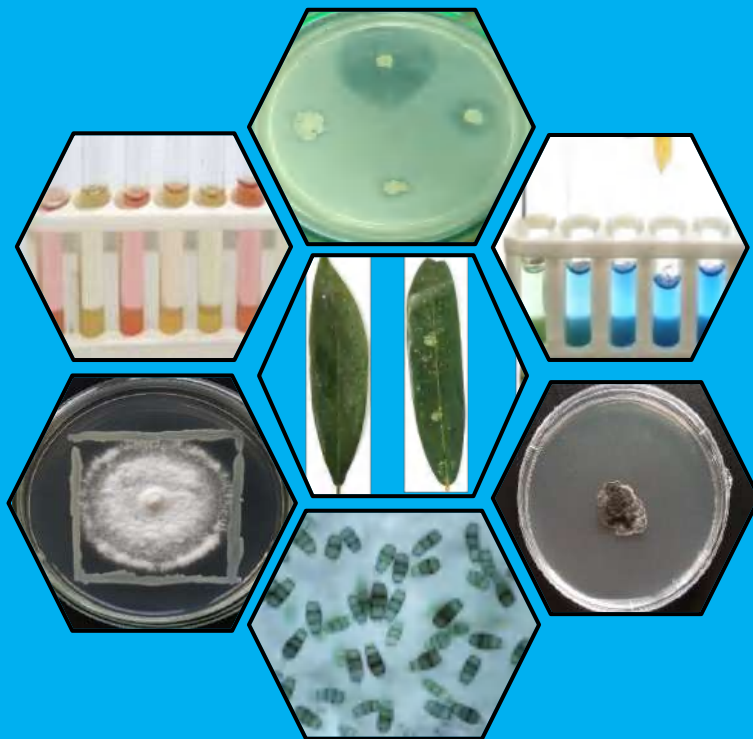


**Identifikasi dan Karakterisasi Mikroba pada daun Eboni (*Diospyros celebica* Bakh.)**

**Identification and Characterization of Microbes on *Diospyros celebica* (Bakh.) Leaves**



**DWI SULASTRI  
M012221005**



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KEHUTANAN  
FAKULTAS KEHUTANAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR**

**2024**

**Identifikasi dan Karakterisasi Mikroba pada daun Eboni (*Diospyros celebica*  
Bakh.)**

**DWI SULASTRI  
M012221005**



**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KEHUTANAN  
FAKULTAS KEHUTANAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

**Identification and Characterization of Microbes on *Diosphyros celebica*  
(Bakh.) Leaves**

**DWI SULASTRI  
M012221005**



**Y PROGRAM MASTER FORESTRY SCIENCE  
FACULTY OF FORESTRY  
HASANUDDIN UNIVERSITY  
MAKASSAR  
2024**

Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

## HALAMAN PENGANTAR

### IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI MIKROBA PADA DAUN EBONI (*DIOSPYROS CELEBICA* BAKH.)

Tesis

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Ilmu Kehutanan

Disusun dan diajukan oleh

**DWI SULASTRI**

**M012221005**

Kepada



**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KEHUTANAN  
FAKULTAS KEHUTANAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

**HALAMAN PENGESAHAN**

**TESIS**

**IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI MIKROBA PADA DAUN EBONI  
(DIOSPYROS CELEBICA BAKH.)**

**DWI SULASTRI  
M012221005**

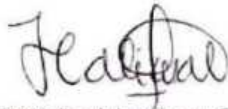
Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Magister 21 Oktober 2024  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Pada

Program Studi Magister Ilmu Kehutanan  
Departman Kehutanan  
Fakultas Kehutanan  
Universitas Hasanuddin  
Makassar

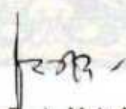
Mengesahkan:

Pembimbing Utama,



Dr. Siti Halimah Larekeng, SP., MP.  
NIP.198202092015042002

Pembimbing Pendamping,



Prof. Dr. Ir. Muh. Restu, MP.  
NIP.19650904 199203 1 001

Pembimbing Pendamping,



Yeni Khairina, Ph.D  
NIP.199010052022022001

Ketua Program Studi  
Magister Ilmu Kehutanan,



S.Hut., MP., Ph.D  
1209 200812 1 001

Dekan Fakultas Kehutanan  
Universitas Hasanuddin,



Prof. Dr. A. Muietahid M, S.Hut., MP  
NIP. 19690908 199702 1 002

## PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul "IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI MIKROBA PADA DAUN EBONI (*DIOSPYROS CELEBICA* BAKH.)" adalah benar karya saya dengan arahan dari tim pembimbing (Dr. Siti Halimah Larekeng, SP., MP sebagai Pembimbing Utama dan Prof. Dr. Ir. Muh. Restu, MP sebagai Pembimbing Pendamping). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka tesis ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 18 November 2024



DWI SULASTRI  
NIM. M012221005



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian yang saya lakukan dapat terlaksana dengan sukses dan Tesis ini dapat terampungkan atas bimbingan, diskusi dan arahan Dr. Siti Halimah Larekeng, SP., MP sebagai Pembimbing Utama dan Prof. Dr. Ir. Muh. Restu, MP dan Yeni Khairina, P.hD sebagai Pembimbing Pendamping. Saya mengucapkan berlimpah terima kasih kepada mereka. Bersama ini saya mengucapkan terima kasih kepada Dr. Ir. Sitti Nuraeni, MP, Dr. Ir. Astuti, S.Hut., M.Si., IPU dan Dr. Ir. Beta Putranto, M.Sc yang telah bersedia menjadi Panitia Penilai dalam Penyusunan Tesis ini. Ucapan terima kasih juga saya ucapkan kepada pimpinan Universitas Hasanuddin dan Prodi Fakultas Kehutanan Universitas Hasanuddin yang telah memfasilitasi saya menempuh program megister serta para dosen. Penghargaan yang tinggi juga saya sampaikan kepada Pihak Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) yang telah mengizinkan saya untuk melaksanakan penelitian, terkhusus kepada Peneliti Pusat Riset Mikrobiologi Terapan-BRIN Dr. Rumella Simarmata, M.Biotech; Margaretta Christita S. Hut, M.Biotech, Ph.D.; Sylvia J.R. Lekatompessy, dan Tiwit Widowati, serta tehniisi laboratorium Liseu Nurjanah dan Nuriyanah dalam bantuan penyusunan pada proses penelitian ini. Akhirnya, kepada kedua orang tua tercinta saya mengucapkan limpah terima kasih atas doa, pengorbanan dan motivasi mereka selama saya menempuh pendidikan. Penghargaan yang besar juga saya sampaikan kepada teman mahasiswa yang melaksanakan penelitian di BRIN atas bantuan dan dukungan yang tak ternilai.

Penulis, 18 November 2024

Dwi Sulastri  
M012221005



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

## ABSTRAK

DWI SULASTRI. **Identifikasi dan Karakterisasi Mikroba pada daun Eboni (*Diospyros celebica* Bakh.)** (dibimbing oleh Siti Halimah Larekeng, Muh Restu, Yeni Khairina)

**Latar Belakang.** *Diospyros celebica* Bakh. adalah tanaman endemik Sulawesi dan saat ini diklasifikasikan sebagai spesies yang terancam punah karena eksploitasi dan regenerasi di alam tergolong lambat. Upaya konservasi, budidaya, dan pengelolaan penyakit perlu dilakukan untuk mencegah kepunahannya. Jamur patogen telah diidentifikasi sebagai penyebab penyakit pada berbagai tanaman hutan, termasuk genus *Diospyros*, sehingga menekankan perlunya mengidentifikasi patogen jamur yang menyerang eboni. Selain jamur patogen, pada tanaman terdapat bakteri. Bakteri dapat digunakan untuk biokontrol dan sebagai pemacu pertumbuhan tanaman. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi Mikroba pada daun *D. celebica*, jamur pathogen dan bakteri potensial biocontrol dan biostimulan. **Metode.** Penelitian ini dibagi menjadi beberapa tahap yakni: 1) Analisis Metagenomik; 2) Isolasi dan karakterisasi bakteri potensial Biostimulan; 3) Isolasi dan identifikasi jamur patogen; 4) Identifikasi dan karakterisasi bakteri potensial biocontrol. **Hasil.** Penelitian ini memperoleh 36 isolat bakteri dari daun tanpa gejala, termasuk isolat filofit dan endofit, dan 26 isolat jamur dari daun bergejala, yang mewakili empat genera jamur patogen. Dua isolat jamur diklasifikasikan sebagai jamur patogen adalah *Neopestalotiopsis clavispora* dan *Phyllosticta alliacea*. Sepuluh isolat bakteri potensial dikarakterisasi, menunjukkan kemampuan seperti sintesis hormon IAA, fiksasi nitrogen, dan pelarutan fosfat. Uji antagonis mengkonfirmasi bahwa dua isolat bakteri, *Bacillus altitudinis* dan *B. tequilensis*, dapat menjadi agen biokontrol yang potensial. Penelitian ini memberikan kontribusi dalam memahami interaksi mikroba dan potensi pengembangan agen biokontrol menggunakan bakteri untuk pohon eboni dan tanaman hutan lainnya.

Kata kunci: *Diospyros celebica*; Jamur Patogen; Bakteri Biostimulan; Biokontrol.





## ABSTRACT

DWI SULASTRI. **Identification and Characterization of Microbes on *Diospyros celebica* (Bakh.) Leaves** (supervised by Siti Halimah Larekeng, Muh Restu, Yeni Khairina)

**Background.** *Diospyros celebica* Bakh. is endemic to Sulawesi and is currently classified as a threatened species due to slow exploitation and regeneration in nature. Conservation, cultivation, and disease management efforts are necessary to prevent its extinction. Pathogenic fungi have been identified as the cause of disease in various forest plants, including the *Diospyros* genus, thus emphasizing the need to identify fungal pathogens that attack ebony. In addition to pathogenic fungi, bacteria are present in plants. Bacteria can be used for biocontrol and as plant growth promoters. **Objective.** This study aims to identify and characterize Microbes on *D. celebica* leaves, pathogenic fungi and potential biocontrol and biostimulant bacteria. **Methods.** This research is divided into several stages, namely: 1) Metagenomic analysis; 2) Isolation and characterization of potential biostimulant bacteria; 3) Isolation and identification of pathogenic fungi; 4) Identification and characterization of potential biocontrol bacteria. **Results.** This study obtained 36 bacterial isolates from symptomless leaves, including phyllosphere and endophytic isolates, and 26 fungal isolates from symptomatic leaves, representing four genera of pathogenic fungi. Two fungal isolates classified as pathogenic fungi were *Neopestalotiopsis clavispora* and *Phyllosticta alliacea*. Ten potential bacterial isolates were characterized, showing capabilities such as IAA hormone synthesis, nitrogen fixation, and phosphate solubilization. Antagonistic tests confirmed that two bacterial isolates, *Bacillus altitudinis* and *B. tequilensis*, could be potential biocontrol agents. This study contributes to understanding microbial interactions and the potential development of biocontrol agents using bacteria for ebony trees and other forest plants.

Keywords: *Diospyros celebica*; Pathogenic Fungus; Biostimulant Bacteria; Biocontrol.



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>iii</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>iv</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>v</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>vi</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan.....	3
1.4. Kerangka Berpikir .....	3
<b>BAB II METOLOGI PENELITIAN</b> .....	<b>5</b>
2.1. Waktu & Tempat .....	5
2.2. Alat & Bahan .....	5
2.3. Tahapan Penelitian .....	8
2.3.1. Pengambilan Sampel.....	8
2.3.2. Analisis Keragaman Mikroba dengan Metagenomik .....	8
2.3.3. Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Potensial Biostimulan .....	9
1. Pembuatan Media isolasi bakteri & Reagen.....	9
2. Isolasi Bakteri.....	12
3. Uji Bakteri Penghasil Hormon laa.....	14
4. Uji Bakteri Penambat Nitrogen.....	14
5. Uji Bakteri Pelarut Fosfat .....	15
2.3.4. Isolasi dan Identifikasi Jamur Patogen .....	16
1. Pembuatan Media isolasi Jamur.....	16
2. Isolasi Jamur.....	17
3. Identifikasi Makroskopis dan Mikroskopis Jamur .....	18
4. Identifikasi Molekuler Jamur Patogen.....	19
2.3.5. Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Potensial Biokontrol .....	19
1. Uji Antagonis.....	19
2. Identifikasi Molekuler Bakteri Potensial Biokontrol.....	19
2.4. Analisis Data .....	20
2.5. Alur Penelitian .....	24
<b>BAB III HASIL &amp; PEMBAHASAN</b> .....	<b>25</b>
3.1. Deskripsi Sampel .....	25
3.2. Analisis Metagenomik .....	27
3.2.1. Analisis Metagenomik Bakteri Daun <i>D. Celebica</i> .....	27
1. Analisis Keragaman Alfa.....	27
2. Analisis Keragaman Beta.....	28
latif .....	30
enomik Jamur Daun <i>D. Celebica</i> .....	33
man Alfa .....	33
man Beta.....	34
latif .....	35
terisasi Bakteri Potensial Biostimulan .....	38
.....	38
ghasil Hormon laa .....	39



3.3.3. Uji Bakteri Penambat Fosfat .....	40
3.3.4. Uji Bakteri Pelarut Nitrogen.....	42
3.4. Isolasi dan Identifikasi Jamur Patogen .....	44
3.4.1. Isolasi Jamur .....	44
3.4.2. Identifikasi Makroskopis dan Mikroskopis Jamur .....	44
3.4.3 Identifikasi Molekuler Jamur Patogen .....	47
3.5. Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Potensial Biokontrol .....	50
3.5.1. Uji Antagonis .....	50
3.5.2. Identifikasi Molekuler Bakteri .....	52
<b>BAB IV KESIMPULAN .....</b>	<b>55</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>56</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>65</b>



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

## DAFTAR TABEL

No.Urut.....	Hal.
1. Alat dan Bahan yang digunakan pada beberapa tahapan penelitian.....	6
2. Data Sampel Daun <i>D. celebica</i> .....	9
3. Hasil Clean Tag Metagenomik.....	27
4. Hasil Isolat Mikroba dari daun <i>D.celebica</i> .....	38
5. Hasil Identifikasi Jamur secara makroskopis.....	45
6. Hasil BLAST Urutan Fragmen Isolat Jamur.....	47
7. Hasil BLAST Urutan Fragmen Isolat Bakteri.....	52



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

## DAFTAR GAMBAR

No. Urut.....	Hal.
1. Kurva standar IAA.....	21
2. Kurva standar fosfat.....	22
3. Kurva standar nitrogen.....	23
4. Alur Penelitian.....	24
5. Penampakan Sampel Daun Metagenomik.....	25
6. Penampakan Daun Isolasi Bakteri.....	26
7. Penampakan Daun Isolasi Jamur patogen.....	26
8. Analisis Keragaman Alfa Bakteri.....	27
9. UPGMA Cluster Tree Berdasarkan <i>Weighted Unifrac Distance</i> Bakteri.....	29
10. UPGMA Cluster Tree Berdasarkan <i>Unweighted Unifrac Distance</i> Bakteri.....	29
11. Kelimpahan Relatif Bakteri Level Filum.....	30
12. Kelimpahan Relatif Bakteri Level Genus.....	31
13. Analisis Keragaman Alfa Jamur.....	34
14. UPGMA Cluster Tree Berdasarkan <i>Weighted Unifrac Distance</i> Jamur.....	35
15. UPGMA Cluster Tree Berdasarkan <i>Unweighted Unifrac Distance</i> Jamur.....	35
16. Kelimpahan Relatif Jamur Level Filum.....	37
17. Kelimpahan Relatif Jamur Level Genus.....	37
18. Kemampuan mensintesis Hormon IAA dari Isolat Bakteri.....	40
19. Kemampuan Bakteri Melarutkan Fosfat.....	41
20. Hasil Pengamatan Uji Bakteri Penambat Nitrogen (Kualitatif).....	42
21. Kemampuan Bakteri Mengfiksasi Nitrogen.....	43
22. Visualisasi Hasil Amplifikasi DNA Jamur.....	47
23. Pohon pilogenik.....	49
24. Pengamatan Daya Hambat Bakteri terhadap Jamur Patogen.....	51
25. Persentase Daya Hambat Bakteri terhadap Jamur Patogen.....	51
26. Visualisasi Hasil Amplifikasi DNA Bakteri.....	52
27. Pohon pilogentik Bacillus.....	53



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

## DAFTAR LAMPIRAN

1. Hasil Pengukuran Konsentrasi IAA.....	65
2. Hasil Pengamatan Kualitatif Uji Fosfat .....	66
3. Hasil Pengamatan Kuantitatif Uji Fosfat .....	66
4. Pengamatan Konsentrasi Amonium Uji Nitrogen Secara Kuantitatif.....	67
5. 10 Isolat Bakteri potensial Terpilih Untuk Uji Antagonis .....	68
6. Hasil Pengamatan Uji daya Hambat Bakteri Potensial terhadap Jamur Patogen <i>Neopestalotiopsis</i> .....	69
7. Hasil Pengamatan Uji daya Hambat Bakteri Potensial terhadap Jamur Patogen <i>Phyllosticta</i> .....	69
8. Hasil Pengamatan Uji daya Hambat Bakteri Potensial terhadap Jamur Patogen .....	69



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

# BAB I PENDAHULUAN

## 1.1. Latar belakang

Eboni atau (*Diospyros celebica* Bakh) merupakan tumbuhan endemik pada hutan alam di Pulau Sulawesi. Eboni tumbuh menyebar di Sulawesi diantaranya Sulawesi Selatan, Sulawesi Tengah dan Sulawesi Utara. *D. celebica* adalah salah satu jenis pohon unggulan dari Sulawesi (Prasetyawati & Edi, 2013) berdasarkan tingkat kekuatan dan keawetannya ada pada kelas kuat I dan kelas awet I (Martawijaya, 2005). *D. celebica* tergolong *Vulnerable* spesies yang disebabkan oleh eksploitasi yang tidak sebanding dengan regenerasinya di alam. Kegiatan pencegahan kepunahan dapat dilakukan dengan konservasi, budidaya dan manajemen hama penyakit. Bentuk pencegahan dapat dilakukan dengan mempercepat pertumbuhan eboni dan identifikasi hama dan penyebab penyakit.

Penyakit tanaman umumnya disebabkan oleh aktivitas mikroba patogen. Fenomena ini terbukti melalui studi beberapa spesies tanaman kehutanan yang terserang penyakit akibat serangan jamur. Contohnya, penelitian oleh Herliyana *et al.*, (2020) mengamati adanya hawar daun pada daun jabon merah, Nuraeni (2018) melaporkan adanya penyakit layu pada bibit *Gmelina arborea*. Achmad & Maisaroh (2004) juga mencatat keberadaan penyakit hawar daun pada Suren (*Toona sureni*), sementara Arsensi (2018) menemukan adanya penyakit busuk batang pada bibit *Eucalyptus pellita*. Selain itu, Putri *et al.* (2018) menemukan penyakit pada bibit sengon di persemaian. Temuan tersebut, menggarisbawahi peran mikroba patogen dalam mengancam kesehatan tanaman kehutanan. Penyakit pada *D. celebica* belum ditemukan, namun pada daun kerap ditemukan bercak hitam atau coklat yang tidak beraturan. Bercak tersebut merupakan gejala serangan patogen yang disebabkan oleh jamur. Gejala serupa ditemukan pada *D. malabarica* yang menyebabkan penyakit embun Jelaga disebabkan oleh *Meliola sp.* (Anggraeni & Ngatiman, 2006) dan daun kesemek Jepang (*D. kaki*) yang disebabkan oleh jamur *Adisciso kaki sp. nov.* (Yamamoto *et al.*, 2012). Kebaharuan penelitian ini adalah mengisolasi dan mengidentifikasi jamur patogen penyebab gejala bercak yang muncul pada daun tanaman *D. celebica*. Selain itu untuk menambah informasi terkait keragaman jamur patogen pada daun *D. celebica* akan dilakukan metagenomik menggunakan teknologi *Next-generation sequencing* (NGS).

Analisis keragaman (metagenomik) dikenal dengan genomik lingkungan, genomik populasi dan genomik komunitas (Neelakanta & Sultana, 2013), (2020). Metagenomik adalah studi tentang genom komunitas langsung dari lingkungan (Gilbert, 2013), (Nazir, 2016), (Prayogo, 2020). Metagenomik dapat membaca keanekaragaman mikroorganisme dan mikroorganisme yang ada dalam sampel (Alves *et al.*, 2018). Saat ini telah banyak digunakan untuk melihat komunitas mikroba dalam ekosistem tumbuhan (Qu *et al.*, 2023). Metagenomik menggunakan teknologi proses pengurutan DNA genom. NGS (*Next Generation Sequencing*) merupakan salah satu teknologi pengurutan DNA terbaru yang lebih



maju dibandingkan dengan Sequencing Sanger. Teknologi NGS menargetkan wilayah amplifikasi yang lebih spesifik (Amrane & Lagier, 2018). Beberapa Platform yang digunakan dalam metagenomik seperti Illumina, Roche 454, *Sequencing by Oligo Ligation Detection* (SOLiD), *Ion Torrent Personal Genome Machine* (PGM), PacBio dan *Oxford Nanopore Technologies* (ONT). Kebanyakan penelitian metagenomik menggunakan platform Illumina (Slatko *et al.*, 2018).

Selain jamur patogen, pada daun tanaman terdapat bakteri filosfer dan endofit. Bakteri filosfer adalah bakteri yang berada dipermukaan daun (Vorholt *et al.*, 2012). Bakteri endofit adalah bakteri yang menghuni jaringan internal tanaman tanpa menimbulkan penyakit (Kandel *et al.*, 2017), (White *et al.*, 2019). Beberapa bakteri endofit telah terbukti memberikan manfaat bagi tumbuhan yang menjadi inangnya. Contohnya, bakteri endofit pada Tanaman *Curcuma heyneana* berperan sebagai agen penambat nitrogen (Sulistiyani & Lisdiyanti, 2016); serta bakteri endofit yang berasal dari tanaman karet digunakan sebagai pemacu pertumbuhan bibit batang bawah tanaman karet (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) (Hidayati, 2014). Bakteri endofit telah diterapkan sebagai agen hayati, contohnya adalah bakteri yang berasal dari akar bibit padi mampu mengurangi keparahan penyakit blas daun pada tanaman padi (Marwan *et al.*, 2021), bakteri endofit yang berasal dari tanaman sirih hijau memiliki potensi sebagai penghasil senyawa antibakteri (Safira *et al.*, 2014); bakteri endofit juga dapat bertindak sebagai agen ketahanan tanaman padi terhadap penyakit hawar daun (Parida, 2016); bakteri endofit juga digunakan untuk mengendalikan penyakit hawar daun bakteri pada bawang merah (Resti *et al.*, 2014); Selain itu, bakteri endofit yang diisolasi dari akar-akar dan batang tanaman paku-pakuan menghasilkan senyawa antimikroba yang efektif sebagai agen hayati melawan patogen penyebab penyakit hawar selundang pada tanaman padi serta dapat merangsang pertumbuhan tanaman padi (Asmoro & Munif, 2020). Mengacu pada penelitian-penelitian tersebut, maka dilakukan analisis keragaman bakteri potensial pada daun tanaman *D. celebica* dengan menggunakan teknologi *Next-generation Sequencing* (NGS). Serta untuk memperoleh bakteri potensial maka dilakukan isolasi, karakterisasi dan identifikasi secara molekuler.

Isolat bakteri dikarakterisasi untuk memperoleh bakteri potensial. Bakteri potensial diperoleh dengan karakterisasi. Karakterisasi bakteri biokontrol dilakukan dengan uji daya hambat dengan metode *Dual culture* (Srivastava & Singh, 2020) dan uji senyawa antifungal (Chai *et al.*, 2022), (Baptista *et al.*, 2022). Pengujian daya hambat adalah teknik yang digunakan untuk menilai kemampuan dalam menghentikan perkembangan mikroba patogen. Uji daya hambat dilakukan dengan menguji kemampuan bakteri menghambat pertumbuhan patogen begitupun sebaliknya. Bakteri potensial dan jamur patogen diuji dengan metode *dual culture* untuk melihat interaksi dan kemampuan bakteri menghambat pertumbuhan jamur patogen. Hasil dari interaksi tersebut digunakan untuk memilih isolat bakteri potensi biokontrol. Karakterisasi bakteri dilakukan dengan metode *dual culture* sebagai cara untuk menyeleksi bakteri yang dapat meningkatkan ketahanan tanaman padi, menghasilkan senyawa yang merangsang pertumbuhan





tanaman, dan meningkatkan kemampuan tanaman untuk bertahan dalam kondisi lingkungan yang sulit. Seleksi bakteri biostimulan dilakukan uji mikroba penghasil hormon IAA (*Indole Acetid Acid*), Uji Mikroba Fiksasi Nitrogen dan Uji Mikroba Pelarut Fosfat (Dewi *et al.*, 2015), (Jha & Saraf, 2015).

Hasil metagenomik diharapkan dapat melengkapi keterbatasan informasi mengenai keragaman mikroba yang terdapat pada daun *D. celebica*. Mengingat, penelitian terkait mikroba *D. celebica* sejauh ini masih terbatas pada identifikasi dan karakterisasi pada tingkat genera (Mukrimin *et al.*, 2021). Selanjutnya, bakteri potensial yang berhasil diisolasi akan menjadi subjek uji lanjutan dalam pengembangan formulasi pupuk hayati, baik untuk tujuan biokontrol maupun biostimulan.

## 1.2. Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana keragaman mikroba pada daun bergejala dan tidak bergejala *D. celebica* ?
2. Apakah terdapat jenis bakteri pada daun *D. Celebica* tidak bergejala yang berpotensi sebagai biostimulan dan biokontrol ?
3. Apakah terdapat jenis jamur dari daun bergejala *D. Celebica* yang berpotensi sebagai patogen pada tanaman ?
4. Apakah isolat bakteri yang diisolasi mampu menghambat pertumbuhan jamur patogen pada daun *D. Celebica* ?

## 1.3. Tujuan dan Manfaat

Tujuan dari penelitian adalah sebagai berikut:

1. Menganalisis keragaman Mikroba pada daun tidak bergejala dan bergejala *D. celebica*
2. Mengisolasi, menyeleksi dan mengidentifikasi bakteri potensial dari daun tidak bergejala *D. celebica*
3. Mengisolasi dan mengidentifikasi jamur patogen dari daun bergejala *D. Celebica*
4. Menguji kemampuan bakteri potensial menghambat pertumbuhan jamur patogen.

## 1.4. Kerangka Berpikir



mikroba residen pada tanaman sebagai agen hayati untuk pertumbuhan tanaman dikenal dengan mikroba potensial sebagai biostimulan dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman melalui fitohormon, pengatur keseimbangan osmosis, pengaturan morfologi akar, peningkatan serapan mineral dan perubahan lainnya. Selain itu, mikroba biokontrol merupakan pengendali

hayati yang dapat dimanfaatkan untuk menghambat atau melindungi tanaman dari serangan patogen.

Identifikasi mikroba merupakan cara untuk memperoleh informasi tentang jenis suatu mikroba yang terdapat pada suatu sampel (Pelczar & Chan, 1989). Identifikasi mikroba dapat dilakukan dengan identifikasi makroskopis, mikroskopis dan molekuler. Identifikasi secara makroskopis dilakukan dengan pengamatan secara langsung morfologi dari suatu organisme. Sedangkan identifikasi mikroskopis dilakukan dengan pengamatan organisme menggunakan mikroskop. Identifikasi molekuler merupakan cara untuk mengetahui spesies dari suatu mikroba dengan pendekatan atau analisis molekuler. Teknik identifikasi molekuler mikroba diantaranya Sekuensing DNA dan Analisis Metagenomik. Identifikasi mikroba dengan teknik sekuensing pada bakteri dengan menggunakan gen 16S rRNA dan untuk jamur menggunakan ITS /18S rRNA. Penggunaan gen 16s rRNA untuk identifikasi jenis bakteri telah banyak digunakan karena memiliki urutan DNA yang mirip dengan kebanyakan spesies bakteri (Reller *et al.*, 2007), (Akihary & Kolondam, 2020). Sedangkan analisis metagenomik merupakan studi tentang genom komunitas mikroorganisme langsung dari lingkungan (Gilbert, 2013), (Nasir, 2016), (Prayogo *et al.*, 2020).

Isolasi merupakan cara untuk memperoleh isolat mikroba dari sampel dengan cara memisahkan satu isolat mikroba ke media tumbuh. Media tumbuh mikroba menggunakan *Nutrient Agar* (NA) untuk bakteri dan *Potato Dextrose Agar* (PDA) untuk jamur.

Seleksi mikroba potensial untuk mempercepat pertumbuhan tanaman menggunakan uji mikroba penghasil hormon IAA (Candra *et al.*, 2018). IAA merupakan hormon auksin yang berperan dalam proses pemanjangan batang dan akar tanaman. Selain itu, Uji mikroba pelarut fosfat (Hala & Arifin, 2021) dan penambat nitrogen (Aung *et al.*, 2011). Pengujian tersebut untuk memperoleh bakteri potensial. Fosfat dan nitrogen merupakan unsur yang dibutuhkan tanaman dalam proses pertumbuhan. Seperti fosfat berperan dalam proses perkembangan tanaman dari fase muda menjadi fase dewasa, serta nitrogen berperan dalam pembentukan klorofil daun. Fosfat dan nitrogen tersedia di alam dalam jumlah yang cukup melimpah namun senyawa tersebut di alam masih dalam bentuk yang tidak dapat diserap oleh tanaman, sehingga perlu bantuan mikroba untuk mengubah senyawa-senyawa tersebut menjadi senyawa yang dapat diserap oleh tanaman.

Seleksi mikroba potensial untuk menghambat dan melindungi tanaman dari dapat dilakukan dengan pengujian antagonis. Uji antagonis an daya hambat suatu mikroba antagonis terhadap mikroba onis dapat dilakukan dengan metode *Dual culture*. Metode dengan menumbuhkan mikroba antagonis dan mikroba i media tumbuh (Pretscher *et al.*, 2018). Untuk media tumbuh it mikroba yang akan diujikan.



## BAB II METODOLOGI PENELITIAN

### 2.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan mulai Februari sampai Desember 2023. Pelaksanaan penelitian ini dibagi menjadi dua tahap yaitu pengambilan sampel penelitian yang dilaksanakan di Hutan Pendidikan Universitas Hasanuddin, Kec. Cenrana, Kabupaten Maros, Sulawesi Selatan. Isolasi, karakterisasi, interaksi, dan identifikasi mikroba dari daun *D. celebica* dilakukan di Laboratorium *Recombinant Protein Preparation* (Microbe) Gedung Genomik dan Laboratorium Kapang di Gedung *Indonesian Culture Collection* (InaCC) Badan Riset dan Inovasi Nasional Jl. Raya Jakarta-Bogor No.32, Kec. Cibinong, Kabupaten Bogor, Jawa Barat.

### 2.2. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam pengambilan sampel di lapangan yaitu cutter, Lux Meter, SW Maps, *Abney level*, kamera digital, gunting, alat tulis menulis, *cooler box*, spidol permanen, meteran, map coklat, dan *Plastic zipper*. Bahan yang digunakan adalah ice gell dan sampel daun *D. celebica* yang terdiri dari daun bergejala dan tidak bergejala di Areal Hutan Pendidikan Universitas Hasanuddin. Alat dan bahan yang digunakan untuk teknik isolasi bakteri dan jamur, karakterisasi bakteri potensial, uji antagonis, dan identifikasi molekuler dapat dilihat pada Tabel 1.



**Tabel 1.** Alat dan bahan yang digunakan pada beberapa tahapan penelitian

<b>Tahapan Penelitian</b>			
<b>Isolasi Bakteri dan Jamur</b>	<b>Karakterisasi Bakteri Potensial</b>	<b>Karakterisasi Bakteri Potensial Biokontrol (Uji Antagonis)</b>	<b>Identifikasi Makroskopis &amp; Molekuler</b>
<p><i>Alat:</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Gunting</li> <li>2) Pinset steril</li> <li>3) Cawan Petri steril</li> <li>4) Beaker glass</li> <li>5) Erlenmeyer 250 ml</li> <li>6) Tusuk sate steril</li> <li>7) Tisu steril</li> <li>8) Sarung tangan karet</li> <li>9) Aluminium foil</li> <li>10) Karet</li> <li>11) <i>Scalpel</i></li> <li>12) <i>Plastic wrap</i></li> <li>13) Sumbat kasa</li> <li>14) Tabung reaksi</li> <li>15) Inkubator 28°C</li> <li>16) <i>Autoclave</i></li> <li>17) <i>Laminar Air Flow</i></li> <li>18) Timbangan Analitik AS 220.R2</li> </ol>	<p><i>Alat:</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Sarung tangan karet</li> <li>2) Mikropipet dan tip (2µL, 20µL, 200 µL, 1000µL)</li> <li>3) Centrifuge</li> <li>4) Cawan petri steril</li> <li>5) Spektrofotometer UV Vis Shimadzu 1800</li> <li>6) Inkubator 28°C, 30°, dan 37°C</li> <li>7) Shaker Incubator</li> <li>8) Erlenmeyer 250 ml</li> <li>9) Tabung Reaksi</li> <li>10) <i>Vortex</i></li> <li>11) <i>Microwave</i></li> <li>12) <i>Centrifuge</i></li> <li>13) <i>Autoclave</i></li> <li>14) <i>Laminar Air Flow</i></li> <li>15) Tusuk sate steril</li> <li>16) Tube Eppendorf 2 ml</li> <li>17) Conical tube 15 ml steril</li> <li>18) <i>Hotplate Magnetic stirrer</i></li> <li>19) Sumbat kasa</li> <li>20) Karet</li> <li>21) Kertas</li> <li>22) Plastik</li> <li>23) Penggaris</li> </ol>	<p><i>Alat:</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Cawan Petri 9 cm steril</li> <li>2) <i>Laminar Air Flow</i></li> <li>3) Tusuk sate steril</li> <li>4) Sarung tangan karet</li> <li>5) Penggaris</li> <li>6) Pinset steril</li> <li>7) Beaker glass</li> <li>8) Tusuk sate steril</li> <li>9) Tisu steril</li> <li>10) <i>Plastic wrap</i></li> <li>11) Inkubator 28°C</li> <li>12) <i>Autoclave</i></li> <li>13) Timbangan Analitik AS 220.R2 Plus (Radwag)</li> </ol>	<p><i>Alat:</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Centrifuge</li> <li>2) <i>Vortex</i></li> <li>3) Microwave</li> <li>4) Inkubator 37°C</li> <li>5) Mesin elektroforesis (BIO-RAD)</li> <li>6) BIO-RAD T-100 Thermal Cycler</li> <li>7) Mesin Mini PCR</li> <li>8) Gel Doc GD-1000 (Axygen®)</li> <li>9) Sarung tangan karet</li> <li>10) Tube Eppendorf 2 ml</li> <li>11) Tube PCR</li> <li>12) <i>Spindown</i></li> <li>13) Mikroskop CPD.03.20E</li> <li>14) Timbangan Analitik AS 220.R2 Plus (Radwag)</li> </ol>



---

24) Timbangan Analitik AS  
220.R2 Plus (Radwag)

*Bahan:*

- 1) Sampel Daun tidak bergejala *D. celebica* (Isolasi Bakteri)
- 2) Sampel Daun bergejala *D. celebica* (Isolasi Jamur)
- 3) Media *Nutrient Agar* (NA)
- 4) Media *Potato Dextrose Agar* (PDA)
- 5) Akuades steril
- 6) Alkohol 70%
- 7) NaOCl 2,5%
- 8) Gliserol 10%

*Bahan:*

- 1) Media NA (*Nutrient Agar*)
- 2) Media NB (*Nutrient Broth*)
- 3) Media *Pikovskaya*
- 4) Media *Pikovskaya* cair
- 5) Media NFB (*Nitrogen Free Bromothymol Blue*)
- 6) *Reagen Salkowski*
- 7) Media *Ashby*
- 8) Reagen P Pekat
- 9) *Reagen Nessler*
- 10) Isolasi Bakteri
- 11) *Tryptophan*
- 12) Akuades steril

*Bahan:*

- 1) Media *Potato Dextrose Agar* (PDA)
- 2) Isolasi Bakteri Terpilih
- 3) Isolasi Jamur Patogen

*Bahan:*

- 1) Isolasi Jamur Patogen
  - 2) Isolasi Bakteri Potensial
  - 3) Yeast Genomic DNA Kit
  - 4) Primer 18S rRNA (NS1-NS8)
  - 5) Primer ITS (ITS1-ITS4)
  - 6) Primer 16S rRNA (1492R-27F)
  - 7) Agarose 0,8%
  - 8) TAE Buffer 1X
  - 9) *Nuclease Free water*
  - 10) Master Mix (Mytaq HS Red)
  - 11) Yeast Genomic DNA Kit
  - 12) Master Mix (KOD One)
- 



## 2.3. Tahapan Penelitian

### 2.3.1. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel daun dilaksanakan di Hutan Pendidikan Universitas Hasanuddin, Maros, Sulawesi Selatan. Sampel yang digunakan adalah bagian daun dengan gejala serangan jamur patogen dengan ciri adanya bercak hitam atau bercak coklat pada daun, serta daun tanpa gejala (daun sehat). Enam helai daun diambil dari setiap pohon dengan jumlah 6 pohon mewakili lokasi pengambilan sampel. Enam pohon dikategorikan kedalam fase pohon, fase tiang dan fase pancang berdasarkan diameter. Kategori pohon memiliki diameter  $\geq 20$  cm. Kategori tiang memiliki diameter 10- $<20$  cm, sedangkan kategori pancang memiliki diameter  $<10$  cm dengan tinggi  $\geq 1,5$ m (Soerianegara & Indrawan, 1998), (Kasmadi *et al.*, 2015). Intensitas cahaya dan suhu diukur dengan lux meter (Smart Sensor AS803, China). Ketinggian masing-masing pohon diukur menggunakan aplikasi SW Maps, tinggi pohon diukur dengan menggunakan level Abney, dan diameter diukur dengan menggunakan meteran. Sampel daun diambil dari masing-masing pohon kemudian dimasukkan ke dalam map coklat dan diberi kode. Sampel dalam map coklat dimasukkan kedalam *plastic zipper* dan disimpan dalam *coolbox*. Data sampel daun *D. celebica* dapat dilihat pada Tabel 2.



**Tabel 2.** Data Sampel Daun *D. celebica*

No.	Kode Isolat	Ket.	Titik Koordinat	Kelembapan	Intensitas Cahaya	Elevasi	Diameter (m)	Tinggi total (m)
1	P1	Tiang 1	-4,97193532'S - 119,77723523'E	66%	154 lux	492,966 m	0.18	10.60
2	P2	Pohon 2	-4,96979231'S - 119,77698884'E	72%	119 lux	549,268 m	0.20	9.99
3	P3	Pancang 1	-4,97018954'S - 119,77660778'E	68%	192 lux	529,498 m	0.08	7.43
4	P4	Tiang 2	-4,97004392'S - 119,77681687'E	68%	90 lux	543,065 m	0.13	8.09
5	P5	Pancang 2	-4,96982117'S - 119,77696075'E	72%	147 lux	545,981 m	0.06	7.14
6	P6	Tiang 3	-4,96819361'S - 119,77648597'E	68%	53 lux	564,369 m	0.11	8.60

### 2.3.2. Analisis Keragaman Mikroba dengan Metagenomik

Analisis keragaman mikroba dengan metagenomik dilakukan dengan melihat secara keseluruhan jenis bakteri dan jamur yang ada pada sampel daun bergejala dan daun tidak bergejala. Sampel dikirim untuk dianalisis ke layanan metagenomik (PT. Genetica Science Indonesia). Analisis metagenomik meliputi beberapa tahap, yaitu ekstraksi DNA genom dengan menggunakan CTAB (*Cethyl-Trimethyl-Ammonium-Bromide*) Extraction KIT, PCR menggunakan gen marker 16SrRNA untuk bakteri dan 18SrRNA untuk jamur. Preparasi sekuensing dengan menggunakan NEB Next® Ultra™ II FS FS DNA PCR-free Library Prep KIT (Illumina, USA), dan pengecekan kualitas DNA dengan menggunakan Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Scientific) dan sistem Agilent Bioanalyzer 2100. Proses sekuensing dilakukan dengan menggunakan platform Illumina dan dilanjutkan dengan analisis bioinformatika.

### 2.3.3. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Potensial

#### 1. Pembuatan Media & Reagen

##### a. Media Nutrient Agar

Isolasi Bakteri dilakukan dengan mengisolasi bakteri endofit dan bakteri filofser daun tanpa gejala (sehat) menggunakan media NA. Sebelum dilakukan isolasi bakteri didahului dengan pembuatan media NA, Penyiapan alat dan bahan (Sterilisasi). Tahapan pembuatan media NA adalah sebagai berikut:

- Sebanyak 5,6 g NA ditimbang dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml yang berisikan 200 ml aquades.
- Erlenmeyer kemudian ditutup menggunakan sumbat kasa yang dilapisi kertas bekas dan plastik diatasnya, kemudian sumbat tersebut ditutup dengan karet.

Media kemudian disterilisasi menggunakan *Autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 2 ATM selama 15 menit.

Media yang telah disterilisasi dan didinginkan sampai suhu 45-50°C dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah disiapkan dan dituangkan dengan sebanyak 12-13 ml pada masing-masing cawan.



### b. Media Agar Miring

Tahapan pembuatan media agar miring sebagai berikut:

- Sebanyak 5,6 g NA ditimbang dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml yang berisikan 200 ml aquades,
- Media dalam Erlenmeyer dihomogenkan dan dimasak sampai mendidih dengan *microwave*.
- Sebanyak 200 ml media NA dibagi sebanyak 5 ml ke dalam masing-masing 40 tabung reaksi. Tabung reaksi ditutup menggunakan sumbat kasa.
- Tabung reaksi disterilisasi menggunakan Autoclave pada suhu 121°C dan tekanan 2 ATM selama 15 menit.
- Setelah disterilisasi, saat medium dalam keadaan masih cair (sekitar suhu 45-50°C), tabung reaksi harus dimiringkan dengan derajat kemiringan 160-170°. Media NA dalam agar miring kemudian didiamkan pada suhu ruang selama 5-7 hari.

### c. Media Nutrient Broth

Pengujian bakteri penghasil hormon IAA terlebih dahulu dilakukan proses sterilisasi alat dan bahan yang akan digunakan serta pembuatan media kultur. Media kultur bakteri yang digunakan adalah media NB, tahapan pembuatan media NB sebagai berikut.:

- Sebanyak 1,6 g NB ditimbang dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml yang berisikan 200 ml aquades dan dihomogenkan.
- Sebanyak 200 ml media NB dibagi sebanyak 5 ml ke dalam masing-masing 40 tabung reaksi. Tabung reaksi ditutup menggunakan sumbat kasa.
- Tabung reaksi disterilisasi menggunakan *Autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 2 ATM selama 15 menit. Setelah disterilisasi media NB kemudian didiamkan selama 1 hari

### d. Media Nitrogen Free Bromothymol Blue

Pengujian bakteri penambat Nitrogen secara kualitatif dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat bakteri pada media NFB. Cara membuat media NFB (Dobereiner, 1992), (Hala & Arifin, 2021):

- Media NFB dibuat dengan mencampurkan bahan seperti DL Malic acid 1 g, KOH 0.8 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 g, MnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.04 g, NaCl 0.002 g, CaCl<sub>2</sub> 0.4 g, Larutan Mikro 2ml, Larutan Fe EDTA 1,64% 4ml, Larutan BTB (*Bromothymol Blue*) 2 ml, *Bacteriological Agar* 0.46 g ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi 200 ml aquades. Bahan tersebut dihomogenkan dan dipanasi dengan *Hotplate stirrer*. KOH dimasukan bertahap dengan mengecek pH dan warna media sampai menjadi hijau tua (pH 7).





- Media NFB dibagi sebanyak 2 ml ke dalam tabung reaksi. Tabung reaksi ditutup menggunakan sumbat kasa.
- Tabung reaksi berisi media NFB disterilisasi menggunakan *Autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 2 ATM selama 15 menit.

**e. Media Ashby**

Tahapan pembuatan media *Ashby* adalah sebagai berikut:

- Media Ashby cair dibuat dengan campuran bahan seperti Mannitol 4g,  $K_2HPO_4$  0.04 g,  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.04 g, NaCl 0.04 g,  $K_2SO_4$  0,02 g,  $CaCO_3$  0,1 g, dicampur ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi 200 ml aquades. Semua bahan tersebut dihomogenkan dengan *Magnetic Stirrer*.
- Media tersebut dibagi sebanyak 6 ml ke dalam tabung reaksi. Tabung reaksi ditutup menggunakan sumbat kasa.
- Tabung reaksi berisi media Ashby disterilisasi menggunakan *Autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 2 ATM selama 15 menit.

**f. Media Pikovskaya padat**

Pengujian bakteri pelarut fosfat secara kualitatif dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat bakteri pada media *Pikovskaya* padat. Cara membuat media *Pikovskaya* padat adalah:

- Sebanyak 6,26 g media *Pikovskaya* bubuk ditimbang dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml yang berisikan 200 ml aquades dan dihomogenkan.
- Erlenmeyer kemudian ditutup menggunakan sumbat kasa yang dilapisi kertas bekas dan plastik di atasnya, kemudian sumbat direkatkan dengan karet.
- Media tersebut kemudian disterilisasi menggunakan *Autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 2 ATM selama 15 menit.
- Media yang telah disterilisasi dan didinginkan sampai suhu 45-50°C dapat dituang ke masing-masing cawan petri sesuai kebutuhan.

**g. Media Pikovskaya cair**

Uji pelarut fosfat secara kuantitatif menggunakan media *Pikovskaya* cair. Tahapan pembuatan media *Pikovskaya* cair terdiri dari (Nautiyal, 1999):

- Media *Pikovskaya* cair dibuat dengan campuran bahan seperti  $Ca_3(PO_4)_2$  1 g; Glukosa 0,5 g; NaCl 0,04 g; KCL 0,04 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$   $H_4SO_4$  0,1 g; Yeast Ekstrak 0,1 g;  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.00005 g;  $zO$  0,00005 g; Agar Bacto 4 g; dilarutkan ke dalam 200 ml



sebut dibagi sebanyak 10 ml ke dalam tabung reaksi. Tabung itup menggunakan sumbat kasa.

reaksi berisi media disterilisasi menggunakan *Autoclave* pada C dan tekanan 2 ATM selama 15 menit

#### h. Reagen Salkowski

Proses pengujian bakteri penghasil hormon IAA terdapat *Reagen Salkowski*. Adapun tahapan pembuatan reagen tersebut adalah:

- Sebanyak 16,6 ml akuades steril dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang terlebih dahulu dibungkus dengan aluminium foil.
- Penambahan 10 ml  $H_2SO_4$  ke dalam Erlenmeyer berisi aquades harus dilakukan di dalam lemari asam. Saat menuang  $H_2SO_4$  ke dalam akuades akan terjadi reaksi kedua larutan menyebabkan larutan mendidih, sehingga perlu untuk menunggu sampai suhu larutan turun.
- Saat suhu larutan turun kemudian ditambahkan dengan 1,5M  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  sebanyak 0,5 ml. kemudian dihomogenkan. Erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil.

#### i. Reagen Nessler

Proses pengujian bakteri Penambat Nitrogen terdapat *Reagen Nessler*. Adapun tahapan pembuatan reagen tersebut adalah:

- Reagen Nessler terdiri dari 3 larutan A, B dan C. Larutan A terdiri dari KI 25 g dan akuades 25 ml. Larutan B terdiri dari HgI<sub>2</sub> 11g dan 175 ml aquades serta larutan C terdiri dari NaOH 5N 100ml.
- Larutan A dan B terlebih dahulu dicampur dalam Erlenmeyer.
- Campuran Larutan A dan B secara perlahan ditambahkan ke larutan C dan kemudian ditambahkan aquades sampai volume larutan menjadi 500 ml.

## 2. Isolasi Bakteri

### a. Bakteri Filosfer

Adapun tahapan isolasi bakteri filofit dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* adalah sebagai berikut:

- Sampel daun tanpa gejala (daun sehat) dari masing-masing pohon dipotong dalam 3 bagian pangkal, tengah dan ujung daun dengan ukuran 3-4 cm. bagian daun yang diambil harus daun yang tidak ada bercak atau bintik (daun sehat).
- Ketiga bagian daun kemudian dibersihkan dari kotoran atau debu yang menempel pada daun dengan akuades steril. Masing-masing daun dari pohon yang berbeda direndam atau dibersihkan menggunakan gelas beker yang berbeda.

- Sampel daun yang telah dibersihkan kemudian dikeringkan dengan tisu sampai daun benar-benar kering.



Daun dipotong menggunakan *scalpel* dengan ukuran 1-2 cm. Potongan daun harus meminimalisir luka pada daun.

Daun kemudian diletakkan pada media NA pada cawan petri. Cawan petri kemudian ditutup dan diberikan *plastik wrap* pada sisi

cawan agar menghindari kontaminasi mikroba pada saat

- Sebanyak 1 ml akuades sisa pencucian terakhir diletakkan dan diratakan menggunakan *Spreader* diatas permukaan media NA. Tahapan ini bertujuan memastikan tidak adanya kontaminasi mikroba lain pada sampel daun yang ditumbuhkan.
- Potongan daun dan akuades sisa sterilisasi ditumbuhkan pada media NA kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 12-24 jam.
- Koloni bakteri yang telah tumbuh pada bagian filosfer daun (yang tidak terluka) dipurifikasi atau dipindahkan ke media NA baru, kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 12-24 jam.
- Koloni tunggal yang diperoleh dari hasil purifikasi kemudian diremajakan atau ditumbuhkan pada media agar miring (NA) dan diinkubasi selama 12 jam pada suhu ruang.
- Isolat bakteri pada media agar miring diambil sebanyak satu ose dan dimasukkan ke 1 ml gliserol 10% dan disimpan pada suhu -20°C untuk penyimpanan jangka panjang.

#### b. Bakteri Endofit

Tahapan isolasi bakteri Endofit dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* menggunakan metode sterilisasi permukaan mengikuti Fisher *et al.*, (1992) dan Kabir *et al.*, (2023) dengan modifikasi waktu menyesuaikan sampel daun *D. celebica*. Tahapan isolasi bakteri endofit dijabarkan sebagai berikut:

- Sampel daun tanpa gejala (daun sehat) dari masing-masing pohon dipotong dalam 3 bagian pangkal, tengah dan ujung daun dengan ukuran 3-4 cm. bagian daun yang diambil harus daun yang tidak ada bercak atau bintik (daun sehat).
- Ketiga bagian daun tersebut kemudian dibersihkan dari kotoran atau debu yang menempel pada daun dengan akuades steril. Masing-masing daun dari pohon yang berbeda direndam atau dibersihkan menggunakan gelas beker yang berbeda.
- Sampel daun yang telah dibersihkan, kemudian direndam dengan Alkohol 70% selama 30 detik (menggunakan gelas beker berbeda untuk masing masing sampel)
- Sampel daun kemudian direndam dengan NaOCl 2,5% selama 60 detik (menggunakan gelas beker berbeda untuk masing-masing sampel)
- Sampel daun selanjutnya dibilas sebanyak 4 kali dengan akuades steril. Sampel daun dikeringkan dengan tisu steril.



daun dipotong menggunakan *scalpel* membentuk persegi kuran 1-2 cm pada masing-masing sisi. Pada bagian bawah res sampai daun menjadi tipis.

daun diletakkan pada media NA dalam cawan petri, peletakan is memposisikan permukaan atas daun bersentuhan dengan

4. Cawan petri kemudian ditutup dan diberikan *plastik wrap*

pada sisi samping cawan agar menghindari kontaminasi mikroba pada saat inkubasi.

- Sebanyak 1 ml akuades sisa pencucian terakhir diletakkan dan diratakan menggunakan *Spreader* diatas permukaan media NA. Tahapan ini bertujuan memastikan tidak adanya kontaminasi mikroba lain pada sampel daun yang ditumbuhkan.
- Potongan daun dan akuades sisa sterilisasi yang ditumbuhkan pada media NA kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 12-24 jam.
- Koloni bakteri yang telah tumbuh pada bagian filosfer daun (yang tidak terluka) dipurifikasi atau dipindahkan ke media NA baru, kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 12-24 jam.
- Koloni tunggal yang diperoleh dari hasil purifikasi kemudian diremajakan atau ditumbuhkan pada media agar miring (NA) pada tabung reaksi dan diinkubasi selama 12 jam pada suhu ruang.
- Isolat bakteri pada media agar miring kemudian diambil sebanyak 1 ose dan dimasukkan ke dalam gliserol 1ml dan disimpan pada suhu -20°C. untuk penyimpanan jangka panjang.

### 3. Uji Bakteri Penghasil Hormon Indole- 3-Acetic Acid (IAA)

Karakterisasi bakteri potensi dilakukan dengan uji bakteri penghasil hormon IAA, penambat nitrogen dan pelarut fosfat. Adapun tahapan uji bakteri penghasil hormon IAA adalah sebagai berikut (Bric *et al.*, 1991):

- a. Sebanyak 0,01 ml *Tryptophan* dimasukkan ke dalam 5 ml media NB. Kemudian disimpan pada suhu ruang selama 24 jam
- b. Satu ose isolat bakteri diinokulasi ke media NB+ *Tryptophan* kemudian inkubasi dengan *Shaker Incubator* pada suhu 28°C kecepatan 150 rpm selama 24-48 jam
- c. Sebanyak 2 ml kultur bakteri dipindahkan ke *Eppendorf tube* 2 ml dan disentrifugasi pada suhu 4°C kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan pellet dan supernatan
- d. Dua ml supernatan dipindahkan ke tabung reaksi dan ditambahkan 2 ml *Reagen Salkowski* kemudian diinkubasi 60 menit pada suhu ruang (gelap).
- e. Pengamatan kualitatif dengan melihat perubahan warna pada tabung reaksi, perubahan warna dari kuning menjadi merah muda mengindikasikan adanya hormon IAA yang dihasilkan isolat bakteri.



in kuantitatif dengan mengukur absorbansi. Nilai absorbansi dari *Spektrofotometer* dengan panjang gelombang 530 nm. Nilai IAA diperoleh dengan memasukkan nilai absorbansi ke persamaan kurva standar IAA.

#### Uji Penambat Nitrogen

Uji penambat nitrogen menggunakan pengamatan kualitatif dan pengamatan kualitatif dilakukan dengan cara menumbuhkan satu ose

bakteri ke media NFB. Kemudian diinkubasi selama 7 hari. Pengamatan perubahan warna (biru) dan ada tidaknya pelikel dilakukan selama 7 hari (Baldani *et al.*, 2014). Isolat bakteri yang dapat memfiksasi nitrogen berdasarkan uji penambat Nitrogen secara kualitatif dilanjutkan dengan uji penambat nitrogen secara kuantitatif. Uji kuantitatif dilakukan untuk melihat konsentrasi ammonium yang dapat difiksasi oleh isolat bakteri. Media kultur bakteri yang digunakan adalah media NB (*Nutrient Broth*) dan media *Ashby*. Tahapan uji bakteri penambat Nitrogen secara kuantitatif atau menguji konsentrasi amonium yang difiksasi oleh bakteri dijabarkan sebagai berikut:

- a. Satu ose isolat bakteri diinokulasi pada media NB dan diinkubasi dengan *Shaker Incubator* pada suhu 28°C dan kecepatan 150 rpm selama 24-48 jam
- b. Sebanyak 0.5 ml isolat bakteri dipindahkan ke 6 ml media *Ashby* dan diinkubasi dengan *Shaker Incubator* pada suhu 28°C dan kecepatan 150 rpm selama 24-48 jam
- c. Tiga ml kultur bakteri dipindahkan ke *falcon tube* dan disentrifugasi 10.000 rpm 4°C selama 10 menit.
- d. Tiga ml supernatant dipindahkan ke tabung reaksi dan ditambahkan 0.13 ml *Reagen Nessler*, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang (gelap).
- e. Pengamatan kuantitatif dengan mengukur absorbansi. Nilai absorbansi diperoleh dari *Spektrofotometer* dengan panjang gelombang 435 nm. Konsentrasi amonium diperoleh dengan memasukkan nilai absorbansi ke dalam persamaan kurva standar Nitrogen.

## 5. Uji Bakteri Pelarut Fosfat

### a. Uji Bakteri Pelarut Fosfat Secara Kualitatif

Pengujian bakteri pelarut fosfat secara kualitatif dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat bakteri pada media *Pikovskaya* padat. Uji bakteri Pelarut fosfat secara kualitatif adalah sebagai berikut (Dawwam *et al.*, 2013), (Candra *et al.*, 2018):

- Satu ose bakteri ditanam pada media *Pikovskaya* padat dengan membuat kuadran pada media, dan meletakkan isolat bakteri pada masing-masing sisi.
- Isolat bakteri diinkubasi selama 7 hari. Pengamatan zona bening dilakukan selama 7 hari



### Uji Bakteri Pelarut Fosfat Secara Kuantitatif

Uji bakteri pelarut fosfat secara kuantitatif atau mengukur konsentrasi amonium yang dilarutkan masing-masing bakteri adalah sebagai berikut (Dawwam *et al.*, 2013):

- 1) Isolat bakteri ditumbuhkan pada media *Pikovskaya* cair di shaker 120 rpm 28°C selama 7 hari.

- Selanjutnya kultur bakteri disaring menggunakan kertas *Whatman* untuk memisahkan sisa  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .
- Lima ml kultur tersebut dipindahkan pada *falcon tube* dan sentrifugasi 10.000 rpm 4°C selama 15 menit.
- Lima ml supernatant dipindahkan ke tabung reaksi dan ditambahkan 1 ml pereaksi warna P pekat dan 1 ml larutan Hidrazin Sulfat ( $\text{N}_2\text{H}_4$ ),
- Pengamatan kuantitatif dengan mengukur absorbansi. Nilai absorbansi diperoleh dari *Spektrofotometer* dengan panjang gelombang 830 nm. Konsentrasi pelarut fosfat diperoleh dengan memasukkan nilai absorbansi kedalam persamaan kurva standar fosfat.

### 2.3.4. Isolasi, Identifikasi, dan Karakterisasi Jamur Patogen

#### 1. Pembuatan Media Isolasi Jamur

##### a. Media PDA

Sebelum dilakukan isolasi didahului dengan pembuatan media PDA, Penyiapan alat dan bahan (Sterilisasi). Tahapan pembuatan media PDA adalah sebagai berikut:

- Pembuatan PDA disesuaikan dengan jumlah cawan petri yang diperlukan. Sebanyak 200 ml media PDA dimasukkan ke dalam 12-15 cawan petri dengan diameter 9 cm.
- Sebanyak 7,8 g PDA ditimbang dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml yang berisikan 200 ml aquades.
- Erlenmeyer kemudian ditutup menggunakan sumbat kasa yang dilapisi kertas bekas dan plastic di atasnya, kemudian sumbat tersebut direkatkan dengan karet.
- Media PDA disterilisasi menggunakan *Autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 2 ATM selama 15 menit.
- Media yang telah disterilisasi dan didinginkan sampai suhu 45-50°C dapat dituang ke masing-masing cawan petri sesuai kebutuhan.

##### b. Media Agar Miring PDA

Tahapan pembuatan media agar miring (PDA) sebagai berikut:

- Sebanyak 5,6 g PDA ditimbang dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml yang berisikan 200 ml aquades,
- Media dalam Erlenmeyer dihomogenkan dan dimasak sampai mendidih dengan *microwave*.



200 ml media PDA dibagi sebanyak 5 ml ke dalam masing-masing tabung reaksi. Tabung reaksi ditutup menggunakan sumbat

reaksi disterilisasi menggunakan *Autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 2 ATM selama 15 menit. Setelah disterilisasi, saat dalam kondisi masih cair (sekitar suhu 45-50°C), tabung reaksi

dimiringkan dengan derajat kemiringan 160-170°. Media PDA dalam agar miring kemudian didiamkan pada suhu ruang selama 5-7 hari.

## 2. Isolasi Jamur Patogen

Isolasi jamur dilakukan dengan mengisolasi jamur dari daun bergejala menggunakan media PDA (*Potato Dextrose Agar*). Tahapan isolasi jamur menggunakan daun bergejala *D. celebica*. Isolasi jamur menggunakan metode sterilisasi permukaan mengikuti Hasiani *et al.*, (2015) dengan modifikasi disesuaikan dengan sampel daun *D. celebica*. Tahap isolasi jamur patogen sebagai berikut:

- a. Sampel daun bergejala dari masing-masing pohon dipotong dalam 3 bagian pangkal, tengah dan ujung daun dengan ukuran 3-4 cm. bagian daun yang diambil harus daun yang terdapat bercak atau bintik pada daun.
- b. Ketiga bagian daun tersebut kemudian dibersihkan dari kotoran atau debu yang menempel pada daun dengan akuades steril. Masing-masing daun dari pohon yang berbeda direndam atau dibersihkan menggunakan gelas beker yang berbeda.
- c. Sampel daun yang telah dibersihkan, kemudian direndam dengan Alkohol 70% selama 1 menit (menggunakan gelas beker berbeda untuk masing masing sampel)
- d. Sampel daun kemudian direndam dengan NaOCl 2,5% selama 2 menit (menggunakan gelas beker berbeda untuk masing-masing sampel)
- e. Sampel daun selanjutnya dibilas sebanyak dengan akuades steril. Sampel daun dikeringkan dengan tisu steril.
- f. Sampel daun dipotong menggunakan *scalpel* membentuk persegi dengan ukuran 1-2 cm pada masing-masing sisi.
- g. Potongan daun diletakkan pada media PDA dalam cawan petri, peletakan daun harus memosisikan permukaan atas daun bersentuhan dengan media PDA. Cawan petri kemudian ditutup dan diberikan *plastik wrap* pada sisi samping cawan agar menghindari kontaminasi mikroba pada saat inkubasi.
- h. Potongan daun yang ditumbuhkan pada media PDA kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 3-7 hari
- i. Koloni jamur yang telah tumbuh pada tepi daun dipurifikasi atau dipindahkan ke media PDA baru, kemudian diinkubasi pada suhu ruang

ari

ora jamur yang diperoleh dari hasil purifikasi kemudian atau ditumbuhkan pada media agar miring dan distok dalam 1 %) dan disimpan pada suhu -20°C untuk penyimpanan jangka





### 3. Identifikasi Makroskopis dan Mikroskopis Jamur Patogen

Isolat Jamur hasil Isolasi pada cawan petri diidentifikasi dengan melihat ciri-ciri makroskopis seperti warna, bentuk miselium, dan tampilan permukaan koloni. Identifikasi mikroskopis mencakup pengukuran bentuk spora, hifa, serta memeriksa keberadaan septa. Karakteristik makroskopis dan mikroskopis digunakan untuk mengelompokkan isolat jamur dengan ciri yang sama. Penentuan genus dan penggolongan jamur patogen menggunakan studi literatur yakni memadukan ciri-ciri makroskopis dan mikroskopis jamur dengan hasil karya penelitian atau tulisan terkait tentang jamur patogen pada tanaman.

### 4. Isolasi DNA dan Identifikasi Molekuler Jamur Patogen

#### a. Isolasi DNA Jamur

Isolasi DNA jamur patogen mengikuti protocol Yeastar Genomic DNA Kit. Adapun tahapan isolasi DNA menggunakan Yeastar Genomic DNA Kit adalah sebagai berikut:

- Satu ml spora jamur dalam *Eppendorf Tube* disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit
- Pellet ditambahkan 120  $\mu$ l *YD Digestion* dan 5  $\mu$ l *R-zymolyase (RNase A +Zymolyase)*, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit.
- Larutan step 2 ditambahkan 120  $\mu$ l *YD Lysis Buffer*, kemudian divorteks selama 10 detik.
- Larutan step 3 disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit
- Supernatan dipindahkan ke *Zymospin II Colum*, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit
- Supernatan dibuang, kemudian 300  $\mu$ l *DNA Wash Buffer* dimasukkan ke dalam *Zymospin II Colum* dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit (dua kali proses)
- *Zymospin II Colum* dipindahkan ke *Eppendorf Tube* baru, lalu ditambahkan 40  $\mu$ l *NFW (Nuclease Free Water)* kemudian diinkubasi selama 5 menit.
- Larutan pada step 7 disentrifugasi 12.000 rpm selama 1 menit. Supernatan yang dihasilkan merupakan DNA murni Jamur.

#### b. Amplifikasi DNA



es Isolasi DNA jamur, Selanjutnya dilakukan Amplifikasi DNA. ilih di PCR menggunakan primer ITS (*Internal Transcribed* 4) dan 18S rRNA (NS1-NS8). Tahapan Amplifikasi DNA jamur berikut:

running PCR dilakukan menggunakan mesin PCR terlebih buatkan larutan PCR Mix menggunakan *KOD One* yang terdiri



dari 12,5 µl KOD fix, Primer NS1 0,75 µl, Primer NS8 0,75 µl, dan NFW 9 µl. Master Mix campur di dalam PCR Cabinet.

- b) Master mix ditambahkan 2µl Template DNA jamur. larutan PCR kemudian divortex dan *dispindown*.
- c) Larutan PCR dimasukan ke mesin PCR dengan kondisi PCR, Pra-Denaturasi 94°C selama 4 menit; Denaturasi 94°C selama 30 detik; Annealing 55°C selama 45 detik; Extension 72°C selama 1 menit; Pra-Extension 72°C selama 4 menit, Final Hol 4°C dengan waktu yang tidak ditentukan. Proses Amplifikasi sebanyak 30 siklus.
- d) Hasil PCR divisualisasikan menggunakan Gel Doc. Pita yang terang mengindikasi proses isolasi dan amplifikasi DNA jamur berhasil. Selanjutnya PCR mix dikirim ke *Genetika science* untuk dilakukan proses Sekuensing.
- e) Hasil sekuen DNA diedit menggunakan program MEGA versi 11. Pencarian sekuen menggunakan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) dan dibandingkan dengan database pada NCBI (Sulistiani & Hidayat, 2020) untuk memperoleh spesie mikroba (Sulistiani & Hidayat, 2020).

### 2.3.5. Karakterisasi Bakteri Potensial Biokontrol

#### 1. Uji Antagonis

- a. Uji antagonis bertujuan untuk melihat kemampuan bakteri menghambat pertumbuhan jamur patogen. Tahapan uji antagonis menggunakan metode *Dual Culture* (Pretscher *et al.*, 2018).
- b. Efek antagonis bakteri diuji dengan menumbuhkan satu ose bakteri dan satu ose isolat jamur patogen dalam satu cawan petri berisi media PDA.
- c. Posisi isolat jamur diletakan ditengah cawan dan isolat bakteri digores di 4 sisi jamur dengan jarak 3 cm.
- d. Analisa anatogistik dihitung menggunakan persentase waktu penutupan permukaan cawan petri oleh bakteri dan pengamatan efek yang ditimbulkan bakteri terhadap jamur patogen (Leiwakabessy *et al.*, 2019). Perhitungan PIRG (*Percentage Inhibition of Radial Growth*) menggunakan persamaan (Leiwakabessy *et al.*, 2019, Skidmore & Dickinson, 1976).

#### 2. Identifikasi Molekuler Bakteri Potensial Biokontrol dan Biostimulan

Isolat Bakteri potensial identifikasi molekuler menggunakan gen 16S rRNA.

didahului dengan prose PCR menggunakan primer 1492R dan *Colony* sebagai berikut (Noer, 2021):

Isolat bakteri dimasukkan ke dalam tube pcr, kemudian isolat panaskan dengan microwave dengan suhu 50°C selama 40

menit. Isolat disiapkan di tube berbeda (total volume 25 µl/isolat) menggunakan Kit Mytaq HS Red. PCR mix terdiri dari primer forward dan reverse masing-masing sebanyak 1,5 µl, master mix Gotaq green

sebanyak 12,5 µl dan nuclease free water sebanyak 7 µl. Master Mix campur di dalam PCR tube.

- c. Master mix kemudian divortex dan *dispindown*, selanjutnya ditambahkan 2 µl Template Larutan PCR kemudian divorteks dan *dispindown*. Larutan PCR selanjutnya dimasukan ke mesin PCR dengan kondisi PCR, Pra-Denaturasi 95°C selama 1 menit; Denaturasi 95°C selama 30 detik; Annealing 53°C selama 30 detik; Extension 72°C selama 1 menit; Pra-Extension 72°C selama 5 menit, Final Hol 4°C dengan waktu yang tidak ditentukan. Proses Amplifikasi sebanyak 30 siklus.
- d. Hasil PCR divisualisasikan menggunakan Gel Doc. Pita yang terang mengindikasi proses PCR berhasil. Selanjutnya PCR mix dikirim ke *Genetika science* untuk dilakukan proses Sekuensing.
- e. Hasil sekuen DNA diedit menggunakan program MEGA versi 11. Pencarian sekuen menggunakan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) dan dibandingkan dengan database pada NCBI (Sulistiani & Hidayat, 2020).

## 2.4. Analisis Data

### 2.4.1. Analisis Keragaman Mikroba (Metagenomik)

Hasil sekvensing menggunakan platform Illumina adalah Raw PE. Raw PE adalah data sekuen dari sampel daun. RAW PE kemudian diolah untuk mendapatkan Tag Bersih. Clean Tags tersebut diolah menggunakan FLASH (V1.2.1.1) untuk memperoleh Tag Efektif. Untuk mempelajari komposisi komunitas mikroba pada setiap sampel, *Operational Taxonomic Units* (OTUs) diperoleh dengan cara mengelompokkan dengan Tag Efektif semua sampel, dan kemudian diidentifikasi menggunakan QIIME2 software (Version QIIME2-202202). OTUs digunakan untuk memperoleh data keragaman alfa, keragaman beta dan kelimpahan relatif.

### 2.4.2. Karakterisasi Bakteri Potensial Biostimulan

#### 1. Uji bakteri penghasil hormon IAA

Nilai absorbansi dari *Spektrofotometer* disubstitusi pada persamaan kurva standar IAA. Persamaan kurva standar IAA diperoleh metode pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi 0 ppm, 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm. Sebanyak 2 ml larutan IAA pada masing-masing konsentrasi ditambahkan 2 ml



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

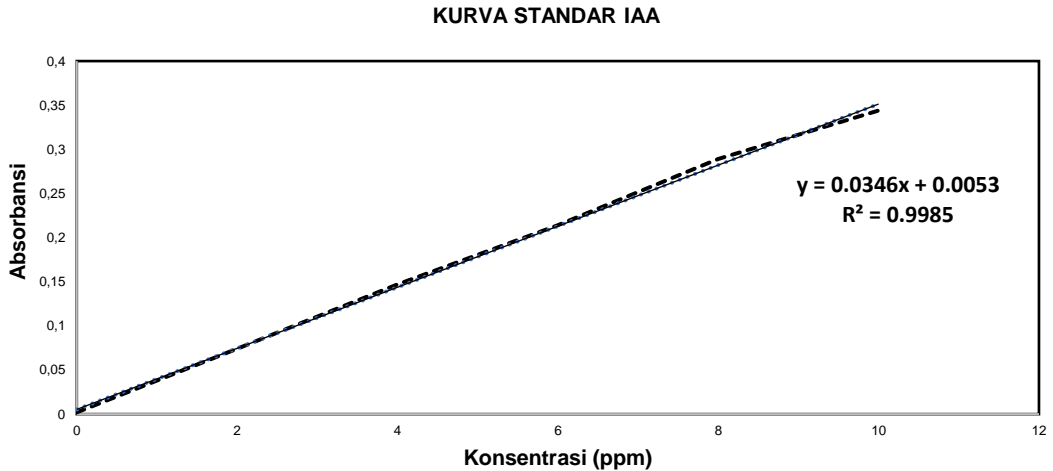
dan diinkubasi pada ruang gelap dengan suhu ruang selama absorbansi masing-masing variasi konsentrasi selanjutnya diukur dengan Spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm dan dibuatkan kurva standar IAA. Kurva standar IAA akan digunakan untuk memperoleh persamaan regresi linear yang akan digunakan untuk mengukur konsentrasi IAA. Persamaan regresi liner dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi IAA. Konsentrasi IAA diperoleh dengan mensubstitusi nilai absorbansi pada persamaan liner pada gambar 1 dengan persamaan sebagai

$$Y = 0,0346X + 0,0053 \dots \dots \dots (1)$$

Ket:

Y : Nilai Absorbansi

X : Konsentrasi IAA (ppm)



**Gambar 1.** Kurva Standar IAA

**2. Uji bakteri pelarut fosfat**

Uji bakteri pelarut fosfat secara kualitatif dilakukan pengukuran Indeks kelarutan fosfat dihitung dengan menggunakan persamaan berikut (Srivastava *et al.*, 2004), (Candra *et al.*, 2018):

$$\text{Indeks Kelarutan Fosfat (\%)} = \frac{\text{Diameter Zona Bening} - \text{Diameter koloni}}{\text{Diameter koloni}} \times 100 \dots \dots \dots (2)$$

Uji bakteri pelarut fosfat secara kuantitatif yakni pengukuran konsentrasi fosfat yang dihasilkan dari nilai absorbansi disubstitusi ke persamaan kurva standar fosfat pada gambar 2. Kurva standar fosfat diperoleh dengan cara melarutkan kalium dihidrogen fosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) kemudian ditambahkan 1 ml larutan hidrazin sulfat dan diinkubasi dengan suhu ruang selama 30 menit. standar fosfat diukur menggunakan spektrofotometer UV VIS gelombang 830 nm. Konsentrasi Fosfat diperoleh dengan absorbansi ke persamaan liner pada gambar 2 dengan i berikut:



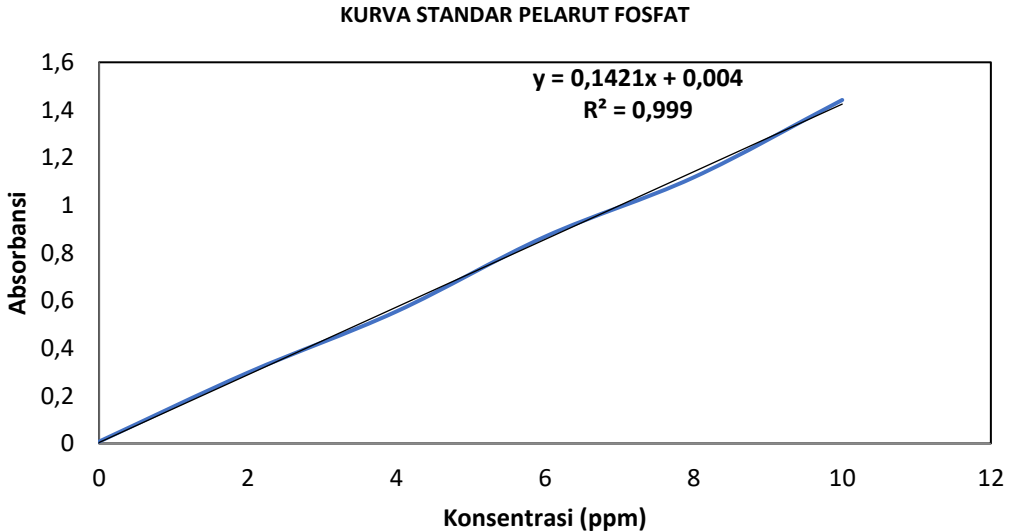
Optimized using trial version [www.balesio.com](http://www.balesio.com)

$$Y = 0,1421X + 0,004 \dots \dots \dots (3)$$

Ket:

Y : Nilai Absorbansi

X : Konsentrasi Fosfat (ppm)



**Gambar 2.** Kurva Standar Pelarut Fosfat

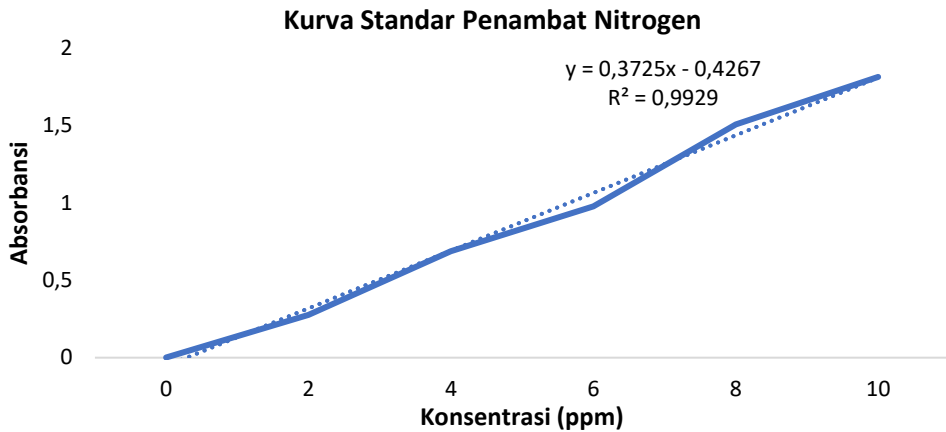
**3. Uji bakteri penambat nitrogen**

Uji bakteri penambat nitrogen secara kuantitatif yakni pengukuran konsentrasi amonium yang dihasilkan dari nilai absorbansi disubstitusi ke persamaan kurva standar nitrogen pada gambar 3. Kurva standar nitrogen diperoleh dengan metode pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi ammonia 0 ppm, 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm. Sebanyak 3 ml larutan NH<sub>4</sub>Cl pada masing-masing konsentrasi ditambahkan reagen Nessler sebanyak 0,13 ml dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 30 menit. Absorbansi larutan standar penambat nitrogen diukur menggunakan spektrofotometer UV VIS dengan panjang gelombang 435 nm. Konsentrasi Amonium diperoleh dengan mensubstitusi nilai absorbansi ke persamaan liner pada gambar 2 dengan persamaan sebagai berikut:

$$Y = 0,3725X - 0,4267 \dots \dots \dots (4)$$



onium (ppm)



**Gambar 3.** Kurva standar Nitrogen

#### 2.4.3. Karakterisasi Bakteri Potensial Biokontrol

Karakterisasi bakteri potensial biocontrol dilakukan pengujian antagonis. Uji anatgonis merupakan pengujian kemampuan mikroba menghambat mikroba patogen dengan metode *Dual Culture*. Perhitungan PIRG (*Percentage Inhibition of Radial Growth*) menggunakan persamaan (Leiwakabessy *et al.*, 2019, Skidmore & Dickinson, 1976):

$$PIRG = \frac{R1-R2}{R1} \times 100 \dots \dots \dots (5)$$

Keterangan :

PIRG = Percentage Inhibition of Radial Growth

R1= Diameter koloni jamur patogen pada perlakuan kontrol (cm)

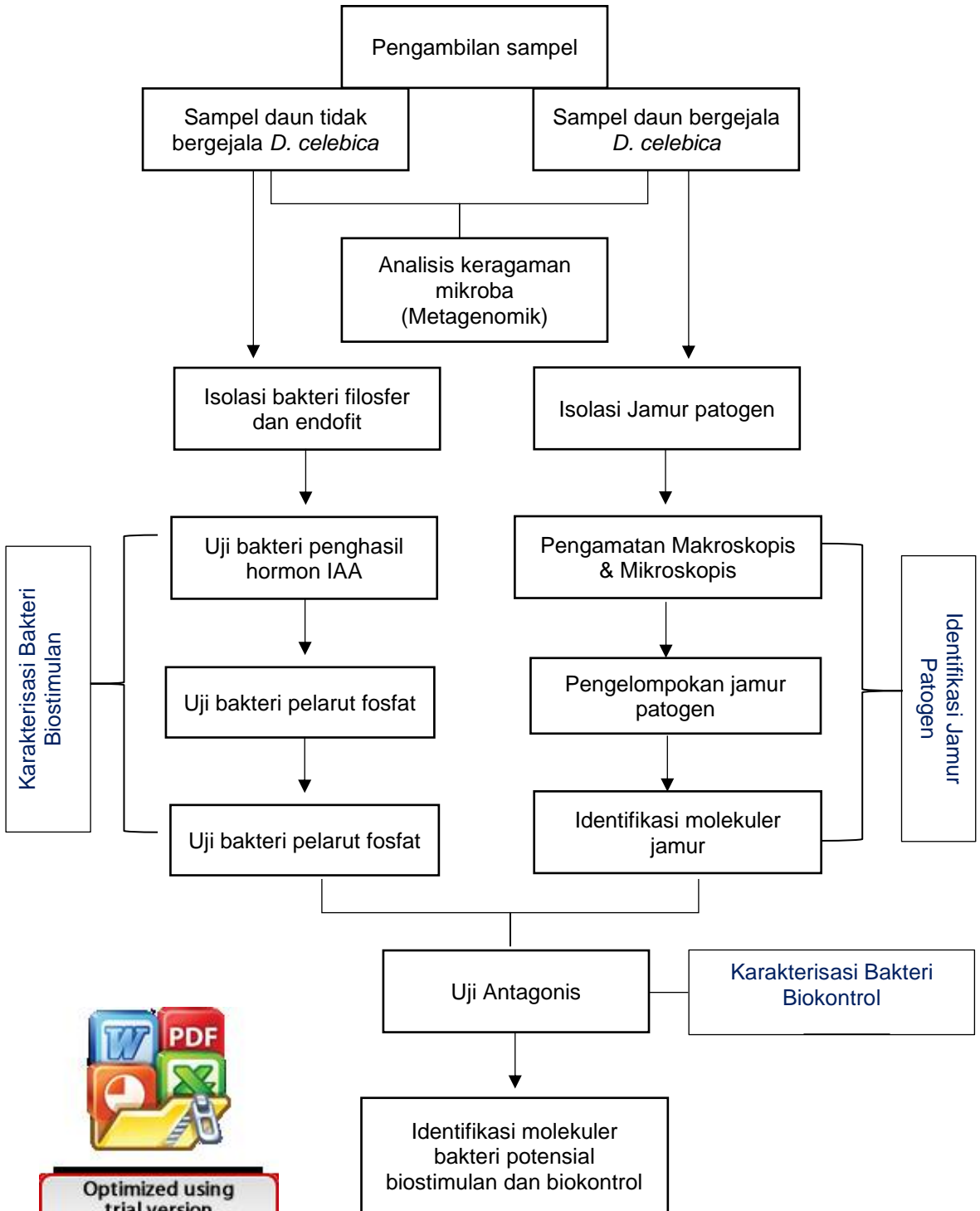
R2= Diameter koloni jamur patogen pada perlakuan bakteri antagonis (cm)

#### 2.4.4. Identifikasi Molekuler Mikroba

Hasil Amplifikasi DNA jamur maupun bakteri dilanjutkan dengan sekuensing. Hasil sekuen berupa untaian basanukleotida dengan bp tertentu. Urutan basanukleotida tersebut kemudian dilakukan alligement DNA menggunakan program MEGA versi 11. Urutan masing-masing sekuens bakteri dan jamur dapat dilihat pada lampiran 10. Pencarian sekuen menggunakan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) dan dibandingkan dengan database pada NCBI (Sulistiani & Hidayat, 2020). Hasil pencocokan sekuens sampel i website NCBI dapat dilihat pada lampiran 11.



## 2.5. Alur Penelitian



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

Gambar 4. Alur Penelitian