

Isolation and Molecular Characterization of Brotowali (*Tinospora crispa*) Rhizosphere Bacteria Producing Siderophore from Dry Lands of Lombok Island

Sekar Partiw¹, Agil Al Idrus^{1,2*}, Lalu Zulkifli^{1,2}, Mahrus^{1,2}, Prapti Sedijani^{1,2}

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

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

Article History

Received : October 22th, 2023

Revised : November 18th, 2023

Accepted : November 24th, 2023

*Corresponding Author:

Agil Al Idrus, Program Studi Magister Pendidikan IPA, Universitas Mataram, Mataram, Nusa Tenggara Barat, Indonesia;

Email:

agilalidrus112015@gmail.com

Abstract: In the context of biopesticide development, siderophore-producing rhizosphere bacteria play an important role as potential biological control agents. Siderophores are complex organic compounds produced by microorganisms to bind and take up iron ions (Fe^{3+}) from the surrounding environment. This compound is very important because iron is a nutrient necessary for life for many microorganisms and plants. The aim of this research was to determine the type and ability of bacteria in the rhizosphere of Brotowali (*Tinospora crispa*) to produce siderophores. The method used in this research is an exploratory descriptive type. The isolation results obtained from the North Lombok area obtained 5 samples with codes B4A1, B6A1, BT61, BT63 and BT83. The results of the bacterial isolate potency test with Media Kings showed that only isolate BT63 showed clear fluorescence when exposed to ultraviolet light. Meanwhile, the Arnow's Assay test showed that only BT63 colonies experienced a color change to pink. The results of the molecular identification of the potential bacteria, namely BT63, using the BLAST method using the GenBank data base at NCBI, show that it is closely related to the species *Bacillus thuringiensis* strain FDAARGOS 791. The results above show that the rhizobacteria isolated from Brotowali have the potential to be developed as a natural biopesticide that can be applied in the future.

Keywords: Brotowali, dray land, rhizobacteria, siderophore.

Pendahuluan

Konteks pengembangan biopestisida, bakteri rizosfer yang mampu menghasilkan siderofor memegang peran penting sebagai agen pengendalian hayati yang potensial. Siderofor sebagai senyawa yang mampu membentuk kompleks dengan logam besi, tidak hanya mendukung pertumbuhan tanaman dengan meningkatkan ketersediaan besi, tetapi juga dapat berperan sebagai kunci dalam pengendalian organisme patogen tanaman (Marten, 2018). Bakteri rizosfer penghasil siderofor dapat secara selektif bersaing dengan patogen untuk sumber daya besi, menghambat pertumbuhan patogen, dan pada saat yang sama, memperkuat pertahanan tanaman melalui

interaksi yang kompleks (Amaria *et al.*, 2019). Oleh karena itu, penelitian terhadap bakteri rizosfer sebagai sumber biopestisida berbasis siderofor menjadi relevan dalam upaya mengembangkan alternatif ramah lingkungan dan berkelanjutan untuk mengendalikan hama tanaman, dengan potensi memberikan solusi inovatif dalam pertanian modern yang semakin mengedepankan keberlanjutan dan minim penggunaan pestisida kimia.

Biopestisida merupakan agen pengendalian hama atau organisme yang digunakan untuk mengendalikan populasi hama atau penyakit tanaman secara alami (Sutriadi *et al.*, 2019). Berbeda dengan pestisida kimia yang dibuat dari bahan-bahan sintetis, biopestisida terbuat dari bahan-bahan alami seperti bakteri,

virus, jamur, atau bahan organik lainnya (Ula & Mizani, 2022). Biopestisida bekerja dengan berbagai cara, misalnya dengan menginfeksi hama atau penyakit tanaman tertentu, mempengaruhi siklus hidup hama, atau mengganggu sistem fisiologis mereka (Indiati & Marwoto, 2017). Keuntungan utama dari biopestisida adalah bahwa mereka cenderung lebih ramah lingkungan dan memiliki dampak yang lebih sedikit pada organisme non-target dibandingkan pestisida kimia (Anindita *et al.*, 2023). Meskipun demikian, penggunaan biopestisida juga memiliki batasan. Kehati-hatian tetap diperlukan dalam penerapannya karena efektivitasnya bisa dipengaruhi oleh kondisi lingkungan tertentu, seperti suhu atau kelembaban.

Rizobakteria yang hidup di tanaman seperti brotowali telah diidentifikasi memiliki kemampuan untuk menghasilkan siderofor. Brotowali (*Tinospora crispa*) adalah tumbuhan merambat yang berasal dari berbagai wilayah tropis, termasuk Asia Tenggara dan Indonesia (Fitriah, 2015). Tanaman brotowali memiliki kemampuan adaptasi pada lahan kering dikarenakan memiliki sistem perakaran yang kuat (Primandra, 2020). Akar-akarnya merespons dengan cepat terhadap air yang tersedia dalam tanah, membantu tumbuhan ini mengatasi kekurangan air dengan efisien. Selain itu, daun-daun Brotowali memiliki struktur khusus yang membantu mengurangi penguapan air melalui proses transpirasi. Ini membantu menjaga keseimbangan air dalam tumbuhan dan meminimalkan kehilangan air berlebih saat tumbuhan berada di lingkungan kering. Dengan demikian, rizobakteria yang hidup di rizosfer brotowali dan mampu memproduksi siderofor dapat memberikan manfaat dalam meningkatkan keseimbangan nutrisi, khususnya dalam hal kebutuhan besi (Agustin *et al.*, 20121). Dalam ekosistem tanah, interaksi antara tanaman dan mikroorganisme sering kali memiliki dampak yang signifikan pada kesehatan dan pertumbuhan tanaman.

Beberapa jenis spesies rizobakteria yang ditemukan memiliki peran sebagai penghasil siderofor yaitu *Pseudomonas sp.* Sejumlah spesies dari genus *Pseudomonas*, seperti *Pseudomonas fluorescens* dan *Pseudomonas aeruginosa*, terkenal dengan kemampuannya dalam memproduksi siderofor (Sondang *et al.*,

2018). Mereka sering ditemukan di rizosfer berbagai tanaman dan dapat berkontribusi pada ketersediaan besi bagi tanaman inang mereka. Kemudian bakteri *Bacillus sp.* Bakteri seperti *Bacillus subtilis* dan *Bacillus cereus* dapat berperan dalam meningkatkan ketersediaan besi bagi tanaman yang tumbuh di lingkungan tempat mereka hidup (Pour *et al.*, 2022). Spesies bakteri *Azotobacter sp* juga diketahui memiliki kemampuan untuk memproduksi siderofor (Zulaika *et al.*, 2017). Oleh sebab itu, penggunaan rizobakteria dari tanaman brotowali ini diharapkan mampu sebagai kandidat biopestisida dalam mengendalikan populasi hama atau penyakit tanaman secara alami khususnya di daerah Lombok.

Bahan dan Metode

Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya alkohol 70%, Natrium Hipoklorit (NaOCI) 4%, aquades, tisu, Nutrien Agar (NA), Trypticase Soy Agar (TSA), garam fisiologis (NaCl, 0,9 %) yang telah di sterilkan terlebih dahulu, larutan kristal violet, lugol, alkohol 70% dan larutan safranin. Protease Pepton sebanyak 10 g. K₂HPO₄ 0,75 g/l, M.SO 7H₂O 0,75 g/l, Agar 7,5 g. dan gliserol 7,5 ml. 500 ml aquades. FeCl₃ 2%. Bahan ekstraksi DNA adalah 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. PCR 4 µl, Loading buffer (*Bromphenol-blue* dan *Cyline 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 gram di ambil pada kedalaman 15-30 cm dengan 3 kali ulangan dan dijadikan satu untuk setiap lokasi. Caranya adalah tanah sekitar akar di gali dan akar dicabut pelan-pelan dan bongkahan tanah yang masih melekat dibuang dengan cara digoyang. Selanjutnya tanah yang melekat pada akar sapu dengan sikat dan dikoleksi sebagai sampel tanah

rizosfer (Zhu, *et al.*, 2017). Sampel terkandung dimasukkan dalam kantong plastik dan disimpan pada ice box (4°C) untuk kemudian dibawa ke laboratorium.

Isolasi bakteri dari rizosfer tanaman Brotowali

Total bakteri diisolasi dari sampel rizosfer tanah menggunakan teknik pengenceran serial dengan NA (Nutrient Agar) sebagai mediana. Kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 24-120 jam. Koloni bakteri yang tumbuh pada medium adalah total populasi bakteri.

Identifikasi dan karakterisasi bakteri

Pengamatan morfologi

Variabel yang diobservasi dalam penelitian ini melibatkan jumlah isolat yang terdeteksi, morfologi koloni bakteri, karakteristik tepi koloni bakteri, bentuk elevasi koloni, dan warna koloni bakteri (Lennin & Yekki, 2011).

Pengecatan gram

Aquades diaplikasikan pada kaca objek setelah meneteskan 1 ose biakan sampel. Selanjutnya, dilakukan fiksasi di atas api. Proses selanjutnya melibatkan pewarnaan dengan kristal violet selama 1 menit, diikuti pencucian menggunakan air mengalir. Setelah itu, dilakukan pewarnaan dengan lugol selama satu menit, diikuti kembali oleh pencucian dengan air mengalir. Tahap berikutnya melibatkan penambahan alkohol 96% selama 30 detik, dilanjutkan dengan pencucian menggunakan air mengalir. Selanjutnya, dilakukan penambahan safranin selama 1 menit, dan kembali dicuci dengan air mengalir. Sampel kemudian dikeringkan dengan kertas serap, diikuti dengan penambahan minyak emersi dan pengamatan di bawah mikroskop. Jika hasil pewarnaan menunjukkan bakteri berwarna merah, itu menandakan bahwa bakteri tersebut adalah gram negatif. Sebaliknya, jika bakteri berwarna ungu, maka bakteri tersebut termasuk dalam kategori gram positif (Lennin & Yekki, 2011).

Identifikasi molekuler

1) Ekstrak DNA.

DNA diekstraksi, langkah-langkah mengikuti prosedur Kit DNA-Zol. Setelah sentrifugasi menghasilkan pelet, pelet tersebut

dikeringkan pada suhu kamar. Selanjutnya, ditambahkan aquades sebanyak 50 µl ke pelet dan disimpan pada suhu -20 °C hingga digunakan nanti.

2) 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 CCG CGT GTA CAAGGC-3') (Marchesi *et al.*, 1998). Proses PCR dilakukan dengan menambahkan 2x PCR master mix solution sebanyak 10 µl, template DNA sebanyak 1 µl, primer 63f sebanyak 1 µl, primer 1387r sebanyak 1 µl, dan aquades sebanyak 17 µl ke dalam tabung PCR. Selanjutnya, tabung PCR ditempatkan dalam mesin PCR (bio red), dan amplifikasi DNA dilakukan menggunakan alat my cyclor (bio red).

Kondisi awal (pre) PCR diatur pada suhu 94 °C selama 5 menit, diikuti dengan 35 siklus PCR. Setiap siklus terdiri dari denaturasi pada suhu 94 °C selama 30 detik, penempatan primer (annealing) pada suhu 50 °C selama 30 detik, dan ekstensi pada suhu 72 °C selama 45 detik. Setelah menyelesaikan 35 siklus, dilakukan tahap post PCR pada suhu 72 °C selama 5 menit, dan hasilnya disimpan pada suhu 20 °C (Aris *et al.*, 2013).

3) Elektroforesis.

Tahap elektroforesis, 4 µl produk PCR ditempatkan dalam gel agarose 2% yang sudah diisi dengan buffer TBE (0,5 TBE) dan 4 µl EtBr. Elektroforesis dilakukan dengan menetapkan tegangan 100 V dan arus sebesar 400 A selama 30 menit. Sebagai marker, digunakan 100 bp DNA ladder. Hasil elektroforesis divisualisasikan di bawah sinar ultraviolet dan difoto menggunakan Gel Doc.

4) Sekuensing produk PCR.

Produk PCR yang berhasil dihasilkan kemudian dijalani proses sekuensing.

Uji kemampuan isolat bakteri penghasil siderofor

a. Uji Media King's

Estimasi kualitatif siderofor, biakan isolat yang tumbuh aktif diinokulasi ke media King's B. Dengan metode goresan dan diinkubasi selama 2 hari setelah itu dipilih yang berwarna hijau terang atau hijau kebiruan yang berpendar di bawah lampu UV (265nm). Selanjutnya bakteri yang terdeteksi mengandung senyawa siderofor.

b. Uji Arnow's assay

Isolat bakteri yang berumur 24 jam diambil menggunakan jarum ose lalu diinokulasi pada media cair Nutrient Broth (NB) steril. Selanjutnya dishaker selama 2 hari. Setelah 2 hari, dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan sel bakteri dengan supernatan pada kecepatan 5000 rpm selama 25 menit. Evaluasi kemampuan isolat dalam memproduksi siderofor tipe katekolat dengan cara 0,5 ml isolat dimasukkan kedalam tabung reaksi lalu ditambahkan dengan 0,5 ml HCl tambahkan dengan 0,5 ml Nitrit lalu tambahkan dengan 0,5 ml NaoH. Jika terjadi perubahan warna menjadi merah muda, maka isolat bakteri yang diperoleh dapat menghasilkan siderofor tipe katekolat.

Hasil dan Pembahasan

Hasil isolasi dan morfologi bakteri rizosfer Brotowali (*Tinospora crisper*)

Hasil isolasi yang dilakukan pada rizosfer tanaman brotowali, didapatkan 5 isolat bakteri dengan kode B4A1, B6A1, BT61, BT63 dan BT83.

Morfologi koloni hasil isolasi bakteri rizosfer Brotowali (*Tinospora crisper*)

Hasil isolasi bakteri rizosfer brotowali, menunjukkan adanya keberagaman pada morfologi koloni bakteri yang tumbuh. Keberagaman morfologi koloni bakteri yang tumbuh dari hasil isolasi rizosfer brotowali bisa menjadi indikasi adanya beragam spesies bakteri yang hidup di sekitar akar tanaman tersebut. Hasil identifikasi morfologi koloni bakteri dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Morfologi koloni bakteri rizosfer Brotowali

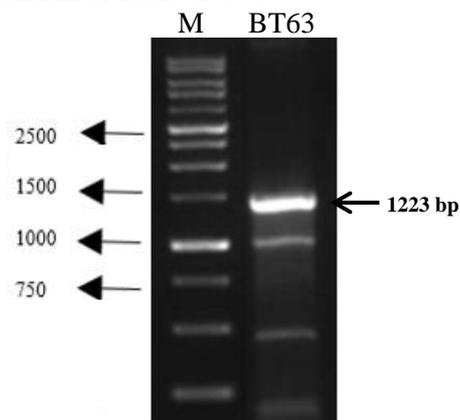
Kode Isolat	Morfologi koloni			
	Bentuk	Tepi	Elevasi	Warna
B4A1	Circular	Entire	Timbul	Kuning
B6A1	Irreguler	Lobate	Timbul	Putih
BT 61	Irreguler	Undulate	Timbul	Putih
BT63	Circular	Lobate	Timbul	Putih
BT83	Irreguler	Undulate	Timbul	Putih

Isolat B4A1 memiliki bentuk circular, tepian berbentuk entire dan pada bagian elevasi terlihat timbul, sedangkan untuk warna koloni terlihat kuning. Selanjutnya pada isolat dengan kode B6A1, memiliki bentuk ireguler, tepian

lobate, elevasi terlihat timbul dan warna koloni putih. Selanjutnya untuk koloni dengan kode BT61 memiliki bentuk irreguler, tepian undulate dengan bentuk elevasi timbul sedangkan warna koloni yang Nampak terlihat putih. Koloni dengan kode BT63 menunjukkan bentuk circular, dengan tepian lobate, dan untuk elevasi koloni memiliki bentuk timbul, sedangkan untuk warna koloni yang terlihat putih. Yang terakhir untuk koloni dengan kode BT83 memiliki bentuk irreguler, dengan bentuk tepian undulate, sedangkan untuk elevasi terlihat timbul dan warna terlihat putih.

Hasil identifikasi gen 16S rRNA

Spesies bakteri yang ditemukan di rizosfer tanaman Brotowali (*Tinospora crisper* L) diidentifikasi melalui penggunaan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dengan primer universal 63f dan 1387r pada dua sampel yang memiliki potensi yang di peroleh dari isolasi, yaitu BT63. Setelah proses amplifikasi, dilanjutkan dengan elektroforesis menggunakan tegangan 100 volt dan kuat arus 400 A. Hasil uji menunjukkan adanya pita DNA yang menyandi gen 16S rRNA dengan ukuran sekitar ± 1500 bp (lihat Gambar 1). Perbandingan dengan DNA Marker (100 bp DNA ladder) dilakukan untuk mengonfirmasi hasil tersebut.



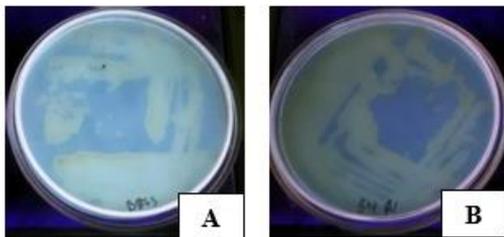
Gambar 1. Elektroforesis pada gel agarose hasil PCR menggunakan primer universal 63f dan 1387r dengan hasil amplifikasi sampel BT63 sebesar 1223 bp.

Potensi isolat penghasil siderofor

Uji Media King's

Penelitian ini melibatkan analisis siderofor pada beberapa koloni mikroorganisme yang diidentifikasi dengan kode B4A1, B6A1, BT 61, BT63, dan BT83. Pada tahap evaluasi

menggunakan teknik goresan dengan menggunakan media King's dan setelah diamati di bawah sinar ultraviolet, terlihat bahwa koloni dengan kode B4A1, B6A1, BT61, dan BT83 tidak menunjukkan fluoresensi. Hasil ini menyarankan bahwa mikroorganisme dalam koloni-koloni tersebut mungkin tidak memiliki kemampuan untuk menghasilkan siderofor, atau produksinya mungkin sangat rendah. Sebaliknya, koloni kode BT63 menunjukkan fluoresensi yang jelas saat terkena sinar ultraviolet. Ini menunjukkan adanya aktivitas siderofor pada mikroorganisme dalam koloni BT63. Adanya fluoresensi, dapat disimpulkan isolat kode BT63 mampu menghasilkan senyawa siderofor. Untuk lebih jelasnya hasil uji Isolat bakteri dapat di lihat perbandingannya pada **gambar 2**.



Gambar 2. Uji kemampuan bakteri rizosfer brotowali sebagai penghasil Siderofor (A) dan tidak menghasilkan siderofor (B)

Teknik Arnow's Assay

Hasil penelitian menyoroti penggunaan metode Arnow's assay sebagai pendekatan untuk memeriksa kemampuan isolat bakteri dalam menghasilkan siderofor. Siderofor merupakan senyawa organik berperan penting dalam kelangsungan hidup bakteri, khususnya dalam mengakses dan mengelola zat besi. Isolat B4A1, B6A1, BT61, BT63, dan BT83 diuji menggunakan metode tersebut. Perubahan warna sampel dapat dilihat pada **gambar 3**.



Gambar 3. Perubahan warna sampel dalam menghasilkan siderofor tipe katekolat (Kode isolate: B4A1; B4A1; B6A1; BT61; BT63 dan BT83)

Hasil menunjukkan bahwa hanya koloni BT63 yang mengalami perubahan warna menjadi merah muda. Temuan ini memperkuat hasil uji goresan sebelumnya, yang juga menunjukkan bahwa koloni BT63 memiliki kemampuan untuk menghasilkan siderofor tipe katekolat. Dengan demikian, dapat diambil kesimpulan bahwa isolat tersebut memiliki potensi untuk efektif dalam mobilisasi dan pemanfaatan zat besi dalam lingkungan pertumbuhannya. Selain itu, peran bakteri dalam proses ketersediaan zat besi. Dengan adanya bakteri yang mampu menghasilkan siderofor, dapat diantisipasi bahwa mereka memiliki keunggulan kompetitif dalam bersaing untuk mendapatkan zat besi, yang merupakan nutrisi esensial bagi pertumbuhan mikroorganisme. Ini mengindikasikan potensi isolat BT63 dalam meningkatkan daya saingnya dalam lingkungan yang mungkin keterbatasan zat besi.

Pembahasan

Isolasi bakteri rizosfer tanaman Brotowali (*Tinospora crispa*)

Tinospora crispa atau tanaman Brotowali merupakan jenis tanaman yang banyak ditemukan di Indonesia, khususnya di daerah pulau Lombok, ditanam sebagai tanaman obat dan tubuh liar pada daerah tropis dan beriklim kering terutama di wilayah Lombok Utara. Bakteri rizosfer merupakan jenis bakteri yang tumbuh di sekitar perakaran tanaman dan jumlahnya hampir 70% sel populasi bakteri (Saeed *et al.*, 2021). Keberadaannya jika dibandingkan dengan yang berada di dalam tanaman (endofit) jauh lebih banyak (Zulkifli *et al.*, 2016). Hubungan simbiosis mutualisme antara tanaman dengan bakteri, dimana bakteri mendapatkan nutrisi dari hasil metabolisme tanaman 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 (Zulkifli *et al.*, 2018).

Bakteri yang di isolasi dari tanaman Brotowali (*Tinospora crispa*), memiliki karakter yang berbeda, diantaranya memiliki kemampuan dalam menghasilkan IAA, melarutkan fosfat dan

menghasilkan siderofor, dimana unsur-unsur tersebut adalah merupakan unsur yang sangat penting untuk kelangsungan hidup tanaman (Prihatiningsih *et al.*, 2017). Isolasi pada berbagai jenis tanaman banyak dilakukan untuk membuktikan peran bakteri rizosfer dalam bersimbiosis dengan tanaman. 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 Brotowali (*Tinospora crispa*) diperoleh 5 isolat dimana ke 5 isolat mampu sebagai penghasil IAA dan sebagai pelarut fosfat, sedangkan 1 isolat mampu sebagai penghasil siderofor.

Morfologi koloni dan sel bakteri rizosfer tanaman Brotowali (*Tinospora crispa*)

Hasil isolasi bakteri rizosfer dari tanaman Brotowali, diperoleh sebanyak 5 isolat memiliki keragaman baik dari bentuk sel, ukuran, tepian, bentuk koloni, elevasi, dan pigmen. Pada umumnya koloni bakteri memiliki bentuk rhizoid, circular, irregular, filamentous. Elevasi crateriform, convex, flat, umbonate, raised. Tepian memiliki bentuk curled, labote, entire, undulate, dan filifom (Tri & Setiawan, 2021). Perbedaan morfologi koloni pada bakteri rizosfer ini disebabkan karena beberapa faktor seperti jenis bakteri (Nuraini *et al.*, 2020), setiap spesies bakteri memiliki pola pertumbuhan dan pembentukan koloni yang unik. Faktor genetik dari bakteri tersebut dapat memengaruhi morfologi koloni yang dihasilkan.

Substrat dan lingkungan (Amir, 2020), komposisi kimia dari lingkungan rizosfer, termasuk nutrisi, kelembaban, pH tanah, dan faktor lingkungan lainnya, dapat mempengaruhi cara bakteri tumbuh dan membentuk koloni. *Interaksi dengan tumbuhan* (Widyati, 2017), kolonisasi bakteri di rizosfer bisa dipengaruhi oleh interaksi dengan tumbuhan inang. Bakteri rizosfer sering kali berinteraksi simbiotik dengan akar tanaman, yang dapat memengaruhi pola pertumbuhan dan morfologi koloni. *Kompetisi dan Interaksi Antar-Bakteri* (Noor *et al.*, 2021), adanya bakteri lain dalam rizosfer bisa memengaruhi morfologi koloni. Kompetisi atau interaksi antar-bakteri dapat memicu variasi dalam bentuk dan struktur koloni. Taksonomi bakteri dilakukan melalui teknik pengecatan

gram, dimana bakteri masih di kelompokkan ke dalam dua kelompok berdasarkan dari dinding sel yang di milikinya.

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 5 isolat yang di peroleh terdapat 3 gram negatif dan 2 isolat termasuk gram positif. Untuk bentuk sel isolat berbentuk batang keseluruhannya. 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 teikoat (Sabdaningsih & Lunggani, 2020).

Identifikasi molekuler bakteri rizosfer tanaman Brotowali menggunakan gen 16S rRNA

Identifikasi molekuler menggunakan gen 16S rRNA telah menjadi alat yang sangat berguna dalam membedakan bakteri secara spesifik. Pada bakteri yang di peroleh dari isolasi dan termasuk sebagai bakteri potensial dilakukan analisis molekuler sebagai analisis lanjutan, gen 16S rRNA digunakan untuk analisis filogenetik dan identifikasi spesies. Gen ini merupakan bagian dari unit kecil subunit ribosom dan sangat konservatif, memungkinkan perbandingan filogenetik yang akurat.

Berdasarkan hasil BLAST pada web NCBI diperoleh jenis bakteri yang identik dengan bakteri yang di isolasi yaitu termasuk kedalam genus Bacillus, dengan kode BT63 menunjukkan spesies *Bacillus thuringiensis* strain FDAARGOS 791 dengan nilai maksimal 797 dan total score sebesar 11075, query cover 100% dan identitas 98,05% dan untuk *e-value* sebesar 0,0 dimana nilai tersebut semakin kecil yang di tampilkan akan menunjukkan semakin dekatnya tingkat kekerabatan isolat. *Bacillus thuringiensis* adalah sebuah bakteri Gram-positif. *Bacillus thuringiensis* adalah bakteri gram-positif yang umum ditemukan di lingkungan, terutama di tanah dan air. Ini adalah mikroorganisme yang

sangat serbaguna dan dapat hidup dalam berbagai kondisi lingkungan. *Bacillus thuringiensis* (Bt) adalah bakteri yang dikenal dengan kemampuannya memproduksi kristal toksin yang bersifat insektisida. Analisis molekuler gen 16S rRNA pada *Bacillus thuringiensis* telah memberikan wawasan mendalam tentang keragaman genetik dalam spesies ini (Nontji, 2022). Hal ini membantu dalam pemahaman taksonomi dan evolusi *Bacillus thuringiensis*.

Memfasilitasi identifikasi yang lebih spesifik, pengembangan primer spesifik dapat dilakukan berdasarkan sekuens gen 16S rRNA. Penelitian oleh Seprianto & Wahyuni (2019) berhasil mengembangkan primer spesifik untuk deteksi *Bacillus thuringiensis* yang dapat digunakan dalam metode PCR. Penggunaan gen 16S rRNA tidak hanya terbatas pada budidaya laboratorium, tetapi juga penting dalam identifikasi bakteri dalam lingkungan alami. Analisis filogenetik menggunakan gen 16S rRNA pada kelompok bakteri rizosfer dapat memberikan informasi tentang hubungan evolusioner dan struktur filogenetik mereka. Penelitian Zulkifli *et al* (2020) menggambarkan kerangka filogenetik bakteri dengan memanfaatkan sekuens 16S rRNA. Gen 16S rRNA juga digunakan untuk mengidentifikasi strain dan variasi dalam suatu spesies. Penelitian oleh Adithiya *et al* (2015) pada *Bacillus thuringiensis* menunjukkan perbedaan sekuens 16S rRNA yang memungkinkan identifikasi strain dan variasi genetik dalam spesies ini.

Potensi isolat penghasil siderofor

Bakteri penghasil siderofor memiliki peran penting dalam siklus besi dan berpotensi memberikan dampak positif pada pertumbuhan tanaman. Siderofor adalah senyawa organik yang dihasilkan oleh bakteri untuk mengikat dan membantu dalam penyerapan besi, yang merupakan nutrisi esensial bagi tanaman. Penelitian yang dilakukan oleh peneliti diperoleh 1 isolat dengan kode BT63 yang mampu menghasilkan siderofor dengan ciri-ciri pengujian dengan menggunakan media King's, isolat berpendar jika di letakkan di bawah sinar ultraviolet dan terbentuk warna merah muda pada media Arnow's.

Besi atau (Fe) adalah komponen esensial untuk proses fotosintesis, pernapasan, dan

sintesis klorofil dalam tanaman. Bakteri penghasil siderofor dapat memainkan peran penting dalam meningkatkan ketersediaan besi untuk tanaman (Zulkifli *et al.*, 2020). Penelitian oleh Wulandari *et al* (2019) menggunakan metode kultur dan analisis biokimia untuk mengidentifikasi bakteri penghasil siderofor. Mereka mengisolasi sejumlah strain bakteri yang efektif dalam memproduksi siderofor. Bakteri menghasilkan siderofor untuk mengatasi keterbatasan besi dalam tanah. Bakteri penghasil siderofor dapat meningkatkan ketersediaan besi bagi tanaman dengan membentuk kompleks besi-siderofor yang dapat diserap oleh akar tanaman (Prihatiningsih *et al.*, 2017). Hal ini dapat meningkatkan produktivitas tanaman terutama di tanah dengan keterbatasan besi.

Penelitian oleh Karlinda (2022) menyoroti kemungkinan terbentuknya hubungan simbiotik antara bakteri penghasil siderofor dan tanaman. Symbiosis ini dapat meningkatkan ketersediaan besi bagi tanaman melalui mekanisme pertukaran yang saling menguntungkan. Pemberian bakteri ini dapat meningkatkan ketersediaan besi dan memperbaiki kesehatan tanaman. Miethke and Marahiel (2007) menyelidiki karakteristik genetik bakteri penghasil siderofor. Pemahaman ini dapat membuka peluang untuk manipulasi genetik dan pengembangan strain yang lebih efektif. Bakteri penghasil siderofor juga dapat berinteraksi dengan mikroba tanah lainnya.

Penelitian oleh Nugroho & Setiawan (2021) menunjukkan bahwa bakteri penghasil siderofor dapat memengaruhi komunitas mikroba tanah, menciptakan lingkungan yang lebih menguntungkan untuk pertumbuhan tanaman. Penelitian oleh Pratama *et al.*, (2018) mencoba mengoptimalkan kondisi pertumbuhan bakteri penghasil siderofor untuk meningkatkan produksi senyawa ini. Hal ini penting untuk memastikan efisiensi tinggi dalam aplikasi pertanian. Meskipun bakteri penghasil siderofor menawarkan potensi besar untuk meningkatkan ketersediaan besi bagi tanaman, tantangan seperti formulasi produk yang stabil dan pemahaman lebih lanjut tentang interaksi dengan tanah masih perlu diatasi (Muthiah *et al.*, 2023).

Kesimpulan

Penelitian yang telah dilakukan, memperoleh hasil sebanyak 5 isolat murni

dengan jenis bakteri berbentuk basil atau batang sebanyak 3 isolat gram negatif dan 2 isolat gram positif. Berdasarkan kemampuannya terdapat 1 isolat yang mampu menghasilkan siderofor dan dari hasil identifikasi molekuler bakteri yang memiliki potensi besar sebagai penghasil siderofor memiliki kesamaan dengan genus *Bacillus*.

Ucapan Terima Kasih

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

Referensi

- Adithiya, D. S., Feliatra, F., & Tanjung, A. (2017). *Using of Bacteria Heterotrophic as an Anti-Bacterial Against Pathogenic Bacteria Isolated from Sea Water in Dumai City, Riau Province* (Doctoral dissertation, Riau University).
- Agustin, D. A., A'yun, E. Q., Marsya, T. I., & Kusuma, R. R. (2021). Potensi Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) sebagai Pemacu Ketahanan Tanaman Padi terhadap Hawar Malai Padi. *Plantropica: Journal of Agricultural Science*, 6(2), 96-105. DOI: <http://dx.doi.org/10.21776/ub.jpt.2021.006.2.1>
- Amaria, W., Kasim, N. N., & Munif, A. (2019). Kelimpahan populasi bakteri filosfer, rizosfer, dan endofit tanaman kemiri sunan (*Reutealis Trisperma* (Blanco) Airy Shaw), serta potensinya sebagai agens biokontrol. *Journal TABARO Agriculture Science*, 3(1), 305-317. DOI: <http://dx.doi.org/10.35914/tabaro.v3i1.200>
- Amir, M. (2020). *Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Tanah Di Kelurahan Kampung Melayu Jakarta Timur*.
- Anindita, D. C., Sutiknjo, T. D., & Pawani, R. E. (2023). Sosialisasi Pestisida Nabati Ramah Lingkungan Di Desa Joho, Kabupaten Kediri. *JATIMAS: Jurnal Pertanian dan Pengabdian Masyarakat*, 3(2), 159-167.
- Fitriah, S. (2015). Pengaruh Ekstrak batang Brotowali (*Tinospora crispa*) Terhadap Kematian Larva Nyamuk *Aedes aegypti* Dan Sumbangsihnya Pada Mata Pelajaran Biologi di SMA/MA. In *Universitas Islam Negri Raden Fatah Palembang*.
- Indiati, S. W., & Marwoto, M. (2017). Penerapan pengendalian hama terpadu (PHT) pada tanaman kedelai. *Buletin Palawija*, 15(2), 87-100. DOI: 10.21082/bulpalawija.v15n2.2017.p87-100
- Karlinda, K. (2022). *Isolasi Dan Karakterisasi Plant Growth Promoting Rhizobacteria (Pgpr) Dari Rizosfer Tanaman Kacang Tanah Arachis hypogaea L* (Doctoral dissertation, Universitas Hasanuddin).
- 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.
- Marten, T. W. (2018). Pengaruh sumber mineral dan jenis isolat dari *Pseudomonad* fluoresen terhadap produksi siderofor. *Serambi Biologi*, 3.
- Miethke M, Marahiel MA. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2007 Sep;71(3):413-51.PMCID: PMC2168645. DOI: 10.1128/MMBR.00012-07
- Muthiah, A., Advinda, L., Anhar, A., Putri, I. L. E., & Farma, S. A. (2023). *Pseudomonas fluorescens* as Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). *Jurnal Serambi Biologi*, 8(1), 67-73. URL: <https://serambibiologi.ppj.unp.ac.id/index.php/srmb/article/view/186>
- Noor, R., Sutanto, A., Widowati, H., Zen, S., & Rifai, M. R. (2021). Uji Antagonis Isolat Bakteri Indigen Limbah Cair Nanas (Lcn) Dengan Isolat Bakteri Tanah Di Kebun Percobaan Karang Rejo Metro Utara. *BIOEDUKASI (Jurnal Pendidikan Biologi)*, 12(1), 109-120. DOI: <http://dx.doi.org/10.24127/bioedukasi.v12i1.3761>
- Nugroho, F. T., & Setiawan, A. W. (2021). Isolasi dan karakterisasi bakteri pada tanah organik dan anorganik di Kec. Kopeng dan

- Kec. Magelang. *Agriland: Jurnal Ilmu Pertanian*, 9(1), 17-26. DOI: <https://doi.org/10.30743/agr.v9i1.3931>
- Nuraini, C., Saida, S., Suryanti, S., & Nontji, M. (2020). Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Rhizosfer Tanaman Jagung Pada Fase Vegetatif Dan Generatif. *AGrotekMAS Jurnal Indonesia: Jurnal Ilmu Peranian*, 1(1), 24-30. URL: <https://jurnal.fp.umi.ac.id/index.php/agrotekmas/article/view/103>
- Pour, M. M., Rish, R. S., Ranjbar-Karimi, R., Hassanisaadi, M., Rahdar, A., & Bairo, F. (2022). Microencapsulation of *Bacillus velezensis* using alginate-gum polymers enriched with TiO₂ and SiO₂ nanoparticles. *Micromachines*, 13(9), 1423. DOI: <https://doi.org/10.3390/mi13091423>
- Pratama, i., Advinda, l., & Fifendy, m. (2018). Pengaruh sumber karbon terhadap produksi siderofor dari bakteri pseudomonad fluoresen the influence of carbon sources on the production of siderophores from the fluorescent pseudomonad bacteria. *Bioscience*, 2(2), 50-57. DOI: [10.24036/020182210406-0-00](https://doi.org/10.24036/020182210406-0-00)
- Prihatiningsih, N., Djatmiko, H. A., & Lestari, P. (2017). Aktivitas Siderofor *Bacillus Subtilis* Sebagai Pemacu Pertumbuhan Dan Pengendali Patogen Tanaman Terung. *Jurnal Hama Dan Penyakit Tumbuhan Tropika*, 17(2), 170. DOI: <https://doi.org/10.23960/j.hptt.217170-178>
- Primandra, J. (2020). Pengaruh Pola Jarak Tanam dan Bipestisida Terhadap Pertumbuhan dan Hasil Jagung (*Zea mays* L.). In *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952. (Vol. 13, Issue April). DOI: <https://doi.org/10.31851/sainmatika.v15i2.2378>
- 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>
- 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>
- Saeed, Q., Xiukang, W., Haider, F. U., Kučerik, J., Mumtaz, M. Z., Holatko, J., Naseem, M., Kintl, A., Ejaz, M., Naveed, M., Brtnicky, M., & Mustafa, A. (2021). Rhizosphere bacteria in plant growth promotion, biocontrol, and bioremediation of contaminated sites: A comprehensive review of effects and mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19). DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms221910529>
- Seprianto, S. P., & Wahyuni, F. D. (2019). Laporan Akhir Tahun Hasil Penelitian Hibah Internal.
- Suciani, A., Sugiharto, Lubis, D. P., & Mbina Pinem, Tumiar Sidauruk, N. B. (2022). Analisis Kelangkaan Pupuk Bersubsidi Untuk Petani Padi (Studi Kasus Dusun VIII Desa Pematang Setrak Kecamatan Teluk Mengkudu). *Journal of Laguna Geography*, 01(2), 9–16. URL: <https://journal.moripublishing.com/index.php/joulage/article/view/651>
- Sutriadi, M. T., Harsanti, E. S., Wahyuni, S., & Wihardjaka, A. (2019). Pestisida nabati: prospek pengendali hama ramah lingkungan. *Jurnal Sumberdaya Lahan*, 13(2), 89-101. DOI: [10.21082/jsdl.v13n2.2019.89-101](https://doi.org/10.21082/jsdl.v13n2.2019.89-101)
- Tri Nugroho, F., & Setiawan, A. W. (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>
- Ula, A., & Mizani, Z. M. (2022). Pemanfaatan Limbah Kulit Bawang Putih Menjadi Biopestisida Alami pada Kelompok Tani di Desa Klorogan, Kecamatan Geger, Kabupaten Madiun. *Jurnal Tadris IPA Indonesia*, 2(1), 111-120. DOI: <https://doi.org/10.21154/jtii.v2i1.541>
- Vidyanita, V., Fefta Wijaya, A., & Rochmah, S. (2016). Kinerja Birokrasi Dalam Penyaluran Pupuk Bersubsidi Di

- Kecamatan Jombang. *Jurnal Ilmu Sosial Dan Ilmu Politik*, 5(1), 74.
- Widyati, E. (2017). Memahami komunikasi tumbuhan-tanah dalam areal rhizosfir untuk optimasi pengelolaan lahan. *Jurnal Sumberdaya Lahan*, 11(1), 33-42. DOI: 10.2018/jSDL.v11i1.8190
- Wulandari, N., Irfan, M., & Saragih, R. (2019). Isolasi dan karakterisasi plant growth promoting rhizobacteria dari rizosfer kebun karet rakyat. *Dinamika Pertanian*, 35(3), 57-64. DOI: [https://doi.org/10.25299/dp.2019.vol35\(3\).4565](https://doi.org/10.25299/dp.2019.vol35(3).4565)
- Zulaika, E., Solikhah, F., Alami, N. H., Kuswytasari, N. D., & Shovitri, M. (2017, June). Viability of Azotobacter consortium in auxin production. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 1854, No. 1). AIP Publishing
- 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), 475-484. DOI: 10.29303/jbt.v20i3.1730