

**AMPLIFIKASI PRIMER 16S rRNA UNTUK
KEPENTINGAN IDENTIFIKASI BAKTERI RHIZOSFER
DI LAHAN REKLAMASI PT. VALE**

Oleh:

ATISA MUSLIMIN

M01171038



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

LEMBAR PENGESAHAN

AMPLIFIKASI PRIMER 16S rRNA UNTUK KEPENTINGAN IDENTIFIKASI BAKTERI RHIZOSFER DI LAHAN REKLAMASI PT. VALE

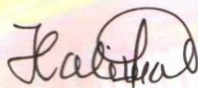
ATISA MUSLIMIN
M011171038

Telah dipertahankan dihadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Sarjana Studi Kehutanan Fakultas Kehutanan
Universitas Hasanuddin
pada tanggal 21 Mei 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping



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



Gusmiaty, SP., MP
NIP. 19791120 200912 2 002

Ketua Program Studi



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

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Atisa Muslimin
Nim : M011171038
Program Studi : Kehutanan
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul

“Amplifikasi Primer 16S rRNA Untuk Kepentingan Identifikasi Bakteri Rhizosfer Di Lahan Reklamasi 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, 21 Mei 2021

Yang menyatakan



Atisa Muslimin

ABSTRAK

ATISA MUSLIMIN (M011171038) Amplifikasi Primer 16S rRNA untuk Kepentingan Identifikasi Bakteri Rhizosfer di Lahan Reklamasi PT. Vale

Kemajuan teknologi memungkinkan untuk untuk menganalisis spesies bakteri dilaboratorium dengan melakukan isolasi DNA atau dari sampel bakteri yang diambil dari lingkungan. Perbandingan urutan gen dari spesies bakteri menunjukkan bahwa gen 16S rRNA kekal dalam suatu spesies dan diantara spesies yang sama genusnya, dan dapat digunakan sebagai teknik baru untuk identifikasi bakteri pada tingkat spesies. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui isolat bakteri yang didapatkan dilahan reklamasi kawasan PT. Vale serta amplifikasi isolat bakteri dengan menggunakan primer 16S rRNA. Hasil penelitian yang didapatkan bahwa terdapat 5 isolat bakteri rhizosfer dilahan reklamasi PT. Vale dan hanya 1 yang dapat teramplifikasi dengan menggunakan primer 16S rRNA

Kata Kunci: Bakteri, Amplifikasi, 16S rRNA.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, penulis memanjatkan puji dan syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya, yang telah memberikan kekuatan serta kelancaran kepada penulis sehingga mampu menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul “Amplifikasi Primer 16S rRNA Untuk Kepentingan Identifikasi Bakteri Rhizosfer Di Lahan Reklamasi PT. Vale”. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Kehutanan pada Fakultas Kehutanan, Universitas Hasanuddin. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan yang tulus kepada semua pihak yang telah membantu selama penelitian juga dalam proses penyusunan skripsi ini, terutama kepada **Dr. Siti Halima Larekeng, MP.** dan **Gusmiaty, S.P., M.P** selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga dan pikiran dalam membimbing serta memberi arahan dalam penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, sejak duduk dibangku perkuliahan hingga pada penyusunan skripsi, akan sangat sulit untuk menyelesaikannya. Oleh karenanya, pada kesempatan ini secara khusus dan penuh kerendahan hati penulis menghantarkankan banyak terimakasih kepada :

1. Kedua orang tua saya Bapak **Ir. Mukri Muslimin** dan Ibu **Bungawati** yang tercinta dan terhormat atas bimbingan, dorongan, segala bantuan serta doa restu yang diberikan kepada penulis selama penyusunan skripsi **Atira Muslimin** dan **Atiqa Muslimin** yang tersayang atas dukungan, motivasi serta doa restunya.
2. **Ir. Budirman Bachtiar, M.S** dan **Prof. Dr Iswara Gautama, M.Si** selaku dosen penguji yang telah memberikan masukan dan saran, bantuan serta koreksi dalam penyusunan skripsi.

3. **Harlina S, S.Si., Sri Wahyuni Jufri S.Hut., Fitriani S.Hut., Iswanto S. Hut. M.Si, Iser Purwanti Ayu** serta teman teman biotek lainnya yang telah ikut berpartisipasi dalam penyusunan penelitian ini.
4. **Keluarga Mahasiswa Kehutanan Sylva Indonesia (PC.) Universitas Hasanuddin** yang selama ini menjadi wadah atau tempat belajar diluar bangku kuliah. Terima kasih untuk segala ilmu, kesempatan dan pengalaman berharganya.
5. Terima kasih untuk Saudaraku **FRAXINUS**, terima kasih atas kerjasamanya, doa dan semangat yang kalian berikan kepada penulis dalam menyelesaikan kuliah di Fakultas Kehutanan, Universitas Hasanuddin.
6. **Andi Sindy Wahyuni Arista, Resky Amelia, Annisa Nurislami S.Hut, Jessica Zabrina Muddin, Syarifa Nirmala Asjum Kaslabi, Agustina L** selaku orang-orang yang paling berkesan dalam 3 tahun terakhir ini.

Dengan keterbatasan ilmu dan pengetahuan, penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Bertolak dari itulah, penulis mengharapkan adanya koreksi, kritik dan saran yang membangun, dari berbagai pihak sehingga menjadi masukan bagi penulis untuk peningkatan di masa yang akan datang. Akhir kata penulis mengharapkan penyusunan skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Wassalamu'alaikum Wr.Wb

Makassar, 21 Mei 2021

Atisa Muslimin

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN KEASLIAN.....	iii
ABSTRAK	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan dan Kegunaan	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Reklamasi Tambang	5
2.2 Bakteri Rhizosfer	6
2.3 Media Biakan Mikroba	7
2.3.1 Nutrient Broth.....	9
2.4 Identifikasi Mikroba dengan Pendekatan Molekuler 16S rRNA.....	9
III. METODOLOGI PENELITIAN	11
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	11
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	11
3.3 Metode Pelaksanaan Penelitian	12

3.3.1	Pembuatan Media Biakan Mikroba	12
3.3.2	Proses Pengenceran.....	13
3.3.3	Proses Pemurnian	13
3.3.4	Isolasi DNA	14
3.3.5	Uji Kuantitas DNA	15
3.3.6	Uji Kualitas DNA	15
3.3.7	Amplifikasi DNA	16
3.3.8	Elektroforesis.....	16
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	18
4.1	Hasil Isolat Bakteri	18
4.2	Analisis Molekuler Isolat Bakteri Rhzosfer	21
4.3	Uji Kuantitas DNA	22
4.4	Uji Kualitas DNA	23
4.5	Amplifikasi DNA menggunakan Primer 16S rRNA	24
V.	KESIMPULAN.....	26
5.1	Kesimpulan	26
5.2	Saran.....	26
	DAFTAR PUSATAKA	27
	LAMPIRAN.....	31

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Judul	Halaman
Gambar 1.	Isolat Bakteri dari hasil Pengenceran.....	18
Gambar 2.	Elektroforegram Hasil Uji Kualitas DNA Isolat Bakteri	23
Gambar 3.	Hasil Amplifikasi PCR DNA Isolat Bakteri menggunakan Primer 16S rRNA	24

DAFTAR TABEL

Tabel	Judul	Halaman
Tabel 1.	Alat dan Bahan yang digunakan pada Isolasi dan Identifikasi Molekuler Bakteri	11
Tabel 2.	Karakteristik Makroskopis Bakteri Rhizosfer Hasil Isolasi dilahan Reklamasi PT. Vale.....	19

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Judul	Halaman
Lampiran 1.	Dokumentasi peremajaan isolat cendawan	32
Lampiran 2.	Hasil Peremajaan Isolat Bakteri Rhizosfer	33
Lampiran 3.	Bambar Bentuk Koloni, Pengebaran, Dan Pinggiran Bakteri	34
Lampiran 4.	Alat dan bahan yang digunakan pada pembuatan media dan peremajaan Bakteri Rhizosfer	36

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

PT Vale Indonesia dalam penambangannya menggunakan sistem tambang terbuka atau open cast. Secara umum, tahapan kegiatan penambangan yang dilakukan meliputi pembukaan lahan, pengupasan lapisan tanah pucuk (top soil) dimana penambangannya dilakukan dengan cara memotong bagian sisi bukit dari puncak menuju ke bawah sesuai dengan garis konturnya, sehingga dapat disebut juga Countour Mining dan tanah penutup (overburden), pemindahan material tanah dan batuan hingga diperoleh lapisan kaya nikel yang disebut saprolite ore. Bekas lapisan galian tersebut ditimpuk pada wilayah sekitar areal penambangan dan akan ditimbun kembali setelah kegiatan penambangan selesai (Sariwahyuni, 2012)

Salah satu kegiatan reklamasi adalah revegetasi. Revegetasi adalah usaha untuk memperbaiki dan memulihkan vegetasi yang rusak melalui kegiatan penanaman dan pemeliharaan pada lahan bekas penggunaan kawasan hutan (Permenhut RI No P.4/Menhut-II/2011). Revegetasi yang sukses tergantung pada pemilihan jenis vegetasi yang mudah menyesuaikan diri dengan karakteristik tanah, iklim dan tujuan akhir pascatambang (Cakyayanti & Setiadi, 2014).

Menurut Netty et al., 2011 bahwa salah satu tumbuhan yang tumbuh pada lahan pascatambang Sorowako, Sulawesi Selatan adalah *Sarcotheca celebica*. *Sarcotheca celebica* adalah tumbuhan yang mempunyai kemampuan Hiperakumu Nikel (tanaman penyerap kadar Nikel yang tinggi). Berdasarkan hal ini *Sarcotheca celebica* dapat digunakan sebagai salah satu jenis tumbuhan dalam revegetasi lahan pascatambang. *Melastoma malabatricum* merupakan jenis tumbuhan yang ditemukan juga pada wilayah PT. Vale Sorowako, jenis tumbuhan ini menunjukkan mampu adaptif dan masuk dalam kategori tumbuhan akumulator rendah (*low accumulator*).

Menurut Muhlis et al, (2015) *Scleria lithosperma* dan *Machaerina glomerata* merupakan jenis rerumputan yang juga daerah PT. Vale. Rerumputan merupakan jenis yang dominan tumbuh pada lahan pascatambang Nikel hal ini disebabkan dalam proses suksesi. Biji yang ringan dari bibit rerumputan mudah tertiuip angin

atau terbawa oleh hewan yang melintas di lahan pascatambang tersebut dan tumbuh pada lahan pascatambang. Selain itu kelebihan rerumputan sebagai jenis yang dominan tumbuh disebabkan oleh akar yang panjang dan halus sehingga mudah menjangkau unsur hara dalam tanah dan adanya asosiasi dengan mikroba dalam tanah misalnya rumput *Ischaemum barbatum* berasosisasi dengan FMA (Saidy & Mardatin, 2013).

Menurut Prayudyaningsih & Sari (2015) bahwa, pertumbuhan pohon tidak lepas dari kondisi tanah tempat pohon tersebut. Salah satu bagian tanah yang mengandung banyak mikroba yang bermanfaat bagi pertumbuhan tanaman yaitu rhizosfer. Mikroba rhizosfer berperan penting dalam siklus hara dan proses pembentukan tanah, pertumbuhan tanaman, mempengaruhi aktivitas mikroba serta sebagai pengendali hayati terhadap pathogen akar. rhizosfer merupakan bagian tanah yang berada di sekitar perakaran tanaman.

Populasi mikroorganisme di rhizosfer tanah umumnya lebih banyak dan beragam dibandingkan pada tanah nonrhizosfer. Aktivitas mikroorganisme rhizosfer dipengaruhi oleh eksudat yang dihasilkan oleh perakaran tanaman. Beberapa mikroorganisme rhizosfer berperan dalam siklus hara dan proses pembentukan tanah, pertumbuhan tanaman, memengaruhi aktivitas mikroorganisme, serta sebagai pengendali hayati terhadap patogen akar (Simatupang, 2008).

Kelompok utama mikroba tanah meliputi bakteri, cendawan dan protozoa. Diantara ketiga mikroorganisme tersebut bakteri merupakan mikroba yang melimpah jumlahnya di dalam tanah. Menurut Ferfinia (2010), pada tanah di daerah rhizosfer memiliki jumlah bakteri, cendawan dan actinomycetes yang lebih banyak dibandingkan tanah tanpa sistem perakaran (tanpa rhizosfer), untuk mengetahui jenis bakteri, cendawan dan actinomycetes yang terdapat pada tanah perlu dilakukan identifikasi, baik itu secara konvensional dan molekuler.

Identifikasi bakteri dapat dilakukan dengan menggunakan metode konvensional dan molekuler. Metode konvensional dapat dilakukan dengan berdasarkan pada karakteristik fenotip yaitu pewarnaan Gram, morfologi dan reaksi biokimia. Namun, metode identifikasi bakteri secara konvensional ini memiliki beberapa kelemahan. Metode ini tidak dapat digunakan untuk organisme

yang belum teridentifikasi. Lebih lanjut, kita kadang-kadang dihadapkan dengan organisme yang menunjukkan karakteristik biokimia yang tidak cocok dengan pola setiap genus dan spesies yang dikenal. Sementara itu, identifikasi organisme yang ketika dikultur tumbuhnya lambat menjadi sangat sulit. Karakter fisik dan biokimiawi merupakan karakter yang tidak statis dan berubah karena adanya stress dan evolusi, maka hal ini juga mempengaruhi hasil identifikasi (Setiawan et al., 2017).

Saat ini 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 (Rinanda, 2011).

Kemajuan teknologi memungkinkan untuk menganalisis spesies bakteri di laboratorium dengan melakukan isolasi DNA atau dari sampel bakteri yang diambil dari lingkungan. Sejak penemuan Polymerase Chain Reaction dan sekuensing DNA, perbandingan urutan gen dari spesies bakteri menunjukkan bahwa gen 16S rDNA sangat kekal dalam suatu spesies dan di antara spesies yang sama genusnya, dan dapat digunakan sebagai teknik baru untuk identifikasi bakteri pada tingkat spesies. Penentuan spesies bakteri telah diperkenalkan gen 16S rRNA yang terdapat pada bakteri (Setiawan et al, 2017)

Gen 16S rRNA adalah gen yang paling lestari pada bakteri. Gen yang paling lestari ini maksudnya adalah gen yang mudah dicari kemiripannya dengan gen yang lain dari spesies bakteri berbeda. Oleh sebab itu gen 16S rRNA sangat membantu dalam menentukan pembeda dan penanda suatu spesies bakteri yang ada. Molekul gen 16S rRNA memiliki urutan basa yang relatif konservatif dan beberapa daerah variatif. (Dewata et al, 2016).

Pemanfaatan gen 16S rRNA untuk metode deteksi molekuler dianggap memiliki tingkat diskriminasi yang rendah karena sebagian besar hasil runutan DNA 16S rRNA menunjukkan adanya kesamaan yang tinggi di dalam satu

spesies. Apabila homologi sekuen 16S rRNA menunjukkan <97.5% dapat dikatakan sebagai spesies yang berbeda (Janda & Abbott, 2007).

Penelitian yang dilakukan Dewata et al (2016) yaitu identifikasi molekuler gen 16S rRNA isolat bakteri pendegradasi inulin dari rizosfer umbi dahlia, bahwa berdasarkan identifikasi molekuler gen 16S rRNA isolat bakteri RZ-01 pendegradasi inulin dari rizosfer umbi Dahlia dapat disimpulkan bahwa isolat bakteri RZ-01 termasuk kedalam species *Enterobacteria erogenes*. Hal ini menunjukkan bahwa adanya kecocokan antara gen 16S rRNA dengan isolat bakteri yang digunakan

Berdasarkan akan hal tersebut, maka dilakukan penelitian ini untuk mengetahui lebih lanjut tentang bakteri rhizosfer dan mengetahui hasil isolasi mikroba murni serta amplifikasinya terhadap primer 16S rRNA di lahan reklamasi pasca tambang dengan pendekatan molekuler.

1.1 Tujuan dan Kegunaan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui isolat bakteri rhizosfer di lahan reklamasi PT. Vale yang dapat teramplifikasi menggunakan primer 16S rRNA.

Kegunaan dari penelitian ini, adalah mampu mengamplifikasikan DNA isolat bakteri rhizosfer di lahan reklamasi PT. Vale untuk digunakan sebagai kepentingan pengidentifikasian bakteri di lahan reklamasi PT. Vale pada umumnya.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Reklamasi Tambang

Reklamasi adalah suatu kegiatan pengelolaan tanah yang mencakup perbaikan kondisi fisik tanah (*overburden*) agar tidak terjadi longsor, pembuatan waduk untuk perbaikan kualitas air asam tambang yang beracun, yang kemudian harus dilanjutkan dengan melakukan revegetasi. Pada dasarnya reklamasi dan revegetasi merupakan salah satu usaha yang dilakukan untuk memperbaiki kondisi lahan pasca penambangan (Setyowati et al, 2017).

Salah satu bentuk reklamasi adalah dengan melakukan alih fungsi lahan bekas tambang menjadi lahan pertanian tanaman pangan dengan melakukan tiga tahapan reklamasi. Pemulihan fungsi lahan, peningkatan fungsi lahan, dan pemeliharaan fungsi lahan (Hermawan, 2011).

Penambangan di Indonesia umumnya dilakukan dengan cara terbuka atau open pit mining. Pengambilan biji tambang dilakukan dengan terlebih dahulu membersihkan area tambang dari vegetasi (*land clearing*) diikuti dengan mengupas lapisan-lapisan tanah hingga sampai pada deposit biji tambang. Lapisan tanah pucuk disisihkan di tempat khusus untuk digunakan pada saat penimbunan atau reklamasi. Setelah biji tambang terambil, lubang tambang diisi kembali dengan tanah bekas galian (*overburden*) dan *tailing* (tanah limbah sisa proses pengambilan biji tambang), dipadatkan dan kemudian ditutup dengan lapisan tanah pucuk yang sebelumnya telah disisihkan untuk kemudian ditanami. Dengan kondisi yang seperti itu maka lahan bekas tambang umumnya memiliki ciri lapisan tanah pucuk dan *sub soil* yang tipis sehingga sedikit pula bahan organik tanah beserta mikroba tanah yang sangat diperlukan untuk pertumbuhan tanaman (Oktorina, 2018).

Pengembalian keadaan lahan kepada kondisi awal memerlukan waktu yang lama, karena rusak komponen-komponen tanah, kandungan bahan organik yang rendah juga menyebabkan rendahnya aktifitas dan populasi mikroba (Romero et al., 2005).

Salah satu penentu keberhasilan reklamasi salah satunya adalah dengan pemilihan tanaman yang sesuai dengan kondisi lahan. Tanaman yang sering

dipilih dalam melakukan revegetasi tanah pada lahan bekas tambang biasanya dilakukan dengan menanam tanaman akasia (*A. mangium* dan *A. auriculiformis*), gamal dan sengon (Cakyayanti & Setiadi, 2014). Namun pemilihan tanaman haruslah sesuai dengan kondisi lahan bekas tambang.

Reklamasi dinilai berhasil apabila telah memenuhi kriteria keberhasilan reklamasi yang ditetapkan. Dalam hal ini untuk kegiatan revegetasi perlu memperhatikan antara jenis tanaman yang dipilih dan syarat tumbuh tanaman dengan kondisi lahan, agar kriteria keberhasilan reklamasi dapat tercapai (Setyowati et al, 2017).

2.2 Bakteri Rhizosfer

Kelompok utama mikroba tanah meliputi bakteri, cendawan dan protozoa. Diantara ketiga mikroorganisme tersebut bakteri merupakan mikroba yang melimpah jumlahnya di dalam tanah. Setiap gram tanah diperkirakan terdapat 60.000 spesies yang berbeda dan jumlahnya mencapai milyaran sel bakteri. Kekayaan rhizosfer akan nutrisi yang bersumber dari eksudat tanaman, memungkinkan peningkatan populasi bakteri (Nuraini et al, 2011). Menurut Ferfinia 2010, pada tanah di daerah rhizosfer memiliki jumlah bakteri, cendawan dan actinomycetes yang lebih banyak dibandingkan tanah tanpa sistem perakaran (tanpa rhizosfer).

Menurut Simatupang, 2008, rhizosfer merupakan bagian tanah yang berada di area sekitar perakaran tanaman. Populasi mikroorganisme di area rhizosfer umumnya lebih banyak dan beragam dibandingkan pada tanah nonrhizosfer. Aktivitas mikroorganisme rhizosfer dipengaruhi oleh nutrisi yang dihasilkan oleh perakaran tanaman budidaya. Beberapa mikroorganisme rhizosfer berperan dalam siklus hara, kualitas tanah, proses pembentukan tanah, memengaruhi aktivitas mikroorganisme, pertumbuhan tanaman, serta sebagai pengendali hayati terhadap penyakit pada akar.

Tanah merupakan habitat bagi organisme dari yang berukuran makro seperti cacing, predator seperti tikus, maupun hewan lainnya yang hidup di tanah, hingga yang berukuran mikro seperti jamur, bakteri, dan protozoa. Masing-masing organisme memiliki peran penting dalam siklus materi-energi yang sangat

diperlukan oleh tanaman. Kolaborasi dan aktivitas organisme tanah ini memerlukan kondisi lingkungan yang mendukung seperti temperatur, pH, struktur tanah, kelembaban, dan faktor-faktor yang lain (Juriah & Sari, 2018).

Mikroorganisme di dalam tanah memiliki peran penting dalam menjaga kesuburan tanah karena mikroorganisme memiliki peran yaitu sebagai dekomposer. Kolaborasi fungsi mikroorganisme tanah akan menghasilkan hara yang dapat digunakan oleh tanaman. Beberapa mikroorganisme yang menyelimuti perakaran tanaman sehat diketahui sebagai pelindung dari serangan patogen layu. Pada perakaran tanaman sehat, bakteri antagonis *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* dan *Streptomyces* sp. dilaporkan dapat mengendalikan *R. solanacearum* pada kentang (Nurbaya et. al, 2011).

Rhizosfer merupakan bagian tanah yang dipengaruhi perakaran dan substansi yang dikeluarkan dari akar ke dalam larutan tanah, sehingga tercipta kondisi yang menyenangkan bagi bakteri tertentu tanaman. Adanya mikroorganisme antagonis pada daerah Rhizosfer dapat menghambat persebaran dan infeksi akar oleh patogen, keadaan ini disebut hambatan alamiah mikroba. Mikroba antagonis sangat potensial dikembangkan sebagai agen pengendalian hayati (Hasanuddin, 2003).

Pentingnya populasi mikroorganisme di sekitar Rhizosfer adalah untuk memelihara kesehatan akar, pengambilan nutrisi atau unsur hara, dan toleran terhadap stress/cekaman lingkungan pada saat sekarang telah dikenal. Mikroorganisme menguntungkan ini dapat menjadi komponen yang signifikan dalam manajemen pengelolaan untuk dapat mencapai hasil, yang mana ditegaskan bahwa hasil tanaman budidaya dibatasi hanya oleh lingkungan fisik alamiah tanaman dan potensial genetik bawaan (Intan, 2007).

2.3 Media Biakan Mikroba

Medium ialah suatu bahan yang terdiri atas campuran nutrisi (zat makanan) yang dipakai untuk menumbuhkan mikroba termasuk bakteri patogen tanaman. Selain itu menumbuhkan mikrobia medium dapat digunakan pula untuk isolasi, memperbanyak, pengujian sifat-sifat fisiologi dan perhitungan jumlah mikroba (Khaeruni & Satrah, 2014).

Medium harus mengandung nutrisi yang merupakan substansi dengan berat molekul rendah dan mudah larut dalam air. Nutrisi ini adalah degradasi dari nutrisi dengan molekul yang kompleks. Nutrisi dalam medium harus memenuhi kebutuhan dasar makhluk hidup, yang meliputi air, karbon, energi, mineral dan faktor tumbuh (Label, 2008).

Pembiakan mikroba secara buatan sangat memerlukan media pertumbuhan untuk menjadi tempat tumbuh dan penyedia nutrisi bagi mikroba. Media pertumbuhan yang terdiri dari garam organik, sumber energi (karbon), vitamin dan zat pengatur tumbuh. Pembuatan media ini dapat pula ditambahkan komponen lain seperti senyawa organik dan senyawa kompleks lainnya.

Media berfungsi untuk tempat tumbuhnya mikroba, isolasi, memperbanyak jumlah, menguji sifat-sifat fisiologi dan perhitungan jumlah mikroba, dimana dalam proses pembuatannya harus disterilisasi dan menerapkan metode aseptis untuk menghindari kontaminasi pada media itu sendiri (Label, 2008).

Media juga berperan sebagai wadah atau tempat zat hara yang digunakan oleh mikroorganisme untuk pertumbuhan, sintesis sel, keperluan energi dalam metabolisme, dan pergerakan. umumnya, media pertumbuhan berisi air, sumber energi, zat hara sebagai sumber karbon, nitrogen, sulfur, fosfat, oksigen, hidrogen, serta unsur-unsur lainnya. Variasi dalam tipe nutrisi, diimbangi oleh tersedianya berbagai macam media yang banyak macamnya untuk kultivasinya (Radji, 2011).

Pembiakan mikroba dalam laboratorium memerlukan media yang berisi zat-zat hara atau nutrisi serta lingkungan pertumbuhan sesuai dengan mikroorganisme (Rahayu et. al, 2014). Nutrisi yang diperlukan mikroorganisme seperti bakteri dan jamur biasanya berupa senyawa sederhana yang tersedia secara langsung atau berasal dari senyawa kompleks yang kemudian dipecah oleh mikroorganisme menjadi senyawa yang sederhana melalui proses enzimatik. Menurut Radji (2011), nutrisi yang dibutuhkan mikroorganisme untuk pertumbuhannya meliputi karbon, nitrogen, unsur non logam seperti sulfur dan fosfor, unsur logam seperti Ca, Zn, Na, K, Cu, Mn, Mg, dan Fe, serta vitamin, air, dan energi. Media pertumbuhan mikroorganisme seperti bakteri harus memenuhi

syarat nutrisi yang dibutuhkan. Media biakan dapat yang berupa cairan, padatan, dan setengah padat (semi solid) tergantung bakteri yang akan ditumbuhkan.

2.3.1 Nutrient Broth (NB)

Media merupakan sarana pertumbuhan yang mengandung nutrisi yang sangat dibutuhkan oleh mikroorganisme sebagai makanannya. Mikroorganisme dalam pertumbuhannya membutuhkan unsur logam seperti natrium, kalium, kalsium, magnesium, mangan, besi, seng, tembaga, fosfor, cobalt, hidrogen, oksigen dan sulfur.

(Basu et al. 2015) memberikan info bahwa terdapat enam komponen pertama yang digunakan dalam sintesis adalah karbohidrat, lipid, protein dan asam nukleat dan dua sisanya ada di dalam sel sebagai kation dan memainkan berbagai peran. Pada organisme heterotrof, kebutuhan akan faktor tumbuh sudah dapat terpenuhi oleh ekstrak daging (Purwaning,2017).

Media NB (*Nutrient Broth*) 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. Mahalnya harga media serta melimpahnya sumber alam dan pemanfaatan limbah yang dapat digunakan sebagai media pertumbuhan mikroorganisme mendorong para peneliti untuk menemukan media alternatif dari bahan-bahan yang mudah didapat dan tidak memerlukan biaya yang mahal (Juriah & Sari, 2018).

2.4 Identifikasi Mikroba dengan Pendekatan Molekuler 16S rRNA

Proses identifikasi bakteri secara konvensional berdasarkan karakter fenotip bakteri seperti pewarnaan Gram, morfologi koloni, dan aktivitas enzim seringkali tidak bersifat statis dan dapat berubah seiring dengan adanya evolusi. Kesalahan identifikasi seringkali terjadi dikarenakan hadirnya karakteristik fenotip bakteri yang tidak biasa ataupun kurangnya pengalaman dalam menginterpretasikan data karakter fenotip, hal ini menimbulkan hadirnya metode identifikasi secara

molekuler menggunakan gen 16S rRNA. Mengurangi prasangka penafsiran dan menyingkirkan kebutuhan untuk kemungkinan "pretest" mengenai klasifikasi mikroorganisme untuk pemeriksaan langsung dan pemilihan database (Petti et al., 2005).

Gen 16S rRNA adalah gen yang digunakan dalam menentukan filogenetik dan taksonomi dari bakteri secara molekuler. Penggunaan 16S rRNA sekuensing gen di laboratorium klinis menjadi umum untuk mengidentifikasi bakteri biokimia tak dikenal atau menyediakan referensi identifikasi untuk strain yang tidak biasa. (Janda & Abbott, 2007). Penggunaan gen 16S rRNA dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) memungkinkan untuk mengidentifikasi bakteri amilolitik dengan cepat dan spesifik. PCR merupakan suatu metode enzimatik untuk melipat gandakan secara eksponensial suatu sekuens nukleotida tertentu dengan cara in vitro (Yuwono, 2006).

Gen 16S rRNA memiliki daerah-daerah yang secara universal bersifat lestari. Pada beberapa bagian lain terdapat daerah yang bersifat semi-lestari, dan variabel. Pada gen 16S rRNA terdapat 9 daerah variabel yang ditandai dengan V1 sampai V9 (Baker et. al, 2003).

Molekul 16S rRNA merupakan salah satu molekul rRNA penyusun ribosom sub unit kecil pada prokariot. Molekul 16S rRNA mempunyai fungsi yang identik pada seluruh organisme, terdistribusi secara universal dan bersifat sangat lestari (Madigan & Martinko, 2006).