

Molecular Characterization of Neem Rhizosphere Bacteria as A Nitrogen Fixer Isolated from The Dry Land of East Lombok

Rizal Umami¹, Lalu Zulkifli^{1,2*}, Syamsul Bahri^{1,2}, Mahrus^{1,2}, Prapti Sedijani^{1,2}

¹Program Studi Magister Pendidikan IPA, Pascasarjana, Universitas Mataram, Mataram, Nusa Tenggara Barat, Indonesia;

²Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Mataram, Mataram, Nusa Tenggara Barat, Indonesia;

Article History

Received: September 01th, 2023

Revised : October 18th, 2023

Accepted : October 24th, 2023

*Corresponding Author:

Lalu Zulkifli, Program Studi Magister Pendidikan IPA, Pascasarjana, Universitas Mataram, Mataram, Nusa Tenggara Barat, Indonesia; Email:

lalu_zulkifli@unram.ac.id

Abstract: Bacteria have an important role in providing essential nutrients for plants in dry land through various beneficial working mechanisms. One of the main mechanisms is the involvement of bacteria in nutrient cycles, such as the nitrogen cycle. The aim of this research was to determine the type and ability of bacteria in the rhizosphere of neem (*Azadirachta indica*) to fix nitrogen. The method used in this research is an exploratory descriptive type. The results of the isolation carried out from the rhizosphere of neem (*Azadirachta indica*) taken from the East Lombok area of Jerowaru sub-district, 5 samples were obtained with the code LO, where 2 isolates had the ability to fix nitrogen, namely LO3 and LO4. This is proven by using NFB media where there is a change in the color of the media from green to blue, and quantitatively using a spectrophotometer with results of 1,112 ppm and 2,156 ppm, respectively. The results of the molecular identification of the potential bacteria, namely LO4, using the BLAST method at the GenBank data base (NCBI), show that LO4 is the closest relationship to the species *Lysinibacillus fusiformis* strain SMC303. The results above show that rhizobacteria isolated from neem have the potential to be developed as a biofertilizer that can be applied to future cultivated plants.

Keywords: Dray land, molecular characterization, neem, nitrogen fixer, rhizosphere bacteria.

Pendahuluan

Provinsi Nusa Tenggara Barat (NTB) merupakan salah satu daerah di Indonesia yang memiliki luas lahan kering yang cukup banyak sekitar 85,19% dari luas wilayahnya (Mulyati *et al.*, 2023). Lahan kering ini ditandai oleh curah hujan yang rendah dan kondisi lingkungan yang cenderung kering sepanjang tahun (Rachman, 2017). Kondisi ini menjadi tantangan bagi pertanian dan penanaman tanaman pangan (Hikmat *et al.*, 2022), namun ditengah keterbatasan ini, terdapat satu tanaman yang mampu beradaptasi dengan baik, yaitu tanaman mimba (*Azadirachta indica*) (Wibawa & Putu, 2019).

Tanaman mimba adalah salah satu jenis tanaman yang memiliki karakteristik khas untuk

bertahan hidup di lahan kering (Setyayudi *et al.*, 2017). Ciri-ciri morfologisnya meliputi daun majemuk dengan bentuk bergerigi, batang yang kokoh, serta bunga yang berwarna putih dan harum (Shofa, 2021). Tanaman ini sering ditemukan tumbuh di daerah-daerah kering seperti hutan gersang, savana, dan dataran rendah dengan paparan sinar matahari yang tinggi (Wibawa & Putu, 2019).

Mimba memiliki kemampuan adaptasi yang luar biasa terhadap kondisi lingkungan kering (Laga, 2019). Daunnya yang berbentuk kecil dan berkerut membantu mengurangi penguapan air, sehingga mengurangi kehilangan air melalui proses transpirasi (Gusnawati *et al.*, 2023). Selain itu, akar mimba memiliki sistem perakaran yang dalam dan kuat, mampu menyerap air dan nutrisi dari lapisan tanah yang

lebih dalam.

Rizosfer tanaman mimba merupakan daerah di sekitar akar tempat mikroba berkembang biak (Henggu, 2022). Mikroba yang hidup di daerah rizosfer berperan penting dalam menjaga keseimbangan ekosistem tanah dan membantu tanaman bertahan hidup di lahan kering. Mikroba seperti bakteri, fungi, dan aktinomisetes berinteraksi dengan akar tanaman, membantu meningkatkan ketersediaan nutrisi, menghasilkan senyawa yang merangsang pertumbuhan, serta melindungi tanaman dari patogen (Soesanto dan Ending, 2023).

Bakteri salah satu jenis mikroba yang memiliki peran penting dalam kemampuan tanaman mimba bertahan hidup di lahan kering. Beberapa jenis bakteri mampu membentuk hubungan mutualistik dengan tanaman (Prosanti *et al.*, 2023), di mana bakteri mendapatkan nutrisi dari akar tanaman dan sebaliknya tanaman mendapatkan manfaat seperti peningkatan ketersediaan nutrisi dan perlindungan terhadap stres lingkungan. Selain itu, bakteri di rizosfer juga memiliki potensi sebagai pengikat nitrogen (Hardiyanti *et al.*, 2017), membantu meningkatkan ketersediaan nutrisi esensial bagi tanaman di lahan kering.

Bakteri memiliki peran penting dalam menyediakan nutrisi esensial bagi tanaman di lahan kering melalui berbagai mekanisme kerja yang menguntungkan (Azizah, 2009). Salah satu mekanisme utama adalah keterlibatan bakteri dalam siklus nutrisi, seperti siklus nitrogen. Beberapa jenis bakteri mampu mengikat nitrogen atmosfer ke dalam bentuk yang dapat diakses oleh tanaman, seperti amoniak atau senyawa organik yang mengandung nitrogen (Nur, 2023). Proses ini dikenal sebagai fiksasi nitrogen, dimana bakteri membantu meningkatkan ketersediaan nitrogen dalam tanah yang sering kali terbatas di daerah kering. Selain itu, bakteri juga dapat membantu dalam pelarutan fosfat dan mineral lainnya dalam tanah, memungkinkan tanaman untuk mengakses nutrisi yang diperlukan meskipun dalam kondisi lahan yang tandus (Djuarnani, 2005).

Bakteri memiliki kemampuan adaptasi yang luar biasa dalam menghadapi cekaman kering (Sumarno *et al.* 2023), sehingga memungkinkan mereka untuk bertahan hidup dan berkembang biak di daerah kering. Salah

satu cara adaptasi yang paling penting adalah kemampuan bakteri untuk mengatur keseimbangan air dalam selnya. Bakteri menghasilkan senyawa yang dapat mengurangi tekanan osmotik di dalam sel, memungkinkan mereka untuk mengatasi tekanan air yang rendah dalam lingkungan kering. Selain itu, beberapa jenis bakteri mampu membentuk struktur perlindungan seperti kapsul atau biofilm, yang membantu menjaga kelembaban di sekitar sel bakteri dan mencegah kehilangan air yang berlebihan. Mekanisme adaptasi ini memungkinkan bakteri untuk tetap aktif dan mempertahankan fungsi vitalnya dalam kondisi lingkungan yang kering dan berpotensi merusak.

Bahan dan Metode

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Mataram dan Rumah Sakit Provinsi Nusa Tenggara Barat, Kemudian untuk pengambilan sampel dilakukan di Dusun Saung Desa Wakan Kecamatan Jerowaru

Bahan eksperimen

Bahan isolasi bakteri rizosfer Mimba terdiri dari alkohol 70%, garam fisiologis, aquades, tisu, NA (Natrium Agar), dan tanah yang berada didekat akar tanaman Mimba (*Azadirachta indica*). Garam fisiologis (NaCl, 0,9 %) yang telah di sterilkan terlebih dahulu, larutan kristal violet, lugol, alkohol 70% dan larutan safranin. media semisolid NfB (*Nitrogen Free Bromthymol Blue*), (Narayan *et al.*, 2018). Media *pepton broath* 250 ml, garam signette dan larutan nessler. (Yang & Ting, 1978). DNAzol 200 µl, etanol 100% 100 µl, etanol 80% 200 µl, Aquades 40µ. primer 1: 63 f (5'- CAG GCCCTAA CACATG CAA GTC-3') 1 µl, primer 2: 1387r (5'- GGG CGG CGT GTA CAAGGC-3') 1 µl, PCR Master Mix Solution (2x) 10 µl, template DNA 1-2 µl, aquades 17 µl. produk PCR 4 µl, Loading buffer (*Bromphenol-blue* dan *Cylene Cyanol*), gel agarosa 2% 0,5 gram, buffer TBE (*Tris Borat EDTA*) 50 ml, *Ethidium Bromide* (EtBr) 4µl, Marker 100 bp DNA Ladder (Invitrogen).

Pengambilan sampel tanah

Sampel tanah sebanyak 100 g di ambil

pada kedalaman 1-50 cm dengan 3 kali ulangan dan jadikan satu untuk setiap lokasi. Caranya adalah tanah sekitar akar digali dan di dicabut perlahan kemudian bongkahan tanah yang masih melekat dibuang dengan cara digoyang. Tanah yang melekat pada akar disapu dengan sikat dan dikoleksi sebagai sampel tanah rizosfer (Zhu *et al.*, 2011). Sampel dimasukkan dalam kantong plastik dan disimpan pada ice box (4°C) untuk kemudian dibawa ke laboratorium.

Isolasi bakteri dari rizosfer Tanaman Mimba

Sampel tanah diambil satu gram (1gr) kemudian dilarutkan dalam 9 ml aquades. Satu ml dari larutan yang telah dihomogenkan di atas kemudian ditransfer ke dalam 9 ml aquades untuk membentuk pengenceran 10^{-2} . Dengan cara yang sama dilakukan pengenceran sampai 10^{-8} (Hou *et al.*, 2008). Seri pengenceran sampel tanah 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} di sebar sebanyak 0,1 ml pada medium agar. Kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24-120 jam. Koloni bakteri yang tumbuh pada medium adalah total populasi bakteri. Selanjutnya koloni bakteri yang tumbuh dilakukan pemurnian sampai memperoleh isolat murni.

Identifikasi dan karakterisasi bakteri

Pengamatan morfologi

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah jumlah isolat yang ditemukan, bentuk koloni bakteri, bentuk tepian koloni bakteri, bentuk elevasi koloni, dan warna koloni bakteri. (Lennin & Yasmin, 2011)

Pengecatan gram

Diambil aquades ditetaskan pada kaca objek ditambahkan 1 ose biakan sampel, lalu difiksasi di atas api. Tetesi pewarnaan kristal violet dan biarkan selama 1 menit, cuci dengan air mengalir, kemudian tetesi lugol biarkan selama satu menit dan kembali dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya tetesi alkohol 96% biarkan selama 30 detik, cuci dengan air mengalir dan tambahkan safranin biarkan selama 1 menit kemudian cuci lagi dengan air mengalir. Tahap selanjutnya keringkan dengan menggunakan kertas serap dan tambahkan minyak emersi kemudian amati di bawah mikroskop. Bila hasil pewarnaan diperoleh bakteri berwarna merah maka bakteri tersebut

adalah bakteri gram negatif, sedangkan bila diperoleh bakteri berwarna ungu maka bakteri tersebut adalah gram positif (Lennin & Yekki, 2011).

Identifikasi Molekuler

Ekstrak DNA

Proses ekstraksi DNA, mengikuti prosedur Kit DNA-Zol. Hasil sentrifugasi (pelet) dikeringkan pada suhu kamar, kemudian ditambah aquades 50 µl dan disimpan pada -20 °C sampai saat digunakan.

Amplifikasi gen 16S-rRNA dengan PCR

Primer universal 16S-rRNA yang digunakan adalah primer 63f (5'-CAG GCCTAA CACATG CAA GTC- 3') dan 1387r (5'-GGG CGG CGT GTA CAAGGC-3') (Marchesi *et al.*, 1998). PCR dilakukan dengan cara, kedalam tabung PCR dimasukkan 2x PCR master mix solution 10 µl, template DNA 1 µl, primer 63f 1 µl, primer 1387r 1 µl, aquades 17 µl, selanjutnya tabung PCR dimasukkan dalam mesin PCR (bio red). Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan alat my cycler (bio red). Kondisi awal (pre) PCR diatur pada suhu 94°C selama 5 menit, selanjutnya diikuti dengan 35 siklus PCR yang terdiri dari denaturasi pada suhu 94 °C selama 30 detik, penempatan primer (*annealing*) pada suhu 55 °C selama 30 detik dan ekstensi pada suhu 72 °C selama 45 detik. Setelah 35 siklus terlampaui, dilakukan post PCR pada suhu 72 °C selama 5 menit dan disimpan pada suhu 20 °C (Aris *et al.*, 2013).

Elektroforesis

Tahap elektroforesis, sebanyak 4 µl produk PCR dielektroforesis pada 2% gel agarose dalam buffer TBE (0,5 TBE) yang telah di isi sebanyak 4 µl EtBr. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 V dan kuat arus sebesar 400 A selama 30 menit. Marker yang dipakai adalah 100 bp DNA ladder. Hasil elektroforesis divisualisasi dibawah sinar ultraviolet dan difoto dengan menggunakan Gel doc.

Sekuensing produk PCR

Produk PCR yang diperoleh selanjutnya disekuensing.

Uji kemampuan isolat bakteri pengikat nitrogen

Uji kualitatif bakteri pengikat nitrogen

Bakteri hasil isolasi di tumbuhkan dalam media *Nitrogen Free mineral* yang ditambahkan dengan *Bromotomiul Blue* (BTB) dan 0,7 % glukosa, kemudian dilakukan inkubasi selama 48 jam dan perubahan warna media dari hijau menjadi biru mengindikasikan adanya bakteri pemfiksasi nitrogen (Mallombasi, 2018).

Pembuatan kurva standar nitrogen

Larutan NH_4^+ 100 ppm sebagai larutan stok, di buat masing-masing konsentrasi kedalam labu takar 0,0 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 1,5 ppm, 2 ppm, dan 2,5 ppm, kemudian dalam masing-masing larutan ditambahkan 0,5 ml reagen kalium natrium tartarat dan 2 ml pereaksi nesler kemudian di diamkan. Setelah 10 menit dilanjutkan untu pengujian spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm. Kemudian masing-masing nilai serapan di catat.

Uji kuantitatif bakteri pengikat nitrogen

Uji kuantitatif kemampuan fiksasi nitrogen. Bakteri ditumbuhkan pada media *Pepton broth* selama 3 hari, kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. 2 tetes garan signette dan 0,5 ml reagen nessler ditambahkan di supernatan hasil sentrifugasi media *pepton broth*, kemudian di spektrofotometri dengan panjang gelombang 420 nm (Asrul & Aryantha, 2021). Hasil absorbansi cahaya spektrofotometer dikalibrasi menjadi ppm dengan menggunakan kurva standar (NH_4^+).

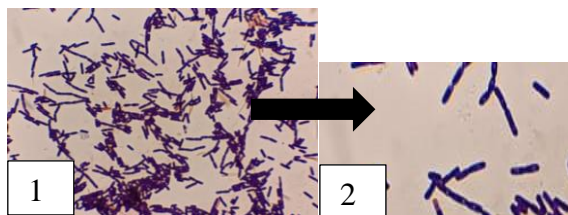
Hasil dan Pembahasan

Hasil isolasi bakteri Rizosfer Mimba (*Azadirachta indica*)

Hasil isolasi yang dilakukan dari rizosfer Mimba (*Azadirachta indica*) yang di ambil dari daerah Lombok Timur wilayah kecamatan Jerowaru di peroleh 5 sampel dengan kode LO. Lebih jelasnya lihat pada tabel Tabel 1

Morfologi koloni dan sel bakteri Rizosfer Mimba (*Azadirachta indica*)

Dari hasil isolasi yang dilakukan menunjukkan adanya keragaman pada morfologi koloni yang di tujukkan oleh 5 isolat murni yang di peroleh. Mulai dari bentuk, tepian, elevasi, warna, sedangkan untuk morfologi sel terdiri dari gram positif, gram negatif dan bentuk bakteri. Hasil pewarnaan gram menunjukkan 5 isolat termasuk dalam bakteri gram positif.



Gambar 1. Hasil pewarnaan gram bakteri rizosfer Mimba (LO4) bakteri batang gram positif

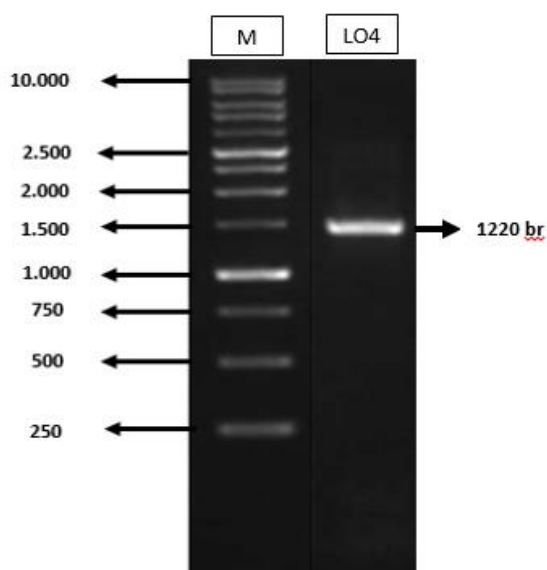
Lebih jelasnya morfologi koloni dan sel bakteri rizosfer Mimba dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Morfologi koloni dan sel bakteri Rizosfer Mimba

Kode Isolat	Karakteristik Bakteri					
	Morfologi Koloni			Morfologi		
	Bentuk	Tepi	Elevasi	Warna	Gram	Bentuk
LO1	Circular	Curlet	Flat	Putih kekuningan	Positif	Batang
LO2	Circular	Curlet	Flat	Putih keruh	Positif	Batang panjang
LO3	Iregular	Entire	Raised	Putih susu	Positif	Batang tunggal
LO4	Iregular	Entire	Raised	Putih susu	Positif	Batang
LO5	Iregular	Undulet	Raised	Putih	Positif	Batang berantai

Hasil identifikasi gen 16S rRNA

Identifikasi spesies bakteri rizosfer yang di peroleh dari rizosfer tanaman Mimba (*Azadirachta indica*) dilakukan dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dengan menggunakan primer universal 63f dan 1387r pada satu sampel potensial yaitu LO4. setelah dilakukan amplifikasi kemudian dilanjutkan dengan elektroforesis pada tegangan 100 volt dengan kuat arus 400 A. Hasil uji yang dilakukan diperoleh pita DNA penyandi gen 16S rRNA yang sejajar pada ukuran \pm 1500 bp (Gambar 4) setelah dilakukan perbandingan dengan DNA Marker (100 bp DNA ladder).



Gambar 2. Elektroforesis pada gel agarose hasil PCR menggunakan primer universal 63f dan 1387r dengan hasil amplifikasi sampel LO4 sebesar 1220 br.

Hasil visualisasi menunjukkan bahwa pita DNA yang terdiri dari bp (*base Pair*), marker, sampel LO4 menunjukkan hasil amplifikasi sampling memiliki panjang 1220 br. Susunan DNA hasil sekuensing (*Complementary sequences*) yang berasal dari berbagai spesies *Lysinibacillus* disimpan dalam format file FASTA dengan menggunakan perangkat lunak BioEdit versi 7.2.5.0. Data urutan DNA diatur dalam posisi yang sejajar menggunakan ClustalW (Thompson et al., 1997). Selanjutnya, dalam program MEGA X, sebuah pohon filogenetik dibuat menggunakan metode *Neighbour Joining Tree* berdasarkan penelitian oleh Naruya dan Masatoshi (1987). Jarak

evolusi dan jarak kekerabatan bakteri rizosfer yang di uji dengan bakteri referensi dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. *Genetic distance* berbasis sekuen gen 16S rRNA isolat bakteri rizosfer Mimba (*Azadirachta indica*) dengan kode LO4 terhadap bakteri referensi yang diakses dari *GenBank*

No	Kode isolat bakteri Rizosfer Mimba	Bakteri referensi	Jarak Genetik
1	LO4	LN995755.1_Lysinibacillus_mangiferihumi_partial_16S_rRNA_gene_isolate_Fe_4.1_H_RNR_041276.1_Lysinibacillus_boronitolerans_strain_10a_16S_ribosomal_RNA_partial_sequence	0.053
		NR_042072.1_Lysinibacillus_fusiformis	0,000
		NR_113166.1_Lysinibacillus_pakistanensis_strain_NCCP-54_16S_ribosomal_RNA_partial_sequence	0.003

Hasil dari pembuatan pohon filogenetik atau dendrogram isolat dari rizosfer tanaman Mimba (*Azadirachta indica*) dengan kode LO4 termasuk dalam famili *bacillaceae* dan berada satu genus dengan beberapa strain dari spesies *Lysinibacillus mangiferihumi*, *Lysinibacillus boronitolerans*, dan *Lysinibacillus fusiformis*. Hal tersebut dapat disimpulkan bakteri yang uji lanjutan dengan PCR dan Sekuensing memiliki hasil bahwa Isolat bakteri dari rizosfer tanaman Mimba termasuk dalam genus *Lysinibacillus*. Berdasarkan jarak evolusi Isolat dengan kode LO4 berada satu kelompok dengan beberapa strain *Lysinibacillus* dengan jarak genetik tertinggi 0,053 dan terendah 0,000.

Hasil yang lebih akurat didapatkan dengan melakukan analisis GenBank menggunakan analisis BLAST, adapun hasil yang di peroleh di analisis diantaranya: Koloni

dengan kode LO4 menunjukkan kesamaan dengan spesies *Lysinibacillus fusiformis* strain SMC303 dengan nilai maksimal 832 dan total skor sebesar 832, query cover 100% dan identitas 100% dan untuk *e value* sebesar 0,0 dimana nilai tersebut semakin kecil yang di tampilkan akan menunjukkan semakin dekatnya tingkat kekerabatan isolat. *Lysinibacillus fusiformis* adalah sebuah bakteri Gram-positif yang masuk ke dalam kelompok Bacillus. Ini adalah organisme yang umumnya ditemukan di lingkungan alami seperti tanah dan sedimen air. Beberapa spesies *Lysinibacillus* dapat memiliki peran dalam dekomposisi bahan organik, sirkulasi nutrisi, dan keseimbangan ekosistem.

Potensi isolat pengikat nitrogen

Kemampuan isolat bakteri pengikat nitrogen secara kualitatif

Bakteri hasil isolasi ditumbuhkan dalam media *Nitrogen Free mineral* yang ditambahkan dengan *Bromotomiul Blue* (BTB) dan 0,7 % glukosa, kemudian dilakukan inkubasi maksimal selama 2 hari dan perubahan warna media dari hijau menjadi biru mengindikasikan adanya bakteri pemfiksasi nitrogen. Diperoleh dari 5 isolat yang ada terdapat 2 isolat yang mampu menunjukkan kemampuannya dalam mengikat nitrogen, ini terbukti dari adanya perubahan warna media dari hijau menjadi biru, yaitu pada isolat LO3, LO4, sedangkan isolat lain tidak menunjukkan adanya perubahan warna dan dapat di simpulkan bahwa isolat tersebut tidak mampu mengikat nitrogen. Ketika koloni mengalami perubahan warna menjadi warna biru, ini menandakan bahwa isolat tersebut mampu mengikat nitrogen secara positif.

Kemampuan isolat bakteri pengikat nitrogen secara kuantitatif

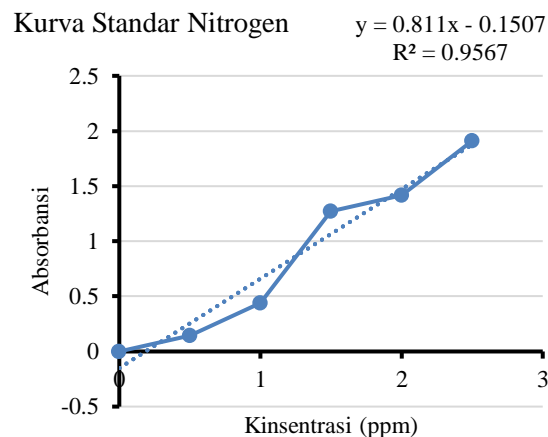
Kurva Standar NH₄⁺

Larutan NH₄⁺ 100 ppm sebagai larutan stok, di buat masing-masing konsentrasi kedalam labu takar 0,0 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 1,5 ppm, 2 ppm, dan 2,5 ppm, kemudian dalam masing-masing larutan ditambahkan 0,5 ml reagen kalium natrium tartarat dan 2 ml pereaksi nessler kemudian di diamkan. Setelah 10 menit dilanjutkan untuk pengujian spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm. Kemudian masing-masing nilai serapan di catat.

Tabel 3. Hasil pengukuran nilai absorbansi NH₄⁺ untuk pembuatan kurva standar

No	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
1	0	0
2	0.5	0.145
3	1	0.438
4	1.5	1.270
5	2	1.415
6	2.5	1.910

Berdasarkan data nilai serapan (absorbansi) yang di peroleh dapat di buat kurva standar seperti gambar 3. Setelah hasil uji kemampuan bakteri pengikat nitrogen secara kualitatif, dilanjutkan melakukan pengujian kuantitatif dengan mengukur nilai serapan dengan menggunakan spektropotometr, pada panjang gelombang 420 nano meter (nm), dari 5 isolat yang ada hanya 2 isolat yang mampu menunjukkan kemampuannya dalam mengikat nitrogen berdsarkan hasil uji kualitatif yang dilakukan yaitu LO3, LO4, dengan menunjukkan terjadinya perubahan dari warna hijau media menjadi warna biru, sedangkan isolat yang lain tidak mengalami perubahan warna yang artinya isolate tersebut tidak mampu mngikat nitrogen.



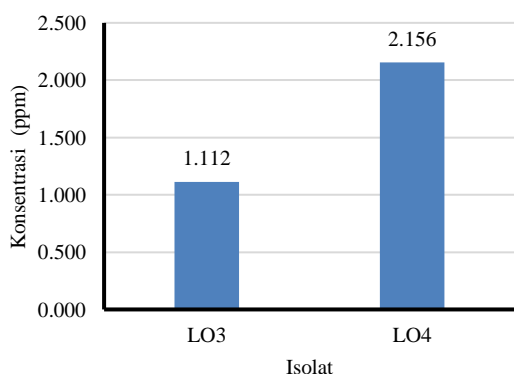
Gambar 3. Kurva Standar NH₄⁺

Setelah melalui masa inkubasi selama 3 hari selanjutnya isolat di sentrifius dengan kecepatan 4000 rpm, selama 15 menit dan masing-masing isolat diambil supernatannya 1 ml, 2 tetes garan signette dan 0,5 ml reagen nessler ditambahkan, selanjutnya diukur serapannya menggunakan spektrofotometer. Adapun hasil perhitungan serapan dapat di lihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil pengukuran absorbansi nitrogen oleh isolat bakteri

Isolat	Ulangan	PH	Absorbansi
LO3	U1	6	0.748
	U2	7	0.605
	U3	6	0.886
Rata-Rata		6,34	0.746
Konsentrasi (ppm)			1.112
LO4	U1	7	1.547
	U2	8	1.695
	U3	8	1.652
Rata-Rata		7,67	1.631
Konsentrasi (ppm)			2.156

Hasil pengukuran kemampuan bakteri dalam mengikat nitrogen diperoleh nilai absorbansi rata-rata pada isolat LO3 diperoleh angka sebesar 0.746 sedangkan pada isolate ke 2 dengan kode LO4 diperoleh nilai absorbansi sebesar 1.631 sehingga dapat di simpulkan bahwa isolate LO4 memiliki nilai absorbansi lebih tinggi dari LO3. Namun jika dikonfersikan pada besaran nilai absorbansi berdasarkan ppm diperoleh nilai 1.112 ppm pada LO3 dan 2.156 ppm pada LO4. Untuk lebih jelasnya nilai absorbansi yang di konfersikan dapat di lihat pada grafik 3.



Gambar 3. Grafik konsentrasi hasil pengukuran Nitrogen

Pembahasan

Isolasi bakteri rizosfer Tanaman Mimba (*Azadirachta indica*)

Azadirachta indica atau tanaman Mimba merupakan jenis tanaman yang banyak ditemukan di Indonesia, khususnya di daerah pulau Lombok, ditanam sebagai tanaman peneduh pinggir jalan dan banyak juga yang

tubuh secara liar di tempat-tempat yang memiliki iklim kering terutama di wilayah Lombok bagaian selatan. Pemanfaatan tanaman Mimba oleh masyarakat selain dijadikan sebagai pakan ternak, banyak juga yang memanfaatkan tanaman ini sebagai bahan obat-obatan dan pestisida, karena tanaman ini memiliki senyawa yang bersifat nemasida dan masih banyak lagi manfaat yang bisa di peroleh pada tanaman ini. Kemampuan tanaman ini beradaptasi pada lingkungan yang kering, diduga mikroba khususnya bakteri juga mampu bertahan, karena setiap tanaman tidak mungkin terpisah dari mikroorganisme tanah yang membantu kesuburan dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Kamsurya & Botanri, 2022).

Bakteri rizosfer merupakan jenis bakteri yang tumbuh di sekitar perakaran tanaman dan jumlahnya hampir 10^6 - 10^9 sel populasi bakteri (Mallombasi, 2018). Keberadaannya jika dibandingkan dengan yang berada di dalam tanaman (endofit) jauh lebih banyak. Hubungan simbiosis mutualisme antara tanaman dengan bakteri, dimana bakteri mendapatkan nutrisi dari hasil metabolisme tanaman (Zulkifli *et al.*, 2018) dan begitu juga sebaliknya, tanaman mendapatkan keuntungan dari kemampuan bakteri dalam memanfaatkan unsur hara yang berada di sekitar perakaran tanaman mengubahnya kedalam bentuk yang lebih sederhana sehingga tanaman mampu memanfaatkannya untuk pertumbuhan dan perkembangannya (Kamsurya & Botanri, 2022).

Bakteri yang di isolasi dari tanaman mimba (*Azadirachta indica*), memiliki karakter yang berbeda, diantaranya memiliki kemampuan dalam mengikat nitrogen, dimana unsur tersebut adalah merupakan unsur yang sangat penting untuk kelangsungan hidup tanaman (Widawati & Muharam, 2013). Isolasi pada berbagai jenis tanaman banyak dilakukan untuk membuktikan peran bakteri rizosfer dalam bersimbiosis dengan tanaman, seperti yang dilakukan oleh (Malombasi, 2018) melakukan isolasi pada rizosfer tanaman padi dan di peroleh sebanyak 17 isolat yang beberapa diantaranya memiliki kemampuan dalam mengikat nitrogen.

Proses isolasi pada rizosfer merupakan langkah awal untuk memperoleh isolat murni, yang kemudian dapat di lanjutkan melakukan uji

kemampuan secara spesifik pada isolat yang di peroleh. Dalam isolasi yang dilakukan pada rizosfer tanaman Mimba (*Azadirachta indica*) diperoleh 5 isolat dimana 2 isolat mampu sebagai pengikat nitrogen. Isolasi bakteri dilakukan hamper 3 bulan untuk memperoleh isolat yang benar-benar murni sehingga akan memudahkan peneliti untuk melakukan identifikasi terhadap bakteri yang hidup pada rizosfer mimba di daerah kering.

Morfologi koloni dan sel bakteri Rizosfer Tanaman Mimba (*Azadirachta Indica*)

Hasil isolasi bakteri rizosfer dari tanaman Mimba (*Azadirachta indica*), diperoleh sebanyak 5 isolat memiliki keragaman baik dari bentuk sel, ukuran, tepian, bentuk koloni, elevasi, dan pigmen. Pada umumnya kolono bakteri memiliki bentuk *rhizoid*, *circular*, *irregular*, *filamentous*. elevasi *crateriform*, *convex*, *flat*, *umbonate*, *raised*. Tepian memiliki bentuk *curled*, *labote*, *entire*, *undulate*, dan *filifom* (Nugroho et al., 2021). Hasil isolasi bakteri, dari 5 isolat yang di temukan memiliki ciri sebagai berikut: bentuk koloni bundar (*circular*) diperoleh 2 koloni bakteri, kemudian bentuk *irreguler* (tidak beraturan) sebanyak 3. Selanjutnya untuk bentuk tepian koloni *curled* (melengkung) 2 koloni, tepian lurus (*entire*) sebanyak 2 koloni, kemudian bentuk tepian bergelombang sebanyak 1 koloni.

Elevasi atau permukaan koloni memiliki 2 bentuk dimana bentuk flat atau rata sebanyak 2 koloni, *raised* atau agak naik sebanyak 3 koloni. Sedangkan untuk warna koloni mulai dari Putih kekuningan, putih keruh, putih susu, dan putih. Taksonomi bakteri diperlukan teknik pengecatan gram, dimana bakteri masih di kelompokkan ke dalam dua kelompok berdasarkan dari dinding sel yang di miliknya. Bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Bakteri gram positif merupakan jenis bakteri yang memiliki dinding sel yang lebih sederhana, dengan jumlah peptidoglikan yang relatif lebih banyak dari bakteri gram negatif (Rachmawaty et al., 2009). Kemudian untuk bakteri gram negatif memiliki struktur dinding sel lebih kompleks dan memiliki lapisan lipopolisakarida yang tebal.

Hasil cat gram yang dilakukan terhadap sepuluh isolat yang di peroleh terdapat 5 gram positif dan berbentuk batang. Pewarnaan gram

membedakan antara bakteri gram positif dan gram negatif yang mana, bakteri gram negatif hanya memiliki membran plasma tunggal yang dikelilingi dinding sel tebal berupa *peptidoglikan* dan yang lainnya berupa asam teikhoat (Sabdaningsih & Lunggani, 2020).

Identifikasi molekuler bakteri Rizosfer Tanaman Mimba menggunakan Gen 16S rRNA

Identifikasi molekuler merupakan tahapan lanjutan yang dilakukan untuk mengetahui jenis bakteri yang di peroleh dari tahapan isolasi. Identifikasi ditentukan berdasarkan komposisi basa DNA, homologi dan sifat genetiknya. Dari hasil struktur DNA yang telah diperoleh, selanjutnya dilakukan pendekatan spesies pada bakteri melalui genom keseluruhan gen dalam menentukan tingkatan kedekatan kekerabatan bakteri. Metode yang digunakan berdasarkan pada amplifikasi *polymerase chain reaction* (PCR) terhadap urutan nukleotida gen 16s rRNA yang diikuti dengan pemotongan oleh enzim restriksi (enzim pemotong molekul DNA) gen yang mengkodekan 16s rRNA pada mahluk hidup yang memiliki sekuen sehingga dapat digunakan sebagai suatu dasar untuk analisis keberagaman.

Bioinformatika memiliki salah satu peran yaitu mengidentifikasi bakteri yang belum diketahui, menentukan hubungan filogenetik serta analisis ekosistem berdasarkan informasi genetik (Mallombasi, 2018). Filogenetika sebagai gambaran klasifikasi secara taksonomi dari suatu organisme berdasarkan pada sejaran evolusi yaitu filogeninya dan merupakan bagian integral dari ilmu pengetahuan sistematik yang bertujuan untuk menentukan filogeni dari organisme berdasarkan karakteristinya. Cara menganalisis filogenetika sekuen asam amino dan protein biasanya akan menjadi wilayah yang penting dalam menganalisis sekuen.

Berdasarkan identifikasi bakteri rizosfer Mimba (*Azadirachta indica*) yang di ambil berdasarkan kemampuannya mengikat nitrogen, ada 2 bakteri yang di peroleh namun yang diuji molekuler 1 bakteri potensial, secara molekuler menunjukkan isolat bakteri rizosfer yang didapatkan dari genus *Lysinibacillus*. Hasil isolasi bakteri rizosfer tanaman Mimba (*Azadirachta indica*) dengan kode LO4 mempunyai kekerabatan dengan *Lysinibacillus*

boronitolerans, *Lysinibacillus fusiformis*. Isolat bakteri rizosfer tanaman Mimba (*Azadirachta indica*) berdasarkan tabel jarak genetik (Tabel 4) memiliki tingkat kesamaan yang tinggi (100%) atau jarak evolusi sebesar 0,000. Isolat LO4 berkerabat kelompok *Lysinibacillus* dengan jarak evolusi tertinggi dan terendah 0,000 dan 0,053. Semakin kecil jarak yang dihasilkan maka akan semakin dekat tingkat kekerabatan spesiesnya, dan sebaliknya (Mallombasi, 2018). Selanjutnya dilakukan konfirmasi hasil consensus dengan mengkonfirmasi pada GenBank pada situs NCBI terhadap isolat yang telah dipilih. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat bakteri rizosfer tanaman Mimba (*Azadirachta indica*) termasuk dalam genus *Lysinibacillus* yaitu basil gram positif.

Koloni dengan kode LO4 menunjukkan kesamaan dengan spesies *Lysinibacillus fusiformis* strain SMC303 dengan nilai maksimal 832 dan total skor sebesar 832, query cover 100% dan identitas 100% dan untuk *e value* sebesar 0,0 dimana nilai tersebut semakin kecil yang di tampilkan akan menunjukkan semakin dekatnya tingkat kekerabatan isolat. Berikut adalah klasifikasi taksonomi umum untuk *Lysinibacillus fusiformis*:

Domain: Bacteria
Filum: Firmicutes
Kelas: Bacilli
Ordo: Bacillales
Famili: Bacillaceae
Genus: *Lysinibacillus*
Spesies: *L. fusiformis*

Klasifikasi di atas menggambarkan bagaimana *Lysinibacillus fusiformis* diorganisir dalam hierarki taksonomi. Bakteri ini memiliki bentuk fusiform (berbentuk seperti spindle) dan telah diisolasi dari berbagai lingkungan, termasuk tanah dan air. Pada beberapa kasus, *Lysinibacillus fusiformis* telah diketahui memiliki potensi dalam berbagai aplikasi, termasuk sebagai agen pengendalian patogen tumbuhan dan sebagai agen bioremediasi.

Potensi isolat pengikat nitrogen

Bakteri pengikat nitrogen adalah kelompok mikroorganisme yang memiliki kemampuan untuk mengubah nitrogen atmosfer (N_2) menjadi bentuk yang dapat dimanfaatkan oleh tanaman, seperti amonium (NH_4^+) atau

nitrat (NO_3^-) (Maria, 2019). Proses ini dikenal sebagai fiksasi nitrogen, dan memiliki peran penting dalam menyediakan nutrisi nitrogen bagi kehidupan di Bumi. Bakteri pengikat nitrogen mengandung enzim nitrogenase yang memungkinkan mereka mengubah nitrogen atmosfer (N_2) menjadi amonium (NH_4^+) atau senyawa lainnya yang mengandung nitrogen. Proses ini memerlukan energi yang besar dan oksigen harus dihindari karena dapat menginaktivkan enzim nitrogenase. Oleh karena itu, banyak bakteri pengikat nitrogen hidup di lingkungan anaerob atau memiliki mekanisme khusus untuk melindungi nitrogenase dari oksigen.

Keberadaan bakteri pada lingkungan, ada yang berasosiasi dengan akar tanaman secara langsung (endofit), dan ada yang keberadaannya bebas di sekitar perakaran tanaman (bakteri rizosfer) (Sukmadi, 2013; Zulkifli *et al.*, 2020). Beberapa bakteri pengikat nitrogen, seperti *Rhizobium* dan *Bradyrhizobium* (Khan & Bano, 2019), membentuk asosiasi mutualistik dengan akar tanaman. Bakteri ini menginfeksi akar dan membentuk struktur khusus yang disebut nodul yang berfungsi sebagai tempat fiksasi nitrogen. Dalam pertukaran, bakteri mendapatkan karbohidrat dari tanaman sebagai sumber energi. Selanjutnya, selain yang terkait dengan akar tanaman (endofit) (Zulkifli *et al.*, 2016), ada juga bakteri pengikat nitrogen yang hidup secara bebas di tanah atau perairan. Contohnya adalah bakteri *Azotobacter* dan *Azospirillum*, *Lysinibacillus* (Rasiska & Sari, 2023). Bakteri ini dapat berkolonisasi di sekitar akar tanaman dan menyediakan nutrisi nitrogen tambahan melalui fiksasi nitrogen (Mubarik & Suwanto, 2015).

Hasil uji kemampuan yang dilakukan pada 5 isolat yang diambil dari rizosfer tanaman Mimba (*Azadirachta indica*) diperoleh 2 isolat yang menunjukkan kemampuannya dalam mengikat nitrogen, ini terbukti dari hasil yang dilakukan terjadi perubahan warna pada media NFB dari warna media hijau menjadi biru pada uji kualitatif. Sedangkan dari hasil pengujian kuantitatif pada isolat dengan kode LO3 menunjukkan nilai absorbansi sebesar 0,746 dengan di konfersikan kedalam ppm sebesar 1,112 ppm, kemudian untuk isolat dengan kode LO4 menunjukkan nilai rata-rata absorbansi sebesar 1,631 yang jika dikonfersikan kedalam

ppm menjadi 2,156 ppm. Hal ini merupakan sebuah bukti bahwa keberadaan bakteri pengikat nitrogen yang berada di rizosfer tanaman mimba membantu dalam kesuburan tanaman dengan perannya sebagai penyedia nitrogen bagi tanama. Bakteri ini memanfaatkan gas nitrogen atmosfer untuk proses sintesis protein sel. Protein sel tersebut kemudian dimineralisasi dalam tanah menyebabkan adanya ketersediaan nitrogen bagi tanaman (Lubis *et al.*, 2020).

Bakteri pengikat nitrogen memiliki peran kunci dalam meningkatkan kesuburan tanah dan ketersediaan nutrisi bagi tanaman (Widiyawati *et al.*, 2014). Pertanian berkelanjutan sering memanfaatkan bakteri pengikat nitrogen untuk mengurangi ketergantungan pupuk nitrogen sintetis, yang memerlukan energi dan sumber daya fosil dalam produksinya. Selain itu, bakteri pengikat nitrogen juga berkontribusi pada keseimbangan ekosistem dan membantu mempertahankan kualitas tanah dan keanekaragaman hayati. Beberapa praktik pertanian termasuk aplikasi pupuk organik atau biofertilizer yang mengandung bakteri pengikat nitrogen untuk meningkatkan ketersediaan nutrisi bagi tanaman. Penggunaan bakteri pengikat nitrogen juga membantu mengurangi polusi lingkungan karena mengurangi pelepasan nitrogen berlebih dalam air tanah atau perairan (Hakim, 2021).

Kesimpulan

Hasil penelitian diperoleh 5 isolat murni dengan jenis bakteri gram positif berbentuk basil atau batang, kemudian dari kemampuannya terdapat 2 bakteri yang mampu mengikat nitrogen dan dari hasil identifikasi molekuler bakteri yang memiliki potensi besar sebagai pengikat nitrogen memiliki kesamaan dengan genus *Lysinibacillus*.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini sebagian didanai oleh dana hibah penelitian PNPB dengan nomor kontrak 1466/UN18.LI/pp/2022. Terimakasih penulis sampaikan kepada Laboran Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Mataram dan Laboratorium Mikrobiologi RSUP Nusa Tenggara Barat yang telah membantu dalam penelitian ini.

Referensi

- Asrul, & Aryantha, I. N. (2021). Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Penambat Nitrogen Untuk Pembuatan Biofertilizer. *Journal Viabel Pertanian*, 15(1), 16–23. DOI: <https://doi.org/10.35457/viabel.v15i1.1386>
- Azizah, U. N. (2009). *Pengaruh media tanam dan jenis pupuk terhadap pertumbuhan dan perkembangan tanaman tomat (Lycopersicum esculentum Mill.) dengan teknik budidaya hidroponik* (Doctoral dissertation, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim).
- Djuarnani, I. N. (2005). *Cara cepat membuat kompos*. AgroMedia.
- Gusnawaty, H. S., Putri, N. P., Johan, E. A., & Arini, R. (2023). *Buku Ajar Penyakit Benih dan Pascapanen*. Penerbit NEM.
- Hakim, S. (2021). Diazotrophs for Lowering Nitrogen Pollution Crises : Looking Deep Into the Roots. *Frontiers in Microbiology*, 12(May), 1–18. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.637815>
- Hardiyanti, S., Soekarno, B. P. W., & Yuliani, T. S. (2017). Kemampuan mikroba endofit dan rizosfer tanaman karet dalam mengendalikan *Rigidoporus lignosus*. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*, 13(5), 153-153. DOI: <https://doi.org/10.14692/jfi.13.5.153>
- Henggu, K. U. (2023). 4.3 Azolla sebagai Pupuk Organik. *Pertanian Organik*, 44.
- Hikmat, M., Hati, D. P., & Sukarman, S. (2022). Kajian Lahan Kering Berproduktivitas Tinggi di Nusa Tenggara untuk Pengembangan Pertanian. *Jurnal Sumberdaya Lahan*, 16(2), 119-133. DOI: <https://doi.org/10.21082/jsdl.v16n2.2022.119-133>
- Kamsurya Yani, M., & Botanri, S. (2022). Peran Bahan Organik dalam Mempertahankan dan Perbaikan Kesuburan Tanah Pertanian; Review. *Jurnal Agrohut*, 13(1), 25–34. DOI: <https://doi.org/10.51135/agh.v13i1.121>
- Laga, Y. (2019). *Efektivitas Penyemprotan Ekstrak Daun Mimba (Azadirachta Indica) Terhadap Kematian Nyamuk*

- Aedes Sp* (Doctoral dissertation, Poltekkes Kemenkes Kupang).
- Lennin Fitri, F., & Yekki Yasmin, Y. (2011). Isolation and Observation of Morphology of Chitinolytic Bacteria Colony. *Jurnal Ilmiah Pendidikan Biolog*, Volume 3(2), 20–25.
- Lubis, S. S., Sardi, A. S., Huslina, F. F., & Lisa, M. M. (2020). Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Pengikat Nitrogen Tanah Gambut Hutan Dari Kecamatan Trumon Aceh Selatan. *Quagga: Jurnal Pendidikan Dan Biologi*, 12(2), 117. DOI: <https://doi.org/10.25134/quagga.v12i2.2794>
- Mallombasi, N. A. (2018). *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Pengikat Nitrogen Non Simbiotik Daerah Perakaran Padi (Oriza Sativa) di Kelurahan Balang Kecamatan Binamu Kabupaten Jeneponto*. UIN Alauddin Makasar.
- Marchesi, J. R., Sato, T., Weightman, A. J., Martin, T. A., Fry, J. C., Hiom, S. J., & Wade, W. G. (1998). *Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA*. 64(2), 795–799.
- Maria, L. (2019). Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Pengikat Nitrogen Dari Tanah Gambut Kecamatan Trumon, Aceh Selatan. *Universitas Islam Ar-Raniry Darusalam Banda Aceh*.
- Mubarik, N. R., & Suwanto, A. (2015). Keragaman Spesies dan Fungsional Rhizobakteri pada Tanaman Padi di Tanah Sawah Daerah Pesisir di Indonesia. *Indonesian Journal of Agricultural Science*, 16(1), 39–50. DOI: <https://dx.doi.org/10.21082/ijas.v16n1.2015.p39-50>
- Mulyati, Priyono, J., & Tejowulani, S. (2023). *Tanah dan Dosis Pupuk NPK Pada Lahan Suboptimal*. 5, 18–27. URL: <https://proceeding.unram.ac.id/index.php/saintek/article/view/222>
- Nugroho, T., Fransiskus, Setiawan, & Wijaya, A. (2021). Isolasi dan karakterisasi bakteri pada tanah organik dan anorganik di Kec.Kopeng dan Kec.Magelang Isolation and characterization of bacteria in organic and inorganic soil in Kec. Kopeng and Kab. Magelang. *AGRILAND Jurnal Ilmu Pertanian*, 8(1). URL: <https://jurnal.uisu.ac.id/index.php/agriland>
- Nur, K. (2023). Pengaruh Level Penggunaan Mikoriza dan Jenis Pupuk yang Berbeda Pada Kondisi Cekaman Kekeringan Terhadap Produktivitas Rumput Pakchong. URL: <http://digilib.unila.ac.id/id/eprint/73336>
- Prosanti, D. A., Prasetya, B., & Soemarno, S. (2023). Aplikasi Lubang Resapan Biopori Berkompos Di Kebun Kopi Meningkatkan Jumlah Spora Mikoriza Arbuskula Dan Koloni Akar. *Jurnal Tanah dan Sumberdaya Lahan*, 10(2), 341-351. DOI: <https://doi.org/10.21776/ub.jtsl.2023.010.2.18>
- Rachman, A. (2017). Peluang dan tantangan implementasi model pertanian konservasi di lahan kering. *Sumber Daya Lahan*, 11(2), 77-90. DOI: <https://doi.org/10.21082/jSDL.v11n2.2017.77-90>
- Rachmawaty, F. J., Citra, D. A., Nirwani, B., Nurmasitoh, T., & Tri Bowo, E. (2009). Manfaat Sirih Merah (*Piper crocatum*) sebagai Agen Anti Bakterial terhadap Bakteri Gram Positif dan Bakteri Gram Negatif. *Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan Indonesia*, 1(1), 12–20. DOI: <https://doi.org/10.20885/jkki.vol1.iss1.art3>
- Rasiska, S., & Sari, R. S. (2023). *Uji Kemampuan Bacillus subtilis dan Lysinibacillus sp . dalam Campuran Carbon Fiber dan Silica Nano untuk Mengendalikan Nematoda Puru Akar (Meloidogyne spp .) pada Tanaman Tomat*. 8(1), 29–38. DOI: <https://doi.org/10.24853/jat.8.1.29-38>
- Sabdaningsih, A., & Lunggani, A. T. (2020). Isolasi dan Karakterisasi Morfologi Bakteri Halofilik dari Bledug Kuwu, Kabupaten Grobogan. *Bioma: Berkala Ilmiah Biologi*, 22(1), 46–52. DOI: <https://doi.org/10.14710/bioma.22.1.46-52>
- Setyayudi, A., Narendra, B. H., & Nandini, R. (2017). Pertumbuhan awal tanaman mimba di nusa penida dengan teknik manipulasi lingkungan. *J. Vol, 1*, 21-30. DOI:

- <https://doi.org/10.20886/jpkf.2017.1.1.21-30>
- Shofa, W. N. (2021). *Pengaruh ekstrak daun mimba (Azadirachta indica), daun sirsak (Annona muricata), dan kombinasi keduanya sebagai insektisida nabati terhadap ulat grayak (Spodoptera litura F.)* (Doctoral dissertation, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim).
- Soesanto, I. L., & Endang Mugiastuti, S. P. (2023). *MIKROBA ENDOFIT: Eksplorasi, Potensi, dan Pemanfaatan Mikroba Endofit Bagi Kesehatan Tanaman dan Manusia serta Keuntungan Ekonomi*. Penerbit Andi.
- Suharno, M. S., Runtuboi, D. Y., & Sujarta, P. (2023). *Buku Ajar Pengantar Bioremediasi*. Deepublish
- Sukmadi, R. B. (2013). Aktivitas Vitohormon Indole-3- Acetic Acid (IAA) Dari Beberapa Isolat Bakteri Rizosfer dan Endofit. *Jurnal Sains Dan Teknologi Indonesia*, 14, 221–227. DOI: <https://doi.org/10.29122/jsti.v14i3.930>
- Wibawa, I. P. A. H., & Putu Ahus, H. (2019). Uji efektivitas ekstrak mimba (*Azadirachta indica* A. Juss.) untuk mengendalikan hama penggerek daun pada tanaman *Podocarpus neriifolius*. *E-Jurnal Agroekoteknologi Tropika*, 8(1), 20-31. URL: <https://ojs.unud.ac.id/index.php/JAT>
- Widawati, S., & Muharam, A. (2013). Uji Laboratorium *Azospirillum* sp. yang Diisolasi dari Beberapa Ekosistem. *Jurnal Hortikultura*, 22(3), 258. DOI: <https://doi.org/10.21082/jhort.v22n3.2012.p258-267>
- Widiyawati, I., Junaedi, A., Widyastuti, R., Meranti, J., & Dramaga, K. I. P. B. (2014). *Peran Bakteri Penambat Nitrogen untuk Mengurangi Dosis Pupuk Nitrogen Anorganik pada Padi Sawah The Role of Nitrogen-Fixing Bacteria to Reduce the Rate of Inorganic Nitrogen Fertilizer on Lowland Rice*. 42(2), 96–102. DOI: <https://doi.org/10.24831/jai.v42i2.8424>
- Zhu, F., Qu, L., Hong, X., & Sun, X. (2011). Isolation and characterization of a phosphate-solubilizing halophilic bacterium *Kushneria* sp. YCWA18 from Daqiao saltern on the coast of yellow sea of China. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1155/2011/615032>
- Zulkifli, L., Jekti, D. S. D., & Bahri, S. (2018). Isolasi, karakterisasi dan identifikasi bakteri endofit kulit batang srikaya (*Annona squamosa*) dan potensinya sebagai antibakteri. *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA*, 4(1). DOI: <https://doi.org/10.29303/jppipa.v4i1.98>
- Zulkifli, L., Jekti, D. S. D., Lestari, N., & Rasmi, D. A. C. (2016). Isolasi bakteri endofit dari sea grass yang tumbuh di kawasan pantai pulau lombok dan potensinya sebagai sumber antimikroba terhadap bakteri patogen. *Jurnal Biologi Tropis*. DOI: <https://doi.org/10.29303/jbt.v16i2.226>
- Zulkifli, L., Sedijani, P., Rasmi, D. A. C., & Amrullah, L. W. Z. (2020). Screening and Molecular Identification of Phosphate-Solubilizing Rhizobacteria from Mangrove Ecosystem of the Lombok Island. *Jurnal Biologi Tropis*, 20(3), 475-48. DOI: <https://doi.org/10.29303/jbt.v20i3.1730>