

**AMPLIFIKASI PRIMER 16S rRNA UNTUK  
KEPENTINGAN IDENTIFIKASI BAKTERI  
RHIZOSFER DI HUTAN ALAM PT. VALE**

**Oleh:**

**ISER PURWANTI AYU**

**M011171040**



**PROGRAM STUDI KEHUTANAN  
FAKULTAS KEHUTANAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2021**

**LEMBAR PENGESAHAN**

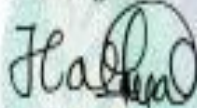
**AMPLIFIKASI PRIMER 16S rRNA UNTUK KEPENTINGAN  
IDENTIFIKASI BAKTERI RHIZOSFER DI HUTAN ALAM PT. VALE**

**ESER PURWANTI AYU  
M011171040**

Telah dipertahankan dihadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka  
Penyelesaian Studi Program Sarjana Studi Kehutanan Fakultas Kehutanan  
Universitas Hasanuddin  
Pada tanggal 15 Juni 2021  
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

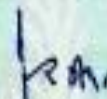
**Menyetujui,**

**Pembimbing Utama**



Dr. Siti Halimah Larekeng, SP., MP  
NIP. 19820209 201504 2 002

**Pembimbing Pendamping**



Prof. Dr. Ir. H. Muhammad Restu, M.P  
NIP. 19640904199203 1 003

**Ketua Program Studi**



Dr. Forest, Muhammad Arief K.S., S.Hut., M.Si  
NIP. 19790831 200812 1 002

## PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Iser Purwanti Ayu

Nim : M011171040

Program Studi : Kehutanan

Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul

“Amplifikasi Primer 16S rRNA Untuk Kepentingan Identifikasi Bakteri Rhizosfer  
Di Hutan Alam PT. Vale”

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 15 Juni 2021

Yang menyatakan  
  
Iser Purwanti Ayu

## **ABSTRAK**

**ISER PURWANTI AYU (M011171040). Amplifikasi Primer 16S rRNA untuk Kepentingan Identifikasi Bakteri Rhizosfer di Hutan Alam PT. Alam. Di bawah bimbingan Siti Halimah Larekeng dan Muhammad Restu.**

Rhizosfer adalah zona tanah yang terletak di perakaran tanaman. Mikroba rhizosfer berperan penting dalam siklus hara dan proses pembentukan tanah, pertumbuhan tanaman, mempengaruhi aktivitas mikroba serta pengendalian biologis terhadap patogen akar. Bakteri berperan penting dalam transformasi dan degradasi residu herbisida dari sangat beracun menjadi tidak beracun bagi kesehatan dan lingkungan. Teknologi yang saat ini berkembang pesat adalah pemanfaatan mikroorganisme (bakteri saprofit non patogen) yang dieksplorasi dari rizosfer tumbuhan (rhizobacteria) yang dapat merangsang pertumbuhan tanaman. Perkembangan identifikasi mikroba diawali dengan identifikasi melalui ciri-ciri morfologi, fisiologis dan metabolik. Kekurangan dari metode ini adalah ketidaktepatan dan waktu identifikasi yang lama, sehingga penggunaan molekulernya lebih berkembang. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui isolat bakteri yang diperoleh di PT. Vale dan amplifikasi isolat bakteri menggunakan primer 16S rRNA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat 10 isolat bakteri rhizosfer di PT. Vale dan hanya 4 diamplifikasi dengan baik menggunakan primer 16S rRNA.

**Kata Kunci : Bakteri Rhizosfer, Amplifikasi, 16S rRNA.**

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Kuasa atas segala berkat dan karunia-Nya yang telah memberikan kekuatan serta kelancaran kepada penulis sehingga mampu menyelesaikan penulisan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak,. Oleh karenanya, pada kesempatan ini secara khusus dan penuh kerendahan hati penulis mengucapkan terima kasih kepada **Dr. Siti Halimah Larekeng, SP.,MP** dan **Prof. Dr. Ir. H. Muh. Restu, M.P**, selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga dan pikiran dalam membimbing serta memberi arahan dalam penyusunan skripsi ini.

Terkhusus salam hormat dan kasih saya kepada kedua orangtua tercinta, Ayahanda **Petrus Garampa'** dan Ibunda **Ester Rayo Sattu** serta saudara saya, **Indra Purwanto** dan **Ijan Tandiayu'** yang selalu memberikan motivasi, dukungan, doa, serta cinta kasih. Semoga Tuhan Yesus senantiasa memberikan berkat dan perlindungan kepada beliau. Dengan segala kerendahan hati penulis juga mengucapkan rasa terima kasih khususnya kepada:

1. Bapak **Dr. H. A Mujetahid M, S.Hut., M.P** selaku Dekan Fakultas Kehutanan Universitas Hasanuddin, Bapak **Dr. Muhammad Alif K. S., S.Hut. M.Si** selaku Ketua Departemen Kehutanan beserta seluruh dosen dan staff Fakultas Kehutanan
2. Bapak **Ir. Budirman Bachtiar, M.S** dan Bapak **Prof. Dr. Iswara Gautama, M. Si.** selaku dosen penguji yang telah memberikan masukan dan saran, bantuan serta koreksi dalam penyusunan skripsi
3. **Kakanda: Sri Wahyuni Jufri S.Hut, Fitriani S.Hut, Iswanto, S.Hut.,M.Si, Yusniar S.Hut, Aminah, S.P., Muh. Bima Arsyad S.Hut, Yuni Fitri Cahyaningsih, S.P.,M.Si., dan Jusri S.Hut** yang telah bersedia mengarahkan penulis selama melaksanakan penelitian di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Pohon hingga skripsi ini selesai.
4. Teman seperjuangan selama penelitian: **Atisa Muslimin, Nasrah, Kiki Sulo, Musdalifah S.Hut, Annisa Nurislami S.Hut, Nurul andykasari**

**S.Hut, Nurul Musdalifah S.Hut, Sri Ayu, Zulfadillah Syam, Aqdia Adila**, dan teman – teman Lab Bioteknologi yang lainyang selalu memberi motivasi dan dukungan serta semangat yang diberikan hingga saat ini

5. Teman terdekat saya: **Angelia Marcelin Pagewang, Rindiani, Patta Nani Sallata, Grace Lande' Parerung, Stefani Ambalinggi' dan Selyn Bangalino, Armi Ngayo Lintin, dan Herlina** yang selalu memberikan hiburan dan waktu yang sangat bermakna untuk memberi dukungan dan motivasi untuk terus berjuang dalam penyelesaian skripsi ini
6. **PDR-MK (Persekutuan Doa Rimbawan – Mahasiswa Kehutanan)** yang selalu menjadi tempat belajar dan bertumbuh dalam Kristus bersama dan bertukar informasi serta selalu mendoakan hingga skripsi ini selesai.
7. **GAMARA UNHAS (Keluarga Mahasiswa Toraja Universitas Hasanuddin)** yang selama ini menjadi wadah atau tempat belajar di luar bangku kuliah.
8. Keluarga besar **FRAXINUS 2017** selama menjadi mahasiswa kehutanan banyak suka dan duka yang telah dilalui bersama mulai dari masa pengkaderan, perkuliahan hingga masa akhir semester. Bersama kalian adalah cerita indah yang akan selalu menjadi hal yang menyenangkan untuk dikenang.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini, masih banyak terdapat kekurangan yang perlu diperbaiki, untuk itu penulis mengharapkan kritikan dan saran yang membangun demi penyempurnaan skripsi ini. Akhir kata, penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penulisan skripsi ini semoga Tuhan memberkati dan melindungi dalam setiap langkah kehidupan serta berkat yang melimpah.

Makassar, 14 Juni 2021

Penulis

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PENGESAHAN .....	ii
PERNYATAAN KEASLIAN .....	iii
ABSTRAK .....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
DAFTAR ISI .....	vii
DAFTAR TABEL .....	ix
DAFTAR GAMBAR .....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
I. PENDAHULUAN .....	1
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Tujuan dan Kegunaan.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Mikroba Rhizosfer .....	5
2.2. Media Biakan Mikroba.....	6
2.3. Identifikasi Mikroba dengan Pendekatan Molekuler 16S rRNA.....	9
III. METODE PENELITIAN.....	11
3.1. Waktu dan Tempat .....	11
3.2. Alat dan Bahan Penelitian .....	11
3.3. Prosedur Penelitian .....	12
3.3.1 Pembuatan Media Biakan Mikroba.....	12
3.3.2 Proses Pengenceran .....	13
3.3.3 Proses Pemurnian .....	14
3.3.4 Isolasi DNA .....	14
3.3.5 Uji Kuantitas DNA .....	15
3.3.6 Uji Kualitas DNA.....	16
3.3.7 Uji Amplifikasi DNA .....	16
3.3.8 Elektroforesis .....	17
3.4. Analisis Data.....	17
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	19
4.1. Isolasi Mikroba Rhizosfer Hasil Peremajaan .....	19
4.2. Karakteristik Morfologi Bakteri Rhizosfer .....	23
4.3. Analisis Molekuler Isolat Bakteri Rhizosfer .....	24
4.4. Uji Kuantitas dan Uji Kualitas DNA .....	25
4.5. Hasil Amplifikasi Menggunakan Primer 16S rRNA .....	2

V. KESIMPULAN DAN SARAN .....	29
5.1. Kesimpulan.....	29
5.2. Saran.....	29
DAFTAR PUSTAKA.....	30
LAMPIRAN .....	32



## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Judul</b>	<b>Halaman</b>
Tabel 1.	Alat dan Bahan Isolasi Peremajaan Bakteri dan DNA Bakteri .....	11
Tabel 2.	Hasil Peremajaan Bakteri Rhizosfer Hutan Alam Kawasan Vale .....	20

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Judul</b>	<b>Halaman</b>
Gambar 1.	Hasil Pengenceran .....	19
Gambar 2.	Isolat Bakteri dan Hasil Peremajaan .....	20
Gambar 3.	Karakteristik Makroskopis .....	23
Gambar 4.	Hasil Uji Kualitas DNA Bakteri Rhizosfer Hutan Alam Kawasan Vale .....	26
Gambar 5	Hasil Amplifikasi Primer 16S rRNA .....	28

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran</b>	<b>Judul</b>	<b>Halaman</b>
Lampiran 1.	Dokumentasi Pembuatan Media Biakan Mikroba .....	33
Lampiran 2.	Dokumentasi Peremajaan Isolat Bakteri .....	34
Lampiran 3	Alat dan Bahan yang digunakan pada Pembuatan media dan Peremajaan Bakteri Rhizosfer .....	35
Lampiran 4.	Dokumentasi Alat dan Bahan yang digunakan pada Proses Molekuler .....	38
Lampiran 5.	Isolat Bakteri Rhizosfer Hutan Alam Kawasan Vale.....	43
Lampiran 6.	Modul Isolat dan Identifikasi Bakteri .....	45

# I. PENDAHULUAN

## 1.1. Latar Belakang

Perusahaan yang bergerak di bidang pertambangan salah satunya adalah PT. Vale Indonesia Tbk. Perusahaan ini merupakan salah satu bagian operasional dari Vale Indonesia yang bergerak di bidang pertambangan serta beroperasi di Sulawesi. Tahapan kegiatan penambangan yang dilakukan PT. Vale yaitu pembersihan lahan (*land clearing*), pengupasan lapisan tanah penutup (*stripping*), penambangan endapan bijih (*mining*) dan penggalian material (*quarry*), penyaringan (*screening*), pengolahan bijih nikel, dan reklamasi lahan. Kegiatan *revegetasi* dilanjutkan dengan perawatan tanaman meliputi pemupukan, penyiangan, pendangiran, pengendalian hama penyakit dan dilakukan kegiatan pemantauan keberhasilan. Bibit yang digunakan untuk kegiatan *revegetasi* berasal dari *nursery*. Perbanyak bibit dilakukan dengan metode vegetatif dan generative (Songli, 2013).

Pertumbuhan pohon dipengaruhi oleh kondisi tanah sebagai media tempat tumbuh dan berkembang pohon tersebut. Salah satu zona tanah yang mengandung banyak mikroba yang bermanfaat bagi pertumbuhan tanaman yaitu *rhizosfer*. *Rhizosfer* merupakan zona tanah yang berada pada perakaran tanaman. Mikroba *rhizosfer* berperan penting dalam siklus hara dan proses pembentukan tanah, pertumbuhan tanaman, mempengaruhi aktivitas mikroba serta sebagai pengendali hayati terhadap patogen akar (Jufri et al., 2017).

Peranan mikroba yang dapat bermanfaat dalam usaha pertanian saat ini belum disadari sepenuhnya bahkan sering dianggap sebagai komponen yang merugikan. Beberapa fungsi mikroba di dalam tanah, dapat digolongkan menjadi empat, yaitu sebagai penyedia unsur hara dalam tanah, perombak bahan organik dan mineralisasi organik, memacu pertumbuhan tanaman, serta sebagai agen hayati pengendali hama dan penyakit tanaman. Dengan demikian peranan mikroba juga berpengaruh terhadap sifat kimia dan fisik tanah serta pertumbuhan tanaman (Irfan, 2014).

Bakteri berperan penting dalam transformasi dan *degradasi residu herbisida* yang semula sangat toksik menjadi tidak toksik bagi kesehatan dan lingkungan. *Herbisida* paling persisten pun dapat dimetabolisme sampai batas tertentu oleh kultur mikroba. Senyawa dalam pestisida dapat dimanfaatkan oleh mikroba baik sebagai sumber energi atau nutrisi, atau sebagai co-metabolisme dengan substrat lain yang dapat mendukung pertumbuhan mikroba (Panjaitan et al., 2015).

Produksi tinggi yang telah dicapai banyak didukung oleh teknologi dengan input bahan-bahan anorganik yang tinggi terutama bahan kimia pertanian seperti pupuk dan pestisida yang berbahaya bagi kesehatan dan merusak fungsi tanah dengan dosis tinggi secara terus-menerus. Pendekatan sains terutama dalam manajemen ekologi lingkungan sangat dibutuhkan untuk menyelesaikan permasalahan yang berkaitan dengan kesehatan dan lingkungan seperti masalah pencemaran *herbisida* pada tanah (Panjaitan et al., 2015).

Mengandalkan pupuk kimia untuk meningkatkan kesuburan tanah, sebagai contoh lahan yang dipupuk dengan urea secara terus-menerus cenderung menampakkan respon kesuburan tanaman seketika, tetapi berdampak pada cepat habisnya bahan organik tanah. Pemakaian pupuk dan pestisida kimia secara terus-menerus dan tidak bijaksana, menyebabkan tumpukan *residu* yang melebihi daya dukung lingkungan dan menyebabkan tanah menjadi tidak subur. Akibatnya, berbagai upaya/program berbasis bahan kimiawi yang diluncurkan untuk peningkatan produktivitas tanaman sudah tidak mampu memberikan hasil sesuai yang diharapkan, bahkan yang terjadi justru cenderung menurun karena telah mencapai titik jenuh atau telah terjadi *levelling off* produksi. Untuk mengantisipasi permasalahan tersebut, penggunaan bakteri *rhizosfer* sebagai agensia pemacu pertumbuhan tanaman dan pengendali hayati (*Plant Growth-Promoting and Bioprotecting Rhizobacteria/ PGPBR*) jika dibandingkan dengan penggunaan pupuk kimia, penggunaan PGPBR memiliki beberapa keuntungan antara lain: (1) penggunaannya tidak menimbulkan pencemaran terhadap lingkungan, (2) tidak mengandung bahan beracun yang dapat menimbulkan *residu* pada rantai makanan, (3) tidak memerlukan aplikasi berulang, karena mikroba dapat memperbanyak diri selama lingkungan mendukung perkembangannya, (4) tidak

menimbulkan efek samping terhadap organisme yang bermanfaat pada tanaman, dan (5) dapat meningkatkan ketahanan tanaman terhadap serangan patogen. Hilangnya mikroorganisme yang menguntungkan yang berasosiasi dengan tanaman harus dikembalikan agar fungsi keseimbangan ekosistem pertanian berlangsung kembali secara normal.

Teknologi yang sedang pesat perkembangannya saat ini adalah pemanfaatan mikroorganisme (bakteri *saprophyt nonpathogenic*) yang dieksplorasi dari *rhizosfer* tanaman (*rizobakteri*) yang dapat memacu pertumbuhan tanaman. *Rizobakteri* merupakan suatu kelompok bakteri yang hidup secara saprofit pada daerah *rhizosfer* atau daerah perakaran dan beberapa jenis yang dapat berperan sebagai pemacu pertumbuhan tanaman dan atau sebagai agens biokontrol terhadap penyakit sehingga mampu meningkatkan hasil tanaman pertanian.

Perkembangan identifikasi mikroba diawali dengan melakukan identifikasi melalui ciri-ciri morfologi, fisiologi, dan metabolisme. Kekurangan metode ini yaitu ketidakakuratan dan waktu identifikasi yang lama, sehingga penggunaan secara molekuler lebih berkembang. Tahapan identifikasi dengan metode molekuler meliputi ekstraksi *deoxyribonucleic acid* (DNA), amplifikasi DNA, *sekuensing*, dan analisis hasil sekuen (Warnida, 2019). Karakterisasi morfologi dan fisiologi juga merupakan faktor penting. Data morfologi dan fisiologi dalam tahap identifikasi bakteri dapat digunakan untuk mendiskripsikan isolat-isolat yang diamati yang dapat memberi identitas bakteri (Nurkanto & Augusta, 2015).

Menurut (Nurkanto & Augusta, 2015) Gen *16S rRNA* bersifat multi copy karena terdapat sekitar 150-300 copy di dalam genom, sehingga mempermudah untuk mendapatkannya dalam genom. Gen *16S rRNA* memiliki daerah variabel dan konservatif yang dapat dijadikan pembeda antar spesies. Database tentang bakteri berdasarkan identifikasi *16S rRNA* sudah banyak sehingga memudahkan dalam perbandingan. Gen *16S rRNA* bersifat universal pada bakteri.

Gen *16S rRNA* memiliki region yang sangat bervariasi dan berbeda setiap spesies bakteri. Penggunaannya sebagai perangkat penelitian, gen *16S rRNA* telah banyak membantu terutama dalam proses identifikasi pada berbagai jenis bakteri secara akurat untuk berbagai penelitian di Indonesia. Gen ini memiliki banyak

manfaat sehingga dijadikan sebagai Gen Penanda. Gen *16S rRNA* telah banyak digunakan di berbagai bidang penelitian maupun untuk tujuan praktis karena dinilai cepat dan praktis. Primer *16S rRNA* tidak hanya dapat mengidentifikasi tetapi dapat dijadikan arahan dalam mengetahui potensi suatu bakteri. Pemanfaatan primer *16S rRNA* banyak digunakan dalam berbagai bidang terkait dengan keuntungannya (Akihary & Kolondam, 2020).

Primer *16S rRNA* digunakan untuk mengamplifikasi spesies bakteri karena gen *16S rRNA* terdapat di dalam semua sel bakteri sebagai kelompok multigen atau operon, fungsi dari gen *16S rRNA* dalam waktu yang lama tidak berubah tergantung jarak evolusinya, dan gen *16S rRNA* memiliki range yang cukup panjang yaitu 1500 bp. Amplifikasi merupakan tahap penggandaan DNA yang biasanya dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction (PCR)* dimana DNA mengalami *denaturasi*, *annealing*, dan ekstensi dalam beberapa siklus dengan menggunakan mesin *thermocycler*. Untuk mengetahui lebih lanjut identifikasi molekuler sangat penting dilakukan untuk informasi yang lebih akurat untuk memperoleh teknik isolasi bakteri hingga mampu mengamplifikasi primer universal dan menjadi rujukan penelitian selanjutnya sebagai informasi penggunaan mikroba di hutan alam pada umumnya.

Berdasarkan hal itu, maka dilakukan penelitian ini untuk mengetahui isolat bakteri *rhizosfer* hasil isolasi mikroba murni hutan alam dengan amplifikasi primer *16S rRNA* dengan pendekatan molekuler.

## **1.2 Tujuan dan Kegunaan**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui isolat bakteri *rhizosfer* hutan alam yang dapat teramplifikasi menggunakan primer *16S rRNA*.

Kegunaan dari penelitian ini adalah mampu mengetahui isolat bakteri *rhizosfer* yang diamplifikasi menggunakan primer *16S rRNA* pada hutan alam yang ada di kawasan PT Vale untuk dapat digunakan sebagai rujukan informasi penggunaan mikroba di hutan alam pada umumnya.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Mikroba *Rhizosfer*

*Rhizosfer* adalah suatu zona lingkungan mikro yang berada di sekitar perakaran tanaman. Sering juga diartikan atau dibatasi sebagai material atau bahan-bahan berukuran mikro dan mikroorganisme yang masih menempel pada akar tanaman setelah dilakukan pencelupan dan sedikit digerakkan-gerakkan di dalam air. Secara teori luasnya daerah *rhizosfer* sangat dipengaruhi oleh seberapa luasnya daerah yang masih tercakup oleh pengaruh aktivitas perakaran tanaman beserta dengan mikroorganisme yang berasosiasi dengannya. Daerah *rhizosfer* akan selalu merupakan lingkungan dimana kegiatan metabolik selalu lebih aktif, berubah dengan cepat dan lebih kompetitif dibandingkan dengan bagian tanah yang ada di sekelilingnya (Lumbanraja, 2018).

Tanah memiliki kandungan *C Organik* terbesar di alam, yakni 1,2–1,6 x 10<sup>15</sup> kg C sehingga mampu menyokong kehidupan berbagai jenis mikroba dari beragam tipe morfologi dan fisiologi, baik yang menguntungkan maupun yang merugikan. Peranan mikroba yang dapat bermanfaat dalam usaha pertanian saat ini belum disadari sepenuhnya bahkan sering dianggap sebagai komponen yang merugikan (Irfan, 2014).

*Rhizosfer* merupakan daerah perakaran yang subur, kaya akan nutrisi, kepadatan dan kesuburan mikroba sangat tinggi. Keberadaan bakteri di daerah *rhizosfer* sangat bermanfaat bagi tanaman, antara lain mendekomposisi bahan organik, menyediakan unsur hara N dengan menambatnya dari udara, menyediakan unsur hara P melalui pelarutan unsur P dari bentuk yang tidak tersedia bagi tanaman menjadi bentuk yang tersedia, menghancurkan bahan toksik, membentuk asosiasi simbiotik dengan akar tanaman sebagai agens antagonis, serta pemacu pertumbuhan tanaman atau *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*. *Rhizosfer* tanaman yang kurang unsur hara dan mikroba mengakibatkan terjadinya ketidakseimbangan pertumbuhan tanaman yang diakibatkan oleh kurangnya



mikroba berguna yang membantu proses pelapukan bahan organik dan fosfor, serta kurangnya serapan unsur hara yang dibutuhkan tanaman (Sukmawati, 2013)

Fungsi mikroba di dalam tanah digolongkan menjadi empat, yaitu sebagai penyedia unsur hara dalam tanah, perombak bahan organik dan mineralisasi organik, memacu pertumbuhan tanaman, serta sebagai agen hayati pengendali hama dan penyakit tanaman. Peranan mikroba juga berpengaruh terhadap sifat kimia dan fisik tanah serta pertumbuhan tanaman. Mengetahui jumlah populasi dan aktivitas mikroba di dalam suatu tanah dapat menjadi indikasi kesuburan tanah tersebut karena populasi mikroba yang tinggi menunjukkan adanya bahan organik yang cukup, suhu yang sesuai, ketersediaan air yang cukup, dan kondisi ekologi tanah yang mendukung merugikan (Irfan, 2014).

## **2.2 Media Biakan Mikroba**

Media biakan merupakan bahan atau substansi yang dapat digunakan untuk membiakkan mikroorganisme. Media sebagai tempat tumbuh dan berkembang harus menjamin ketersediaan dan kebutuhan mikroba untuk dapat tumbuh dan berkembang. Media harus mengandung nutrisi dan oksigen yang dibutuhkan oleh mikroba. Nutrisi yang dibutuhkan mikroorganisme untuk tumbuh yaitu karbon, nitrogen, unsur non logam seperti sulfur dan fosfor, unsur logam seperti Ca, Zn, Na, K, Cu, Mn, Mg, dan Fe, vitamin, air, dan energy (Wolfman, 2013).

Karbohidrat sangat dibutuhkan oleh bakteri karena karbohidrat merupakan substrat utama untuk metabolisme bakteri, setengah berat kering suatu bakteri adalah unsur karbon. Karbon dapat ditemukan dalam senyawa karbohidrat sehingga karbohidrat sangat berperan penting untuk pertumbuhan bakteri. Bahan yang bisa digunakan untuk media pertumbuhan bakteri adalah bahan yang mampu menyediakan nutrisi untuk pertumbuhan bakteri. Media yang biasa digunakan untuk menumbuhkan mikroba di laboratorium seperti bakteri adalah *NA (Nutrien Agar)* (Wolfman, 2013).

Pelaksanaan kegiatan ilmiahnya, para pakar mikrobiologi dan pakar ilmu yang terkait seperti pakar fitopatologi dan entomologi perlu mempunyai koleksi *plasma nutfah mikroba*, baik untuk digunakan sehari-hari, untuk jangka menengah, maupun jangka panjang. Metode pembuatan dan penyimpanan harus memperhatikan kondisi lingkungannya untuk menjaga agar biakan mikroba tetap hidup, ciri-ciri genetiknya tetap stabil dan tidak berubah, serta hemat biaya dan tenaga. Metode yang dipilih sangat tergantung pada sifat mikroba. Sifat mikroba tercermin dalam:

1. Ciri-ciri morfologi mikroba yang beragam (virus, bakteri, jamur, nematoda, algae, khamir, dan protozoa);
2. Ciri-ciri fisiologi dan biokimia mikroba; dan
3. Kemampuan mikroba bertahan hidup baik dalam lingkungan alaminya maupun lingkungan buatan

Keberhasilan pembuatan koleksi *plasma nutfah mikroba* tergantung pada tiga faktor, yaitu penguasaan teknologi, ketersediaan fasilitas preservasi, dan ketersediaan tenaga terampil, tekun, dan rutin. Penentuan teknik penyimpanan atau pengawetan mikroba memerlukan penelitian yang rumit, jangka waktu lama, dan pemantauan, serta dana yang besar. Hal ini berkaitan dengan tujuan utama preservasi, yaitu (Machmud, 2001):

1. Mereduksi atau mengurangi laju metabolisme dari mikroorganisme hingga sekecil mungkin dengan tetap mempertahankan viabilitas (daya hidupnya) dan
2. Memelihara sebaik mungkin biakan, sehingga diperoleh angka perolehan (*recovery*) dan kehidupan (*survival*) yang tinggi dengan perubahan ciri-ciri yang minimum. Namun demikian, saat ini berbagai teknik preservasi untuk berbagai mikroba telah tersedia dalam berbagai buku acuan, sehingga penggunaannya tinggal mengadopsi teknologi tersebut sesuai dengan kebutuhannya.

Penyimpanan jangka pendek mikroba dilakukan dengan memindahkan secara berkala jangka pendek, misalnya sebulan sekali dari media lama ke media baru. Teknik ini memerlukan waktu dan tenaga yang banyak. Teknik penyimpanan sederhana yang efektif untuk penyimpanan isolat jangka pendek atau menengah,

dan biasanya tidak sesuai untuk penyimpanan jangka panjang. Teknik yang digunakan adalah penyimpanan dalam minyak mineral, parafin cair, tanah steril, air steril, manik-manik porselin, lempengan gelatin, dan P2O5 dalam keadaan vakum. Metode penyimpanan jangka panjang yang paling efektif dan banyak dilakukan ialah metode *liofilisasi* atau kering beku (*lyophilization* atau *freeze drying*) dan *kriopreservasi* (*cryopreservation* atau *cryogenic preservation*) (Machmud, 2001).

### ***Nutrient Agar (NA)***

Salah satu media yang menggunakan ekstrak daging dan protein sebagai sumber glukosa dan asam amino serta paling umum digunakan untuk menumbuhkan sebagian besar bakteri adalah media NA (*nutrient agar*). Media NA (*nutrient agar*) merupakan media yang berbentuk serbuk berwarna putih kekuningan dan apabila setelah digunakan akan berbentuk padat karena terdapat kandungan agar sebagai pematatnya. Komposisi yang terpenting dalam media ini adalah karbohidrat dan protein yang terdapat pada ekstrak daging dan pepton sesuai dengan kebutuhan sebagian besar bakteri (N. Maria Thohari, Pestariati, 2019)

*Nutrient Agar* merupakan suatu medium yang berbentuk padat, yang merupakan perpaduan antara bahan alami dan senyawa-senyawa kimia. *Nutrient Agar* terbuat dari campuran ekstrak daging dan pepton dengan menggunakan agar sebagai pematat. Penggunaan pematat, karena sifatnya mudah membeku dan mengandung karbohidrat yang berupa galaktam sehingga tidak mudah diuraikan oleh mikroorganisme. *Ekstrak beef* dan pepton digunakan sebagai bahan dasar karena merupakan sumber protein, nitrogen, vitamin serta karbohidrat yang sangat dibutuhkan oleh mikroorganisme untuk tumbuh dan berkembang. Media oksoid yang instan terkadang tidak menjamin kepadatan media apabila sudah melewati masa kadaluarsa. Sehingga laboran terkadang menambahkan agar – agar untuk memadatkan media *Nutrient Agar*. Pembuatan media *Nutrient Agar* sering dilakukan penambahan agar tanpa ketentuan jumlah takaran, sehingga dengan

penambahan tersebut akan menyebabkan media menjadi lebih padat dan media tidak terangkat pada saat penanaman, serta kandungan zat-zat makanan akan bertambah, yang dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri (Fatmariza et al., 2017).

### **2.3 Identifikasi Mikroba dengan Pendekatan Molekuler *16S rRNA***

Proses identifikasi dilakukan dengan mengetahui karakteristik bakteri yang tumbuh. Isolat yang digunakan dalam identifikasi ini adalah biakan murni. Pengamatan morfologi koloni dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Secara makroskopis meliputi bentuk koloni bakteri, warna koloni, tepi koloni, dan elevasi koloni. Secara mikroskopis diamati bentuk sel, susunan sel dengan mikroskop pada perbesaran 1000x (Putri & Kusdiyantini, 2018).

Pendekatan konvensional yang dapat memberikan hasil berupa sifat fisiologis bakteri melalui hasil uji biokimia, serta sifat morfologis bakteri melalui hasil pengamatan morfologi koloni dan sel bakteri. Identifikasi secara konvensional dilakukan melalui pengamatan karakteristik morfologi koloni berupa ukuran, warna, bentuk, elevasi, dan tepi koloni (Khairani et al., 2019).

Identifikasi dan determinasi suatu biakan murni suatu mikroba hasil isolasi perlu ditentukan morfologi sel individual, morfologi koloni, dan sifat-sifat biokimia. Identifikasi mikroba dimulai dengan mengamati morfologi individual secara makroskopik, mikroskopik dan pertumbuhannya pada berbagai medium. Identifikasi bakteri memerlukan pengamatan melalui sifat-sifat biokimia karena bakteri tidak dapat dideterminasi hanya berdasar pada sifat morfologinya saja. Mikroba yang morfologinya sama mungkin berbeda dalam kebutuhan nutrisi dan persyaratan ekologi lainnya. Patogenisitas mikroba patogen dapat juga dipakai membantu identifikasi dan determinasi mikroba tersebut. Bila suatu mikroba memiliki sifat-sifat yang hampir sama (terutama yang patogen) maka perlu dilanjutkan diperiksa sifat serologinya (Jufri et al., 2017).

Analisis gen penyandi *16S rRNA* dapat sebagai penanda molekuler karena bersifat ubikuitus dengan fungsi yang identik pada semua bakteri. Gen *16S rRNA*

memiliki beberapa daerah dengan urutan basa yang konservatif dan juga daerah yang urutan basanya yang sangat variatif. Perbandingan urutan basa yang konservatif berguna untuk mengkonstruksi pohon filogenetik universal, sedangkan urutan basa yang variatif dapat digunakan untuk melacak keragaman dan menempatkan strain-strain dalam satu spesies (Yohandini et al., 2015).

Identifikasi bakteri secara fenotip belum cukup memberikan informasi yang jelas dalam membedakan strain intraspecies dan interspecies, karena sering terjadi kesalahan dalam membedakan spesies bakteri akibat adanya karakter yang tidak bersifat statis dan dapat berubah seiring dengan perubahan lingkungan. Identifikasi bakteri berdasarkan fenotipe memiliki reproduisibilitas yang rendah karena tergantung pada kondisi kultur di laboratorium yang berbeda, hal inilah yang mendorong dilakukannya identifikasi secara genotipe berdasarkan gen penyandi 16S rRNA (Yohandini et al., 2015).