0,5	0,032
1	0,062
1,5	0,079
2	0,108
2,5	0,129
3	0,154
3,5	0,193
4	0,211
4,5	0,242
5	0,254



Lampiran 7. Analisis Potensi Bakteri PGPR

Lampiran 7.1 Analisis produksi rata-rata IAA pada Kopi Robusta dan Arabika

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		LogIAA_totall
N		30
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	1,6536
	Std. Deviation	,31918
Most Extreme Differences	Absolute	,138
	Positive	,085
	Negative	-,138
Test Statistic		,138
Asymp. Sig. (2-tailed)		,152 ^c

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

Test of Homogeneity of Variances

LogIAA_totall

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,055	9	20	,086

ANOVA

LogIAA_totall

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2,219	9	,247	6,702	,000
Within Groups	,736	20	,037		
Total	2,954	29			

LogIAA_totall

	Isolat	N	Subset for alpha = 0.05			
			1	2	3	4
Tukey HSD ^a	S141	3	1,2029			
	W146	3	1,3518	1,3518		
	W152	3	1,4197	1,4197	1,4197	
	W2442	3	1,4362	1,4362	1,4362	1,4362
	S222	3	1,6022	1,6022	1,6022	1,6022
	S223	3		1,7695	1,7695	1,7695
	W2432	3		1,8999	1,8999	1,8999
	S234	3			1,9290	1,9290
	S1632	3			1,9492	1,9492
	W2441	3				1,9752
Sig.			,302	,054	,069	,061

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Lampiran 7.2 Analisis produksi IAA pada Kopi Robusta dan Arabika berdasarkan waktu dan jenis isolat bakteri IAA

Tests of Normality
One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		LogIAA
N		90
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	1,6148
	Std. Deviation	,38262
Most Extreme Differences	Absolute	,077
	Positive	,053
	Negative	-,077
Test Statistic		,077
Asymp. Sig. (2-tailed)		,200 ^{c,d}

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

d. This is a lower bound of the true significance.

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: LogIAA

F	df1	df2	Sig.
4,060	30	60	,000

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Isolat + Waktu + Isolat * Waktu

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: LogIAA

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	11,065 ^a	30	,369	11,138	,000
Intercept	190,262	1	190,262	5745,348	,000
Isolat	7,971	10	,797	24,069	,000
Waktu	,386	2	,193	5,828	,005
Isolat * Waktu	2,760	18	,153	4,629	,000
Error	1,987	60	,033		
Total	249,851	91			
Corrected Total	13,052	90			

a. R Squared = ,848 (Adjusted R Squared = ,772)

Test of Homogeneity of Variances

LogIAA

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4,121	29	60	,000

ANOVA

LogIAA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11,031	29	,380	11,416	,000
Within Groups	1,999	60	,033		
Total	13,030	89			

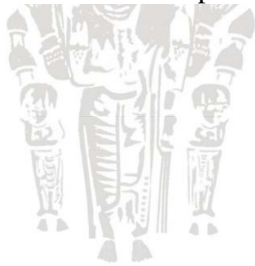
Interaksi isolat IAA dan waktu

		Subset for alpha = 0.05									
Interaksi		N	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tukey HSD ^a	S141 vs 48 jam	3	,8242								
	S141 vs 72 jam	3	1,1290	1,1290							
	WI46 vs 24 jam	3	1,1372	1,1372							
	W152 vs 24 jam	3	1,1588	1,1588	1,1588						
	W2442 vs 48 jam	3	1,2227	1,2227	1,2227						
	W2442 vs 72 jam	3	1,2368	1,2368	1,2368						
	S222 vs 24 jam	3	1,2890	1,2890	1,2890	1,2890					
	S141 vs 24 jam	3	1,3028	1,3028	1,3028	1,3028					
	WI46 vs 72 jam	3	1,3519	1,3519	1,3519	1,3519	1,3519				
	W2442 vs 24 jam	3		1,4201	1,4201	1,4201	1,4201	1,4201			
	S234 vs 72 jam	3		1,5064	1,5064	1,5064	1,5064	1,5064	1,5064		
	W152 vs 72 jam	3		1,5281	1,5281	1,5281	1,5281	1,5281	1,5281	1,5281	
	WI46 vs 48 jam	3		1,5380	1,5380	1,5380	1,5380	1,5380	1,5380	1,5380	
	W152 vs 48 jam	3		1,5593	1,5593	1,5593	1,5593	1,5593	1,5593	1,5593	1,5593
	S1632 vs 24 jam	3		1,5988	1,5988	1,5988	1,5988	1,5988	1,5988	1,5988	1,5988
	S223 vs 24 jam	3		1,6075	1,6075	1,6075	1,6075	1,6075	1,6075	1,6075	1,6075
	S223 vs 72 jam	3		1,6641	1,6641	1,6641	1,6641	1,6641	1,6641	1,6641	1,6641
	S222 vs 72 jam	3		1,6853	1,6853	1,6853	1,6853	1,6853	1,6853	1,6853	1,6853
	W2432 vs 24 jam	3			1,7369	1,7369	1,7369	1,7369	1,7369	1,7369	1,7369
	W2432 vs 48 jam	3				1,8404	1,8404	1,8404	1,8404	1,8404	1,8404
S223 vs 48 jam	3					1,8977	1,8977	1,8977	1,8977	1,8977	
S222 vs 48 jam	3						1,9222	1,9222	1,9222	1,9222	

S234 vs 48 jam	3					1,9240	1,9240	1,9240	1,9240	1,9240	
W2441 vs 24 jam	3						1,9422	1,9422	1,9422	1,9422	
W2441 vs 48 jam	3						1,9643	1,9643	1,9643	1,9643	
W2441 vs 72 jam	3						1,9732	1,9732	1,9732	1,9732	
S1632 vs 72 jam	3							2,0451	2,0451	2,0451	
W2432 vs 72 jam	3							2,0801	2,0801	2,0801	
S234 vs 24 jam	3								2,1300	2,1300	
S1632 vs 48 jam	3									2,2279	
Sig.			,139	,086	,059	,094	,065	,091	,063	,067	,076

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.



Lampiran 7.3 Analisis produksi rata-rata pelarut fosfat pada Kopi Robusta dan Arabika

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		konsentrasi
N		6
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	2,2617
	Std. Deviation	,66677
Most Extreme Differences	Absolute	,300
	Positive	,300
	Negative	-,179
Test Statistic		,300
Asymp. Sig. (2-tailed)		,097 ^c

- a. Test distribution is Normal.
- b. Calculated from data.
- c. Lilliefors Significance Correction.

Test of Homogeneity of Variances

Konsentrasi (ppm)

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,445	1	4	,296

ANOVA

Konsentrasi (ppm)

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,037	1	,037	,067	,808
Within Groups	2,186	4	,547		
Total	2,223	5			

Lampiran 7.4 Analisis produksi pelarut fosfat pada Kopi Robusta dan Arabika berdasarkan faktor waktu dan jenis isolat BPF

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		LogBPF ₋
N		81
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	,3986
	Std. Deviation	,26885
Most Extreme Differences	Absolute	,066
	Positive	,062
	Negative	-,066
Test Statistic		,066
Asymp. Sig. (2-tailed)		,200 ^{c,d}

- a. Test distribution is Normal.
- b. Calculated from data.
- c. Lilliefors Significance Correction.
- d. This is a lower bound of the true significance.

**Levene's Test of Equality of Error
Variances^a**

Dependent Variable: LogBPF

F	df1	df2	Sig.
2,334	26	54	,004

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Isolat + Waktu + Isolat

* Waktu

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: LogBPF_Total

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2,358 ^a	26	,091	1,430	,133
Intercept	12,869	1	12,869	202,923	,000
Isolat	1,051	8	,131	2,071	,055
Waktu	,652	2	,326	5,141	,009
Isolat * Waktu	,655	16	,041	,645	,832
Error	3,425	54	,063		
Total	18,652	81			
Corrected Total	5,782	80			

a. R Squared = ,408 (Adjusted R Squared = ,123)

LogBPF

Tukey HSD^{a,b}

Isolat	N	Subset	
		1	2
W124	9	,2099	
W113	9	,2829	,2829
S131	9	,3016	,3016
S132	9	,3899	,3899
W335	9	,4091	,4091
W323	9	,4218	,4218
W3	9	,4580	,4580
W123	9	,5128	,5128
W35	9		,6012
Sig.		,232	,179

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,063.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9,000.

b. Alpha = ,05.

LogBPF_Total

Tukey HSD^{a,b}

Waktu	N	Subset	
		1	2
72 jam	27	,2762	
24 jam	27	,4308	,4308
48 jam	27		,4888
Sig.		,071	,676

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,063.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 27,000.

b. Alpha = ,05.

Lampiran 7.5 Analisis produksi rata-rata amonia pada Kopi Robusta dan Arabika

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Isolat
N		36
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	6,5000
	Std. Deviation	3,50102
Most Extreme Differences	Absolute	,096
	Positive	,096
	Negative	-,096
Test Statistic		,096
Asymp. Sig. (2-tailed)		,200 ^{c,d}

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

d. This is a lower bound of the true significance.

Test of Homogeneity of Variances

Konsentrasi

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5,872	11	24	,000

ANOVA

Konsentrasi

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2287,622	11	207,966	13,956	,000
Within Groups	357,631	24	14,901		
Total	2645,253	35			

Konsentrasi

Tukey HSD^a

Isolat	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
W2.1.5.2	3	,1033		
W3.4.2	3	,1489		
S2.2.4	3	,3133		
S2.2.2	3	,5589		
W2.2.2	3	,5630		
W3.2.2	3	,7722		
S3.1.1	3	,7933		
W2.1.4.1	3	1,2244		
S3.4.2	3	1,9600		
W1.1.2	3	9,5100	9,5100	
W3.5.1	3		14,3356	
W1.2	3			27,0833
Sig.		,174	,917	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Lampiran 7.6 Analisis produksi amonia pada Kopi Robusta dan Arabika berdasarkan faktor waktu dan jenis isolat BPN

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		LogBPN_Total
N		84
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	,4367
	Std. Deviation	,64131
Most Extreme Differences	Absolute	,095
	Positive	,095
	Negative	-,095
Test Statistic		,095
Asymp. Sig. (2-tailed)		,057 ^c

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

**Levene's Test of Equality of Error
Variances^a**

Dependent Variable: LogBPN_Total

F	df1	df2	Sig.
4,906	31	52	,000

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Isolat + Waktu + Isolat * Waktu

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: LogBPN

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	27,811 ^a	31	,897	7,375	,000
Intercept	7,899	1	7,899	64,937	,000
Isolat	15,735	9	1,748	14,373	,000
Waktu	1,202	3	,401	3,293	,028
Isolat * Waktu	10,514	19	,553	4,549	,000
Error	6,325	52	,122		
Total	50,153	84			
Corrected Total	34,136	83			

a. R Squared = ,815 (Adjusted R Squared = ,704)

Test of Homogeneity of Variances

LogBPN_Total

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5,222 ^a	27	52	,000

a. Groups with only one case are ignored in computing the test of homogeneity of variance for LogBPN_Total.

ANOVA

LogBPN

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	27,811	31	,897	7,375	,000
Within Groups	6,325	52	,122		
Total	34,136	83			

Lampiran 8. Hasil Uji Nanodrop isolat PGPR terpilih dari rhizosfer kopi Arabika dan Robusta

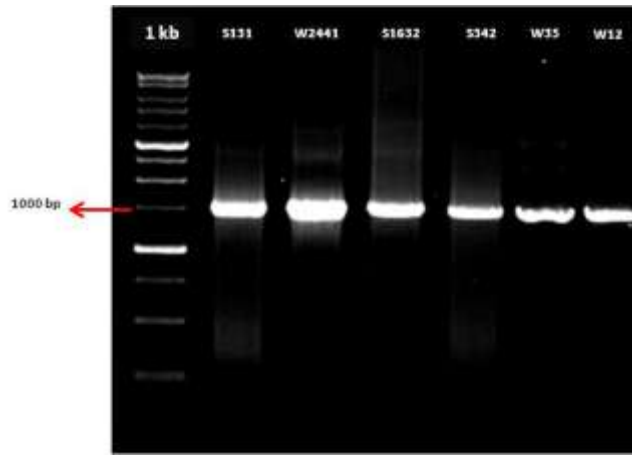
Sampel	ng/l	A260	A280	260/280	260/230	Konstanta	Cursor Pos	Cursor Abs	340 raw
W2441	55,37	1,107	0,581	1,90	1,52	50,00	230	0,727	- 0,036
W35	137,14	2,743	1,440	1,90	1,68	50,00	230	1,637	0,011
W12	6,66	0,133	0,081	1,65	0,37	50,00	230	0,357	- 0,020
S1632	26,65	0,533	0,304	1,75	0,85	50,00	230	0,628	- 0,006
S131	24,96	0,499	0,275	1,81	0,88	50,00	230	0,568	0,013
S342	124,36	2,487	1,290	1,93	1,95	50,00	230	1,278	0,005

Lampiran 9. Karakteristik morfologi isolat PGPR terpilih dari rhizosfer kopi Arabika dan Robusta

Karakteristik	Isolat					
	W2.4.4.1	S16.3.2	W3.5	S1.3.1	W1.2	S3.4.2
Bentuk koloni						
Bulat		+	-	-	+	+
Tidak teratur		+	+	-	-	-
Berfilamen						
Berserabut						
Bentuk tepi						
Menyeluruh					+	-
Beralun					+	-
Lobate		+	+		-	-
Erose					-	+
Permukaan elevasi						
Datar		-	+	+	+	-
Menaik					-	+
Cembung		+			-	-
Umbonat		-			-	-
Pulvinat		-			-	-
Cembung papilat		-			-	-
Cembung berkerut		-			-	-
Permukaan tekstur						
Kasar		-			-	-
Berkontur		+			+	+
Berbatasan secara radial		-			-	+
Berkerut		-			-	-
Permukaan konsistensi						
Kering dan rapuh					-	-
Pertumbuhan tipis					-	-
Lekit					+	+
Garis inokulasi					-	-
Ciri optik						
Opalens					-	-
Iridescens					-	-
Pudar					+	+
Berkilat					-	-
Cat Gram						

Gram (-)	-	-	-	-	-	-
Gram (+)	+	+	+	+	+	+
Bentuk sel						
Basil	+	+	+	+	+	+
Coccus	-	-	-	-	-	-

Lampiran 10. Hasil purifikasi sekuen isolat terpilih berdasarkan 16S rDNA



Lampiran 11. Isolat PGPR dan panjang sekuen DNA

Isolat	Panjang nukleotida	Kemampuan PGPR
W2441	1430 bp	Produksi IAA
S1.6.3.2	1419 bp	Produksi IAA
W3.5	1417 bp	Pelarut fosfat
S1.3.1	1430 bp	Pelarut fosfat
W1.2	1423 bp	Penambat nitrogen
S3.4.2	1529 bp	Penambat nitrogen

Lampiran 12. Data Urutan Basa Nukleotida 16S rDNA

Lampiran 12.1 Data urutan basa nukleotida 16S rDNA *Bacillus subtilis* S1.6.3.2

G TTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTG
GGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACT
TACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGA
TCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGAC
GGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCG
GTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGCCGG
AATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGA AAC
TGGGGA ACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGC
GAAGGCGACTCTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC
CGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACG
GTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAA
CCTTACCAGGTCCTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGATGGTTGTC
GTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCT
AAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAAGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCT
ACAATGGACAGAACAAAGGGGACGGAACCGGAGGTTAAGCCAAATCCCAAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAAC

TCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCG
TCACACCAGAGATTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCGGAAG

Lampiran 12.2 Data urutan basa nukleotida 16S rDNA *Bacillus subtilis* S1.3.1

TCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGTCCCTGATGTTAGCGGGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGG
ATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTA
CAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATC
GGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG
AGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGCGGTA
CCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAAT
TATTGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCATTGAAAAGT
GGGAACTTGAGTGAGAAGAGGAGAGTGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCACTGGCGA
AGGCGACTCTGTGTGTAACGTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGT
CGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAGCAACGCGAAGAACC
TTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCTTCGGGGGCGAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGT
CAGCTCGTGTGATGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGATCTTAGTTCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAA
GGTACTGCCGGTGACAAACCGGAAGGAAGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTA
CAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGGAGGTTAAGCCAATCCCAAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACT
CGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGT
CACACCAGAGAGTTTGAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCGGAAGGT

Lampiran 12.3 Data urutan basa nukleotida 16S rDNA *Bacillus wiedmannii* S3.4.2

AATAGAGATTGAAGAGCTTGTCTTATGAAGTTAGCGGGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCATAAGACTGGGAT
AACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTGAACTGCATGGTTCGAAATTGAAAGGGCGCTTCGGCTGCACTTATG
GATGGACCCGCGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG
CCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAG
CAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTCGGGTGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACC
TTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTA
TTGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCAGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAAAGTGGG
AGACTTGAGTGAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCACTGGCGAAG
GCGACTTTCTGGTCTGTAACGTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGC
AAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAGCAACGCGAAGAACCCTTA
CCAGTCTTGACATCCTCTGAAAACCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAG
CTCGTGTGATGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGATCTTAGTTCGATCATTAAAGTTGGGCACTTAAGGT
GACTGCCGGTGACAAACCGGAAGGAAGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGGAGGTGGAGCTAATCTATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCC
TACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTACAC
CACGAGAGTTTGAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACTTTATGGAGCCAGCCGCGGTAAGGT

Lampiran 12.4 Data urutan basa nukleotida 16S rDNA *Bacillus methylophilus* W1.2

GCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGTCCCTGATGTTAGCGGGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGA
CTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACC
ACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGG
TGATCGGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCT
GACGGAGCAACCGCGGTGAGTGATGAAGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTCCGCTTCAAATAGG
GCGGACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTC
CGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGG
AAACTGGGGAACCTGAGTGAGAAGAGGAGAGTGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAG
TGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCC

ACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAG
TACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCAACGCGA
AGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGT
TGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCA
CTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTAGACCTGGGCTACACACG
TGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGGAGGTTAAGCCAATCCCAAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTG
CAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCG
CCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTAGGAGCCAGCCGCGAAGGT

Lampiran 12.5 Data urutan basa nukleotida 16S rDNA *Pseudomonas putida* W3.5

CTACCATGCAAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTGACGCGGCGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGT
AGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTAT
CAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCA
GTCACACTGGAATGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGCGAAAGCCTGATCCA
GCCATGCCCGCTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTT
TTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTA
CTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAAGCCCGGGCTAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCA
AGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGG
CGACCACCTGGACTGATACTGACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCA
AGGTTAAAAGTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC
CAGGCTTGACATGCAGAGAAGTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGC
TCGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGCTTAGTACCAGCACGTTATGGGGGCACTCTAAGG
AGACTGCCGGTGACAAACCGGAAGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAATCATGACCCTTACGGCTGGGCTACACACGTGCTACA
ATGGTCCGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCACAACCCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCG
ACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCGCCCGTCA
CACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTTACCCACG

Lampiran 12.6 Data urutan basa nukleotida 16S rDNA *Bacillus* sp. W2.4.4.1

TCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACA
AGGCCCGGAACGTATTACCGCGGATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATC
CGAACTGAGAACGGTTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGACGCTCTTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCA
GGTCATAAGGGGCATGATGATTGACGTCATCCACCTTCTCCGTTTGTACCGGCAGTACCTTAGAGTGCCCAACTTAATG
ATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTCGGGACTTAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACC
TGCACTCTGCTCCGAAGGAGAAGCCCTATCTTAGGGTTTTAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCG
AATTAACCATGCTCCACCGCTTGTCGGGCCCCGTCAATCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCACAGCCGAGT
GCTTAATGCGTTAACTTACGACTAAAGGGCGGAAACCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATC
TAATCCTGTTTGTCCACCGCTTTCGCGCTCAGTGTGAGTTACAGACCAGAAAGTGCCTTCGCCACTGGTGTCTCCATATCTC
TAGCATTTCACCGCTACACATGGAATTCACCTTCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCG
TGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCACTGCGCGCTTTACGCCCAATAATTCCGGATAACGCTTCCACCTACGATTAACCG
CGGCTGCTGGCACGATAGTTAGCCGTGGCTTCTGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCACTTGTCTCCCTAA
CAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCACTACGCGGCGTGTGCTCCGTGACACTTTCGTCATTGCGGAAGATTCCCTACTG
CTGCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGTTCGGCTACGCATCGTTGCCTGGTG
AGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCGACGCGGGTCCATCATAAGTACAGCCGAAGCCGCTTCAATTCGAACCATGCAG
TTCAAATGTTATCCGGTATTAGCCCGGTTTCCGGAGTTATCCAGTCTTATGGGAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTCGG
CCGTAACCTCATGAGAGCAAGCTCTCAATCCATTGCTCGACTTGC

Lampiran 13. Tabel Similaritas

Lampiran 13.1 Tabel similaritas *Bacillus subtilis* S1.6.3.2 dan S1.3.1 dengan isolat-isolat acuan

No.	Isolat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1.	S131															
2.	S1632															
3.	<i>Bacillus subtilis</i> DSM 10T	99,9														
4.	<i>Bacillus methylotrophicus</i> SY2	99,6	99,6													
5.	<i>Bacillus shackletonii</i> LMG 18435	95,6	95,6	95,6												
6.	<i>Bacillus pseudofirmus</i> DSM 8715	94,1	94,1	94,1	94,1											
7.	<i>Bacillus halodurans</i> ATCC 27557T	93,9	93,9	93,9	93,9	93,9										
8.	<i>Bacillus thuringiensis</i> IAM 12077T	93,6	93,6	93,6	93,6	93,6	93,6									
9.	<i>Bacillus flexus</i> IFO15715	93,5	93,5	93,5	93,5	93,5	93,5	93,5								
10.	<i>Bacillus acidiceler</i> CBD 119	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4							
11.	<i>Bacillus wiedmannii</i> FSL W8-0169	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4						
12.	<i>Bacillus luciferensis</i> LMG 18422	93,2	93,2	93,2	93,2	93,2	93,2	93,2	93,2	93,2	93,2					
13.	<i>Bacillus mycoides</i> ATCC 6462T	93,2	93,2	93,2	93,2	93,2	93,2	93,2	93,2	93,2	93,2	93,2				
14.	<i>Bacillus megaterium</i> IAM 13418	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93			
15.	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93		
16.	<i>Bacillus hemicellulosilyticus</i> C-11	92,7	92,7	92,7	92,7	92,7	92,7	92,7	92,7	92,7	92,7	92,7	92,7	92,7	92,7	92,7
17.	<i>Bacillus cereus</i> A41	90,7	90,7	90,7	90,7	90,7	90,7	90,7	90,7	90,7	90,7	90,7	90,7	90,7	90,7	90,7

Lampiran 13.2 Tabel similaritas *Bacillus wiedmannii* S3.4.2 dengan isolat-isolat acuan

No.	Isolat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1.	S342													
2.	<i>Bacillus wiedmannii</i> FSL W8-0169	99,4												
3.	<i>Bacillus luciferensis</i> LMG 18422	95	95											
4.	<i>Bacillus acidicer</i> CBD 119	94,8	94,8	94,8										
5.	<i>Bacillus flexus</i> IFO15715	94,7	94,7	94,7	94,7									
6.	<i>Bacillus shackletonii</i> LMG 18435	94,7	94,7	94,7	94,7	94,7								
7.	<i>Bacillus megaterium</i> IAM 13418	94	94	94	94	94	94							
8.	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22	94	94	94	94	94	94	94						
9.	<i>Bacillus pseudofirmus</i> DSM 8715	93,2	93,2	93,2	93,2	93,2	93,2	93,2	93,2					
10.	<i>Bacillus methylothrophicus</i> SY2	93,1	93,1	93,1	93,1	93,1	93,1	93,1	93,1	93,1				
11.	<i>Bacillus subtilis</i> DSM 10T	93,1	93,1	93,1	93,1	93,1	93,1	93,1	93,1	93,1	93,1			
12.	<i>Bacillus halodurans</i> ATCC 27557T	92,8	92,8	92,8	92,8	92,8	92,8	92,8	92,8	92,8	92,8	92,8		
13.	<i>Bacillus hemi-cellulosilyticus</i> C-11	92,4	92,4	92,4	92,4	92,4	92,4	92,4	92,4	92,4	92,4	92,4	92,4	
14.	<i>Bacillus cereus</i> A41	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92

Lampiran 13.3 Tabel similaritas *Bacillus methylophilus* W1.2 dengan isolat-isolat acuan

No.	Isolat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1.	W12															
2.	<i>Bacillus methylophilus</i> SY2	100														
3.	<i>Bacillus subtilis</i> DSM 10T	99,7	99,7													
4.	<i>Bacillus shackletonii</i> LMG 18435	95,5	95,5	95,5												
5.	<i>Bacillus pseudofirmus</i> DSM 8715	94,4	94,4	94,4	94,4											
6.	<i>Bacillus halodurans</i> ATCC 27557T	94,1	94,1	94,1	94,1	94,1										
7.	<i>Bacillus thuringiensis</i> IAM 12077T	93,7	93,7	93,7	93,7	93,7	93,7									
8.	<i>Bacillus acidiceler</i> CBD 119	93,7	93,7	93,7	93,7	93,7	93,7	93,7								
9.	<i>Bacillus wiedmannii</i> FSL W8-0169	93,6	93,6	93,6	93,6	93,6	93,6	93,6	93,6							
10.	<i>Bacillus flexus</i> IFO15715	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4						
11.	<i>Bacillus luciferensis</i> LMG 18422	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4					
12.	<i>Bacillus mycoides</i> ATCC 6462T	93,3	93,3	93,3	93,3	93,3	93,3	93,3	93,3	93,3	93,3	93,3				
14.	<i>Bacillus megaterium</i> IAM 13418	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93			
15.	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93		
16.	<i>Bacillus hemicellulosilyticus</i> C-11	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93	
17.	<i>Bacillus cereus</i> A41	90,7	90,7	90,7	90,7	90,7	90,7	90,7	90,7	90,7	90,7	90,7	90,7	90,7	90,7	90,7

Lampiran 13.4 Tabel similaritas *Pseudomonas putida* W3.5 dengan isolat-isolat acuan

No.	Isolat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1.	W3.5															
2.	<i>Pseudomonas putida</i> S18	99,8														
3.	<i>Pseudomonas taiwanensis</i> DSM 21245	99,6	99,6													
4.	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> NBRC 103162	99,4	99,4	99,4												
5.	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12633T	98,9	98,9	98,9	98,9											
6.	<i>Pseudomonas koreensis</i> BCRC 17505T	98	98	98	98	98										
7.	<i>Pseudomonas putida</i> B57	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7									
8.	<i>Pseudomonas koreensis</i> JH18	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7								
9.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> HXQ-N33	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7							
10.	<i>Pseudomonas moraviensis</i> F9-6	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7						
11.	<i>Pseudomonas moraviensis</i> 1B4T	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6					
12.	<i>Pseudomonas mandelii</i> NBRC 103147T	96,7	96,7	96,7	96,7	96,7	96,7	96,7	96,7	96,7	96,7	96,7				
13.	<i>Pseudomonas tolaasii</i> NCPPB 2192	96,5	96,5	96,5	96,5	96,5	96,5	96,5	96,5	96,5	96,5	96,5	96,5			
14.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525T	96,4	96,4	96,4	96,4	96,4	96,4	96,4	96,4	96,4	96,4	96,4	96,4	96,4	96,4	
15.	<i>Pseudomonas azotoformans</i> DSM18862	96,3	96,3	96,3	96,3	96,3	96,3	96,3	96,3	96,3	96,3	96,3	96,3	96,3	96,3	96,3
16.	<i>Pseudomonas tolaasii</i> ATCC 33618T	96,2	96,2	96,2	96,2	96,2	96,2	96,2	96,2	96,2	96,2	96,2	96,2	96,2	96,2	96,2

Lampiran 14. Tabel parameter yang diamati dan metode yang digunakan

Parameter	Satuan	Alat/Metode/Media yang digunakan	Waktu Pengamatan	Pustaka Acuan
Abiotik				
Suhu	°C	Termometer	Di lapangan	Salla, 2009
Intensitas cahaya	Lux	Luxmeter	Di lapangan	Decasy dkk., 2003
Diameter pohon	Cm	Meteran	Di lapangan	Nesper dkk, 2017
Elevasi	Dpl	GPS	Di lapangan	Lin dkk, 2015
Kelembaban relatif	%	Psikrometer	Di lapangan	Salla, 2009
Tanah				
pH-H ₂ O (1:1)		Elektroda gelas	Awal	Kerridge, 1925
C-organik	%	Walkey and Black	Awal	Walkley dan Black., 1934
Bahan organik total	%	1,74 × C-organik (%)	Awal	-
N-total	%	Kjedahl	Awal	PanReac, 2018
P-tersedia	µg/mL (mg/kg)	Bray-i	Awal	Bray dan Kurtz, 1945
Kadar air	%	Gravimetri	Awal	Blazka dan Fischer., 2014
Bakteri PGPR				
Isolasi bakteri penghasil IAA		<i>Triptic Soy Agar</i> dan penambahan triptofan 200 µg/mL	Inkubasi selama 48-72 jam	Sukmadewi dkk., 2015
Isolasi bakteri pelarut fosfat		Pikovskaya	Inkubasi selama 48-72 jam	Atlas, 2010
Isolasi bakteri penambat nitrogen		Nfb agar (<i>Nitrogen-free Bromothymol Blue</i>)	Inkubasi selama 48-72 jam	Baldani dkk., 2014
Jumlah sel bakteri	sel/gram	<i>Colony forming unit/CFU</i>		Sutton, 2011
Karakterisasi Bakteri		Pewarnaan Gram		Fawole & Oso, 2004
Konsentrasi penambat nitrogen	µg/mL (mg/L)	Nfb cair tanpa <i>Bromothymol Blue</i>	1 MSI*	Ahmad dkk., 2008, Baldani dkk., 2014
Konsentrasi hormon IAA	µg/mL (µg/mL)	<i>Triptic Soy Broth</i> dengan penambahan 200 µg/mL triptofan	Setiap 24 jam selama 3 hari (jam ke 0, 24, 48, 72)	Khalid dkk., 2004
Konsentrasi fosfat terlarut	µg/mL (µg/mL)	Pikovskaya cair dengan penambahan 0,5% trikalsium fosfat (TCP)	Inkubasi jam ke-0, 24, 48, dan 72	Chauhan dkk., 2014

Keterangan : *MSI = minggu setelah inkubasi

Lampiran 15. Tabel jadwal penelitian

No	Kegiatan	2019												2020						
		Jan	Feb	Mar	Apr	Mei	Jun	Jul	Agu	Sep	Okt	Nov	Des	Jan	Feb	Mar	Apr	Mei	Jun	
1.	Penyusunan proposal	√	√																	
2.	Seminar proposal				√															
3.	Revisi proposal				√															
4.	Preparasi alat dan bahan			√	√															
5.	Sampling tanah			√	√															
6.	Isolasi PGPR				√	√														
7.	Analisis metagenomik tanah,				√	√	√	√												
8.	Skrining PGPR									√	√	√								
9.	Identifikasi PGPR unggul secara filogenik											√	√	√						
10.	Analisis data											√	√	√						
11.	Laporan akhir penelitian												√	√	√					
12.	Penyusunan dan pendaftaran manuskrip jurnal ilmiah														√	√	√			
13.	Seminar hasil penelitian																	√		
14.	Revisi Naskah																		√	
15.	Ujian Akhir & Penjilidan																			√