

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PELARUT FOSFAT DENGAN
SEKUENS 16S rRNA ASAL TANAH PERTANIAN ORGANIK DESA
SUMBEREJO BATU**

SKRIPSI

Oleh :

**NURULLAH ALIFFIATIN NISA'
13620105**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2018**

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PELARUT FOSFAT DENGAN
SEKUENS 16S rRNA ASAL TANAH PERTANIAN ORGANIK DESA
SUMBEREJO BATU**

SKRIPSI

Diajukan Kepada: Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang untuk
Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam Memperoleh
Gelar Sarjana Sains (S.Si)

Oleh:

**NURULLAH ALIFFIATIN NISA'
NIM. 13620105**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2018**

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PELARUT FOSFAT DENGAN
SEKUENS 16S rRNA ASAL TANAH PERTANIAN ORGANIK DESA
SUMBEREJO BATU**

SKRIPSI

Oleh :

NURULLAH ALIFFIATIN NISA'

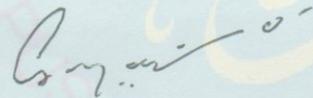
NIM. 13620105

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji :

Tanggal : Mei 2018

Dosen Pembimbing I,

Dosen Pembimbing II,



Suyono, M. P

NIP. 19710622 200312 1 002

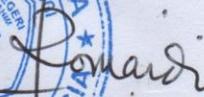


Dr. H. Ahmad Barizi, M. A

NIP. 19731212 199803 1 001

Mengetahui,

Ketua Jurusan Biologi



Romaidi, M. Si, D. Sc

NIP. 19810201 200901 1 019

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PELARUT FOSFAT DENGAN
SEKUENS 16S rRNA ASAL TANAH PERTANIAN ORGANIK DESA
SUMBEREJO BATU**

SKRIPSI

Oleh:

**NURULLAH ALIFFIATIN NISA'
NIM. 13620105**

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi dan
Dinyatakan Diterima sebagai Salah Satu Persyaratan
untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal : 04 Juli 2018

Penguji Utama : Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si
NIP. 19650509 199903 2 003

Ketua Penguji : Romaidi, M., Si., D.Sc
NIP. 19810201 200901 1 019

Sekretaris Penguji : Suyono, M.P
NIP. 19710622 200312 1 001

Anggota Penguji : Dr. H. Ahmad Barizi, M.A
NIP. 197312121998031001

Mengetahui,

Ketua Jurusan Biologi



Romaidi, M.Si, D.Sc
NIP. 19810201 200901 1 019

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nurullah Aliffiatin Nisa'

NIM : 13620105

Jurusan : Biologi

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul : Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Pelarut Fosfat Dengan Sekuens 16S rRNA Asal Tanah Pertanian Organik Desa Sumberrejo Kota Batu

Menyatakan dengan sebenar – benarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar – benar merupakan hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pusaka. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini merupakan hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut

Malang, 7 juli 2018

Yang membuat pernyataan,



Nurullah Aliffiatin Nisa'

NIM. 13620105

MOTTO

مَنْ خَرَجَ فِي طَلَبِ الْعِلْمِ فَهُوَ فِي سَبِيلِ اللَّهِ حَتَّى يَرْجِعَ

**“ Barang siapa keluar untuk mencari ilmu maka dia berada
di jalan Allah hingga ia kembali”**

(HR Tirmidzi)



HALAMAN PERSEMBAHAN

*Karya yang sederhana ini penulis persembahkan kepada:
beliau, orang tua saya yang penuh kesabaran dan semangat luar biasa dalam mendampingi dan memberikan semangat kepada saya selama ini adalah Ayah saya tercinta (Sartono) dan bidadari surga saya (Sri Aimah) yang selalu memanjatkan doa dalam setiap derai nafas hanya untuk putra-putrinya.
Kepada adikku tercinta (Desyana Fadhilatin Nafitri) semoga bisa mengambil yang baik dari apa yang Allah titipkan kepada saya dan juga terima kasih telah memberikan support dan inspirasi bagi kehidupan saya selama hampir 23 tahun ini. Tak lupa karya ini juga saya persembahkan untuk calon imam dan anak – anak ku kelak semoga apa yang sekarang ibu perjuangkan dapat menjadi inspirasi bagi keluarga kita
aamiin*

KATA PENGANTAR

Puji dan Syukur penulis panjatkan kepada kehadiran Allah yang telah memberikan nikmat yang sangat melimpah sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi sebagai salah satu sayarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si). Shalawat serta salam selalu terlimpah curahkan kepada pemimpin umat yakni Nabi besar Muhammad S.A.W yang telah menunjukkan menuju jalan kebenaran.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa dalam menyelesaikan penulisan skripsi ini telah mendapatkan banyak bantuan dan semangat dari berbagai pihak, oleh karena itu dengan segala kerendahan dan ketulusan hati, penulis ingin mengucapkan banyak terima kasih sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Romaidi, M.Si, D.Sc selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Suyono, M.P dan Dr. Ahmad Barizi, M.A selaku Dosen Pembimbing skripsi selaku konsultan yang telah banyak meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan dengan penuh kesabaran.
5. Hj. Ulfa Utami, M.Si dan Nur Kusmiyati, M.Si selaku dosen penguji yang memberikan kritik dan saran sehingga tugas akhir terselesaikan
6. Prily, M.Si selaku Dosen Wali yang telah memberikan dukungan dan semangat sehingga penulisan skripsi dapat terselesaikan.
7. Seluruh dosen, laboran dan staff Administrasi jurusan biologi yang telah membantu dan memberikan kemudahan, terimakasih atas ilmu dan bimbingannya.
8. Kedua orang tuaku Sartono, Sri Aimah dan Adik saya tercinta Desyana F.N yang telah melimpahkan doa motivasi kepada penulis.

9. Sahabat serta kakak saya tersayang M Soehul Mubarak yang selalu memberikan semangat dan motivasi kepada penulis
10. Seluruh teman Biologi angkatan 2013, khususnya teman – teman satu kelas saya di kelas D
11. Teman seperjuangan Fathiyya Nur Rachman dan Ana Faiqatul M, yang selalu menemani saya dalam perjuangan penelitian
12. Teman – teman kontrakan victy, mbak oki, mbak nurul, kak lomrah, mbak lina dan nofa yang selalu memberikan semangat dalam mengerjakan penelitian
13. Teman – teman Pondok Pesantren Yadrusu,
14. Dan teman – teman yang lain yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu

Akhirnya, penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan skripsi ini. Karenakesempurnaan hanya milik Allah. Untuk itu, sarandan kritik yang membangun sangat penulis harapkan. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi penulis khususnya dan bagi para pembaca pada umumnya. Amiin Yaa Allah Ya Rabbal'alami

Malang, Desember 2018

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	I
HALAMAN PENGAJUAN.....	II
HALAMAN PERSETUJUAN	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
HALAMAN PENGESAHAN.....	III
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
MOTTO	VI
HALAMAN PERSEMBAHAN	VII
KATA PENGANTAR.....	VIII
DAFTAR GAMBAR.....	XIII
DAFTAR TABEL	XIV
DAFTAR LAMPIRAN.....	XV
ABSTRAK	XVI
ABSTRACT	XVII
مستخلص البحث.....	XVIII
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	7
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.4 Hipotesis.....	7
1.5 Batasan Masalah.....	7
1.6 Manfaat Penelitian	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1 Kajian Al – Quran Mengenai Tanah	9
2.2 Kajian Al – Quran Mengenai Bakteri Pelarut Fosfat (BPF)	9
2.3 Peran P Bagi Tanaman	10
2.4 Peran Bakteri Pelarut Fosfat (BPF) Pada Siklus P dalam Tanah.....	13
2.5 Identifikasi Bakteri Pelarut Fosfat Melalui karakteristik Koloni Bakteri	18
2.6 Identifikasi Bakteri Pelarut Fosfat Melalui Amplifikasi Gen 16S rRNA	20

2.7	Polymerase Chain Reaction (PCR)	22
2.8	Elektroforesis Gel Agarosa	24
2.9	Analisis Sekuensing 16S rRNA	26
BAB III METODE PENELITIAN		29
3.1	Rancangan Penelitian	29
3.2	Tempat dan Waktu	29
3.3	Alat dan Bahan Penelitian	29
3.4	Prosedur Penelitian	30
3.4.1	Sterilisasi Alat Dan Bahan	30
3.4.2	Pembuatan media Phycowskaya	30
3.4.3	Pengambilan sampel	30
3.4.4	Isolasi bakteri dari tanah	31
3.4.5	Pemurnian bakteri pelarut fosfat	31
3.4.6	Identifikasi dan karakterisasi isolat Bakteri	31
3.4.6.1	Uji kualitatif bakteri pelarut fosfat (BPF) dan Pengamatan makroskopik	31
3.4.6.2	Pengamatan mikroskopik dengan pewarnaan gram	32
3.4.6.3	Identifikasi molekuler dengan sekuen 16S	33
a)	Isolasi DNA bakteri pelarut fosfat (BPF)	33
b)	Amplifikasi gen 16s Rrna dengan PCR	34
c)	Elektroforesis	35
d)	Sekuensing	35
3.5	Analisis Data	36
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		38
4.1	Isolasi bakteri pelarut berdasarkan karakteristik morfologi koloni	38
4.1.1	Pengamatan makroskopis dengan karakteristik koloni bakteri	38
4.1.2	Pengamatan mikroskopis dengan pewarnaan gram	40
4.1.3	Potensi Bakteri Pelarut Fosfat dalam Melarutkan P berdasarkan Indeks Pelarutan Fosfat (IP)	41
4.2	Identifikasi Bakteri dengan menggunakan profil DNA menggunakan sekuens 16S	42

4.2.1	Isolasi DNA bakteri.....	43
4.2.2	Hasil Amplifikasi PCR Sekuens 16 rRNA	46
4.2.3	Hasil Squensing.....	47
4.2.4	Hasil pembuatan pohon filogeni bakteri pelarut fosfat isolat PFOR1 ..	49
BAB V PENUTUP.....		53
5.1	Kesimpulan	53
5.2	Saran.....	53
DAFTAR PUSTAKA.....		54
LAMPIRAN.....		62



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Skema pelepasan P melalui proses khelasi	17
Gambar 2.2. Skema reaksi pelarutan P oleh berbagai enzim pelarut fosfat ...	17
Gambar 2.3. Siklus PCR	24
Gambar 4.1 Karakter makroskopis isolat bakteri pelarut fosfat yang diisolasi dari tanah pertanian organik desa Sumberejo Kota batu	39
Gambar 4.2 Pewarnaan gram isolat PFOR 1, PFOR 2 dan PFOR 3 menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100X	40
Gambar 4.3 Visualisasi hasil isolasi DNA genom dalam gel agarosa 1% dengan menggunakan marker 1Kb	43
Gambar 4.4 Visualisai amplikon sekuens 16 rRNA pada gel agarose 1%. dengan menggunakan marker promega ukuran 1 KB DNA Ladeer	46
Gambar 4.5 Urutan fragmen DNA hasil sequencing gen 16S rRNA Isolat FPA	48
Gambar 4.6 Konstruksi pohon filogeni dengan menggunakan Mega 6 yang analisis dengan menggunakan metode test maximum parsimony tree (s) dan diuji dengan analisis boostrap 100	50

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Karakter makroskopis isolat bakteri pelarut fosfat yang diisolasi dari tanah pertanian organik desa Sumberejo Kota batu	39
Tabel 4.2 Data indeks pelarutan fosfat dilihat dari diameter zona bening dan koloni	41
Tabel 4.3 tingkat kemurnian DNA isolat bakteri pelarut foafat isolat PFOR	44
Tabel 4.4. Identifikasi strain isolat PFOR1 hasil penjejajaran menggunakan NCBI dengan nilai identity % tertinggi	49



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Pembuatan larutan Stok	62
Lampiran 2. Skema Penelitian	64
Lampiran 3. Diagram Alir	65
Lampiran 4. Dokumentasi	68



ABSTRAK

Nisa', Nurullah Aliffiatin. 2018. **Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Pelarut Fosfat Dengan Sekuens 16s Rrna Asal Tanah Pertanian Organik Desa Sumberejo Batu**. Skripsi Jurusan Biologi. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing : (I) Suyono, M.P (II) Dr. Ahmad Barizi, M.A.

Kata Kunci : Bakteri Pelarut Fosfat, Indeks Pelarutan Fosfat, Sekuens gen 16SrRNA

Fosfor (P) merupakan unsur makro yang sangat penting bagi pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Upaya dalam meningkatkan efisiensi pelarutan fosfat, saat ini mulai dikembangkan pemanfaatan mikroba pelarut fosfat sebagai pupuk hayati, salah satunya adalah bakteri pelarut fosfat (BPF). Identifikasi bakteri dapat menggunakan analisis sifat – sifat bakteri ataupun berdasarkan karakter fenotip . Metode ini memiliki reproduibilitas yang rendah karena tergantung pada kondisi kultur di alam yang berbeda sehingga perlu dilakukan identifikasi secara genetik menggunakan sekuens 16 S rRNA. Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh isolat bakteri pelarut fosfat dari tanah pertanian organik yang kemudian diidentifikasi menggunakan sekuens 16S rRNA.

Penelitian ini adalah jenis penelitian deskriptif kualitatif. Data yang diperoleh disajikan secara deskriptif meliputi karakteristik makroskopis, mikroskopis, uji aktifitas bakteri pelarut fosfat (BPF) secara kualitatif dan identifikasi dengan menggunakan sekuens 16S yang diisolasi dari tanah pertanian organik desa Sumberejo Kota Batu

Terdapat tiga bakteri pelarut fosfat yang berhasil diisolasi dari tanah pertanian organik asal tanah desa sumber rejo batu yakni isolat PFOR 1, PFOR2 dan PFOR3. PFOR1 memiliki indeks pelarutan fosfat tertinggi yakni 3. Hasil identifikasi molekuler diketahui bahwa bakteri isolat PFOR1 merupakan kelompok spesies *Klebsiella pneumoniae* strain DSM 30104 yang merupakan satu clade dalam konstruksi pohon filogeni dengan indeks similaritas sebesar 98%.

ABSTRACT

Nisa', Nurullah Aliffiatin. 2018. Isolation and Identification of Phosphate Solubilizing Bacteria with 16s Sequences Original Land of Organic Agriculture of Sumberejo Batu Village. Thesis Department of Biology. Faculty of Science and Technology. State Islamic University (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang. Counselor: (I) Suyono, M.P (II) Dr. Ahmad Barizi, M.A.

Keywords : Phosphate Solvent Bacteria, Phosphate Dissolution Index, 16SrRNA gene Sequence

Phosphorus (P) is a very important macro element for plant growth and cultivation. Efforts to improve the efficiency of phosphate dissolution, currently began to develop the use of microbial solvent phosphate as a biological fertilizer, one of which is the bacteria solubilizing phosphate (BPF). Identification of bacteria can use bacterial properties analysis or by phenotype character. This method has a low reproducibility because it depends on different culture conditions in nature so it needs to be genetically identified using 16 S rRNA sequences. The purpose of this study was to obtain isolates of phosphate solvent bacteria from organic farming soils that were then identified using 16S rRNA sequences.

This is a descriptive qualitative research. The data obtained are presented descriptively covering macroscopic, microscopic, qualitative phosphate solvent bacterial activity (BPF) characteristics and identification using 16S sequence isolated from organic farmland Sumberejo Kota Batu

There are three phosphate solvent bacteria which have been isolated from the organic farm origin from the village land of rejo rock source ie PFOR 1, PFOR2 and PFOR3 isolates. PFOR1 has the highest phosphate dissolution index that is 3. The result of molecular identification is known that PFOR1 isolate bacteria are group of *Klebsiella pneumoniae* sains DSM 30104 which is one clade in phylogeny tree construction with similarity index equal to 98%.

مستخلص البحث

من أرض s Rrna النساء، نور الله أليفة. 2018. عزل جرثومة إذابة فوسفات وتعيينها الهوية بتسلسل 16 زراعة عضوي قرية سميرجو باتو. البحث الجامعي قسم علم الحياة. كلية العلوم والتكنولوجيا. جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف: (1) سويونو الماجستير (2) الدكتور أحمد بارزي الماجستير.

Keywords : Phosphate Solvent Bacteria, Phosphate Dissolution Index, 16SrRNA gene Sequence

16SrRNA كلمات أساسية: جرثومة إذابة فوسفات، فهرس إذابة فوسفات، تسلسل مورثة 16 فوسفور (ف) عنصر مأكرو مهم جدا لتنمية وتطور النبات. السعي لترقية فعالية إذابة فوسفات، في العصر الحاضر تطور استفاة جرثومة إذابة فوسفات الأسمدة البيولوجية، منها بجرثومة إذابة فوسفات. إثبات الجرثومة بتحليل صفات الجرثومة أو اعتمادا على شخصية النمط الظاهري. هذه الطريقة لديها قابلية إعادة الإنتاج دنيئة لأنها متعلقة بحالة الثقافة في العالم المختلف حتى الحاجة إلى إثبات وراثي بتسلسل 16 S هدف البحث نيل عزل جرثومة إذابة فوسفات من أرض زراعة عضوي ثم إثباتها بتسلسل 16 rRNA. rRNA.

هذا البحث بنوع البحث الوصفي الكيفي. البيانات المأخوذة تعرضها الباحثة وصفا الذي يحتوي S على مميزة عيانية، ومجهريية، واختبار نشاط جرثومة إذابة فوسفات كيفيا والإثبات باستخدام تسلسل 16 هناك ثلاث جرثومة إذابة فوسفات تتجح. الذي يعزل من أرض زراعة عضوية قرية سميرجو مدينة باتو ، PFOR 1، PFOR 2، الباحثة تعزليها من أرض زراعة عضوية من أرض قرية سميرجو باتو وهم عزل لديها فهرس إذابة فوسفات الأعلى وهو ثلاثة (3). نتيجة إثبات جزيني معروف أن PFOR 1 و PFOR3. PFOR 1 وهو واحد Klebsiella pneumoniae strain DSM 30104 من فرقة جنس PFOR 1 جرثومة عزل %مغطي في إقامة شجرة فيلوجيني بفهرس التشابه 98

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Fosfor (P) merupakan unsur makro yang sangat penting bagi pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Fungsi fosfor bagi tanaman dalam tingkat sel yakni sebagai komponen molekul biologi seperti DNA, RNA, ATP dan fosfolipid. Fungsi yang lain dalam tingkat makro yakni mempengaruhi perkembangan akar dan batang, kekuatan batang, dan kematangan tanaman (Sharon *et al* 2016).

Tanaman menyerap P dari tanah dalam bentuk ion fosfat, terutama bentuk H_2PO_4^- dan HPO_4^{2-} yang terdapat dalam larutan tanah. Ion H_2PO_4^- lebih banyak dijumpai pada tanah yang lebih masam, sedangkan pada pH yang lebih tinggi (>7) bentuk HPO_4^{2-} lebih dominan (Novriani. 2010).

Fosfat di dalam tanah dapat berbentuk organik dan anorganik yang merupakan sumber fosfat penting bagi tanaman. Fosfat organik berasal dari bahan organik seperti hasil penguraian makhluk hidup, sedangkan fosfat anorganik berasal dari mineral – mineral yang mengandung fosfat. Bentuk fosfat anorganik di dalam tanah mencapai 30% – 70% dari total P dalam tanah (Pierzynski *et al*, 2005)

Besarnya kemampuan tanaman memanfaatkan P dipengaruhi oleh pH tanah, temperatur, bahan organik dan waktu pemupukan. pH tanah sangat berpengaruh terhadap ketersediaan P tanah. Pada tanah masam, P bersenyawa dalam bentuk – bentuk Al-P dan Fe-P, sedangkan pada tanah basah umumnya P bersenyawa sebagai Ca-P. Adanya pengikatan – pengikatan P tersebut menyebabkan pupuk P

yang diberikan menjadi tidak efisien, sehingga perlu diberikan dalam takaran tinggi (Novriani, 2010).

Faktor Temperatur biasanya berpengaruh pada kecepatan reaksi tanah, kecepatan reaksi kimia akan mengikat dengan meningkatnya suhu. Pada tanah panas umumnya lebih banyak mengikat P jika dibandingkan dengan tanah pada iklim sedang. Iklim panas dapat menyebabkan kadar oksida hidrous Al dan Fe dalam tanah cukup tinggi, sehingga P juga banyak terikat pada logam ini (Novriani, 2010).

Semakin lama antara P dan tanah bersentuhan, semakin banyak P terfiksasi. Hal ini juga berhubungan dengan terbentuknya Al-P dan Fe-P pada tanah yang mempunyai daya fiksasi tinggi maka masa penggunaan P akan lebih pendek. Sehubungan dengan itu makan cara dan waktu pemberian pupuk pospat harus diperimbangkan (Novriani, 2010).

Sedikitnya P terlarut dalam tanah menyebabkan tanaman harus mendapatkan asupan P dari sumber lain seperti pupuk. Data asosiasi produsen pupuk indonesia menyatakan bahwa pemakaian pupuk untuk keperluan pertanian dan perkebunan dari tahun 2010 sampai 2016 terus mengalami peningkatan yakni dari 634.883 ton/ tahun sampai 865.329 ton/tahun. Namun pemupukan P ini kurang efisien dikarenakan hanya 10 – 30% saja yang dapat dimanfaatkan oleh tanaman sedangkan sisanya yakni 70 – 90% tetap di dalam tanah (Kasmita, 2010). Selain itu pemakaian pupuk juga dapat menimbulkan dampak negatif bagi lingkungan seperti menipisnya hara lain seperti: S, Ca, Mg, Zn dan Cu (Las *et al*, 2006).

Upaya dalam meningkatkan efisiensi pelarutan fosfat, saat ini mulai dikembangkan pemanfaatan mikroba pelarut fosfat sebagai pupuk hayati, salah

satunya adalah bakteri pelarut fosfat (BPF). Penggunaan mikroba pelarut fosfat sebagai pupuk hayati memiliki keunggulan antara lain hemat energi, tidak mencemari lingkungan, mampu membantu meningkatkan kelarutan P yang terjerap, menghalangi terjerapnya P oleh unsur – unsur penjerap, dan mengurangi toksisitas Al^{3+} , Fe^{3+} , dan Mn^{2+} terhadap tanaman pada tanah masam (Elfiati, 2005). Penelitian Qureshi *et al* mengungkapkan bahwa dari hasil pertumbuhan tanaman kapas yang di tanama dengan perlakuan inokulum bakteri pelarut fosfat (*Bacillus* sp.) memiliki peningkatan yang signifikan yakni 1511 kg ha-1 tanpa inokulum dan 1733 kg ha-1 dengan inokulum. Dalam penelitian lain juga disebutkan bahwa BPF (*Pseudomonas fluorescens* BAM -4 dan *Burkholderia cepacia* BAM-12) dapat meningkatkan produksi biji sampai 98% (Minaxi *et al*, 2013).

Pengkajian mengenai bakteri ini terdapat dalam Surat Al-Baqoroh Ayat 26:

إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحْيِي أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَا بَعُوضَةٌ فَمَا فَوْقَهَا.....

Artinya: Sesungguhnya Allah tiada segan membuat perumpamaan berupa nyamuk atau yang lebih rendah dari itu....(Q.S AL-Baqoroh:26)

Ash – Shiddieqi (2000) menyebutkan dalam tafsir nya bahwa *lafadz* “*innallaha laa yastahyii ay yadhriba ma-tsalam maa ba’uu-dhatan fa maa fauqaha*” memiliki makna bahwa “Tuhan tidak melihat sesuatu kekurangan dengan membuat perumpamaan kutu busuk atau perumpamaan makhluk yang derajatnya lebih rendah lagi atau yang lebih tinggi (besar) dari itu. Sebab, dialah yang menjadikan segala sesuatu, baik yang mulia maupun hina. Disini yang perlu digaris bawahi adalah kata “perumpamaan makhluk yang derajatnya lebih

rendah”. Adapun makhluk yang lebih rendah dari kutu busuk atau pun nyamuk yaitu mikoba dalam hal ini bakteri.

Dijelaskan kembali dalam lanjutan ayat tersebut yakni:

...فَأَمَّا الَّذِينَ آمَنُوا فَيَعْلَمُونَ أَنَّهُ الْحَقُّ مِنْ رَبِّهِمْ...^ط

Artinya:...maka, mereka yakin bahwa perumpamaan itu benar dari Tuhan mereka,....

Ayat tersebut memiliki makna bahwa mendengar perumpamaan tersebut, para mukmin berkata:”tentu ada hikmah dan kemaslahatan yang terkandung di dalamnya dengan perumpamaan yang dibuat Allah itu”(Ash – Shiddieqi.2000). Kata “*Hikmah dan kemaslahatan*” tersebut memiliki makna bahwa bakteri yang merupakan "makhluk yang lebih rendah dari nyamuk dan kutu busuk sebenarnya memiliki “hikmah” dalam hal ini manfaat salah satunya yaitu sebagai agen dalam melarutkan unsur fosfat atau dapat disebut bakteri pelarut fosfat (BPF).

Mekanisme mikroba dalam melarutkan fosfat dengan cara menghasilkan asam – asam organik diantaranya asam sitrat, glutamat, suksinat, laktat, oksalat, gloksalat, malat, fumarat , tartarat dan α -ketobutarat. Meningkatnya asam – asam organik tersebut akan diikuti dengan penurunan pH, sehingga mengakibatkan terjadinya pelarutan fosfat terikat oleh Ca. Selain itu asam organik juga dapat meningkatkan ketersediaan P di dalam tanah melalui beberapa mekanisme, diantaranya adalah anion organik bersaing dengan ortofosfat pada permukaan tapak jerapan koloid yang bermuatan positif, pelepasan ortofosfat dari ikatan logam-P melalui pembentukan kompleks logam organik, dan modifikasi muatan permukaan tapak jerapan oleh ligan organik (Haylin, 1999).

Penelitian Raharjo, *et al* (2007) menjelaskan bahwa beberapa bakteri pelarut fosfat diantaranya : *Bacterium subtilis*, *Bacterium mycoides* dan *Bacterium mesentericus* bakteri – bakteri tersebut mampu melarutkan FePO_4 (2,1 – 7,1%), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (3,2 – 9,6%), gliserol fosfat (3,6 – 13,2%) dan lesitin (5,7 – 21,2%). Selain itu Sharma *et al* (2013) menyebutkan bahwa *Escherichia freundii*, *Aspergillus niger*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus subtilis*, *Arthrobacter sp.*, *Bacillus firmus* B-7650, *Pseudomonas putida* M5TSA, *Enterobacter sakazakii* M2Pfe, *Bacillus megaterium* M1Pca, *Bacillus amyliliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus athrophaeus*, *Penibacillus macerans*, *Vibrio proteolyticus*, *Xanthobacter agilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aerogenes* dan *Chryseomonas luteola* dapat melarutkan fosfat dengan mekanisme yang berbeda.

Pemanfaatan BPF dinilai dapat dijadikan sebagai suatu alternatif yang sangat potensial untuk dikembangkan dalam mencari pemecahan masalah efektivitas ketersediaan P di dalam tanah sehingga perlu dilakukan isolasi dan identifikasi bakteri pelarut fosfat. Identifikasi bakteri umumnya didasarkan pada metode analisa fenotipik meliputi morfologi sel, pewarnaan gram, uji oksidasi dan uji fermentasi (Nuroniyah dan Surya, 2012).

Identifikasi bakteri dengan berdasarkan karakter fenotip memiliki kelemahan utama, yaitu kerap terjadi kesalahan dalam perbedaan spesies dan galur bakteri. Kesalahan tersebut disebabkan hadirnya karakter fenotip bakteri yang tidak biasa. Terlebih karakter fenotip bakteri tidak bersifat statis dan dapat berubah seiring dengan perubahan kondisi organisme dan lingkungan hingga menyebabkan evolusi (Ochman, 2005). Identifikasi bakteri berdasarkan karakter fenotip juga

memiliki reproduibilitas yang rendah karena tergantung pada kondisi kultur di laboratorium yang berbeda.

Kekurang akuratan identifikasi secara fenotip tersebut mendorong dilakukannya identifikasi bakteri dengan metode lain yang lebih akurat. Metode identifikasi bakteri yang banyak dilakukan adalah analisa genotip bakteri melalui pembacaan sekuen basa nitrogen pada nukleotida penyusun fragmen gen 16S rRNA bakteri. Dari beberapa pertimbangan metode ini dinilai lebih baik dibanding dengan identifikasi dengan menggunakan analisa fenotip. Pertimbangan yang pertama adalah gen 16S dari hampir seluruh spesies bakteri telah ditemukan urutan basa nitrogennya sehingga dapat dijadikan pedoman jika ditemukan spesies baru (Acinas, 2004). Pertimbangan yang kedua adalah urutan basa nitrogen gen 16S rRNA memiliki keragaman intraspesifik yang lebih rendah di bandingkan geng pengkode protein yang lain, serta sifat dari gen 16S yang lestari (Oren, 2004).

Pertanian organik merupakan sistem pertanian yang mempromosikan dan menguatkan kesehatan agroekosistem, termasuk biodiversiti siklus biologis dan kegiatan – kegiatan biologis tanah (Sebastian, 2012). Isnaeni (2006) menyatakan bawah salah satu dari kelebihan dari pertanian organik lebih banyak ditemukan bakteri pelarut fosfat dibandingkan tanah konvensional. Penelitian Ilham *et all* (2014) menyebutkan setelah dilakukan isolasi dari tanah konvensional dan organik telah diperoleh hasil bahwa tanah pertanian organik lebih banyak terdapat jenis bakteri yakni empat jenis (TOR1, TOR2, TOR3, dan TOR4) sedangkan tanah konvensional yakni dua isolat yakni (TKO1 dan TKO2).

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan tersebut peneliti melakukan penelitian dengan judul *Isolasi dan Identifikasi Molekuler (Dengan Sekuen 16s) Bakteri Pelarut Fosfat (BPF) dari Tanah Pertanian Organik Desa Sumberejo Kota Batu.*

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut jenis bakteri apa yang terbaik dalam melarutkan fosfat asal tanah pertanian organik Desa Sumber Rejo Kota Batu?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui jenis bakteri apa yang terbaik dalam melarutkan fosfat asal tanah pertanian organik Desa Sumberejo Kota Batu.

1.4 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah terdapat bakteri pelarut fosfat (BPF) dari tanah pertanian di desa Sumberejo kota Batu

1.5 Batasan Masalah

Untuk mendapatkan penelitian yang lebih terarah, maka penelitian ini perlu dibatasi sebagai berikut:

1. Bakteri pelarut fosfat (BPF) yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari tanah pertanian organik desa sumberejo kota batu.
2. Bakteri pelarut fosfat (BPF) diisolasi dari tanah disekitar akar tanaman tomat.
3. Bakteri pelarut fosfat yang diidentifikasi merupakan satu isolat terbaik dalam melarutkan fosfat
4. Penentuan potensi bakteri fosfat untuk identifikasi menggunakan metode zona bening dengan melihat nilai indeks pelarutan fosfat.

5. Analisis DNA menggunakan sekuens gen 16S rRNA yang memiliki ukuran \pm 1500 bp.
6. Primer yang digunakan adalah forward 27f (5'-agagtttgatctggctcag-3') and reverse 1525r (5'-aaggaggtgtccarcc-3').

1.6 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan mempunyai manfaat sebagai berikut:

1. Memberikan informasi kepada masyarakat tentang jenis – jenis bakteri pelarut fosfat di tanah pertanian di desa Sumberejo kota Batu dan dapat dijadikan sebagai koleksi Laboratorium Mikrobiologi.
2. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memperoleh isolat bakteri pelarut fosfat murni yang adaptif terhadap tanaman sehingga dapat di manfaatkan dalam bidang pertanian dalam melarutkan fosfat

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kajian Al – Quran Mengenai Tanah

Allah SWT dalam QS Al A'raaf ayat 58 berfirman:

وَالْبَلَدُ الطَّيِّبُ يَخْرُجُ نَبَاتُهُ بِإِذْنِ رَبِّهِ وَالَّذِي خَبثَ لَا يَخْرُجُ إِلَّا نَكْدًا كَذَلِكَ نُصَرِّفُ
الْآيَاتِ لِقَوْمٍ يَشْكُرُونَ ٥٨

Artinya: “Dan tanah yang baik, tanamannya tumbuh subur dengan seizin Allah; dan tanah yang tidak subur, tanamannya hanya tumbuh merana. Demikianlah Kami mengulang tanda – tanda kebesaran (Kami) bagi orang – orang yang bersyukur.”

Al Qurthubi dalam tafsirnya menjelaskan bahwa **الْبَلَدُ** dalam ayat tersebut diartikan sebagai tanah dan kata **الطَّيِّبُ** merupakan kata sifat yang memberikan arti tanah yang baik dan subur. Kata **خَبثَ** mengandung makna bahwa tanah tersebut dipenuhi dengan bebatuan dan kerikil, sehingga tanahnya tidak subur.

Dengan demikian sudah sepantasnya kita berfikir betapa Allah SWT telah memberikan banyak kenikmatan sebagai tanda – tanda kekuasaan-Nya dalam memenuhi makhluk-Nya, termasuk manusia.

2.2 Kajian Al – Quran Mengenai Bakteri Pelarut Fosfat (BPF)

Bakteri pelarut fosfat merupakan bakteri yang dapat mengubah fosfat organik dan anorganik yang tidak terlarut menjadi terlarut sehingga dapat dimanfaatkan oleh tanaman untuk pertumbuhan dan perkembangnya (Chen *et al*, 2006). Penelitian Fitriyanti (2017) menyebutkan bahwa yang termasuk dalam bakteri pelarut fosfat diantaranya *Pseudomonas oryzihabitans*, *P. Psychrotolerans*,

Stenotrophomonas maltophila, *Bacillus megaterium* dan *Acinetobacter baumannii*.

Hal – hal berkenaan dengan bakteri ini juga telah di jalaskan oleh Allah SWT dalam firmanNya QS. Al – Albaqarah (2) ayat 26 sebagai berikut:

إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحْيِي أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَّا بَعُوضَةً فَمَا فَوْقَهَا ۗ فَأَمَّا الَّذِينَ
 آمَنُوا فَيَعْلَمُونَ أَنَّهُ الْحَقُّ مِنْ رَبِّهِمْ ۗ وَأَمَّا الَّذِينَ كَفَرُوا فَيَقُولُونَ مَاذَا أَرَادَ
 اللَّهُ بِهَذَا مَثَلًا ۗ يُضِلُّ بِهِ كَثِيرًا وَيَهْدِي بِهِ كَثِيرًا ۗ وَمَا يُضِلُّ بِهِ إِلَّا
 الْفَاسِقِينَ

Artinya: Sesungguhnya Allah tiada segan membuat perumpamaan berupa nyamuk atau yang lebih rendah dari itu. Adapun orang-orang yang beriman, maka mereka yakin bahwa perumpamaan itu benar dari Tuhan mereka, tetapi mereka yang kafir mengatakan: "Apakah maksud Allah menjadikan ini untuk perumpamaan?". Dengan perumpamaan itu banyak orang yang disesatkan Allah, dan dengan perumpamaan itu (pula) banyak orang yang diberi-Nya petunjuk. Dan tidak ada yang disesatkan Allah kecuali orang-orang yang fasik.

Tafsir Ibnu Katsir dalam Al – Mubarak (2006) menjelaskan bahwa kata “yang lebih rendah dari itu”, menunjukkan bahwa Allah SWT kuasa untuk menciptakan apa saja, yaitu menciptakan apapun dengan objek apa saja, baik besar maupun kecil, seperti bakteri dalam hal ini adalah bakteri pelarut fosfat. Orang – orang yang beriman meyakini bahwa dalam perumpamaan penciptaan yang di lakukan Allah SWT memiliki manfaat bagi kehidupan manusia. Sebagaimana Allah SWT memiliki manfaat bagi kehidupan manusia sebagaimana bakteri pelarut fosfat.

2.3 Peran P Bagi Tanaman

Fosfat yang terdapat pada tanaman tidak akan tereduksi melainkan akan terurai menjadi senyawa – senyawa organik dan anorganik. Fosfat dalam bentuk anorganik menyusun cairan dalam sel yang berfungsi sebagai penyangga. Sedangkan dalam bentuk organik, fosfat terbentuk sebagai : (1) fosfolipida, yang

menyusun membran sitoplasma dan kloroplas; (2) fitin, yang merupakan simpanan fosfat dalam biji; (3) gula fosfat, yang merupakan senyawa antara dalam berbagai proses metabolisme tanaman; (4) nukleoprotein, komponen utama DNA dan RNA inti sel; (5) ATP, ADP, AMP dan senyawa sejenis, sebagai senyawa berenergi tinggi untuk metabolisme; (6) NAD dan NADP, keduanya adalah koenzim penting dalam proses reduksi dan oksidasi; (vii) 6 FAD dan berbagai senyawa lain, yang berfungsi sebagai pelengkap enzim tanaman (Salisbury dan Ross, 1995).

Soepardi (1983) menyatakan fosfat memiliki fungsi penting bagi tanaman diantaranya penting untuk pertumbuhan sel, pembentukan akar halus, rambut akar, memperkuat jerami agar tanaman tidak mudah rebah, memperbaiki kualitas tanaman, pembentukan bunga, buah, dan biji serta memperkuat daya tahan terhadap penyakit. Kurangnya unsur fosfat pada tanaman akan berakibat pada terhambatannya metabolisme, diantaranya dalam proses sintesis protein, yang menyebabkan terjadinya akumulasi karbohidrat dan ikatan-ikatan nitrogen. Gejala kurangnya unsur fosfat dalam tanaman dapat diamati secara visual, dengan adanya daun – daun yang akan berwarna keunguan atau kemerahan karena terbentuknya pigmen antisianin. Hal ini dikarenakan adanya akumulasi gula di dalam daun sebagai akibat terhambatnya sintesis protein. Gejala lain juga dapat diamati dengan adanya nekrosis atau kematian jaringan pada pinggir atau helai dan tangkai daun, diikuti melemahnya batang dan akar tanaman.

Mekanisme pemanfaatan P oleh tanaman yakni unsur P diambil tanaman dalam bentuk ion orthofosfat primer dan sekunder (H_2PO_4^- atau HPO_4^{2-}). Proporsi penyerapan kedua ion ini dipengaruhi pH area tanaman. Pada pH lebih rendah,

tanaman lebih banyak menyerap ion orthofosfat primer. Sedangkan pada pH yang lebih tinggi ion orthofosfat sekunder yang lebih banyak diserap tanaman. Bentuk P lain yang dapat diserap tanaman adalah *pirofosfat* dan *metafosfat*, dan P-organik hasil dekomposer bahan organik seperti *fosfolipid*, *asam nukleat* dan *phytin* (Hanafiah, 2005).

Secara fisiologis, fosfat atau P-radikal di dalam sel - sel tanaman diubah ke dalam kelompok - kelompok aseptor melalui proses fosforilasi dan menghasilkan senyawa - senyawa reaktif. Adanya fosforilasi ini, menurunkan aktivasi *barrier* (penghalang penggunaan) terhadap energi, sehingga memungkinkan terjadinya berbagai reaksi kimia dalam sel - sel tanaman terjadi melalui 3 fase, yaitu yang pertama P-anorganik diserap akar dan digabungkan ke molekul - molekul organik atau dengan P-radikal lainnya. Kedua yakni Transfosforilasi, proses transfer gugus fosforil dari senyawa - senyawa P (dari tahap (1)) ke molekul - molekul lain. Senyawa ini disebut "senyawa antartefosforilasi" (*the phosphorilated intermediate*), dan kemudian proses elepasan energi kimia melalui hidrolisis senyawa (2) ini yang akan melepaskan fosfat atau *pyrofosfat* dan energi kimiawi, atau melalui proses substitusi P-radikal pada molekul - molekul organik. Energi yang digunakan dalam perubahan fosfat ini terutama berasal dari energi potensial oksidasi - reduksi hasil metabolisme oksidatif (Hanafiah, 2005).

Sebagai hasil peran fisiologis, unsur P ini menyusun 0,2% bagian. Yang antara lain berfungsi: Sebagai komponen beberapa enzim dan protein, ATP (*adenin trifosfat*), RNA (*asam ribonukleat*), DNA (*asam deoksi ribonukleat*) dan fitin. ATP merupakan senyawa yang terlibat dalam berbagai reaksi transfer energi pada

hampir semua proses metabolisme tanaman, sehingga unsur P berperan vital dalam penyediaan energi kimiawi yang terlibat dalam produksi panas, cahaya dan gerak. Respons tanaman terhadap unsur ini terutama terlihat pada sistem perakaran, pertumbuhan secara umum, mutu dan total produksi (Jones, 1991). Fungsi lain yakni sebagai aktivator enzim, unsur P berperan dalam mengatur reaksi – reaksi enzimatik seperti pada sintesis amilose lewat pean enzim *fosforilase glukosan*, yang bersifat bolak alik (*reversible*). Sintesis ini terjadi dengan memisahkan glukosida 1,4 dalam pati dan dibantu ion fosfat (PO_4^{2-}) sebagai pengganti air (Hanafiah, 2005).

2.4 Peran Bakteri Pelarut Fosfat (BPF) Pada Siklus P dalam Tanah

Unsur fosfat di dalam tanah sebagian besar diikat oleh koloid tanah sehingga tidak dapat digunakan oleh tanaman. Pada kebanyakan tanah tropis diperkirakan hanya 25% fosfat yang dapat diserap tanaman atau 75% masih terikat oleh tanah (Susanto, 2008). Fosfat dalam tanah dapat digolongkan menjadi fosfat organik dan fosfat anorganik. Fosfat organik berasal dari humus atau bahan-bahan organik lain yang terurai sehingga melepaskan fosfat ke dalam larutan tanah. Senyawa organik terdapat dalam berbagai ikatan dengan Al, Fe, Ca dan Mn. Senyawa tersebut hanya sedikit yang larut dalam air. Fosfat yang bereaksi dengan lempung (clay) menjadi kompleks fosfat-clay yang tidak larut. Pada umumnya, dapat dikatakan bahwa P anorganik selalu lebih tinggi daripada P-organik (Rosmarkam dan Yuwono, 2002).

Senyawa fosfat organik dalam tanah antara lain adalah fosfolipida, asam suksinat, fitin (Phitin), dan inositol fosfat. Fosfat tersebut kemudian akan diuraikan oleh mikroba sehingga akan menjadi fosfat yang tersedia bagi tanaman.

Kemampuan mikrobia melakukan hidrolisis dengan cara menghasilkan enzim sehingga fosfat lepas dan P-anorganik yang dilepaskan ke dalam larutan tanah. P-anorganik yang baru lepas sering diserap lagi oleh mikrobia itu sendiri atau mikrobia lain (Immobilisasi). Jika mikrobia mati, P-organik (jaringan mikrobia) akan lepas lagi sebagai P-anorganik. P-anorganik sebagian kecil berasal dari mineralisasi bahan organik dan sebagian besar berasal dari pelapukan batuan fosfat, misalnya apatit ($(Ca_3PO_4)_2 \cdot CaF$) (Rosmarkam dan Yuwono, 2002).

Tersedianya P-organik bagi tanaman sangat dipengaruhi oleh aktivitas mikroba dalam proses mineralisasinya. Namun dalam proses mineralisasi ini P-organik yang telah terbentuk akan bersenyawa dengan bentuk – bentuk anorganik untuk membentuk senyawa yang sukar larut. Hal ini yang menyebabkan P-organik sukar digunakan oleh tumbuhan karena itu diperlukan bantuan untuk melarutkannya salah satunya adalah enzim fosfatase. Enzim fosfatase berperan utama dalam melepaskan P dari ikatan p-organik. Enzim ini biasanya banyak dihasilkan oleh bakteri tanah yang bersifat heterotrof. Aktivitas fosfatase dalam tanah meningkat dengan meningkatnya C-organik, tetapi juga dipengaruhi oleh pH, kelembapan, temperatur, dan faktor lainnya. Dalam kebanyakan tanah, total P-organik sangat berkorelasi dengan C-organik tanah, sehingga mineralisasi P meningkat dengan meningkatnya total C-organik. Semakin tinggi C-organik dan semakin rendah P-organik maka semakin meningkat immobilisasi P. p-anorganik dapat diimmobilisasi menjadi P-organik oleh mikroba dengan jumlah yang bervariasi antara 25-100% (Havlin *et al.*, 1999).

Asam organik yang dihasilkan oleh bakteri pelarut fosfat juga dalam meningkatkan ketersediaan P didalam tanah melalui beberapa mekanisme,

diantaranya adalah (a) anion organik bersaing dengan ortofosfat pada permukaan tapak jerapan koloid yang bermuatan positif; (b) pelepasan ortofosfat dari ikatan logam P melalui pembentukan kompleks logam organik; (c) modifikasi muatan tapak jerapan oleh ligan organik (Havlin, 1999).

Ketersediaan P-organik sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya: (a) pH tanah; (b) aluminium, besi dan mangan larut; (c) adanya mineral yang mengandung besi, aluminium, dan mangan; (d) tersedianya kalsium; (e) jumlah dan tingkat dekomposisi bahan organik; dan (f) kegiatan jasad mikro. Empat faktor pertama berhubungan satu sama lain, karena semuanya bergantung dari keasaman tanah (Soepardi, 1983).

P-anorganik dalam bentuk padat biasanya dibagi menjadi tiga bagian aktif dan dua bagian yang nisbi tak aktif. Bagian yang aktif dapat dikelompokkan ke dalam fosfat terikat kalsium (Ca-P), fosfat terikat aluminium (Al-P), dan fosfat terikat besi (Fe-P). Bagian yang nisbi tak aktif adalah yang terdapat dalam bentuk terserap dan dalam bentuk larut dalam pereduksi (Sanchez, 1992).

P-anorganik di dalam tanah pada umumnya berasal dari mineral flour apatit $\{Ca_{10}(PO_4)_6F_2\}$. Dalam proses hancuran iklim dihasilkan berbagai mineral P sekunder seperti hidroksi apatit, karbonat apatit, klor apatit, dan lain-lain sesuai dengan lingkungannya. Selain itu, ion-ion fosfat dengan mudah dapat bereaksi dengan ion Fe^{3+} , Al^{3+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , ataupun terjerap pada permukaan oksida-oksida hidrat besi, aluminium, dan liat (Premono, 1994).

Pada tanah masam, kelarutan Al dan Fe menjadi tinggi. Dengan demikian, ion fosfat ($H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}) akan segera terikat membentuk senyawa P yang kurang tersedia bagi tanaman. Bila pH tanah dinaikkan, maka P

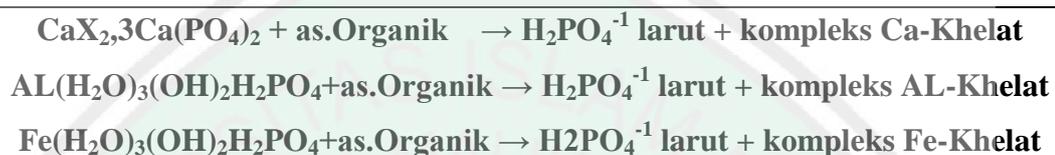
akan berubah menjadi tersedia kembali. Pada pH di atas netral, P juga kurang tersedia bagi tanaman karena diikat oleh Ca menjadi senyawa yang kurang tersedia. Unsur tersebut akan tersedia kembali bila pH diturunkan. Jadi ketersediaan P sangat dipengaruhi oleh pH tanah (Havlin *et al.*, 1999).

Bakteri pelarut fosfat (BPF) adalah kelompok mikroorganisme tanah yang mampu melarutkan P terfiksasi tanah dan mengubahnya menjadi bentuk tersedia untuk diserap tanaman (Keneni *et al.*, 2010). Mikroba ini berpartisipasi dalam pelarutan P-organik melalui produksi CO₂ dan asam – asma organik. Mikroba yang terlibat umumnya bakteri spesies *Pseudomonas* dan *Bacillus*. Salah satunya *Bacillus megaterium* var. *Phosphaticum* telah digunakan secara luas sebagai inokulan bakterial disebut phosphobacterin.

Pseudomonas yang diketahui dapat membantu pertumbuhan tanaman terutama *p. fluorescens* dan *p. Putida*. Beberapa mekanisme *Pseudomonas* dalam mempengaruhi tanaman antara lain (Hanifah, 2007) Dengan menghambat pertumbuhan patogen atau atogen minor, melalui produksi plant growth promoting substances (PGPS) seperti auksin, giberelin dan vitamin, melalui produksi senyawa pelarut fosfat seperti α -ketoglukonik, Produksi asam – asam organik yang dapat mengubah P-tidak larut seperti apatit (Ca(PO)) menjadi monofosfat yang larut, Dan memproduksi enzim fosfatase.

Mekanisme BPF dalam melarutkan P tanah terjadi karena adanya sekresi asam organik berupa asam formiat, asetat, propionat, laktat, glikolat, fumarat, suksinat, oksalat, tartrat, sitrat, dan ketoglutarat serta kemampuan bakteri tersebut dalam menghasilkan enzim fosfatase dan fitase (Illmer *et al.*, 1995). Asam-asam organik tersebut akan membentuk khelat organik dari

Al, Fe, dan Ca dengan reaksinya terhadap AlPO_4 , FePO_4 , dan $\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$ sehingga ion $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ bebas dan larut serta tersedia untuk tanaman. Mekanisme pengikatan Al, Fe, dan Ca oleh gugus fungsi dari komponen organik adalah karena adanya satu gugus karboksil dan satu gugus fenolik, atau dua gugus karboksil yang berdekatan bereaksi dengan ion logam (Rao, 1994). Skema pelepasan P melalui proses khelasi dapat digambarkan pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1. Skema pelepasan P melalui proses khelasi (Rao, 1994)

Peningkatan kadar asam organik juga menyebabkan turunnya pH rizosfer sehingga ion P dapat larut dan tersedia bagi tanaman. Selain fosfatase dan fitase, BPF juga menghasilkan enzim lain yang mampu menghasilkan P bebas, yaitu firofosfatase, dan metafosfatase (Mehrvars dan Chaichi., 2008). Skema pelarutan P oleh beberapa enzim pelarut P digambarkan pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2. Skema reaksi pelarutan P oleh berbagai enzim pelarut fosfat

Pelarutan P juga dapat dilakukan oleh mikroorganisme yang tidak menghasilkan asam organik, yaitu melalui mekanisme pelepasan proton (ion H^+) pada proses respirasi, asimilasi amonium (NH_4^+), dan adanya kompetisi antara anion organik dengan ortofosfat pada permukaan koloid yang dapat

menyebabkan terjadinya motilitas ortofosfat dalam media cair. Menurut Illmer *et al.* (1995), *Pseudomonas* sp. dan *Pseudomonas aurantiogenum* adalah jenis bakteri yang lebih efektif melarutkan P dalam bentuk Ca-P seperti apatit dan brushit.

Pemanfaatan BPF sebagai pupuk hayati dilakukan dengan cara menambahkan isolat BPF ke lahan pertanian yang umumnya dilakukan pada rizosfer tanah dengan menggunakan media pembawa. Hal ini bertujuan untuk membantu mempercepat proses penyediaan nutrisi utama bagi tanaman khususnya P tersedia tanah sehingga mampu meningkatkan pertumbuhan tanaman. BPF sebagai pupuk hayati dapat diaplikasikan bersama dengan pupuk anorganik dan pupuk organik lainnya dengan tujuan untuk mempercepat penyerapan dan menjaga ketersediaan nutrisi (Simanungkalit *et al.*, 2006). Selain itu, beberapa BPF juga dapat berperan sebagai biokontrol yang dapat meningkatkan kesehatan akar dan pertumbuhan tanaman (Arshad dan Frankenberger, 1993).

2.5 Identifikasi Bakteri Pelarut Fosfat Melalui karakteristik Koloni Bakteri

Identifikasi bakteri melalui karakteristik koloni bakteri merupakan metode identifikasi dengan menggunakan penampakan yang dihasilkan oleh koloni bakteri tersebut. Menurut Dwijoseputro (1989) menyatakan bahwa dalam identifikasi bakteri berdasarkan morfologinya dapat diamati dengan beberapa parameter diantaranya (1) bentuk koloni (dilihat dari atas penampakan): berupa bulat (*circulair*), berbenang (*filamentus*), tak teratur (*irreguler*), serupa akar (*rhizoid*), dan serupa kumparan (*spindle*); (2) permukaan koloni/ elevasi (dilihat dari samping): rata (*flat*), timbul – dasar (*raised*), timbul melengkung (*convex*);

(3) tepi koloni (di lihat dari atas): utuh (*entire*), berombak (*lobate*), bergerigi (*serrate*), berbenang (*filamentous*), keriting (*undulate*); (4) warna koloni: keputih – putihan, kelabu, kekuning – kuningan atau hampir bening.

Menurut Hidayat *et al* (2006) bahwa bentuk koloni dari suatu bakteri dipengaruhi oleh umur dan syarat pertumbuhan tertentu. Variasi dan karakteristik bakteri juga dipengaruhi oleh faktor biotik dan abiotik. Ilyas (2001) juga menyebutkan bahwa faktor makanan (medium tumbuh) dan suhu (minimum, maksimum dan optimal). Perbedaan warna koloni yang tampak menunjukkan bahwa setiap bakteri memiliki pigmen yang berbeda pula. Savitri (2006) menyebutkan bahwa pigmen yang terdapat pada bakteri diantaranya adalah pigmen karotenoid, antosianin, melanin, *Tripilmetene* dan *Phenazin*. Masing – masing dari pigmen tersebut akan memberikan warna yang berbeda beda. Warna merah dan kuning pada bakteri disebabkan adanya karotenoid. Melanin memberikan warna coklat, hitam dan jingga sedangkan *Tripirilmethenes* adalah pigmen yang dihasilkan oleh *Serratia mercescens* dan *phenazin* memberikan warna jingga kuning, jingga tua, dan merah jingga.

Miladiarsi (2017) menyebutkan bahwa dalam penelitiannya telah memperoleh isolat bakteri pelarut fosfat memiliki ciri karakteristik koloni yang berbeda - beda. Isolat tersebut diantaranya memiliki ciri bentuk bulat, tepian licin elevasi timbul dan warna putih merupakan ciri dari bakteri *Burkholderia cepacia*. sedangkan isolat dengan ciri bentuk bulat, tepian licin, elevasi timbul dan warna krem merupakan *Enterobacter cloaca*.

2.6 Identifikasi Bakteri Pelarut Fosfat Melalui Amplifikasi Gen 16S rRNA

Identifikasi mikroorganisme dalam bidang mikrobiologi secara konvensional dilakukan melalui metode pembiakan dan dilanjutkan dengan pemeriksaan karakteristik fisiologis dan biokimia. Metode ini membutuhkan waktu yang lebih lama. Sehingga Saat ini telah dikembangkan metode identifikasi berbasis molekuler yang lebih cepat dengan tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi, yaitu dengan analisis sekuensing gen 16S rRNA (16S ribosomal Ribonucleic acid/Asam ribonukleat pengkode ribosom 16S, S menyatakan Svedberg, yaitu satuan ukuran ribosom). Gen 16S rRNA juga sering disebut sebagai 16S rDNA (16S ribosomal deoxyribose nucleic acid), namun menurut konsensus dari American Society for Microbiology (ASM), istilah 16S rRNA dinilai lebih tepat (Amman RI *et al*, 1995; Clarridge, 2004).

Gen pengkode RNA ribosomal (rRNA) adalah gen yang paling lestari (conserved). Porsi sekuens rDNA dari tiap organisme yang secara genetik berkorelasi umumnya adalah sama. Dengan demikian setiap organisme yang memiliki jarak kekerabatan tertentu dapat disejajarkan sehingga lebih mudah untuk menentukan perbedaan dalam sekuens yang menjadi ciri khas organisme tersebut. Daerah yang lestari ini juga yang menyebabkan gen ini dapat digunakan sebagai primer universal yang digunakan dalam Polymerase Chain Reaction (PCR) serta dapat ditentukan urutan nukleotidanya melalui sekuensing (Lau *et al*, 2002).

Gen pengkode rRNA digunakan untuk menentukan taksonomi, filogeni (hubungan evolusi) serta memperkirakan jarak keragaman antar spesies (rates of species divergence) bakteri. Perbandingan sekuens rDNA dapat menunjukkan

hubungan evolusi antar organisme. Penggunaan sekuens 16S rRNA dipelopori oleh Carl Woese, yang juga menemukan klasifikasi 3 domain terbesar makhluk hidup, yaitu bakteri, archaea dan eukaria (Cai *et al*,2003).

Gen pengkode rRNA adalah gen yang mampu mempertahankan kelestariannya selama jutaan tahun keanekaragaman evolusi. Sebagian besar prokariot memiliki 3 jenis rRNA, yaitu 5S (120 bp, diribosom subunit besar), 16S (1500 bp, diribosom subunit kecil) dan 23S (2900 bp, diribosom subunit kecil) Penggunaan 5S rRNA juga sudah dipelajari namun gen ini terlalu kecil untuk digunakan dalam penentuan filogenetik. Gen 16S dan 23S rRNA memiliki ukuran yang cukup untuk dianalisis. Gen 16S rRNA berukuran sekitar 1550 pasang basa dan sekitar 500 basa di bagian ujung sekuens merupakan daerah yang disebut dengan hypervariable region. Daerah ini merupakan bagian yang membedakan antar organisme. Primer yang digunakan dalam amplifikasi sekuens akan mengenali daerah yang lestari dan mengamplifikasi hypervariable region, dengan demikian akan diperoleh sekuens yang khas pada organisme tersebut. Tabel 2 menunjukkan sekuens DNA dari Beberapa organisme mewakili tiga kelompok besar, yaitu bakteri, eukariot dan archea. Sekuens tersebut menunjukkan adanya kesamaan dan perbedaan sejumlah basa Clarridge, 2004).

Tabel 2. Sekuens DNA beberapa Organisme (Clarridge, 2004)

human	GTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGCTGCAGTAAAAAG
yeast	GTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTAAAAAG
corn	GTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTAAAAAG
Escherichia coli	GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTAAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCG
Anacystis nidulans	GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGGAGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCG
Thermotoga maritima	GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTACCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGG
Methanococcus vannieli	GTGCCAGCAGCCGCGTAATACCGACGGCCCGAGTGGTAGCCACTCTTATTGGGCCTAAAGCG
Thermococcus celer	GTGGCAGCCGCGCGTAATACCGGGCCCGAGTGGTGGCCGCTATTATTGGGCCTAAAGCG
Sulfolobus sulfotaricus	GTGTCAGCCGCGCGTAATACCGCTCCGCGAGTGGTCCGGGTGATTACTGGGCCTAAAGCG

Gen 16S rRNA adalah salah satu gen yang telah dikarakterisasi dengan baik sehingga digunakan dalam identifikasi mikroorganisme. Ribuan sekuens dari berbagai isolat klinis dan dari lingkungan telah terkumpul di satu database yaitu National Center for Biotechnology Information (NCBI) yang dapat diakses pada www.ncbi.nlm.nih.gov, serta Ribosomal Database Project yang dapat diakses di www.cme.msu.edu/RDP/html/index.html. Database ini juga menyediakan aplikasi yang dapat digunakan untuk membandingkan sekuens yang diperoleh dengan sekuens yang telah terdaftar di database tersebut (Lau, 2002).

Sejak ditemukan pertama kali oleh Woese, sekuens 16S rDNA semakin banyak digunakan. Pada tahun 1980-an telah dikembangkan standar terbaru dalam mengidentifikasi bakteri. Penelitian Woese menunjukkan bahwa sifat yang conserved dari gen 16S rRNA diduga disebabkan karena peran yang sangat esensial dari gen ini terhadap fungsi sel. Pada gen-gen yang mengkode enzim, mutasi dapat terjadi lebih sering dan umumnya dapat ditolerir oleh sel karena hanya menyebabkan perubahan struktur dan biasanya tidak memegang peranan yang krusial seperti halnya rRNA. Pada bakteri, jika terdapat gen yang mengkode enzim yang dibutuhkan untuk penggunaan laktosa, maka bakteri dapat menggunakan gula lain atau protein sebagai sumber energi (Clarridge, 2004).

2.7 Polymerase Chain Reaction (PCR)

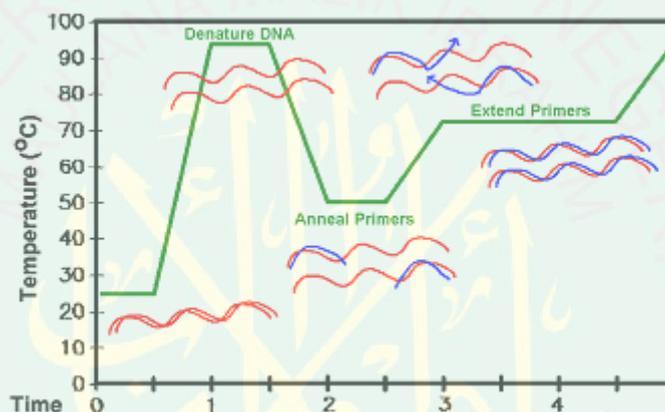
Polymerase Chain Reaction (PCR) atau disebut reaksi rantai polimerase adalah suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuens nukleotida tertentu atau DNA dengan cara *in vitro* (Yuwono, 2006). Sejak ditemukan oleh Kary Mullis pada tahun 1983, teknik ini

telah melahirkan bermacam teknik berbasis PCR lainnya yang sangat bervariasi. Protokol dasar PCR adalah sebagai berikut: yang pertama DNA utas ganda didenaturasi pada suhu 95°C sehingga membentuk DNA utas tunggal yang berfungsi sebagai cetakan. kemudian DNA utas tunggal yang pendek (disebut primer) berikatan dengan DNA cetakan pada temperatur rendah. Ikatan primer terjadi pada utas yang komplementer dengan cetakan pada daerah ujung batassekuen DNA target. Suhu ditingkatkan menjadi 72°C sehingga enzim DNA polimerase dapat melakukan sintesis DNA membentuk utas ganda DNA baru. Dan utas ganda DNA yang baru disintesis, didenaturasi pada suhu tinggi dan siklus berulang.

Tujuan dari PCR adalah untuk membuat sejumlah besar duplikasi suatu gen. Hal ini diperlukan agar diperoleh jumlah DNA cetakan awal yang cukup untuk sekuensing DNA ataupun untuk memperoleh material genetik yang diperlukan dalam proses rekayasa genetik. Tahapan pengerjaan PCR secara umum terdiri dari isolasi DNA/RNA, pengecekan integritas isolat DNA/RNA secara spektrofotometri atau elektroforesis, pencampuran komponen reaksi PCR pemrograman mesin PCR pada kondisi optimum, amplifikasi reaksi dan deteksi atau evaluasi hasil reaksi (Sari, 2006).

Reaksi PCR suatu fragmen DNA dimulai dari tahap denaturasi DNA cetakan. Denaturasi ini akan menyebabkan DNA yang semula rantai ganda akan terpisah menjadi DNA rantai tunggal. Denaturasi DNA menggunakan pemanasan pada suhu 90°C hingga 95°C. Kemudian dilanjutkan dengan tahap penempelan primer pada DNA cetakan yang rantai tunggal. Penempelan primer terjadi pada DNA target untuk mendefinisikan sekuen yang diinginkan. Suhu pada

tahap ini dipengaruhi oleh jumlah G+C dan A+T di dalam primer yang digunakan dan konsentrasi amplifikasi primer. Setelah dilakukan penempelan primer, suhu inkubasi dinaikkan hingga 72°C . Pada suhu ini akan terjadi polimerisasi rantai DNA yang baru pada DNA target. DNA baru hasil polimerisasi tersebut akan berfungsi sebagai cetakan bagi reaksi polimerisasi selanjutnya. Tiga prinsip tahap reaksi tersebut dapat dilakukan 20 hingga 40 kali sehingga pada akhir dari PCR akan didapatkan DNA baru dalam jumlah banyak (Yuwono, 2006). Siklus PCR dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2.3. Siklus PCR

2.8 Elektroforesis Gel Agarosa

Elektroforesis adalah suatu teknik pemisahan molekul selular berdasarkan atas ukurannya, dengan menggunakan medan listrik yang dialirkan pada suatu medium yang mengandung sampel yang akan dipisahkan (Yuwono, 2005). Teknik elektroforesis selalu memiliki dua komponen utama, yaitu medium penyangga (kertas atau gel) dan larutan bufer. Fungsi medium penyangga adalah sebagai reseptor titik dari senyawa-senyawa yang akan dipisahkan dan menyediakan jalur bagi migrasi komponen. Sedangkan fungsi bufer

sebagai konduktor arus, yaitu jembatan konduksi di antara dua elektroda, sehingga memungkinkan terjadinya aliran medan listrik dan menstabilkan pH. Untuk elektroforesis DNA dapat digunakan bufer Tris-asetat-EDTA (TAE) dan Trisborate-EDTA (TBE) (Sari, 2006).

Elektroforesis DNA akan lebih baik menggunakan medium penyangga berupa gel buatan seperti poliakrilamida atau agarosa. Gel agarosa lebih mudah dalam preparasinya daripada poliakrilamida. Konsentrasi gel agarosa yang digunakan dalam elektroforesis bervariasi antara 0.5%-2%. Biasanya gel agarosa dengan konsentrasi 0.8%-1% sangat baik untuk memisahkan fragmen DNA berukuran 1-20.000 pasang basa. Gel agarosa dengan konsentrasi kurang dari 0.5% sangat rapuh dan sulit ditangani. Hasil elektroforesis DNA dapat divisualisasikan dengan mewarnai gel (staining) yang berisi DNA menggunakan Etidium Bromida (EtBr) selama 5-10 menit kemudian dilanjutkan dengan pencucian dalam akuades (destaining) selama 5-10 menit yang bertujuan untuk menghilangkan EtBr yang berikatan secara tidak spesifik pada bagian gel yang tidak terdapat DNA. Selanjutnya pita-pita DNA dapat dilihat dengan sinar ultraviolet (UV). Etidium Bromida dapat menangkap sinar UV, sehingga DNA yang terikat dengan EtBr dapat terlihat pendarannya di transilluminator (Sari, 2006).

Asam deoksiribonukleat merupakan molekul bermuatan negatif, sehingga jika diletakkan di medan listrik, DNA akan bermigrasi dari kutub negatif ke kutub positif. Sebelum dilakukan elektroforesis, suspensi DNA harus dicampur dengan muatan pewarna (loading buffer). Pewarna yang biasa digunakan adalah

bromofenol biru dan xilen sianol yang mengandung sukrosa sebagai pemberat (Sari, 2006).

2.9 Analisis Sekuensing 16S rRNA

Metode sekuensing telah mengalami perkembangan yang cukup pesat. Perkembangan teknologi saat ini telah memungkinkan dilakukannya analisis terhadap jutaan sekuens DNA per tahun. Kualitas analisis sekuensing sangat tergantung pada faktor kecepatan prosedur kerja dan teknologi yang digunakan. Identifikasi mikroorganisme penyebab infeksi dilakukan dengan menumbuhkan bakteri dari berbagai spesimen klinis pada media tertentu (Clarridge, 2004).

Pada metode mikrobiologi konvensional membutuhkan waktu yang lama pada saat identifikasi berdasarkan karakteristik fisiologis dan biokimianya sedangkan pada identifikasi berbasis molekuler melalui analisis sekuensing, waktu yang dibutuhkan jauh lebih singkat. Langkah analisis sekuensing dimulai dengan mengisolasi DNA dari kultur bakteri, baik kultur padat maupun cair. DNA yang diperoleh akan dijadikan sebagai cetakan dalam tahap amplifikasi dengan PCR.. Primer yang digunakan dalam PCR adalah primer 16S rRNA yang bersifat universal berukuran sekitar 1500 pb, sehingga dapat mengamplifikasi daerah 16S rRNA dari seluruh bakteri. Produk PCR dimurnikan terlebih dahulu dengan menggunakan kit komersial untuk menghilangkan sisa-sisa primer serta fragmen nukleotida (Cai, 2003).

Produk PCR yang telah dimurnikan ditentukan urutan nukleotidanya dengan metode sekuensing. Pada tahap sekuensing produk PCR dengan ukuran tertentu digunakan sebagai cetakan. Primer pada tahap PCR juga digunakan

dalam sekuensing, hanya saja masing-masing primer digunakan secara terpisah dalam satu siklus sekuensing (forward saja atau reverse saja). Berbeda dengan PCR, produk yang dihasilkan dari sekuensing memiliki ukuran yang berbeda-beda. Hal ini disebabkan karena pada sekuensing ditambahkan ddNTP (dideoxyribonuclease Triphosphat) atau dNTP terminator yang dilabel dengan zat warna. Terminator ini pada satu siklus akan berikatan secara acak dan menghentikan proses pembacaan. Pada tiap basa terminator (ddATP, ddGTP, ddCTP, atau ddTTP), terdapat zat warna fluoresen yang dapat menyerap panjang gelombang yang berbeda sehingga basa terminator akan dapat dibaca dengan fluorometri (Amman, 1995).

Sekuens DNA terbentuk dari hasil pensejajaran pembacaan primer reversedan forward dan umumnya disebut sebagai sekuens konsensus (consensus sequence). Sekuens konsensus ini kemudian dibandingkan dengan data sekuens yang tersedia di database menggunakan software tertentu. Beberapa sistem dapat menentukan urutan nukleotida melalui pembacaan satu primer, namun pembacaan dengan dua primer memberikan hasil yang lebih akurat. Beberapa database yang dapatdigunakan untuk membandingkan sekuens 16S rRNA antara lain GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Ribosomal Database Project (RDP-II) (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>), Ribosomal Database Project European Molecular Biology Laboratory (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>), Smart Gene IDNS (<http://www.smartgene.ch>) dan Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms (RIDOM) (<http://www.ridom.com/>) (Fox, 1994).

Penggunaan klinis sangat penting untuk dipertimbangkan apakah diperlukan sekuensing dari keseluruhan gen (sekitar 1500 pb). Sekuensing

keseluruhan gen dapat digunakan untuk membedakan strain dari suatu mikroorganisme. Dalam penemuan spesies baru, sekuensing keseluruhan gen 16S rRNA sangat diperlukan. Pada sebagian besar isolat klinis bakteri, fragmen pendek, yaitu 500 pb di bagian awal gen 16S rRNA dinilai sudah cukup informatif dalam mengidentifikasi. Kattar et al menyatakan bahwa spesies dari *Bordetella* sp dapat ditentukan dari sekuens DNA di bagian awal gen 16S rRNA yang dimilikinya (Fox, 1994).



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah jenis penelitian deskriptif kualitatif. Data yang diperoleh disajikan secara deskriptif meliputi karakteristik makroskopis, mikroskopis, uji aktifitas bakteri pelarut fosfat (BPF) secara kualitatif dan identifikasi dengan menggunakan sekuen 16S yang diisolasi dari tanah pertanian organik desa Sumberejo Kota Batu.

3.2 Tempat dan Waktu

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Februari sampai November 2017 bertempat di Laboratorium Mikrobiologi dan Genetik Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pengambilan sampel tanah dilakukan di daerah pertanian organik Desa Sumber Rejo Kota Batu.

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain; autoklaf, hot plate, stirer, beaker glass, sekop, penggaris, oven, latek, masker, bunsen, vortek, cawan petri, tube, tabung reaksi, rak tabung reaksi, inkubator, spatula, neraca analitik, pipet, enlemeyer, ose, cawan petri, jangka sorong, tabung ependorf, termometer, lemari es, kaca benda, objek glass, pcr, elektroforesis, mikro pipet, sentrifuse, tib, tube, water bath, lampu led dan nano drop

Sedangkan bahan – bahan yang digunakan dalam praktikum ini sebagai berikut; Kasa, kapas, aquades, alumuniumfoil, media phykovskaya, tanah,

plastik, karet, kertas, korek api, plastik wrab, larutan fisiologis, tusuk gigi, ragen pewarnaan gram (meliputi kristal violet, iodim, etanol 95% dan safranin), reagen H₂O₂, buffer TE, SDS 10%, proteinase-K, 5M NaCl, 10% CTAB/NaCl, campuran phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1), etanol 70%, Primer forward 27f (5'-agagtttgatcmtggctcag-3') and reverse 1525r (5'-aaggagggtgwtccarcc-3') 1% agarose, 1x buffer TAE (0,24 gr agarose dalam 30 ml 1xTAE) (50x trisasetat EDTA (TAE):1 l dH₂O, 242 gr Trisbasa, 37,2 gr Na₂EDTA, 57,1 ml asam asetat glasial).

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Sterilisasi Alat Dan Bahan

Semua alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian disterilisasikan terlebih dahulu dengan cara mencucinya, dikeringkan kemudian dibungkus dan dimasukkan kedalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi (*per square inci*) selama 30 menit.

3.4.2 Pembuatan media Phycowskaya

Media yang digunakan dalam isolasi bakteri pelarut fosfat adalah media phycowskaya. Ditimbang bahan – bahan dengan takaran sebagai berikut (10g glukosa, 0,5 ekstrak yeast, 0,5 (NH₄)₂SO₄, 0,1 MgSO₄.7H₂O, 5 Ca₃(PO₄)₂, 0,2 KCl, 0,002 MnSO₄.2H₂O, 0,002 FeSO₄.7H₂O dan 20 Agar). Dimasukkan bahan – bahan tersebut kedalam beaker glass yang berisi satu liter aquades kemudian dipanaskan diatas hot plate dengan suhu 150 dan di stirer sampai homogen (Sharon, 2016).

3.4.3 Pengambilan sampel

Metode yang digunakan dalam pengambilan sampel adalah metode *composite sampling* (Hyde. 2009). Diambil lima titik pengambilan sampel secara

acak. Pengambilan sampel tanah dilakukan pada jarak 8 cm dari pangkal akar dengan kedalaman 15 cm di sekitar perakaran tanaman. Tanah kemudian dikompositkan dan dimasukkan kedalam alumunium foil lalu di bawa ke laboratorium.

3.4.4 Isolasi bakteri dari tanah

Isolasi bakteri dilakukan dengan metode pengenceran (*dillution method*) (Waluyo, 2008). Sampel tanah ditimbang sebanyak 1 gram dan dimasukkan kedalam tube. Kemudian dilarutkan dalam 1 ml air aquades steril dan dihomogenkan dengan menggunakan vortex (Sharon, 2016). Selanjutnya diambil 1ml larutan dari tube kedalam 9 ml akuades steril pada tube lain sehingga diperoleh tingkat pengenceran 10^1 . Prosedur kerja diatas diulangi terus menerus hingga tingkat pengenceran mencapai 10^9 .

3.4.5 Pemurnian bakteri pelarut fosfat

Pemurnian bakteri pelarut fosfat dilakukan dengan cara mengambil masing – masing isolat bakteri dari beberapa koloni yang memiliki ciri yang berbeda. Isolat dari beberapa koloni yang tumbuh diambil dengan menggunakan jarum ose secara aseptis dan digoreskan pada media phykovskaya. Media tersebut diinkubasi selama 72 jam pada suhu 30°C sehingga didapatkan isolat murni (Purwaningsih, 2003).

3.4.6 Identifikasi dan karakterisasi isolat Bakteri

3.4.6.1 Uji kualitatif bakteri pelarut fosfat (BPF) dan Pengamatan makoskopik

Bakteri pelarut fosfat (BPF) hasil purifikasi di karakterisasi secara morfologi dengan melakukan pengamatan terhadap koloni BPF meliputi bentuk, tepian, elevasi, dan warna sesuai prosedur Hadioetomo (1993). Kemudian

dilakukan uji kualitatif bakteri pelarut fosfat (BPF) secara kualitatif dengan melihat zona bening pada media Phykovskaya.

Pengujian karakterisasi dan uji kualitatif dilakukan dengan membuat larutan fisiologis 0,75%. Kemudian dimasukkan dalam tabung *Eppendorf* sebanyak 20 µl. Sebanyak 1 ose kultur isolat BPF yang telah ditumbuhkan pada medium Phykovskaya padat, dimasukkan ke dalam tabung *Eppendorf* yang telah berisi larutan fisiologis dengan menggunakan tusuk gigi, kemudian dihomogenkan. Setelah itu diambil sebanyak 10µl menggunakan mikropipet kemudian diteteskan di atas medium phykovskaya padat secara steril, dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang. Pengamatan dilakukan selama 7 hari inkubasi dengan mengamati bentuk, tepian, elevasi dan warna.

Uji kualitatif dilakukan dengan mengukur zona bening yang terbentuk pada masing – masing isolat yang terdapat pada media phykovskaya. Dihitung diameter dan zona bening dan indeks pelarutan (IP) pada masing – masing koloni bakteri pelarut fosfat (BPF) yang menghasilkan zona bening. Dengan rumus sebagai berikut (sharon 2016):

$$\text{Indeks Pelarutan Fosfat (mm)} = \frac{\text{diameter koloni} + \text{zona bening}}{\text{diameter koloni}}$$

3.4.6.2 Pengamatan mikroskopik dengan pewarnaan gram

Pengamatan mikroskopik dilakukan dengan pengamatan gram. Pengujian pewarnaan dilakukan dengan menggunakan metode Waluyo (2010). Dibuat preparat ulas dari beberapa isolat mikroba, kemudian dipanaskan di atas api. Selanjutnya

diberi kristal violet dan didiamkan selama 1 menit, bilas dengan air. Setelah kering tambahkan larutan iodium dan diamkan selama 2 menit kemudian bilas dengan air. Cuci dengan etanol 95%, tetes demi tetes selama 30 detik atau sampai zat warna ungu kristal tidak terlihat lagi mengalir dari kaca bening.

Cuci dengan air lalu tiriskan. Kemudian ditambahkan safrani dan ditunggu selama 30 detik lalu bilas dengan air. Tiriskan kaca bening dan serap kelebihan air pada olesan dengan menekan kertas sepi hati – hati keatasnya. Kemudian diamati dibawah mikroskop dengan lensa bening mulai kekuatan rendah

3.4.6.3 Identifikasi molekuler dengan sekuens 16S

Identifikasi isolat bakteri pelarut fosfat (BPF) dilakukan berdasarkan hasil sekuensing gen 16S rRNA . identifikasi tersebut terdiri dari beberapa tahapan diantaranya isolasi DNA, amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR, elektroforesis (Suwanto, 2002) dan sekuensing. Metode yang digunakan dalam identifikasi molekuler ini menggunakan metode Aris (2013).

a) Isolasi DNA bakteri pelarut fosfat (BPF)

Kultur sel bakteri pelarut fosfat (BPF) diinkubasi dalam media *phikoskaya* dalam *shaker water bath* pada suhu 37°C, 120 rpm selama 7 hari. Isolasi genom dilakukan dengan menggunakan CTAB dan NaCl. Metode tersebut dilakukan dengan cara mengambil kultur bakteri 1 ml kemudian di pisahkan antara pelet dan supernatan dengan cara di sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit.

Pelet yang dihasilkan dari sentrifugasi ditambahkan dengan buffer TE sebanyak 576 µl, SDS 10% 30 µl, NH₄COOH 5M 3µl. Kemudian diinkubasi

selama 1 jam dengan suhu 37°C. Setelah itu ditambahkan 100 µl NaCl 5M dan larutan CTAB 2% sebanyak 80 µl kemudian diinkubasi kembali selama 10 menit dengan suhu 65°C. Suspensi ditambahkan C:I (24:1) sebanding dengan volume sampel 1:1. Kemudian di sentrifus kembali dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit sehingga menghasilkan tiga lapisan yang terpisah.

Supernatan yang diperoleh kemudian dalam tabung mikro kemudiann ditambahkan P:C:I (25:24:1) sebanding dengan volume sampel 1:1 dan di sentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit sampai terbentuk pelet. Ditambahkan isopropanol dingin sebanyak 0,6 volume sampel, selain itu ditambahkan pula 50 µl etanol 70% dingin. Kemudian di sntrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit sampai terbentuk pelet. Pelet yang dihasilkan diuapkan sampai kering dan di resuspensi dengan buffer TE sebanyak 50 µl dan disimpan dalam suhu -20 °C.

b) Amplifikasi gen 16s Rrna dengan PCR

Primer yang digunakan adalah primer universal untuk domain bakteri berupa Primer yang digunakan adalah foward 27f (5'-agagtttgatcmtggctcag-3') and reverse 1525r (5'-aaggaggtgwtccarcc-3') (Sharon, 2016). Semua komponen reaksi dicampur ke dalam microtube dengan komposisi sampel 1µl, Primer (foward 1µl dan reverse 1µl), PCR mix 10µl dan ddH₂O 7µl dan dimasukkan ke dalam mesin PCR. Tahapan PCR terdiri dari pre-denaturasi 94°C, 4 menit; tahap denaturasi 94 °C, 1 menit; tahap annealing 50 °C, 20 detik, tahap elongasi 72 °C selama 2 menit. Proses PCR terdiri dari 35 siklus. Selanjutnya post PCR pada suhu 72 °C selama 3 menit. Hasil PCR disimpan pada suhu -20 °C atau langsung dielektroforesis

c) Elektroforesis

Gel elektroforesis disiapkan dengan 1% agarose dalam 1x buffer TAE (0,4 gr agarose dalam 40 ml 1xTAE) (50x trisasetat EDTA (TAE):1 l dH₂O, 242 gr Trisbasa, 37,2 gr Na₂EDTA, 57,1 ml asam asetat glasial), dipanaskan dan setelah larut didinginkan sampai 50°C kemudian dituang pada cetakan gel. Wadah yang sudah berisi gel diberi buffer 1x TAE secukupnya kemudian memasukkan sampel hasil digesti pada sumur-sumur gel. Pada waktu elektroforesis diberikan suatu marker atau penanda molekul DNA. Elektroforesis dilakukan pada kondisi 65 Volt dan selama 70 menit. Komposisi sampel DNA yang akan di separasi dalam gel agarose diantaranya 3 μ l marker di taruh dalam sumuran awal sedangkan sumuran selanjutnya diisi dengan 3

d) Sekuensing

Sekuensing gen 16S rRNA menggunakan metode dye terminator dideoxy Sanger yang dilakukan dari dua arah, masing – masing arah forward menggunakan 27F dan reverse menggunakan primer 1525R. Proses sekuensing dilakukan di Laboratorium First Base Laboratories; The Gemini Singapore Science Park melalui PT. Genetika Science Indonesia (Jakarta) , dengan menggunakan alat ABI PRISM® 3730 xl Genetic Analyzer dan menggunakan reagen ABI PRISM® Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit.

Proses Sequencing terdiri dari 4 tahap, yaitu cycle sequencing, purifikasi hasil sequencing, elektroforesis kapiler, dan analisis hasil sequencing. Komposisi reaksi untuk proses cycle sequencing terdiri dari 3 μ l DNA template, 2,0 μ l Big Dye Terminator Ready Reaction Mix, 4,0 μ l Buffer Big Dye, 1,0 μ l Primer 3,2 pmol, 10

µl aquabides, sehingga total volume adalah 20µl. Reagen – reagen tersebut dimasukkan dalam tabung PCR 0,2ml dan dicampur rata dengan cara dispin. Kemudian tabung dimasukkan dalam mesin *sequencing* dengan kondisi *initial denaturation* 96oC selama 1 menit, dengan siklus 25 kali terdiri dari 96oC selama 10 detik, 50oC selama 10 detik dan 60oC selama 4 menit.

Pemurnian hasil *Cycle sequencing* dilakukan dengan menggunakan metode Big dye x-Terminator precipitation. Reagen yang digunakan adalah Big dye x-Terminator yang terdiri dari Big dye x-Terminator solution dan Sam solution. Hasil Cycle sequencing sebanyak 20µl ditambah dengan 90µl Sam solution dan 20µl Big dye x-Terminator kemudian di vortex 3 menit. Selanjutnya disentrifugasi 1000rpm selama 2 menit, 2 kali. Hasil purifikasi ditambah dengan larutan buffer khusus yaitu Hi-Di™ *Formadide* (genetic Analysis Grade-applied Biosystem) kemudian dimasukkan ke dalam *plate record* dan siap untuk dilakukan elektroforesis kapiler dengan menggunakan *Capilarity Electrophoresis Genetic* dari *Applied Biosystem*

3.5 Analisis Data

Data yang telah diperoleh disajikan secara deskriptif meliputi karakteristik makroskopis (bentuk, tepian, elevasi dan warna) dan mikroskopis (berupa engaman gram dan bentuk bakteri), uji biokimia (Uji hidrolisis pati, Uji sitrat, Uji TSIA (Triple Sugar Iron Agar), Uji SCA, Uji SIM, Uji Motilitas dan Uji katalase), uji kualitatif bakteri pelarut fosfat (dengan adanya zona benik yang terbentuk) dan identifikasi molekuler (dengan menggunakan 16S rRNA) dari masing – masing bakteri elarut fosfat (BPF) yang terdapat pada tanah pertanian organik desa sumberejo kota.

Data hasil sequencing selanjutnya dianalisis contig dengan menggunakan program Bioedit untuk memperoleh sekuens parsial gen 16S rRNA yang utuh. Selanjutnya data hasil contig dianalisis dengan cara penyejajarkan sekuens isolat yang diperoleh dengan bakteri acun sebanyak 50 – 60 bakteri pelarut fosfat (BPF) yang diperoleh dari *GenBank* NCBI. Langkah yang harus dilakukan adalah membuka program Notepad atau PFE untuk memasukkan dan menyejajarkan sekuens isolat hasil sequen dengan sekuens

ns bakteri acun sebanyak 50 – 60 bakteri pelarut fosfat (BPF) dengan ukuran sekuens sekitar 1300-1500bp. Kemudian sekuens disejajarkan dengan program ClustalX, dengan memilih *outpt* berupa file dengan format Clustal, FASTA, dan *Phydit* (.aln, .FASTA, dan gde).

Konstruksi pohon filogenik berbasis sekuens gen 16s rRNA dilakukan dengan menggunakan metode *neighbor-joining tree* (NJT) yang diimplementasikan pada program MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011). File .FASTA hasil penjejajaran dengan ClustalX di import dalam program MEGA 5 untuk mencari model substitusi terbaik (*best-fit substitution model*) untuk analisis pohon filogenik. Setelah didapatkan model substitusi terbaik, selanjutnya dibuat pohon filogenik dengan model substitusi terbaik dan dengan analisis bootstrapping 1000 pengulangan.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi bakteri pelarut berdasarkan karakteristik morfologi koloni

4.1.1 Pengamatan makroskopis dengan karakteristik koloni bakteri

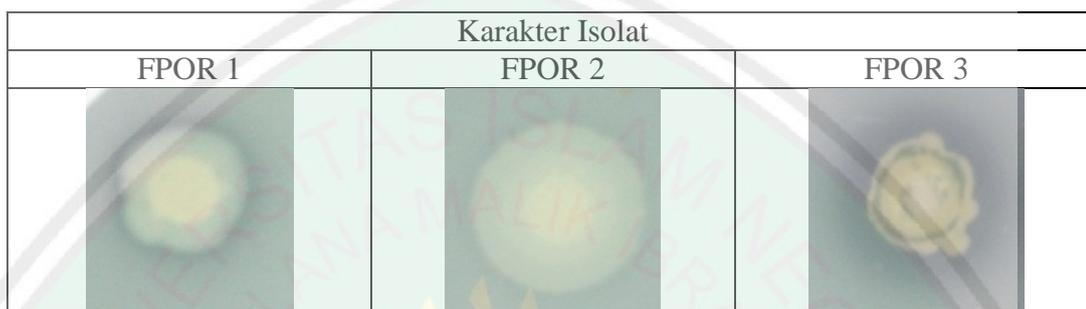
Hasil eksplorasi bakteri pelarut fosfat dari tanah pertanian organik Desa Sumberejo Kota Batu diperoleh tiga isolat bakteri pelarut fosfat dengan karakteristik morfologi yang berbeda. Ketiga bakteri tersebut disajikan pada gambar 4.1

Ketiga isolat bakteri hasil eksplorasi memiliki kesamaan yakni membentuk zona bening pada media pikovskaya yang terdapat disekitar koloni bakteri. Menurut Zulaika dan Ulfiatin (2015) menyatakan bahwa bakteri yang dapat melarutkan fosfat merupakan bakteri yang dapat menghasilkan zona bening dalam media pikovskaya. Terbentuknya zona bening ini dikarenakan adanya reaksi kimia yang dihasilkan dari proses pelarutan fosfat dalam bentuk $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ yang terdapat dalam media pikovskaya . kemudian di lakukan purifikasi pada masing – masing isolat dan di ambil koloni murni pada goresan yang terakhir. Isolat ini digunakan untuk memperoleh biakan murni yang selanjutnya akan diidentifikasi.

Karakteristik morfologi tiga isolat yang diperoleh dari hasil eksplorasi berdasarkan Dwijoseputro (1989) disajikan pada tabel 4.1 yakni pengamatan dilihat bentuk koloni, permukaan koloni/ elevasi, tepi koloni dan warna koloni.

Tabel 4.1 Karakter makroskopis isolat bakteri pelarut fosfat yang diisolasi dari tanah pertanian organik desa Sumberejo Kota batu

Isolat	karakteristik bakteri			
	Bentuk	Margin	Elevasi	Warna
FPOR 1	Bulat	Utuh	Timbul Datar	Putih Susu
FPOR 2	Bulat	Utuh	Datar	Putih
FPOR 3	Bulat	Utuh	Rata	Kuning

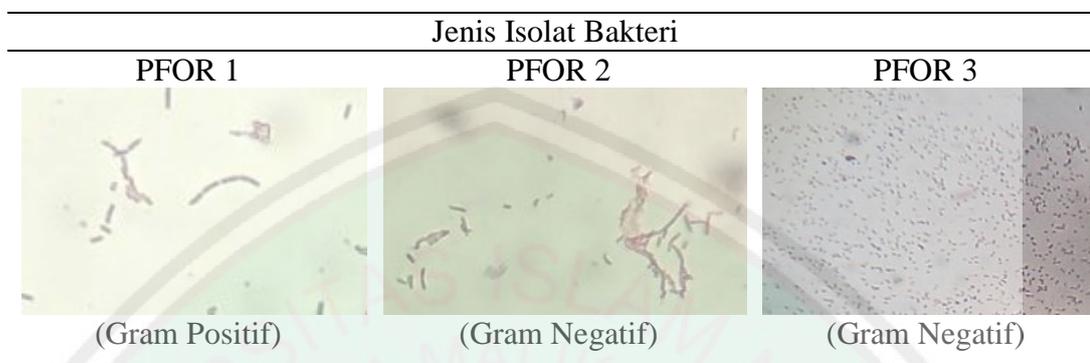


Gambar 4.1 Karakter makroskopis isolat bakteri pelarut fosfat yang diisolasi dari tanah pertanian organik desa Sumberejo Kota batu

Menurut tabel 4.1 diperoleh karakteristik sebagai berikut isolat FPOR 1 memiliki karakteristik makroskopis berbentuk Circuler/bulat, margin Entire/menyeluruh, elevasi raised/timbul dan warna putih susu. Isolat FPOR 2 memiliki karakteristik koloni berbentuk Circuler/bulat, margin Entire/menyeluruh, elevasi flat/datar, warna putih dan penampakan. Isolat FPOR 3 memiliki karakteristik makroskopis berupa berbentuk Circuler/bulat, margin Entire/menyeluruh, elevasi flat/datar dan berwarna kuning. Perbedaan karakteristik dari masing – masing isolat dikarenakan ekspresi dari gen yang berasal dari jenis bakteri yang berbeda – beda (Fakruddin *et al.*, 2013).

4.1.2 Pengamatan mikroskopis dengan pewarnaan gram

Hasil dari karakterisasi bakteri pelarut fosfat (BPF) dapat dilihat pada Gambar 4.3



Gambar 4.2 pewarnaan gram isolat PFOR 1, PFOR 2 dan PFOR 3 menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100X

Hasil pewarnaan gram menunjukkan bahwa isolat yang diperoleh memiliki karakteristik mikroskopis sebagai berikut PFOR 1 memiliki bentuk sel bakteri batang dan gram positif, isolat PFOR 2 memiliki bentuk basil gram negative dan isolat PFOR 3 memiliki bentuk coccus dengan jenis gram negatif. Penelitian lain menyebutkan bahwa bakteri pelarut fosfat yang diperoleh memiliki ciri mikroskopis sebagai berikut isolat QC1A.1 termasuk gram positif (+) bentuk kokus, isolat QC5A.1 gram negatif bentuk batang, isolat QC5B.1 gram negatif bentuk batang, isolat QC5C.1 gram negatif bentuk batang dan isolat QC5B.3 gram negatif bentuk batang.

Perbedaan yang dihasilkan oleh warna bakteri dalam pewarnaan gram dikarenakan adanya perbedaan struktur dinding sel. Bakteri gram positif akan memberikan respon warna ungu atau *violet* (kehitam - hitam) dikarenakan adanya ikatan antara kristal violet dengan dinding sel gram positif yang tersusun atas peptidoglikan tebal tanpa protein dan lipopolisakarida. Gram negatif akan memberikan respon warna merah atau merah muda. Munculnya warna merah

atau merah muda dikarekan gram negatif memiliki peptidoglikan yang tipis dan mudah pecah sertan dilapisi oleh protein dan lipopolisakarida di bagian luarnya. Lipid ini akan larut ketika diberikan alkohol yang juga menyebabkan pori – pori dinding sel membesar dan meningkatkan daya larut kristal violet pada dinding sel bakteri gram negatif (Fatimawali, 2013).

4.1.3 Potensi Bakteri Pelarut Fosfat dalam Melarutkan P berdasarkan Indeks Pelarutan Fosfat (IP)

Berdasarkan nilai indeks pelarutan fosfat Tiga isolat bakteri pelarut fosfat yang diperoleh memiliki kemampuan dalam melarutkan fosfat yang berbeda – beda. Data indeks pelarutan fosfat disajikan dalam tabel 4.2.

Tabel 4.2 Data indeks pelarutan fosfat dilihat dari rerata diameter zona bening dan koloni

Isolat Bakteri Pelarut Fosfat	Rerata Indeks Pelarutan Fosfat ± Standar deviasi
PFOR1	2,78 ± 0,24 b
PFOR2	2,14 ± 0,05 a
PFOR3	2,12 ± 0,01 a

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan pada uji lanjut DMRT 5%

Tiga isolat bakteri pelarut fosfat yang diperoleh dari hasil eksplorasi di lahan pertanian organik desa Sumberejo Kota Batu memiliki perbedaan kemampuan dalam melarutkan fosfat yang ditunjukkan oleh nilai indeks pelarutan fosfat. PFOR1 memiliki nilai indeks pelarutan fosfat tertinggi yakni sebesar 2,78; PFOR2 memiliki indeks pelarutan fosfat sebesar 2,14; dan yang terendah adalah PFOR3 dengan nilai indeks pelarutan fosfat sebesar 2,12. Sagervanshi *et al.* (2012) menjelaskan bahwa aktivitas pelarutan fosfat dicirikan dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni. Sedangkan indeks pelarutan fosfat

menunjukkan kemampuan masing-masing isolat dalam melarutkan fosfat pada media agar pikovskaya. Dengan demikian, semakin tinggi nilai indeks pelarutan yang dihasilkan maka kemampuan bakteri dalam melarutkan fosfat juga tinggi

Terbentuknya zona bening oleh bakteri menunjukkan bahwa isolat tersebut mampu menghasilkan asam organik ekstraseluler yang mampu berikatan dengan ion Ca yang terdapat pada media *pikovskaya* dalam bentuk $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)$ dan membebaskan ion H_2PO_4 sehingga terbentuk area yang berwarna transparan dari daerah yang masih berikatan dengan P (George *et al*, 2002). Maryati (2006) menyatakan bahwa asam organik tersebut diantaranya dapat berupa fumarat, asam sitrat, glutamat, laktat, suksinat, alpha-ketobutirat dan juga tartarat.

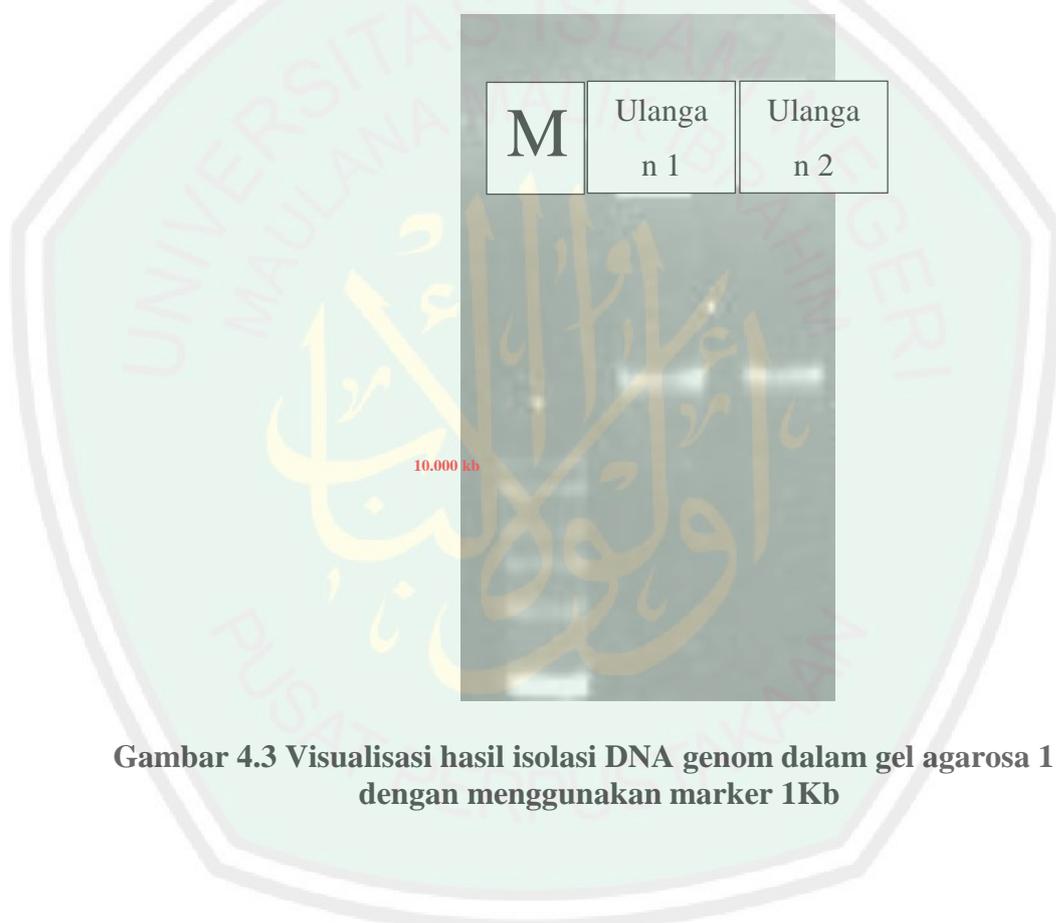
Perbedaan kemampuan isolat dalam melarutkan fosfat berbeda – beda. Pelarutan fosfat oleh bakteri pelarut fosfat dipengaruhi oleh sifat genetik dari masing – masing mikroba dalam memproduksi asam organik yang berperan dalam menentukan kemampuan pelarutan P (Chen *et al*, 2006; Mittal *et al*, 2008). Data indeks pelarutan fosfat menyebutkan bahwa satu isolat terbaik yakni isolat PFOR 1 yang kemudian akan dilakukan uji lanjutan identifikasi dengan menggunakan sekuens 16S rRNA untuk mengetahui jenis dari bakteri tersebut.

4.2 Identifikasi Bakteri dengan menggunakan profil DNA menggunakan sekuens 16S

Isolat terbaik dalam melarutkan fosfat yakni isolat PFOR 1 kemudian diidentifikasi dengan menggunakan sekuens 16 rRNA dengan hasil sebagai berikut:

4.2.1 Isolasi DNA bakteri

DNA diisolasi menggunakan metode yang digunakan oleh Khoiri (2016) yakni metode modifikasi CTAB 2% dan NaCl. Modifikasi yang dimaksud adalah dengan adanya penambahan amonium asetat (NH_4CHOOH). Pengamatan secara kualitatif dilakukan melalui proses elektroforesis dengan menggunakan gel agarose 1%, selanjutnya diamati didalam uv eliminator. Hasil visualisasi disajikan pada gambar 4.4.



Gambar 4.3 Visualisasi hasil isolasi DNA genom dalam gel agarosa 1% dengan menggunakan marker 1Kb

Hasil visualisasi menunjukkan bahwa sampel DNA genom bakteri terisolasi dengan baik hal itu terlihat dengan adanya pita DNA yang terang dari masing – masing isolat dan tidak terbentuk *smear*. Hasil visualisai juga diperoleh bahwa bakteri isolat PFOR 1 ulangan 1 merupakan bakteri dengan panjang genom lebih dari 10.000 bp. Penelitian lain menyebutkan bahwa bakteri pelarut fosfat

diantaranya *Pseudomonas plecoglossicida*, *Bacillus megaterium*, *Klebsiella pneumonia* dan *Klebsiella oxitoca* memiliki panjang DNA genom lebih dari 10.000 bp (Arfarita *et al*, 2017; Kang *et al*, 2016) yakni masing – masing adalah *Pseudomonas plecoglossicida* (6,264,403 bp), *Bacillus megaterium* (40 kb) (Roberto *et al*, 2015; Stover *et al*, 2000;), *Klebsiella pneumonia* (282,476 bp) (Liu *et al*, 2012) dan *Klebsiella oxitoca* (5,974,109 bp) (Shin *et al*, 2012) bakteri tersebut termasuk dalam bakteri yang dapat melarutkan fosfat.

Selanjutnya hasil pengamatan secara kuantitatif berupa konsentrasi dan tingkat kemurnian DNA yang diukur menggunakan Nano Drop. Hasil pengamatan kemurnian DNA disajikan dalam tabel 4.3

Tabel 4.3 Tingkat kemurnian DNA isolat bakteri pelarut fosfat isolat PFOR

Kode Isolat	Konsentrasi Asam Nukleat (ng/ μ l)	Tingkat Kemurnian		Standart tingkat kemurnian	
		260/280	260/230	260/280	260/230
PFOR Ulangan1	383.1	1.82	2.3	1.8 – 2.0	2.0 - 2.2
PFOR Ulangan2	280.9	1.95	2.2	1.8 – 2.0	2.0 - 2.2

Keterangan : dianalisis menggunakan *Nano Drop* dari *bioered*

Data kuantitatif di peroleh dari absorbansi menggunakan nanodrop dengan panjang gelombang 230 , 260 dan 280. Pita DNA akan menyerap cahaya UV pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan kontaminan berupa protein atau senyawa fenol akan menyerap cahaya pada panjang gelombang 280 nm sehingga nilai perbandingan antara absorbansi pada gelombang 260 nm dan 280nm dapat digunakan untuk melihat nilai kemurnian DNA (Muladno, 2010; Fatchiyah, 2011).

Diperoleh data dari isolat PFOR ulangan 1 memiliki konsentrasi lebih tinggi yakni 383.1 ng/ μ l dibanding dengan isolat PFOR ulangan 2 yakni 280.9 ng/ μ l. Namun hal tersebut berbanding terbalik dengan hasil nilai kemurnian DNA. Isolat PFOR ulangan 2 lebih murni dengan nilai 1.95 pada panjang gelombang A_{260}/A_{230} dan 2.2 pada panjang gelombang A_{260}/A_{280} . Sedangkan isolat PFOR ulangan 2 memiliki nilai nilai 1.82 pada panjang gelombang A_{260}/A_{230} dan 2.3 pada panjang gelombang A_{260}/A_{280} . Nilai isoalat PFOR ulangan 1 yang lebih tinggi dari 2.0 ini karena adanya kontaminan dari fenol yang masih terdapat dalam ekstrak DNA. Rasio A_{260}/A_{230} merupakan pengukuran kedua untuk mengetahui kemurnian DNA absorbansi pada panjang gelombang 230 nm menunjukkan adanya kontaminan yang dapat menyerap cahaya pada panjang gelombang tersebut misalnya fenol (Thermoscientific, 2016).

Adanya kontaminasi pada ekstrak DNA ini dipengaruhi oleh beberapa faktor yakni menurut Syafruddin dan santoso (2011) menyatakan bahwa terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi optimalnya proses ekstraksi dan purifikasi DNA yakni proses penghomogenan, komposisi larutan buffer dan penghilangan senyawa polisakarida.

. Meskipun pada isolat PFOR ulangan1 nilai kemurniannya lebih dari ulangan 2 menurut Nugroho (2016) walaupun terdapat sampel yang nilai perbandingan di atas 2.0 namun secara umum DNA yang dihasilkan masih memiliki kualitas yang baik. Hal ini terlihat dari hasil uji kualitatif dengan gel agarose 1% yang menunjukkan bahwa pita DNA terlihat dengan jelas dan tidak menunjukkan adanya degradasi (*smearing*). Selain itu ada bagian bawah gel juga tidak terlihat keberadaan RNA.

4.2.2 Hasil Amplifikasi PCR Sekuens 16 rRNA

Amplifikasi dilakukan untuk memperbanyak sekuens 16 rRNA proses ini dilakukan dengan menggunakan mesin thermal cycler (PCR). Hasil amplifikasi sekuens 16 rRNA dapat dilakukan dengan cara visualisasi Amplikon (hasil amplifikasi) dengan menggunakan elektroforesis pada gel agarose 1%. Amplikon 16 rRNA memiliki ukuran 1500bp yang akan disejajarkan dengan ukuran marker. Hasil visualisasi disajikan dalam gambar 4.2.2



Gambar 4.5 Visualisasi amplikon sekuens 16 rRNA pada gel agarose 1%. dengan menggunakan marker promega ukuran 1 KB DNA Ladeer

Pita hasil visualisasi amplikon sekuens 16S rRNA yang disejajarkan marker menunjukkan bahwa DNA bakteri berhasil teramplifikasi hal tersebut terlihat dari ukuran pita amplikon yang menunjukkan ukuran sebesar 1500 bp. Jill and Clarridge (2004) menyatakan bahwa sekuens 16 S rRNA merupakan sekuens yang dapat digunakan untuk mengetahui jenis bakteri yang memiliki panjang 1500bp.

Penciptaan DNA ini juga tersirat dalam Al –Qur.an surat Al – Furqon (25) ayat 2 sebagai berikut:

لَّذِي لَهُ مُلْكُ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ وَلَمْ يَتَّخِذْ وَلَدًا وَلَمْ يَكُنْ لَهُ شَرِيكٌ فِي الْمُلْكِ وَخَلَقَ كُلَّ شَيْءٍ فَقَدَرَهُ تَقْدِيرًا

Artinya: yang kepunyaan-Nya-lah kerajaan langit dan bumi, dan Dia tidak mempunyai anak, dan tidak ada sekutu bagi-Nya dalam kekuasaan(Nya), dan dia telah menciptakan segala sesuatu, dan Dia menetapkan ukuran-ukurannya dengan serapi-rapinya. Berdasarkan surat Al –Furqon ayat 2 di atas, Allah SWT telah menetapkan segala sesuatu dari apa yang diciptakan-Nya, bukan karena nafsu dan kelalaian (Qurthubi, 2008). Kata كل شيء bermakna bahwa Allah ﷻ yang menciptakan semua ciptaan, termasuk DNA yang terdapat dalam makhluk hidup, kemudian kata فقدره bermakna bahwa Allah menetapkan ukuran-ukuran segala makhluknya, termasuk penciptaan sekuens 16S rRNA bakteri dengan sangat rapi dan tepat (تقديرًا), sehingga semua ciptaan Allah merupakan ciptaan yang terbaik dan sempurna sehingga semua sistem dapat berjalan dengan rapi dan teratur.

Ukuran DNA yang telah ditetapkan oleh Allah ﷻ memberikan hikmah tersendiri bagi makhluk hidup. Salah satunya adalah bahwa ukuran DNA pada setiap spesies adalah sama dan secara tidak langsung ukuran DNA telah menjadi penanda bagi suatu spesies. Selain itu, ukuran DNA yang begitu besar dan komponen DNA itu sendiri memberikan keuntungan dalam hal ketahanan hidup suatu populasi. Bukti-bukti ini telah memaparkan secara jelas bahwa Allah benar-benar menetapkan segala ciptaan-Nya secara rapi dan tepat تقديرًا.

4.2.3 Hasil Sequencing

Hasil sequencing DNA pada isolat FPA dengan menggunakan primer forward 27f (5'-agagtttgatctggctcag-3') and reverse 1525r (5'-aaggaggtgtccacc-3')

berupa visualisasi urutan fragmen DNA. Urutan fragmen DNA sequencing ditampilkan pada gambar 4.6

```

1   GGCTAACTCC GCGTCCCAGC AGCCGGCGGT AATACGGAGG GGGGCAAGTC GTTAATCCGG 60
61  AATTTCTTGG GCGTAAAGGC GCACGGCAGG CCGTCTGTCA AAGTCGGGAT GTGAAATCCC 120
121 CGGGCTCAAC CTGGGAACTG CATTGAAAC TGGCAGGCTA GAGTCTTGTA GAGGGGGGTA 180
181 GAATTCCAGG TGTAGCGGTG AAATGCGTAG AGATCTGGAG GAATACCGGT GGCGAAGGCG 240
241 GCCCCCTGG ACAAAGACT GACGCTCAGG TGCGAAAGCG TGGGGAGCAA ACAGGATTAG 300
301 ATACCCTGGT AGTCCACGCC GTAAACGATG TCGATTTGGA GGTGTGCCCC TTGAGGCGTG 360
361 GCTTCCGGAG CTAACGCGTT AAATCGACCG CCTGGGGAGT ACGGCCGCAA GGTAAAAACT 420
421 CAAATGAATT GACGGGGGCC CGCACAAGCG GTGGAGCATG TGGTTTAATT CGATGCAACG 480
481 CGAAGAACCT TACCTGGTCT TGACATCCAC AGAACTTTCC AGAGATGGAT TGGTGCCTTC 540
541 GGGAACTGTG AGACAGGTGC TGCATGGCTG TCGTCAGCTC GTGTTGTGAA ATGTTGGGTT 600
601 AAGTCCCGCA ACGAGCGCAA CCCTTATCCT TTGTTGCCAG CGGTTCCGCC GGGAACTCAA 660
661 AGGAGACTGC CAGTGATAAA CTGGAGGAAG GTGGGGATGA CGTCAAGTCA TCATGGCCCT 720
721 TACGACCAGG GCTACACACG TGCTACAATG GCATATACAA AGAGAAGCGA CCTCGCGAGA 780
781 GCAAGCGGAC CTCATAAAGT ATGTCGTAGT CCGGATTGGA GTCTGCAACT CGACTCCATG 840
841 AAGTCGGAAT CGCTAGTAAT CGTAGATCAG AATGCTACGG TGAATACGTT CCCGGGCCTT 900
901 ATCACGCCG 909

```

Gambar 4.5 Urutan fragmen DNA hasil sequencing gen 16S rRNA Isolat PFOR 1 yang di peroleh dari program NCBI

Fragmen DNA isolat hasil sequencing kemudian di susun sesuai dengan urutan fragmen. Susunan yang terbebtuk merupakan susunan yang sama dengan susunan yang terdapat dalam *Genbank* yakni setiap baris berisi 60 basa. Hasil sequencing menunjukkan bahwa rangkaian nukleutida yang berhasil terbaca menggunakan primer 16s rRNA memiliki panjang 909bp. Menurut pengastuti (2006) panjang urutan nukleutida yang terdapat dalam sekuens gen 16S rRNA sekitar 1500bp.

Jumlah sekuens isolat PFOR yang kurang dari 1500 bp yakni hanya 909 bp masih dapat digunakan untuk analisis identifikasi. Ukuran PFOR 1 yang

memiliki panjang 909 bp ini dianggap masih memiliki ukuran mendekati 1500 bp. Penelitian serupa telah dilakukan oleh Sari *et al* (2013) yang memperoleh tiga isolat dengan panjang sekuens kurang dari 1500 bp. Isolat EN 10 adalah 731 bp, isolate EN 16 sebesar 717 bp dan isolate EN 6 sebesar 709 bp. Masing - masing isolat teridentifikasi sebagai isolate EN 10 adalah *Bacillus SP*, isolat EN 16 *Bacillus cereus*, isolat EN 6 *Bacillus sp*.

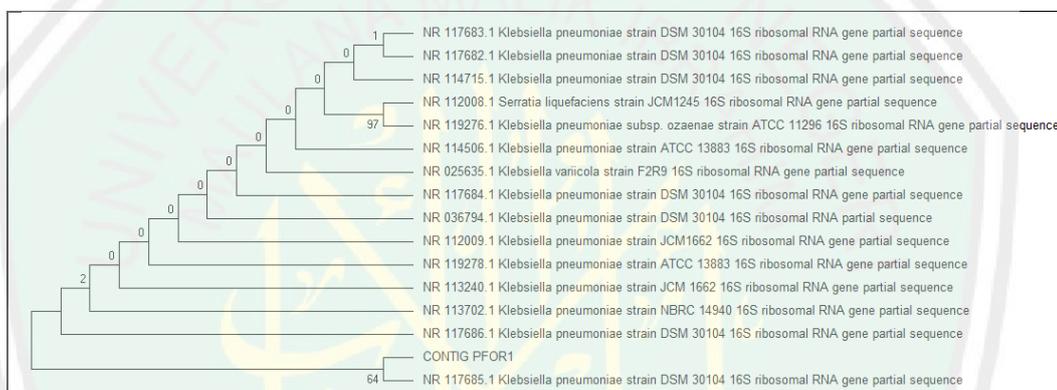
4.2.4 Hasil pembuatan pohon filogeni bakteri pelarut fosfat isolat PFOR1

Hasil sequencing kemudian dianalisis dengan menggunakan Mega 6 dan menghasilkan sekuens consensus. Hasil *Blas* atau penjejajaran sekuens consensus isolat PFOR 1 dengan menggunakan program *NCBI* disajikan pada tabel 4.4.

Tabel 4.4. Identifikasi strain isolat PFOR1 hasil penjejajaran menggunakan NCBI dengan nilai identity % tertinggi

Homologous Microorganism	% Identity	<i>Accession Genbank</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> DSM 30104	98%	NR_117686.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> DSM 30104	98%	NR_117683.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NBRC 14940	98%	NR_113702.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> JCM 1662	98%	NR_113240.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	98%	NR_119278.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> JCM 1662	98%	NR_112009.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> DSM 30104	98%	NR_036794.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> DSM 30104	98%	NR_117684.1
<i>Klebsiella variicola</i> F2R9	98%	NR_025635.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	98%	NR_114506.1
<i>Serratia liquefaciens</i> JCM 1662	98%	NR_112008.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> DSM 30104	98%	NR_114715.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>Ozaenae</i> ATCC 11296	98%	NR_119276.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> DSM 30104	98%	NR_117685.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> DSM 30104	98%	NR_117682.1

Hasil identifikasi strain isolat PFOR 1 memiliki kemiripan sebesar 98% dengan 15 strain bakteri yang terdapat di NCBI, 15 strain tersebut adalah *Klebsiella pneumoniae* strain IDSM 30104, strain NBRC 14940, strain JCM 1662, strain ATCC 13883, *Klebsiella variicola* F2R9, *Serratia liquefaciens* JCM 1662 dan *Klebsiella pneumoniae* subsp. *Ozaenae* ATCC 11296. Penelitian Sadiq *et al* (2013) menyatakan bahwa *Klebsiella pneumoniae* termasuk kelompok isolat bakteri pelarut fosfat yang di temukan di tanah. Konstruksi pohon filogenik selanjutnya dilakukan untuk menyatakan spesies dari isolat PFOR 1.



Gambar 4.6 konstruksi pohon filogeni dengan menggunakan Mega 6 yang analisis dengan menggunakan metode test maximum parsimony tree (s) dan diuji dengan analisis bootstrap 100

Berdasarkan konstruksi pohon filogeni (Gambar 4.7) diperoleh hasil bahwa bakteri pelarut fosfat isolat PFOR 1 membentuk *clade* dengan *Klebsiella pneumoniae* strain DSM 30104. *Clade* atau cladogram merupakan cabang pohon yang terbentuk dalam filogeni yang digunakan untuk mengetahui kedekatan dari makhluk hidup tertentu (Mirabella, 2011). Terbentuknya *clade* isolat PFOR 1 dengan *Klebsiella pneumoniae* strain DSM 30104 menunjukkan bahwa antara keduanya dalam kelompok taksonomi yang memiliki leluhur yang sama.

Kemudian hasil dari pohon filogeni dianalisis tingkat similaritasnya untuk mengetahui spesies bakteri. Hestiningtyas (2008) menyatakan tingkat similaritas sekuans 16S rRNA isolat bakteri dengan bakteri acuan dapat digunakan untuk mengetahui identitas spesies bakteri.

Indeks similaritas (%) diperoleh dari analisis dengan menggunakan mega 6 yang kemudian dianalisis. Hasil indeks similaritas (%) isolat PFOR dapat dilihat dari tabel 4.5. Isolat PFOR1 memiliki nilai indeks similaritas (%) 98% dengan semua isolat acuan namun isolat PFOR1 satu clade dengan *Klebsiella pneumoniae* strain DSM 30104. Hal tersebut menunjukkan bahwa PFOR1 memiliki kemiripan terdekat dengan *Klebsiella pneumoniae* strain DSM 30104.

Klebsiella pneumoniae menurut Bhardwaj (2017) dalam penelitiannya merupakan bakteri pelarut fosfat yang memiliki karakteristik morfologi koloni sebagai berikut tidak berwarna, berbentuk round/cirkular, elevasi raised dan merupakan gram negatif. Ciri tersebut berbeda dengan ciri yang saya peroleh yakni berbentuk Circuler/round, margin Entire, elevasi raised dan warna putih susu dan merupakan gram positif. Perbedaan hasil ini dikarenakan adanya perbedaan karakteristik lingkungan yang berbeda yang memungkinkan hasil ekspresi fenotip yang berbeda pula.

Metode fenotip mengkarakterisasi dan mengidentifikasi organisme berdasarkan produk ekspresi gen (morfologi, fisiologi, dan biokimia) yang sangat sensitif terhadap berbagai macam kondisi lingkungan seperti suhu pertumbuhan, fase pertumbuhan, dan mutasi spontan. Hal ini menyebabkan tingkat reproduksibilitasnya (konsistensi pengukuran) menjadi rendah, artinya

metode fenotip memberikan hasil yang berbeda-beda apabila diulang, sehingga dianggap kurang dapat dipercaya (*reliable*) (Fakruddin *et al.*, 2013).

Karakteristik *Klebsiella pneumoniae* dalam melarutkan fosfat juga kurang maksimal dimana dalam penelitian Islam *et al* kelompok bakteri *Klebsiella.sp* dapat menghasilkan indeks pelarutan fosfat sampai 4.8, berbeda nilai yang dihasilkan dari *Klebsiella pneumoniae* yang peneliti peroleh hanya 2,7. Variasi pelarutan fosfat oleh bakteri pelarut fosfat dipengaruhi oleh sifat genetik dari masing – masing mikroba dalam memproduksi asam organik yang berperan dalam menentukan kemampuan pelarutan P (Chen *et al.*,2006; Mittal *et al.*,2008).

Salah satu mekanisme pelarutan fosfat oleh *Klebsiella pneumoniae* adalah *Klebsiella pneumoniae* merupakan bakteri yang menghasilkan IAA (*indol acetic acid*) yang merupakan salah satu asam organik yang dapat membantuk melarutkan fosfat (Bhardwaj, 2017). Namun disisi lain *Klebsiella pneumoniae* merupakan agen *Friedlander's pneumoniae* yang merupakan penyebab utama pneumonia di beberapa negara sehingga masih perlu dilakukan uji lanjutan untuk mengetahui tingkat patogenitasnya (Tarina dan Kusuma, 2017)

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah Dari hasil eksplorasi dan identifikasi bakteri tanah asal pertanian organik desa Sumberejo kota Batu diperoleh tiga isolat bakteri pelarut fosfat. isolat FPOR 1 memiliki indeks pelarutan fosfat tertinggi yakni 2,7. Kedudukan filogeni isolat bakteri pelarut fosfat PFOR berada pada clade yang sama dengan *Klebsiella pneumoniae* strain DSM 30104 dengan nilai similaritas 98%.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang gen penyandi asam organik yang dapat melarutkan fosfat seperti IAA untuk memaksimalkan bakteri tanah dalam melarutkan fosfat

DAFTAR PUSTAKA

- Acinas Sg, Marcelino La, .2004 Klepac-Ceraj V, Polz Mf. Divergence And Redundancy Of 16s Rrna Sequences In Genomes With Multiple Rrn Operons. *J Bacteriol*;186:2629–2635.
- Ahmad Nuruddin Khoiri. 2016. Identifikasi Bakteri Endofit Rimpang Temulawak (Curcuma Xanthorrhiza Roxb.) Isolat Pd2 Dan Bt2 Berdasarkan Sekuens Gen 16s Rrna Jurusan BiologiFakultas Sains Dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- Aidar Ma, 2007.Simple And Cost-Effective Protocol For Da Isolation From Buccal Epithelial Cells.Braz Dent J, 18(2): 148-152.
- Al-Mubarak, S. 2006. Shahih Tafsir Ibnu Katsir Jilid 1. Bogor: Pustaka Ibnu Katsir. Penerjemah Abu Ihsan Al-Atsari
- Amman Ri, Ludwig W, Schleifer Kh. Phylogenetic Identification And In Situ Detection Of Individual Microbial Cells Without Cultivation. *Microbiol Rev*. 1995. 59(1): 143-69.
- Arfarita , M.W. Lestari¹ , I. Murwani¹ , T. Higuchi² 2017. Isolation Of Indigenous Phosphate Solubilizing Bacteria From Green Bean Rhizospheres. *Journal Of Degraded And Mining Lands Management* Issn: 2339-076x (P); 2502-2458 (E), Volume 4, Number 3
- Ash-Shiddieqy, Hasbi. 2000. *Tafsir Al-Qur'anul Majid An-Nur*, Jilid 2. Cetakan Kedua. Edisi Kedua. Semarang: Pustaka Rizki Putra.
- Brown, A. 2001. *Microbiological Applications Lab Manual*. 8th Ed. New York: The McGraw-Hill Companies.
- Budi Raharjo, Agung Supriyadi, Agustina D.K. 2007. Pelarutan Fosfat Anorganik oleh Kultur Campur Jamur Pelarut Fosfat Secara In Vitro. *Jurnal Sains & Matematika (JSM)*. Vol 15. No 2:0854-0675.
- Cai H, Archambault M, Prescott Jf. 16s Ribosomal Rna Sequence–Based Identification Of Veterinary Clinical Bacteria. *J Vet Diagn Invest*. 2003. 15:465 – 469.

- Chen, Y.P., P.D. Rekha, A.B. Arun, F.T. Shen, W.A. Lai, C.C. Young. 2006. Phosphate Solubilizing Bacteria From Subtropical Soil And Their Tricalcium Phosphate Solubilizing Ability. *App. Soil Ecol.* 34:33-41
- Clarridge Je. Impact Of 16S rRNA Gene Sequence Analysis For Identification Of Bacteria On Clinical Microbiology And Infectious Diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004. 17(4): 840-62.
- Djide, N., dan Sartini. 2006. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Makassar: Universitas Hasanuddin.
- Dong, W., Zhang, X., Liu, Y. Gui, H., Wang, Q., Gao, J., Song, Z., Lai, J., Huang, F., Qiao, J. 2006. Effect of rubber on properties of nylon-6/unmodified clay/ rubber nanocomposites. *European Polymer Journal.* 42. 2515-2522.
- Duncan, F. 2005. *MBC 1000L Applied Microbiology Laboratory Manual 4th Ed.* New York : The McGraw-Hill Companies.
- Elfiati, D. 2005. *Peranan Mikroba Pelarut Fosfat Terhadap Pertumbuhan Tanaman. Jurusan Kehutanan. Fakultas Pertanian: Universitas Sumatera Utara.*
- Evy Novita Sari, Sajdan , Sugiyarto , 2013, Identifikasi Bakteri Penghasil Fitase Dan Karakterisasi Fitase Dari Kawah Sikidang Dieng Vol 1, No 1 hal 13 – 23 jurnal pasca
- Fakruddin, Md., K.S. Bin Mannan, R.M. Mazumdar, A. Chowdhury, dan Md. N. Hossain. 2013. Identification and Characterization of Microorganisms:DNA-fingerprinting Methods. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* 35(4): 397-404.
- Fatchiyah, E.L. Arumingtyas, S. Widyarti, Dan S. Rahayu. 2011. *Biologi Molekuler: Prinsip Dasar Analisis.* Jakarta: Erlangga
- Fatchiyah. 2011. Uji Kuantitatif Dan Kualitatif. Dalam: Fatchiyah, Arumingtyas E.L., Widyarti S., Dan Rahayu S. (Ed). *Biologi Molekular Prinsip Dasar Analisis.* Jakarta: Penerbit Erlangga. P. 33-37
- Fatimawali. 2013. Daya Reduksi Merkuri Isolat Bakteri Yang Diisolasi Dari Urine Pasien Di Puskesmas Bahu Manado. *Jurnal Ilmiah Farmasi – Unsrat* Vol. 2 No. 03

- Fitriya, R. Tyas, M. Ibrahim, Dan L. Lisdiana. 2015. Keefektifan Metode Isolasi Dna Kit Dan Ctab/Nacl Yang Dimodifikasi Pada Staphylococcus Aureus Dan Shigella Dysentriae. Lenterabio. Vol. 4 No. 1: 87–92.
- Fox Ge, Wisotzkey Jd, Jurtschuk P. How Close Is Close: 16s Rrna Sequence Identity May Not Be Sufficient To Guarantee Species Identity. Int. J. Syst. Bacteriol. 1992. 42(1): 166-70.
- George, C.L., Glick, B.R. 2002. Role Of Pseudomonas Putida Indole Acetic Acid In Development Of The The Plant Root System. Appl Environ Microbial J.limu Pert. Indonesia 183 68: 3795 - 3801
- Hadioetomo, R.S. 1993. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek : Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Hafiza Madeha Sadiq, Ghulam Zahara Jahangir, Idrees Ahmad Nasir, Mehwish Iqtidar, Muhammad Iqbal. 2013 Isolation And Characterization Of Phosphate-Solubilizing Bacteria From Rhizosphere Soil Biotechnology & Biotechnological Equipment ISSN: 1310-2818 (Print) 1314-3530 (Online) Journal
- Hanafiah Ka. 2007. *Dasar-Dasar Ilmu Tanah*. Jakarta: Raja Grafindo Persada
- Havlin, J.L., J.P. Beaton., S.L. Tisdale., And W.L.Nelson. 1999. *Soil Fertility And Fertilizers, An Introduction To Nutrient Management*. 6th. Prentice Hall. New Jersey.
- Hestiningtyas, M. 2008. *Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Berbagai Makanan dan Minuman Tradisional dan Identifikasi Isolat-Isolatnya Secara Molekuler Menggunakan DNA Ribosomal 16S*. Skripsi. Jakarta: Departemen Farmasi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Indonesia.
- Hyde, D.K., Aung, S., Jeewon, R., Pointing, B.S.. 2009. Diversity and Abundance of Nematode Trapping Fungi from Decaying Litter in Terrestrial Freshwater and Mangrove Habitats. *Journal Biodivers Conserv*, 18: 1695-1714.
- Ilham*, Ida Bagus Gede Darmayasa**, I Gusti Made Oka Nurjaya**, Retno Kawuri Phosphate-2015. Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Pelarut Fosfat

- Potensial Pada Tanah Konvensional Dan Tanah Organik. *Jurnal Simbiosis* li (1): 173- 183
- Ilham, Ida Bagus Gede Darmayasa, I Gusti Made Oka Nurjaya, Retno Kawuri. 2014 Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Pelarut Fosfat Potensial Pada Tanah Konvensional Dan Tanah Organik. *JURNAL SIMBIOSIS*. Vol 2. No 1: 173- 183.
- Illmer, P., Barbato, A., And Schinner, F. 1995. Solubilization Of Hardly-Soluble $AlPO_4$ With P-Solubilizing Microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* 27:265-270.
- Islama, T, Abhinandan D , Yasuyuki H , Atiqur R, Toshiaki I, And Satoshi T. 2007. Isolation And Identification Of Potential Phosphate Solubilizing Bacteria From The Rhizoplane Of *Oryza Sativa* L. Cv. Br29 Of Bangladesh Md.
- Isnaeni. 2010. Pertanian organik untuk keuntungan ekonomi dan kelestarian bumi. yogyakarta: kreasi wacana.
- Iswiandi, Santoso Dan R. Widya Satuti. 1995. Penggunaan Ciri Mikroorganisme Dalam Mengevaluasi Degradasi Tanah. Kongres Nasional Vi Hiti, 12-15. Serpong
- Jill E. Clarridge Iii. 2004. Impact Of 16s Rrna Gene Sequence Analysis For Identification Of Bacteria On Clinical Microbiology And Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, P. 840–862 Vol. 17, No. 4
- Kang. S , Ramalingam R • Young-H Y • Gil-J J • In-J L • Ko-Eun Lee • Jin-Ho Kim. 2014.
- Kasmita Reni. 2010. Isolasi, Karakterisasi, Dan Identifikasi Molekuler Bakteri Pelarut Fosfat (Bpf) Dari Beberapa Sampel Tanah Di Bogor, Nusa Tenggara Barat (Ntb), Dan Nusa Tenggara Timur (Ntt) Departemen Ilmu Tanah Dan Sumberdaya Lahan Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor
- Kasmita, Reni. 2010. Bogor. Isolasi, Karakterisasi, Dan Identifikasi Molekuler Bakteri Pelarut Fosfat (Bpf) Dari Beberapa Sampel Tanah Di Bogor, Nusa Tenggara Barat (Ntb), Dan Nusa Tenggara Timur (Ntt). *Skripsi*: Institut Pertanian Bogor.

- Kattar M, Et Al. Application Of 16s Rrna Gene Sequencing To Identify Bordetella Hinzii As The Causative Agent Of Fatal Septicemia. *J. Clin. Microbiol.* 38:789-94.
- Lau Skp, Woo Pcy, Teng Jll, Leung Kw, Yuen Ky. Identification By 16s Ribosomal Rna Gene Sequencing Of Arcobacter Butzleri Bacteraemia In A Patient With Acute Gangrenous Appendicitis. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2002.55:182–185.
- Lay, B.W. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Jakarta: Erlangga.
- Marista Etha, Siti Khotimah, Riza Linda. 2013. Bakteri Pelarut Fosfat Hasil Isolasi dari Tiga Jenis Tanah Rizosfer Tanaman Pisang Nipah (Musa paradisiaca var. nipah) di Kota Singkawang. *Jurnal Protobiont*. Vol 2. No 2: 93 – 101.
- Maryanti,D. 2006.Isolasi Dan Uji Kemampuan Bakteri Pelarut Fosfat Dari Rhizosfir Tanaman Pangan Dan Semak. Skripsi. Fakultas Pertanian Universitas Andalas, Padang.
- Minaxi, J. Saxena, S. Chandra, and L. Nain. 2013. Synergistic effect of phosphate solubilizing rhizobacteria and arbuscular mycorrhiza on growth and yield of wheat plants. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. Vol 13. No 2: 511-525.
- Mittal,V., O. Singh, H. Nayyar, J. Kaura, R. Tewari. 2008. Stimulatory Effect Of Phosphate-Solubilizing Fungal Strains (*Aspergillus Awamori* And *Penicillium Citrinum*) On The Yield Of Chickpea (*Cicer Arietinum* L. Cv. Gpf2). *Soil Biol. Biochem.* 40:718-727.
- Monica Mirabella Pendekatan Pohon dalam Filogenetik Flora Program Studi Teknik Informatika Sekolah Teknik Elektro dan Informatika Institut Teknologi Bandung
- Muh. Aris, Sukenda, Enang Harris, M. Fatuhcri Sukadi, Munti Yuhana. *Identifikasi molekular bakteri patogen dan desain primer PCR (Molecular identification of pathogenic bacteria and PCR specific primer design)*. Vol. 1 No. 3: 43 – 50.
- Muladno. 2010. *Teknologi Rekayasa Genetika*. Bogor: Ipb Press. 130hlm

- Mulyani Y, Purwanto A, Nurruhwati I, 2011. Perbandingan Beberapa Metode Isolasi Dna Untuk Deteksi Dini Koi Herpes Virus (Khv) Pada Ikan Mas (*Cyprinus Carpio L.*). *Jurnal Akuatika*, 8(11): 1-16.
- Nadia Ulfiyati Dan Enny Zulaika. 2014. Isolat *Bacillus* Pelarut Fosfat Dari Kalimas Surabaya. *Jurnal Sains Dan Seni Its Vol. 4, No.1*
- Novriani. 2010. Alternatif Pengolahan Unsur Hara P (Fosfor) Pada Tanaman Budidaya Jagung. *Agrobisnis*. Vol, 2. No. 3: 1979 – 82445.
- Nugroho Kristianto, Rerenstradika T. Terryana, Habib Rijzaani, dan Puji Lestar. 2016. Metode Ekstraksi Dna Pada *Jatropha Spp.* Tanpa menggunakan Nitrogen Cair *Jurnal litri* 22(4), 159 - 166
- Nuronyah, Thoyibatun Dan Surya Rosa Putra. 2012. Identifikasi Spesies Isolat Bakteri S1 Dengan Metode Analisa Sekuen Fragmen Gen 16s Rdna. *Jurnal Teknik Pomits*. Vol 1. No 1: 1-6.
- Ochman, 2005 Ochman, H. “*Genomes On The Shrink Proc.Natl.Acad.Sci*”. Vol 102. No 34: 11959 –11960.
- Oren A. 2004. *Prokaryote Diversity And Taxonomy: Current Status And Future Challenges. Philosophical Transsactions Of The Royal Society Of London*. B 394. 623 – 638.
- Pierzynski, G.M., Mcdowell, R.W., Sims, J.T., Sharpley, A.N. 2005. *Chemistry, Cycling, And Potential Movement Of Inorganic Phosphorus In Soils, In: Sims, J.T., Sharpley, A.N. (Eds.), Phosphorus: Agriculture And The Environment*. American Society Of Agronomy, Madison, Wi, Pp. 53-86.
- Pinglei Liu, a Peng Li, a Xiaofei Jiang, b Dexi Bi, a Yingzhou Xie, a Cui Tai, a Zixin Deng, a Kumar Rajakumar, c and Hong-Yu Oua. **Complete Genome Sequence of *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* HS11286, a Multidrug-Resistant Strain Isolated from Human Sputum**. *Journal of Bacteriology* p. 1841–1842. [J Bacteriol](#). 2012 Apr; 194(7): 1841–1842.
- Premono, E.M. 1994. *Jasad Renik Pelarut Fosfat, Pengaruhnya Terhadap P Tanah Dan Efisiensi Pemupukan P Tanaman Tebu. Disertasi*. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Qureshi, Z. A. Ahmad, N. Akhtar, A. Iqbal, F. Mujeeb, and M. A. Shakir. 2012. *Role Of Phosphate Solubilizing Bacteria (Psb) In Enhancing Pavailability*

- And Promoting Cotton Growth. *The Journal of Animal & Plant Sciences*. Vol 22. No 1: 204-210.
- Rao, N.S. 1994. *Mikroorganisme Tanah dan Pertumbuhan Tanaman*. Edisi Kedua. Jakarta: UI-Press.
- Roberto W, Scott J, Jesse L. C, Eric S. R, Gabriel F. K Everett. 2015. Complete Genome Sequence Of *Bacillus Megaterium* Podophage Pavlov. *Genome Journa* Volume 3 Issue 5 E
- Sambrook, J., dan D.W. Russel. 2001. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* 3rd Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J., Dan D.W. Russel. 2001. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* 3Rd Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sang Heum Shin,^a Sewhan Kim,^a Jae Young Kim,^a Soojin Lee,^b Youngsoon Um,^c Min-Kyu Oh,^d Young-Rok Kim,^e Jinwon Lee,^b and Kap-Seok Yang corresponding author 2012 Complete Genome Sequence of *Klebsiella oxytoca* KCTC 1686, Used in Production of 2,3-Butanediol *J Bacteriol*. 2012 May; 194(9): 2371–2372. doi: [10.1128/JB.00026-12](https://doi.org/10.1128/JB.00026-12)
- Sang Heum Shin,^a Sewhan Kim,^a Jae Young Kim,^a Soojin Lee,^b Youngsoon Um,^c Min-Kyu Oh,^d Young-Rok Kim,^e Jinwon Lee,^b and Kap-Seok Yang corresponding author 2012 *J Bacteriol*. 2012 May; 194(9): 2371–2372.
- Sari, I.P. 2006. Analisis Keragaman Genetik Bakteriendofitik Dan Filosfer Padi Dengan Teknik Ardra (Amplified Ribosomal Dna Restriction Analysis). *Skripsi* . Bogor: Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Sebastian, elyas seragih. 2012. *Pertanian organik*. Jakarta: penerbit swadaya.
- Shancez, P.A. 1992. *Sifat Dan Pengelolaan Tanah Tropika. Jilid 1. Terjemahan Johara T. Jayadinata*. Bandung: ITB Press.
- Sharma Seema B, Riyaz Z Sayyed, Mrugesh H Trivedi and Thivakaran A Gobi. 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. Vol 2: 587.
- Sharon, L.T. Hathwaik, G.M. Glenn, S. H. Imam, And C.C. Lee. 2016. Isolation Of Efficient Phosphate Solubilizing Bacteria Capable Of Enhancing

Tomato Plant Growth. *Journal Of Soil Science And Plant Nutrition*. Vol 2. No 16: 525-536.

Soepardi, G. 1983. *Sifat Dan Ciri Tanah*. Bandung: ITB Press.

Steven Taniwan, Dwi Suryanto, Isnaini Nurwahyuni. 2016. Isolasi Dan Karakterisasi Parsial Bakteri Pelarut Fosfat Dari Guano Gua Kampret Dan Uji Kemampuannya Dalam Meningkatkan Pertumbuhan Tanaman. *Jurnal Biosains*. Vol. 2 No. 2: 2460-6804.

Stover, X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrenner, M. J. Hickey, F.S. L. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K.-S. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsenk, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. W. Hancock, S. Lory & M. V. Olson. 2000. Complete Genome Sequence Of *Pseudomonas Aeruginosa* Pao1, An Opportunistic Pathogen. *Nature* . Vol 406

Sulistiyani, T.R., P. Lisdiyanti, dan Y. Lestari. 2014. Population and Diversity of Endophytic Bacteria Associated with Medicinal Plant *Curcuma zedoaria*. *Microbiology Indonesia*. Vol 8. No 2: 65-72.

Susilawati, Mustoyo, Eriandra Budisurya, Anggono , Bistok Simanjuntak. 2013. Analisis Kesuburan Tanah Dengan Indikator Mikroorganisme Tanah Berbagai Sietem Penggunaan Lahan Di Plateu Dieng. *Agric*. Vol 25 No 1: 64-72

Waluyo, L. 2008. *Teknik Metode Dasar Mikrobiologi*. Malang: Universitas Muhamadiyah Malang Press.

Yuwono, T. 2006. *Teori dan Aplikasi: Polymerase Chain Reaction*. Yogyakarta: Penerbit Andi.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Pembuatan larutan Stok

1. Pembuatan Bufer TE (Tris-EDTA)

- 1) 10 mM Tris-Cl pH 7,5
- 2) 1 mM EDTA

Dibuat dari larutan stok Tris-Cl 1 M (pH 7,5) dan larutan stok EDTA 500 mM (pH 8,0) dalam 1 L ddH₂O.

- 10 mL 1 M Tris-Cl pH 7,5
- 2 mL 0,5 EDTA pH 8,0

1 M Tris (crystallized free base)

(Tris(hydroxymethyl)aminomethane)

- 60,57 g dalam 500 mL ddH₂O pH 7,5 (dengan penambahan HCl)

0,5 M EDTA

(Diaminoethane tetraacetic acid)

- 18,6 g dalam 100 mL ddH₂O pH 8,0 (dengan penambahan NaOH)

2. Pembuatan media pykoscaya padat

Dibuat media pykoscaya dengan menambahkan bahan – bahan sebagai berikut :

- | | |
|---|--|
| 1) 10g glucose | 6) 0.2g KCl |
| 2) 0.5g yeast extract | 7) 0.002g MnSO ₄ .2H ₂ O |
| 3) 0.5g (NH ₄) ₂ SO ₄ , | 8) 0.002g FeSO ₄ .7H ₂ O |
| 4) 0.1g MgSO ₄ .7H ₂ O | 9) 15g Agar |
| 5) 5g Ca ₃ (PO ₄) ₂ | 10) 1Lg Aquades |

3. Pembuatan NaCl (natrium chlorida) 5M 1L

$$M = \frac{\text{gr/mol}}{V}$$
$$= \text{gr}/58,48$$

4. Pembuatan Bufer CTAB 2%

0,1 gr dalam 5ml

5. Pembuatan Gel Agarosa 1%

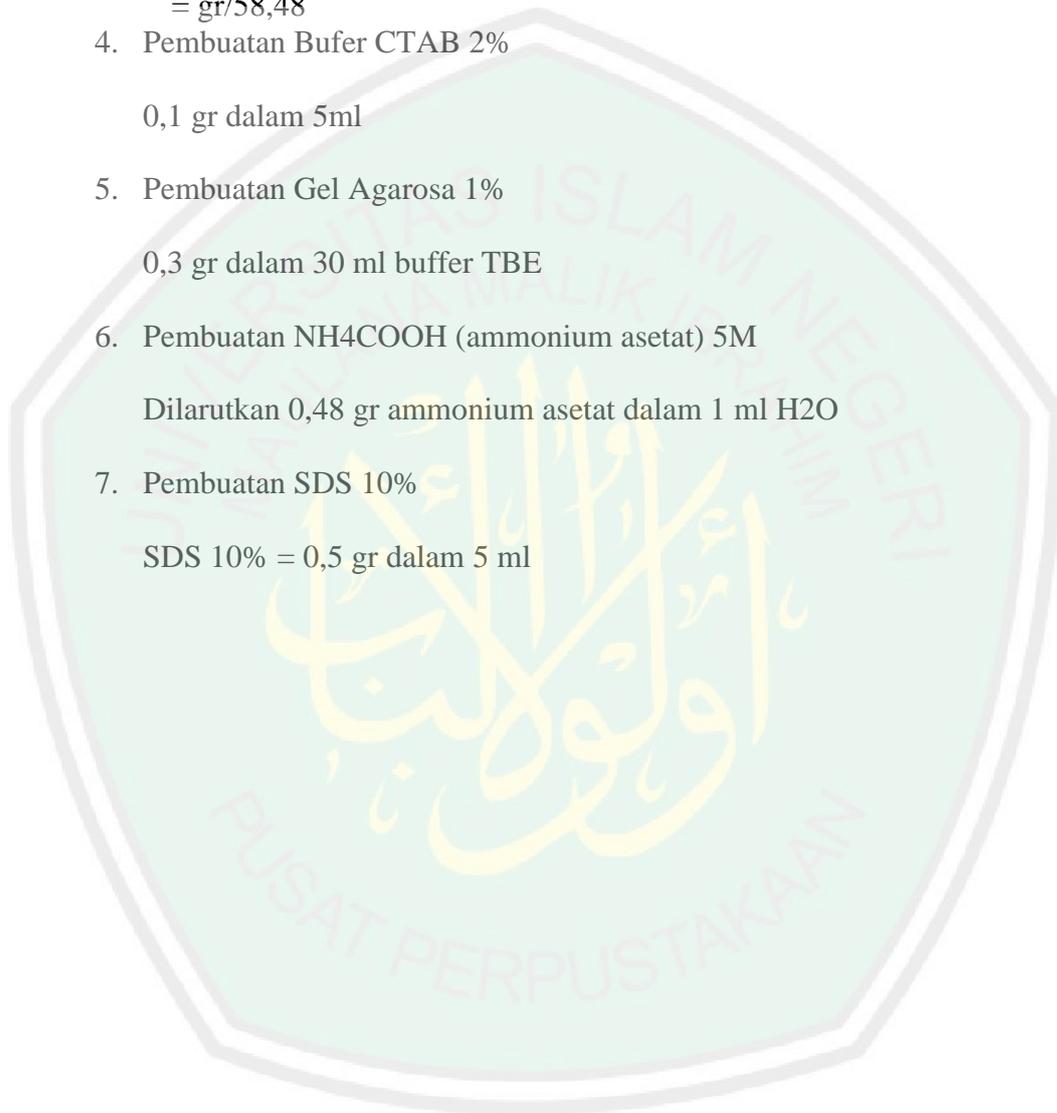
0,3 gr dalam 30 ml buffer TBE

6. Pembuatan NH₄COOH (ammonium asetat) 5M

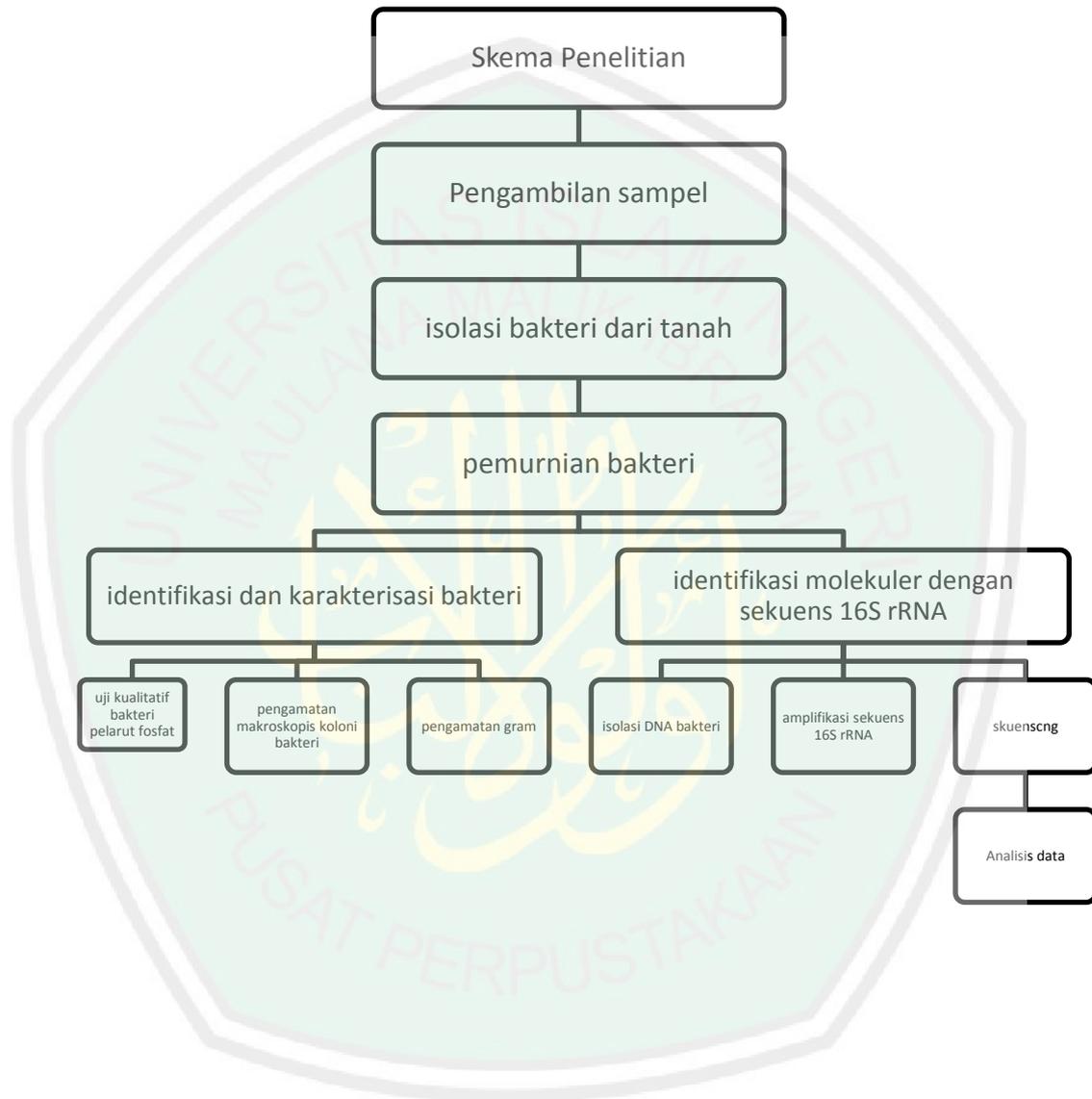
Dilarutkan 0,48 gr ammonium asetat dalam 1 ml H₂O

7. Pembuatan SDS 10%

SDS 10% = 0,5 gr dalam 5 ml

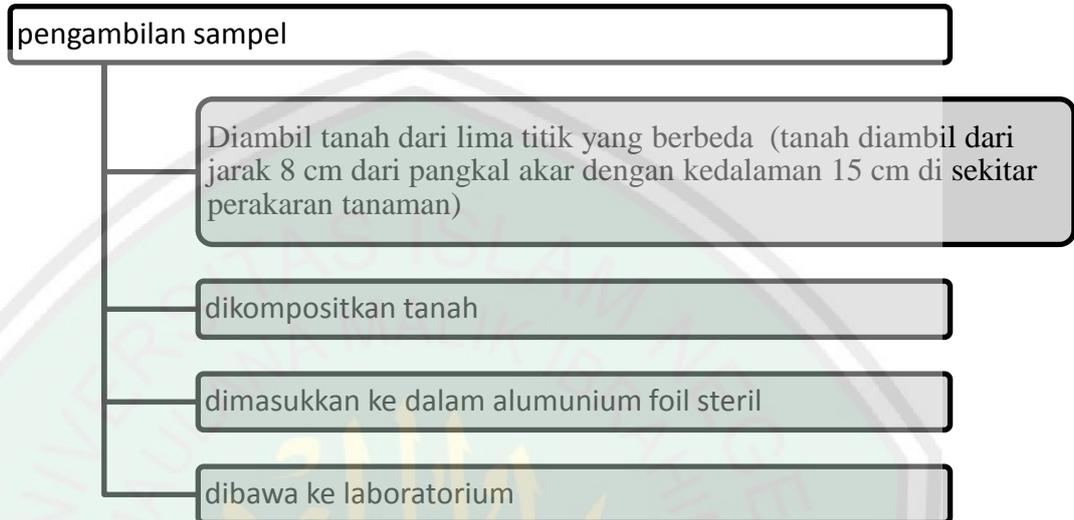


Lampiran 2. Skema Penelitian

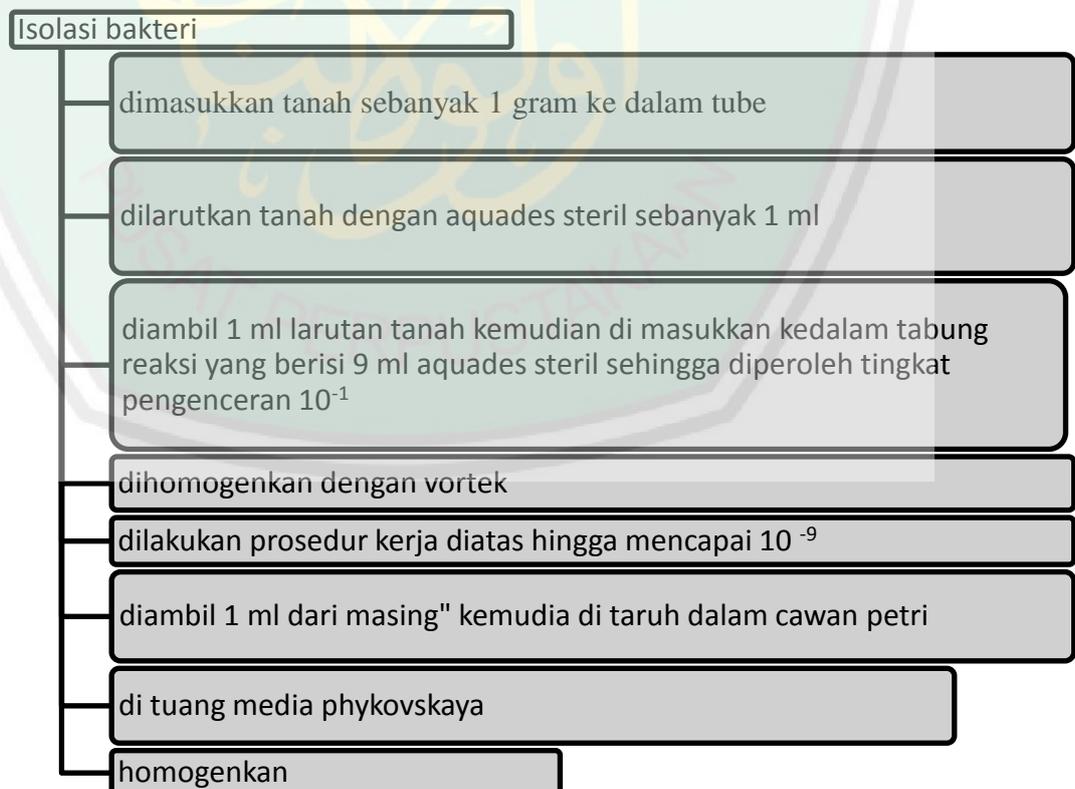


Lampiran 3. Diagram Alir

1. Pengambilan Sampel



2. Isolasi bakteri



3. Purifikasi bakteri

Purifikasi bakteri

diambil isolat dari masing - masing koloni bakteri yang berbeda

di gores kedalam media phikoskaya secara aseptis dengan menggunakan metode kuadran

diperoleh isolat bakteri tunggal dengan mengambil koloni bakteri tunggal diujung goresan

4. Uji Kualitatif dan pengamatan makroskopis koloni bakteri

Uji Kualitatif dan pengamatan makroskopis koloni bakteri

dimasukan satu ose masing - masing isolat kedalam 20 μ l NaCl fisiologis

di homogen kan

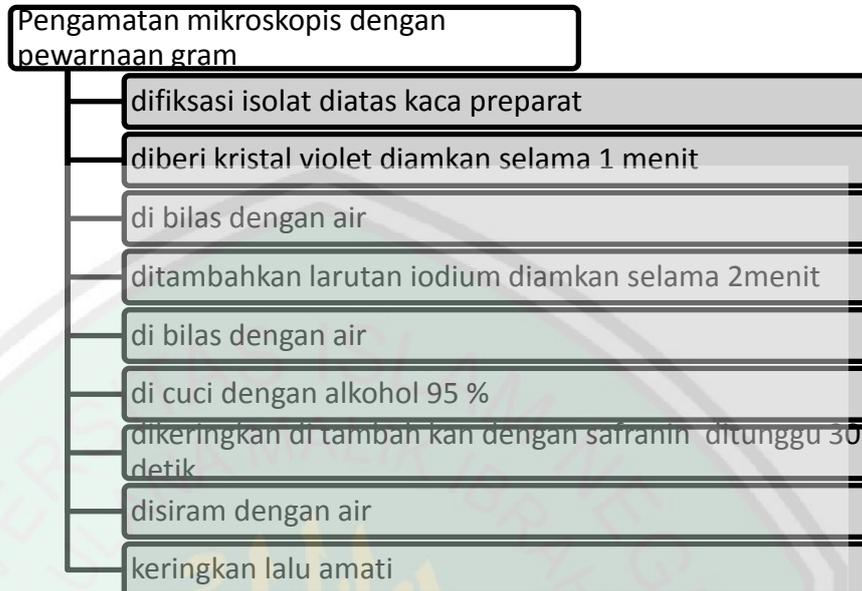
diletakkanl 10 μ l larutan isolat kedalam kertas cakram steril

diletakkan kertas cakram berisi isolat kedalam media padat

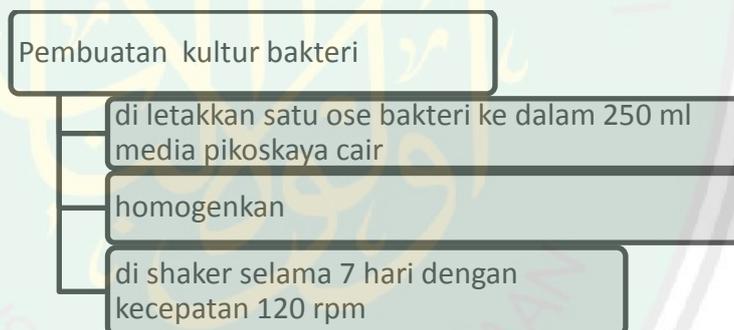
diukur zona bening dan koloni untuk uji kualitatif

di amati bentuk koloni untuk pengamatan makroskopis

5. Pengamatan mikroskopis dengan pewarnaan gram



6. Pembuatan kultur bakteri



Lampiran 4. Dokumentasi

