

**AKTIVITAS ISOLAT *PLANT GROWTH PROMOTING*
RHIZOBIA ASAL TANAH TERPUPUK KIMIA DAN TIDAK
TERPUPUK TERHADAP PERTUMBUHAN JAGUNG**

SKRIPSI

Diajukan untuk Memenuhi Sebagian Syarat Guna
Memperoleh Sarjana Sains dalam Ilmu Biologi



Oleh : AHMAD FEBRIYANSA

NIM : 2008016034

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI WALISONGO
SEMARANG
2024**

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Ahmad Febriyansa

NIM : 2008016034

Program Studi : Biologi

Menyatakan bahwa Skripsi yang berjudul:

**AKTIVITAS ISOLAT *PLANT GROWTH PROMOTING*
RHIZOBIA ASAL TANAH TERPUPUK KIMIA DAN TIDAK
TERPUPUK TERHADAP PERTUMBUHAN JAGUNG**

Secara keseluruhan merupakan hasil penelitian/karya sendiri,
kecuali bagian tertentu yang dirujuk sumbernya.

Semarang, 27 April 2024

Pembuat Pernyataan



Ahmad Febriyansa

NIM : 2008016034



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI WALISONGO
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
Jl. Prof. Dr. Hamka Ngaliyan Semarang
Telp.024-7601295 Fax.7615387

LEMBAR PENGESAHAN

Naskah skripsi berikut ini:

Judul : **Aktivitas Isolat *Plant Growth Promoting Rhizobia* asal Tanah Terpupuk Kimia dan Tidak Terpupuk Terhadap Pertumbuhan Jagung**

Penulis : Ahmad Febriyansa

NIM : 2008016034

Program Studi : S1 Biologi

Telah diujikan dalam sidang tugas akhir oleh Dewan Penguji Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo dan dapat diterima sebagai salah satu syarat memperoleh gelar sarjana dalam ilmu Biologi.

Semarang, 27 April 2024

DEWAN PENGUJI

Penguji I

Tara Puri Ducha Rahmani, M.Sc

NIP : 198806132019032011

Penguji II

Hafidha Asni Akmalia, M.Sc

NIP : 198908212019032013

Penguji III

Andang Syaifudin, M.Sc

NIP : 198907192019031010

Penguji-IV

Asri Febriana, M.Si

NIP : 198709112018012001

Pembimbing I

Andang Syaifudin, M.Sc

NIP : 198907192019031010

Pembimbing II

Arnia Sari Mukaromah, M.Sc

NIP : 198709112018012001

NOTA DINAS

Semarang, 27 April 2024

Yth. Ketua Program Studi Biologi
Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Walisongo Semarang

Assalamu'alaikum wr. wb.

Dengan ini diberitahukan bahwa saya telah melakukan bimbingan, arahan dan koreksi naskah skripsi dengan:

Judul : **Aktivitas Isolat *Plant Growth Promoting Rhizobia* asal Tanah Terpupuk Kimia dan Tidak Terpupuk Terhadap Pertumbuhan Jagung**

Nama : Ahmad Febriyansa

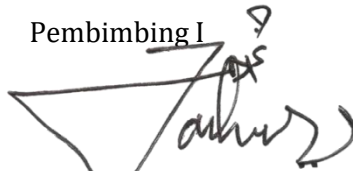
NIM : 2008016034

Program Studi : Biologi

Saya memandang bahwa naskah skripsi tersebut sudah dapat diajukan kepada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo untuk diujikan dalam Sidang Munaqosyah.

Wassalamualaikum wr.wb.

Pembimbing I



Andang Syaifudin, M.Sc.

NIP.198907192019031010

NOTA DINAS

Semarang, 27 April 2024

Yth. Ketua Program Studi Biologi
Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Walisongo Semarang

Assalamu'alaikum wr. wb.

Dengan ini diberitahukan bahwa saya telah melakukan bimbingan, arahan dan koreksi naskah skripsi dengan:

Judul : **Aktivitas Isolat *Plant Growth Promoting Rhizobia* asal Tanah Terpupuk Kimia dan Tidak Terpupuk Terhadap Pertumbuhan Jagung**

Nama : Ahmad Febriyansa

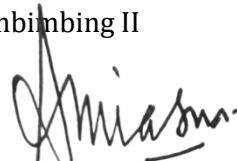
NIM : 2008016034

Program Studi : Biologi

Saya memandang bahwa naskah skripsi tersebut sudah dapat diajukan kepada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo untuk diujikan dalam Sidang Munaqosyah.

Wassalamualaikum wr.wb.

Pembimbing II



Arnia Sari Mukaromah, M.Sc

NIP : 198709112018012001

ABSTRAK

Penggunaan pupuk kimia dalam jangka panjang menyebabkan kerusakan tanah dan menurunkan produktivitas jagung yang kemungkinan disebabkan oleh menurunnya aktivitas PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) yang ada di lingkungan. Oleh karena itu, penting untuk menentukan apakah aktivitas PGPR pada tanah yang mengalami pemupukan kimiawi mengalami penurunan. Pada penelitian ini, efek dari tiga isolat PGPR yang berasal dari tanah yang dipupuk kimia dan tiga isolat dari tanah yang tidak dipupuk dibandingkan secara terpisah. Parameter pengamatan meliputi panjang akar, tinggi tanaman, berat basah dan kering, dan jumlah daun jagung (*Zea mays* L.) selama fase V1-V3, dengan jagung ditanam pada media agar di rumah kaca selama 7 hari. Dampak perlakuan yang berbeda dari perendaman dan penyiraman inokulum, serta pemotongan akar dan tanpa pemotongan, pada panjang akar jagung juga diamati. Selanjutnya, masing-masing isolat dari tanah yang dipupuk dan tidak dipupuk dengan aktivitas tertinggi diidentifikasi dengan Gen 16S rRNA. Aplikasi isolat dari tanah yang dipupuk kimia menunjukkan hasil yang lebih baik, dengan tinggi tanaman, panjang akar, berat basah dan kering, serta jumlah daun masing-masing 3,64%, 71,74%, 1,60%, dan 14,71% lebih tinggi dibandingkan dengan isolat dari tanah yang tidak dipupuk. Selain itu, perlakuan perendaman menghasilkan panjang akar 13,89% lebih panjang dibandingkan dengan penyiraman, dan perlakuan tanpa pemotongan akar 15,25% lebih panjang dibandingkan dengan perlakuan pemotongan. Identifikasi Gen 16S rRNA terhadap isolat dengan aktivitas tertinggi dari tanah yang dipupuk kimiawi dan tanah tidak dipupuk menunjukkan keduanya adalah *Bacillus cereus*. Penelitian ini menunjukkan isolat dari tanah yang dipupuk kimiawi memiliki aktivitas yang lebih baik dibandingkan dengan isolat dari tanah yang tidak dipupuk.

Kata kunci : *Bacillus cereus*, jagung, PGPR, pupuk kimia

ABSTRACT

*The prolonged use of chemical fertilizers can lead to soil damage and reduce maize productivity, likely due to the decrease in the activity of PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) present in the environment. Therefore, it is crucial to determine whether the activity of PGPR in soil subjected to chemical fertilization has decreased. In this study, the effects of three isolates of PGPR originating from chemically fertilized soil and three isolates from unfertilized soil were investigated separately. The observation parameters included root length, plant height, wet and dry weight, and the number of maize (*Zea mays* L.) leaves during the V1-V3 phase, with the maize planted in agar media in greenhouse experiments for 7 days. The impact of different treatments of inoculum soaking and watering, as well as root cutting and no cutting, on maize root length was also observed. Furthermore, one isolate each from chemically fertilized and unfertilized soil with the highest activity was identified using the 16S rRNA gene. The application of isolates originating from chemically fertilized soil showed better results, with plant height, root length, wet and dry weight, and leaf number being 3.64%, 71.74%, 1.60%, and 14.71% higher, respectively, compared to isolates from unfertilized soil. Additionally, soaking treatment resulted in 13.89% longer root length compared to watering, and the treatment without root cutting was 15.25% longer than the cutting treatment. 16S rRNA gene identification conducted on isolates with the highest activity from chemically fertilized and unfertilized soil revealed that both isolates were *Bacillus cereus*. The main finding of this study is that isolates originating from chemically fertilized soil exhibit better activity compared to isolates from unfertilized soil. However, further molecular research is needed to investigate why this phenomenon occurs.*

Keyword : *Bacillus cereus, chemical fertilizer, maize, PGPR*

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis ucapkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas rahmat dan nikmat-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **Aktivitas Isolat *Plant Growth Promoting Rhizobia* asal Tanah Terpupuk Kimia dan Tidak Terpupuk Terhadap Pertumbuhan Jagung**. Skripsi ini ditujukan sebagai bentuk tanggungjawab penulis sebagai mahasiswa program studi biologi yang diharuskan memiliki kontribusi kepada masyarakat maupun lingkungan atas ilmu yang telah didapatkan di bangku perkuliahan.

Skripsi ini menjadi bukti nyata (terlepas hanya berguna sebagai bungkus gorengan atau pajangan dipojokan perpustakaan seperti kebanyakan kasus pada umumnya) bahwa penulis telah bersusah payah dan bersungguh-sungguh dalam menjalankan kewajibannya sebagai seorang mahasiswa dalam memberikan kontribusi semaksimal mungkin sesuai kapasitasnya untuk masyarakat melalui penulisan skripsi ini.

Selain mengantarkan skripsi ini secara singkat, pada bagian kata pengantar ini penulis ingin menyampaikan rasa terimakasih yang tidak ternilai untuk semua pihak yang turut serta memberikan bantuan sehingga skripsi ini dapat diselesaikan. Ucapan terimakasih penulis tujukan kepada :

1. Prof. Dr. Nizar Ali, M.Ag., Rektor UIN Walisongo Semarang.

2. Prof. Dr. H. Musahadi, M.Ag., Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo Semarang;
3. Dr. Baiq Farhatul Wahidah, M.Si., Ketua Program Studi Biologi UIN Walisongo Semarang yang telah menyetujui topik penelitian penulis;
4. Dr. Dian Ayuning Tyas, M.Biotech., Ketua Program Studi baru yang menjadi nakhoda prodi biologi, yang semoga dapat membawa biologi menjadi lebih baik dari tahun-tahun sebelumnya;
5. Andang Syaifudin, M.Sc., dosen wali penulis sekaligus dosen pembimbing I yang selalu menyenangkan diajak berdiskusi terkait mikrobiologi dan juga hal lain diluar perkuliahan serta selalu mengingatkan untuk tetap santai ditengah gempuran aktivitas penelitian. Terimakasih banyak untuk ilmu yang telah diberikan sehingga akhirnya memotivasi penulis untuk terjun ke dunia mikrobiologi;
6. Arnia Sari Mukaromah, M.Sc., dosen pembimbing II yang tanpa lelah memberikan masukan dan arahan terkait fisiologi dan molekuler, terimakasih telah bersedia mengawal penulis selama proses penelitian molekuler yang sangat melelahkan dan juga memberikan masukan untuk penulisan skripsi, tidak lupa terimakasih selalu

mengingatkan untuk jangan terlalu perfeksionis dalam penulisan skripsi ini;

7. Tara Puri Ducha Rahmani, M.Sc., Hafidha Asni Akmalia, M.Sc., dan Asri Febriana, M.Si., dosen penguji yang banyak memberi masukan dan koreksi untuk perbaikan penelitian mulai naskah proposal hingga naskah skripsi ini;
8. Bu Sum, Mas Lukman, Mas Muchis dan satpam kampus 3 UIN Walisongo yang mengizinkan penulis melakukan penelitian dari subuh hingga larut malam;
9. Dr. Dian Ayuning Tyas, M.Biotech., Asri Febriana, M.Si., Dian Triastari Armanda, M.Sc., Chusnul Adib Achmad, M.Si., Mirtaati Naima, M.Sc., Eko Purnomo, M.Si serta segenap dosen prodi Biologi yang turut memberikan semangat dan bersedia ditanya-tanya tentang kendala selama penelitian;
10. Riska Dwi Aswaroh, M. Yusrun Ni'am, dan Syifara Chika yang selalu bersedia memberikan pengalaman, ilmu serta skripsinya untuk menjadi referensi penulis;
11. Agung, Wahib, Roy, yang dengan murah hati menyediakan laptopnya untuk proses analisis molekuler;
12. Kawan-kawan Biosternum 2020 dengan topik riset mikro-fisiologi-molekuler yang menjadi teman adu nasib selama proses riset;

13. Mas Yud, bang Bob, mas Ib, bang Rijoy, Dimas, Inam, Risfa, Agung, dan penghuni kontrakan Goa Hiro lain yang dengan sabar dan telaten menemani proses *burnout* penulis dalam menyelesaikan skripsi ini;
14. Seseorang yang sudah membangkitkan kembali motivasi penulis setelah hilang selama beberapa waktu, sehingga tugas akhir ini dapat selesai tepat waktu.

Terimakasih kepada seluruh pihak yang telah membantu, semoga kebaikan bapak/ibu/saudara/i dibalas berkali lipat oleh Allah S.W.T. Penulis menyadari skripsi ini belum sempurna di beberapa bagian, namun semoga hal tersebut tidak menghalangi kebermanfaatan skripsi ini kepada pembaca maupun penulis.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
PERNYATAAN KEASLIAN.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
NOTA DINAS.....	iv
NOTA DINAS.....	v
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH.....	xx
DAFTAR LAMPIRAN	xxii
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian.....	5
D. Manfaat Penelitian	5
BAB II LANDASAN PUSTAKA	7
A. Kajian Teori.....	7
1. Unsur Hara Tanaman.....	7
2. Pupuk Kimia	9
3. Bakteri.....	10
4. <i>Plant Growth Promoting Rhizobia</i> (PGPR).....	12
5. Skrining Kandidat PGPR.....	15

6. Peran PGPR pada Jagung.....	17
7. Identifikasi Bakteri Menggunakan Gen 16S rRNA... 18	
a. Gen 16S rRNA	19
b. Ekstraksi DNA	21
c. Elektroforesis	22
d. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	23
e. DNA Sekuensing	26
f. Analisis Bioinformatika.....	28
B. Kajian Penelitian yang Relevan.....	30
C. Hipotesis.....	36
D. Pandangan Islam terhadap Kerusakan Lingkungan.....	36
BAB III METODE PENELITIAN.....	38
A. Tempat dan Waktu Penelitian.....	38
B. Alat dan Bahan.....	40
C. Metode	41
1. Koleksi Sampel Tanah	41
2. Preparasi Media	42
3. Isolasi Bakteri Kandidat PGPR.....	43
4. Uji Pendahuluan Isolat PGPR.....	45
5. Uji Lanjutan Isolat PGPR.....	48
6. Identifikasi Morfologi Koloni dan Sel.....	50
7. Uji Aktivitas PGPR Terhadap Pertumbuhan Jagung.....	51
8. Analisis Statistik.....	55
9. Identifikasi Menggunakan Gen 16S rRNA.....	56
a. Isolasi Genom Bakteri	56
b. Konfirmasi Hasil Isolasi dengan Elektroforesis ..	59

c.	Amplifikasi Gen 16S rRNA.....	61
10.	Sekuensing dan Analisis Data Sekuensing.....	61
a.	Sekuensing.....	61
b.	Analisis Data Sekuensing.....	62
c.	Input Data Sekuen ke NCBI.....	62
d.	Rekonstruksi Pohon Filogenetik	63
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	64
A.	Deskripsi Hasil Penelitian.....	64
1.	Parameter Lingkungan Lokasi Sampel Tanah Terpupuk dan Tidak Terpupuk Kimia	64
2.	Isolasi Bakteri Kandidat PGPR.....	65
3.	Uji Pendahuluan Isolat PGPR.....	67
a.	Uji Penambatan Nitrogen	68
b.	Uji Pelarutan Fosfat.....	70
c.	Uji Pelarutan Kalium.....	72
4.	Uji Lanjutan Isolat PGPR.....	75
a.	Uji Produksi <i>Indole Acetid Acid</i>	75
b.	Uji Produksi Ammonia.....	76
5.	Uji Aktivitas PGPR Terhadap Pertumbuhan Jagung	78
6.	Identifikasi Morfologi Koloni dan Sel.....	89
7.	Identifikasi Menggunakan Gen 16S rRNA.....	90
8.	Sekuensing dan Analisis Data Sekuensing.....	91
B.	Pembahasan Hasil Penelitian	101
1.	Parameter Lingkungan Lokasi Sampel Tanah Terpupuk dan Tidak Terpupuk Kimia	101
2.	Isolasi Bakteri Kandidat PGPR.....	103
3.	Uji Pendahuluan Isolat PGPR.....	107

a. Uji Penambatan Nitrogen	107
b. Uji Pelarutan Fosfat.....	108
c. Uji Pelarutan Kalium.....	111
4. Uji Lanjutan Isolat PGPR.....	114
a. Uji Produksi Indole Acetid Acid	114
b. Uji Produksi Ammonia.....	117
5. Uji Aktivitas PGPR Pada Pertumbuhan Jagung	119
6. Identifikasi Morfologi Koloni dan Sel.....	128
7. Identifikasi Menggunakan Gen 16S rRNA	130
8. Sekuensing dan Analisis Data Sekuensing	132
BAB V SIMPULAN DAN SARAN	142
A. SIMPULAN	142
B. SARAN	142
DAFTAR PUSTAKA	144
LAMPIRAN	220
RIWAYAT HIDUP	251

DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Kajian penelitian yang relevan	30
Tabel 4. 1 Parameter lingkungan lokasi pengambilan sampel tanah.....	64
Tabel 4. 2. Curah hujan kabupaten Lamongan 2023	65
Tabel 4. 3 Isolat overgrowth asal tanah terpupuk kimia (FEB01) dan tanah tidak terpupuk (FEB02) pada media Burks agar	68
Tabel 4. 4 Produksi ammonia isolat PGPR asal tanah terpupuk kimia (FEB01) dan tidak terpupuk (FEB02)	77
Tabel 4. 5 Identifikasi morfologi koloni PGPR-K1 dan PGPR-K2	89
Tabel 4. 6 Komposisi nukleotida.....	94
Tabel 4. 7 Analisis BLASTn pada sekuen PGPR-K1 dan PGPR-K2.....	95
Tabel 4. 8 Analisis sekuen PGPR-K1 dan PGPR-K2 menggunakan EzBio Cloud	96
Tabel 4. 9 Variasi nukleotida pada sekuen PGPR-K1 dan PGPR-K2 terhadap isolat pembanding.....	97

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Ilustrasi bentuk bakteri	11
Gambar 2. 2 Hasil pewarnaan gram	12
Gambar 2. 3 Hasil pengujian Indole Acetid Acid	16
Gambar 2. 4 Skema struktur gen 16S rRNA	20
Gambar 2. 5 Persentase urutan daerah conserved dan hypervariable dari gen 16S rRNA bakteri.....	21
Gambar 3. 1 Lokasi pengambilan sampel tanah terpupuk kimia (a) dan tanah tidak terpupuk (b).....	38
Gambar 3. 2 Peta lokasi pengambilan sampel tanah terpupuk kimia dan tidak terpupuk.....	39
Gambar 3. 3 Desain pengujian aktivitas bakteri pada pertumbuhan jagung.....	54
Gambar 4. 1 Hasil isolasi bakteri asal tanah terpupuk kimia (FEB01) dan tidak terpupuk (FEB02) terhadap aktivitas penambat nitrogen pada media Burks, pelarut fosfat pada media Pikovskaya, dan pelarut kalium pada media Aleksandrow	66
Gambar 4. 2 Contoh isolat overgrowth pada media Burks...	69
Gambar 4. 3 Koloni <i>Azotobacter</i> pada media Ashby agar.....	69
Gambar 4. 4 Zona bening hasil aktivitas pelarutan fosfat PGPR asal tanah terpupuk kimia (FEB01) dan tanah tidak terpupuk (FEB02).....	71
Gambar 4. 5 Isolat g asal tanah terpupuk kimia (FEB01) [a] dan isolat c asal tanah tidak terpupuk (FEB02) [b]	71
Gambar 4. 6 Modifikasi media Aleksandrow oleh Rajawat <i>et al.</i> , (2016) (a) dan modifikasi yang mengalami kegagalan (b)	73
Gambar 4. 7 Zona bening hasil pelarutan kalium isolat PGPR asal tanah terpupuk kimia (FEB01) dan tanah tidak terpupuk (FEB02).....	73
Gambar 4. 8 Isolat j asal tanah terpupuk kimia (FEB01) [a] dan isolat d asal tanah tidak terpupuk (FEB02) [b]	75
Gambar 4. 9 Produksi Indole Acetid Acid isolat PGPR asal tanah terpupuk kimia (FEB01) dan tidak terpupuk (FEB02)	76

Gambar 4. 10 Produksi ammonia isolat tanah terpupuk kimia (FEB01) dan tidak terpupuk (FEB02) menggunakan metode Nessler	77
Gambar 4. 11 Aktivitas isolat asal tanah terpupuk kimia (FEB01) dan tidak terpupuk (FEB02) terhadap tinggi jagung hari ke 1-7	78
Gambar 4. 12 Aktivitas isolat asal tanah terpupuk kimia (FEB01) dan tidak terpupuk (FEB02) terhadap panjang akar jagung hari ketujuh	80
Gambar 4. 13 Aktivitas isolat asal tanah terpupuk kimia (FEB01) dan tidak terpupuk (FEB02) terhadap berat basah dan berat kering jagung	82
Gambar 4. 14 Aktivitas isolat asal tanah terpupuk kimia (FEB01) dan tidak terpupuk (FEB02) terhadap jumlah daun jagung hari ketujuh	84
Gambar 4. 15 Panjang akar jagung pada variasi perlakuan perendaman, penyiraman, pemotongan akar serta penggunaan media agar dan triptofan	86
Gambar 4. 16 Aktivitas isolat asal tanah terpupuk kimia (FEB01) dan tidak terpupuk (FEB02) terhadap produktivitas jagung.....	87
Gambar 4. 17 Morfologi sel dan pewarnaan gram dengan hasil gram positif berbentuk basil isolat PGPR-K1 (a) dan PGPR-K2 (b) pada perbesaran 400x.....	90
Gambar 4. 18 Visualisasi elektroforesis ampikon isolat PGPR-K1 dan PGPR-K2	91
Gambar 4. 19 Elektroferogram hasil sekuensing dalam format AB1.....	92
Gambar 4. 20 Elektroferogram dengan peak yang saling bertumpuk pada sekuen reverse PGPR-K1.....	92
Gambar 4. 21 Stutter peak pada sekuen forward isolat PGPR-K1.....	93
Gambar 4. 22 <i>Misleading heterozygous peaks</i> pada sekuen forward isolat PGPR-K1.....	93
Gambar 4. 23 <i>Dye blob</i> pada sekuen forward isolat PGPR-K1	93

Gambar 4. 24 Nukleotida dengan kode "N" pada sekuen reverse PGPR-K2	93
Gambar 4. 25 Analisis chimera terhadap sekuen PGPR-K1 dan PGPR-K2.....	97
Gambar 4. 26 Accesion number sekuen PGPR-K1 dan PGPR-K2.....	98
Gambar 4. 27 Pohon filogenetik dengan 1000x <i>bootstrap</i> (UPGMA – Kimura 2)	99
Gambar 4. 28 Analisis ASAP terhadap sekuen PGPR-K1 dan PGPR-K2.....	100

DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH

PGPR-N1

isolat penambat nitrogen asal tanah terpupuk kimia;

PGPR-P1

isolat pelarut fosfat asal tanah terpupuk kimia;

PGPR-K1

isolat pelarut kalium asal tanah terpupuk kimia;

PGPR-N2

isolat penambat nitrogen asal tanah tidak terpupuk;

PGPR-P2

isolat pelarut fosfat asal tanah tidak terpupuk;

PGPR-K2

isolat pelarut kalium asal tanah tidak terpupuk;

ACC Deaminase

enzim pendegradasi ACC menjadi amonia dan α -ketobutirat, sehingga mengurangi tingkat etilen di dalam tanaman;

EPS

polimer karbohidrat dengan berat molekul tinggi sebagai polisakarida kapsuler yang berhubungan dengan permukaan sel;

nif

gen yang mengkode komponen kompleks enzim nitrogenase yang terdiri dari *nifH*, *nifD*, dan *nifK*;

Overgrowth

jumlah bakteri yang tumbuh di dalam media pertumbuhan melebihi batas normal atau di luar kendali yang diinginkan;

PQQ

gen yang mengkode aktivitas pelarutan fosfat pada bakteri pelarut fosfat;

Quorum sensing

pengaturan ekspresi gen sebagai respons terhadap fluktuasi kepadatan populasi sel;

Volatile Organic Compound

senyawa mudah menguap seperti alkena, alkohol, keton, benzena, benzenoid, pirazin, sulfida, dan terpena hasil metabolisme bakteri;

ZmARF

Zea mays Auxin Response Factor, gen yang berfungsi mengatur persinyalan auksin pada jagung;

ZmPINOID

gen yang berfungsi mengatur transpor auksin pada jagung;

DAFTAR LAMPIRAN

Gambar Lampiran 1. Isolasi kandidat PGPR pada media Burks agar, Pikovskaya agar, dan Aleksandrow agar	220
Gambar Lampiran 2. Purifikasi bakteri kandidat PGPR pada berbagai media.....	220
Gambar Lampiran 3. Pengukuran luas zona bening PGPR pada uji pendahuluan.....	221
Gambar Lampiran 4. Uji aktivitas PGPR terhadap produktivitas jagung.....	221
Gambar Lampiran 5. Kurva standari Indole Acetid Acid (IAA)	222
Lampiran 6. Sekuen contig isolat PGPR-K1.....	224
Lampiran 7. Sekuen contig isolat PGPR-K2.....	225
Tabel Lampiran 1 Komposisi media Burks agar	226
Tabel Lampiran 2. Komposisi media Pikovskaya agar	226
Tabel Lampiran 3. Komposisi media Aleksandrow agar	227
Tabel Lampiran 4. Data morfologi koloni hasil purifikasi bakteri penambat nitrogen pada sampel FEB01	227
Tabel Lampiran 5. Data morfologi koloni hasil purifikasi bakteri penambat nitrogen pada sampel FEB02	228
Tabel Lampiran 6. Data morfologi koloni hasil purifikasi bakteri pelarut fosfat pada sampel FEB01	228
Tabel Lampiran 7. Data morfologi koloni hasil purifikasi bakteri pelarut fosfat pada sampel FEB02	229
Tabel Lampiran 8. Data morfologi koloni hasil purifikasi bakteri pelarut kalium pada sampel FEB01.....	229
Tabel Lampiran 9. Data morfologi koloni hasil purifikasi bakteri pelarut kalium pada sampel FEB02.....	230
Tabel Lampiran 10. Hasil uji ANOVA variasi perendaman dan penyiraman.....	231
Tabel Lampiran 11. Hasil uji ANOVA variasi pemotongan akar	232
Tabel Lampiran 12. Hasil uji ANOVA variasi media	233
Tabel Lampiran 13. Hasil uji ANOVA panjang akar isolat FEB01 & FEB02	234

Tabel Lampiran 14. Hasil uji ANOVA tinggi batang isolat FEB01 & FEB02	235
Tabel Lampiran 15. Hasil uji ANOVA berat kering isolat FEB01 & FEB02	236
Tabel Lampiran 16. Hasil uji ANOVA berat basah isolat FEB01 & FEB02	237
Tabel Lampiran 17. Hasil uji ANOVA panjang akar antar isolat	238
Tabel Lampiran 18. Hasil uji ANOVA tinggi batang antar isolat	240
Tabel Lampiran 19. Hasil uji ANOVA berat basah antar isolat	242
Tabel Lampiran 20. Hasil uji ANOVA berat kering antar isolat	244
Tabel Lampiran 21. Hasil uji ANOVA jumlah daun antar isolat	246
Tabel Lampiran 22. Hasil uji ANOVA jumlah daun isolat FEB01 & FEB02	248
Tabel Lampiran 23. Jarak genetik sekuen PGPR-K1 dan PGPR-K2 terhadap sekuen pembanding	249

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Jagung menjadi komoditas agronomi Indonesia terbesar kedua setelah padi dengan total produksi tahun 2020 sebanyak 29,02 juta ton (Badan Pusat Statistik, 2021). Produktivitas jagung terus mengalami peningkatan dengan nilai rata-rata 2,21% pada tahun 2016-2020. Provinsi Jawa Timur konsisten menjadi produsen jagung tertinggi di Indonesia dengan hasil 5.2 juta ton pada 2020 dan Kabupaten Lamongan berada pada peringkat ketiga dengan hasil panen 383.267 ton (Badan Pusat Statistik, 2021). Beberapa faktor yang mendukung produktivitas jagung secara biologis (*biological yield*) meliputi kompetisi dengan gulma, genotipe, jarak tanam, dan faktor lingkungan yang meliputi kondisi iklim (suhu dan curah hujan), hama, penyakit, serta kondisi tanah (tekstur, pH, unsur hara) (Cong, 2021; Mncube *et al.*, 2024).

Unsur hara didefinisikan sebagai zat yang diperlukan tanaman untuk melakukan metabolisme sehingga tanaman tidak dapat tumbuh dan berkembang tanpa adanya unsur tersebut (Brown *et al.*, 2022). Salah satu unsur hara yakni nitrogen terlibat dalam bagian struktural berbagai molekul tanaman seperti asam amino, klorofil, asam nukleat, ATP dan fitohormon yang diperlukan dalam menyelesaikan proses

biologis (Anas *et al.*, 2020). Pengambilan unsur hara oleh tanaman secara berkepanjangan menyebabkan tanah kekurangan unsur hara sehingga menurunkan hasil panen (Liu *et al.*, 2021; Sarr *et al.*, 2019). Salah satu solusi untuk mengatasi masalah tersebut adalah dengan melakukan pemupukan (Krasilnikov *et al.*, 2022). Aplikasi pupuk diyakini telah bertanggungjawab atas peningkatan 50% hasil panen jagung pada abad ke-20 (Yousaf *et al.*, 2017). Hal tersebut didukung Adoko *et al.*, (2022); Galindo *et al.*, (2022) & Romero-Cortes *et al.*, (2022) yang menyatakan pemberian pupuk secara nyata berpengaruh terhadap kelimpahan unsur hara tanah, pertumbuhan, anatomi, morfo-fisiologi dan hasil produksi jagung.

Penggunaan pupuk di Indonesia didominasi oleh pupuk kimia dengan rata-rata penggunaan sebesar 216,98 kg/hektar (Badan Pusat Statistik, 2021). Namun penggunaan pupuk kimia berlebihan dan berkepanjangan menyebabkan penurunan pH yang berpengaruh pada kemampuan penyerapan unsur hara, merusak struktur tanah sehingga aerasi terganggu, serta meningkatkan polutan tanah yang berakibat pada penurunan karbon organik tanah dan kerusakan mikro-ekologi rizosfer serta meningkatkan aktivitas ion logam berat di dalam tanah yang pada akhirnya menghambat pertumbuhan tanaman serta secara bertahap menurunkan keragaman dan aktivitas bakteri tanah yang

memiliki peran penting dalam mendukung produktivitas tanaman (Bai *et al.*, 2020; Carrazco *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2018; Rahman *et al.*, 2020).

Kelompok *Plant Growth Promoting Rhizobia* (PGPR) dapat meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan tanaman dengan cara memfiksasi nitrogen di atmosfer, melarutkan mineral fosfat dan kalium, memproduksi fitohormon, dan mensintesis enzim pertumbuhan tanaman. Selain itu PGPR bersaing dengan fitopatogen dalam mendapatkan nutrisi serta menghasilkan metabolit sekunder yang bersifat antifungi dan antibiotik terhadap patogen lain. (Nascimento *et al.*, 2020; Sandilya *et al.*, 2017; Vejan *et al.*, 2016). Dalam proses meningkatkan pertumbuhan, PGPR membutuhkan lingkungan yang sesuai untuk melakukan metabolisme sehingga kerusakan tanah akibat pupuk kimia akan menghambat metabolisme PGPR yang berakibat produktivitas tanaman menurun dan menjadi rentan terhadap penyakit (Naz *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022; Yu *et al.*, 2022).

Beberapa penelitian terkait keragaman dan aktivitas PGPR pada tanah terpupuk kimia telah dilakukan, seperti penelitian Reid *et al.*, (2021) yang menyimpulkan pemberian pupuk kimia menurunkan kelimpahan bakteri pelarut nitrogen, fosfat, kalium, besi dan seng pada rizosfer gandum di Inggris. Namun penelitian mengenai perbandingan

aktivitas dan kelimpahan komunitas PGPR asal tanah terpupuk dan tidak terpupuk pada jagung masih sangat terbatas.

Penelitian yang dilakukan di Indonesia sebagian besar berfokus membandingkan sifat kimia pada tanah terpupuk kimia dan organik (Murnita & Taher, 2021; Priambodo *et al.*, 2019). Penelitian dengan fokus utama aktivitas PGPR asal tanah terpupuk dan tidak terpupuk kimia dalam menginduksi pertumbuhan jagung belum dilakukan. Oleh karena itu penelitian ini penting dilakukan guna mengetahui adanya kemungkinan perbedaan aktivitas serta mengidentifikasi spesies PGPR dari kedua jenis tanah tersebut. Selain itu, isolat yang memiliki aktivitas tertinggi dalam menginduksi pertumbuhan jagung dari penelitian ini dapat dikembangkan sebagai pupuk hayati sehingga sekaligus memberikan solusi untuk permasalahan efek samping penggunaan pupuk kimia berkepanjangan guna mendukung pertanian berkelanjutan.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diulas, rumusan masalah dalam penelitian ini adalah

1. Bagaimana aktivitas isolat *Plant Growth Promoting Rhizobia* (PGPR) asal tanah terpupuk dan tidak terpupuk kimia dalam menginduksi pertumbuhan jagung?

2. Apa saja spesies *Plant Growth Promoting Rhizobia* (PGPR) dari tanah terpupuk dan tidak terpupuk yang memiliki aktivitas tertinggi dalam menginduksi pertumbuhan jagung?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah

1. Menganalisis aktivitas PGPR pada tanah terpupuk dan tidak terpupuk kimia dalam menginduksi pertumbuhan jagung.
2. Mengidentifikasi spesies PGPR dari tanah terpupuk dan tidak terpupuk yang memiliki aktivitas tertinggi dalam menginduksi pertumbuhan jagung.

D. Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan memiliki beberapa manfaat untuk beberapa pihak

1. Manfaat Teoritis

Penelitian ini memberikan pemahaman lebih mendalam terkait aktivitas isolat *Plant Growth Promoting Rhizobia* dari tanah terpupuk dan tidak terpupuk kimia, sehingga berguna sebagai rujukan dalam penelitian serta pengembangan praktek pertanian berkelanjutan kedepannya.

2. Manfaat Praktis

- a. Bagi Peneliti

Penelitian ini bermanfaat untuk menambah pengetahuan terkait *Plant Growth Promoting Rhizobia* serta menjadi kesempatan untuk secara langsung mempraktekkan ilmu

yang telah didapatkan di bangku perkuliahan dalam bidang riset mikrobiologi, fisiologi tumbuhan dan molekuler.

b. Bagi Masyarakat

Penelitian ini berpotensi untuk menemukan akar dari masalah kesuburan tanah yang terus berkurang sehingga menyebabkan kebutuhan akan pupuk kimia bertambah, selain itu penelitian ini memberikan pemahaman yang lebih baik terkait aktivitas PGPR asal tanah terpupuk dan tidak terpupuk kimia terhadap pertumbuhan jagung sebagai rujukan dalam mengelola pertanian yang berkelanjutan.

c. Bagi Instansi

Penelitian ini meningkatkan reputasi institusi sebagai pusat riset biologi yang inovatif dan berorientasi pada solusi. Sehingga diharapkan meningkatkan visibilitas dan minat para peneliti serta mahasiswa dalam bidang mikrobiologi, fisiologi tumbuhan serta molekuler.

BAB II

LANDASAN PUSTAKA

A. Kajian Teori

1. Unsur Hara Tanaman

Unsur hara didefinisikan sebagai unsur yang esensial atau penting keberadaannya untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Suatu unsur dianggap penting jika siklus hidup tanaman tidak diselesaikan tanpa adanya unsur tersebut (Brown *et al.*, 2022). Tanaman membutuhkan 17 unsur hara yang terbagi kedalam 9 unsur makro yang dibutuhkan dalam jumlah besar oleh tanaman meliputi karbon (C), hidrogen (H), oksigen (O), nitrogen (N), fosfat (P), kalium (K), kalsium (Ca), belerang (S), dan magnesium (Mg) serta 8 unsur mikro yang dibutuhkan tanaman dalam jumlah sangat kecil yang meliputi besi (Fe), tembaga (Cu), zinc (Zn), mangan (Mn), nikel (Ni), boron (B), molybdenum (Mo) dan klor (Cl) (Uchida, 2000). Nitrogen (N), fosfat (P), belerang (S), seng (Zn), dan besi (Fe) merupakan beberapa nutrisi vital untuk pertumbuhan, perkembangan, dan produktivitas tanaman yang optimal. Kekurangan salah satu unsur hara ini menyebabkan cacat pada pertumbuhan dan penurunan produktivitas (Kumar *et al.*, 2021).

Nitrogen diperlukan untuk pertumbuhan vegetatif tanaman pangan dan berperan dalam sintesis pati dalam daun, produksi asam amino untuk sintesis protein, dan hasil

tanaman sekunder (Gupta & Roy, 2021; Sun *et al.*, 2020). Kekurangan nitrogen menyebabkan klorosis pada daun serta terhambatnya pertumbuhan karena berkurangnya pembelahan sel (Saloner & Bernstein, 2021). Fosfat diperlukan untuk berbagai proses seluler seperti fotosintesis, metabolisme karbohidrat, produksi energi, dan pensinyalan. Fosfat bekerja sebagai aktivator lebih dari 60 enzim pada tanaman, mengatur kadar air, membantu perkembangan akar, serta inisiasi bunga dan benih serta perkembangan buah (Razaq *et al.*, 2017). Kekurangan fosfat menyebabkan tanaman menjadi kerdil & perkembangan buah terhambat (Malhotra *et al.*, 2018).

Besi (Fe) diperlukan untuk sintesis klorofil dan pemeliharaan struktur dan fungsi kloroplas, defisiensi Fe mengakibatkan klorosis interveinal (tulang daun tetap hijau namun jaringan disekitarnya berubah menjadi kuning) pada daun muda, pertumbuhan akar terhambat, dan penurunan kualitas nutrisi (Colombo *et al.*, 2014). Zinc (Zn) diperlukan untuk pertumbuhan tanaman yang optimal, karena berpengaruh pada proses biologis termasuk proliferasi sel, metabolisme karbohidrat, dan interaksi P-Zn. Defisiensi Zn menyebabkan daun klorotik berubah bentuk, penurunan fotosintesis, dan penurunan produksi biomassa yang menyebabkan pertumbuhan tanaman berkurang, dan kualitas nutrisi hasil panen yang buruk (Zhao *et al.*, 2017).

2. Pupuk Kimia

Pupuk kimia merupakan pupuk yang diproduksi industri melalui proses kimiawi, ekstraksi mineral, atau dengan penggilingan mekanis (FAO, 2019). Pupuk kimia berfungsi untuk mencukupi kebutuhan tanaman terhadap suatu unsur secara spesifik dan instan (Rahmawati & Widyasari, 2021). Pupuk kimia dibagi menjadi dua yaitu pupuk tunggal yang hanya mengandung satu jenis unsur hara makro, seperti Urea, N, P, dan K. serta pupuk majemuk dengan kandungan lebih dari satu unsur makro didalamnya, seperti N, P, dan K yang dijadikan satu (Kumolontang *et al.*, 2022).

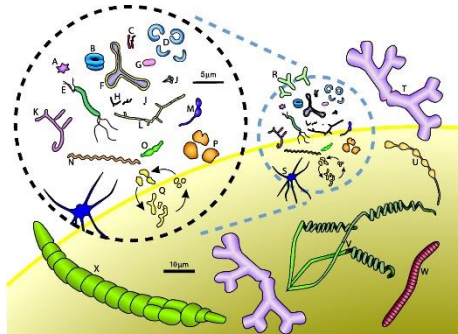
Penggunaan pupuk kimia penting untuk meningkatkan produktivitas (Kementan, 2020). Tanah tidak cukup subur untuk menyediakan unsur hara makro dan mikro esensial bagi tanaman dalam jumlah yang cukup sehingga tanaman membutuhkan sumber nutrisi lain (Salem *et al.*, 2021). Pupuk kimia secara signifikan meningkatkan produktivitas pertanian dengan memberikan nutrisi yang optimal kepada tanaman. Penggunaan pupuk kimia yang sesuai menghasilkan pertumbuhan yang lebih baik, produksi lebih tinggi dan hasil panen yang lebih besar (Gassner *et al.*, 2019; Jaja & Barber, 2017; W. Wu *et al.*, 2017).

3. Bakteri

Bakteri diklasifikasikan sebagai organisme uniseluler prokariotik yang berkembang biak melalui pembelahan biner dengan dinding sel tersusun dari protein khusus yang dinamakan peptidoglikan. Peptidoglikan terdiri dari prekursor disakarida-pentapeptida yang terdiri dari dua aminogula, N-asetilglukosamin (GlcNAc) dan N-asetilmuramat (MurNAc) yang terhubung oleh ikatan glikosidik β -1,4 (Dörr *et al.*, 2019). Ukuran bakteri bervariasi mulai 1–10 μm . *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Caulobacter crescentus* yang merupakan model paling umum bakteri dalam biologi memiliki ukuran yang kurang lebih sama, sekitar 1-1,4 μm (Levin & Angert, 2015).

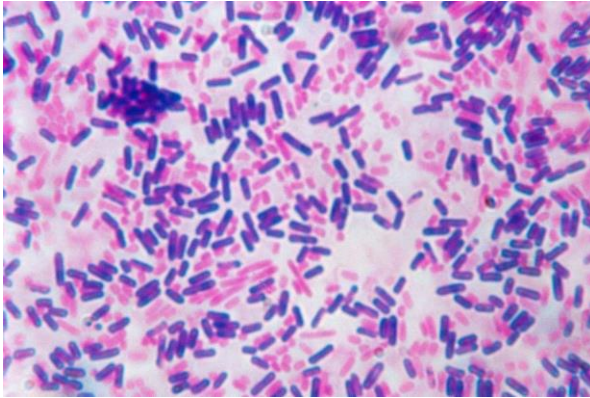
Bentuk bakteri bervariasi seperti terlihat pada Gambar 2.1 yang dipengaruhi oleh *penicillin-binding protein* (PBPs) yang melakukan sintesis dan perombakan peptidoglikan sesuai fase pertumbuhan sel. Dalam proses tersebut, PBPs menciptakan morfologi kerangka peptidoglikan bersama protein sitoskeleton. Jenis PBPs yang berbeda memiliki peran yang berbeda dalam pembelahan sel sehingga membentuk morfologi yang berbeda (Cabeen & Jacobs, 2005; Popham & Young, 2003). Selain batang, bulat, dan spiral yang sudah dikenal, bentuk-bentuk lain seperti bintang, kumis, ular-ularan, dan cabang-cabang lain memiliki presentase yang

besar namun belum terdefinisi menyeluruh (Teeseling *et al.*, 2017).



Gambar 2. 1 Ilustrasi bentuk bakteri (Young, 2006)

Selain bentuk, bakteri dibagi berdasarkan “gram” yang meliputi gram positif dan gram negatif. Adalah Hans Cristian Gram, ilmuwan asal Denmark yang pertama kali melakukan pewarnaan bakteri pada 1884. Pewarnaan Gram membedakan bakteri Gram positif dan Gram negatif berdasarkan pewarnaan diferensial dengan kompleks crystal violet dan pewarna kontras safranin. Dinding sel bakteri gram positif akan mempertahankan kompleks crystal violet setelah dibilas dengan alkohol dan tampak ungu, sedangkan bakteri gram negatif mengalami dekolonisasi setelah dibilas dengan alkohol dan tampak berwarna merah akibat pewarna safranin seperti pada Gambar 2.2 (Prochnow *et al.*, 2016).



Gambar 2. 2 Hasil pewarnaan gram (Boyanova, 2018)

Bakteri hidup di semua tempat mulai tanah hingga mata air panas dan bersimbiosis dengan banyak organisme lain, seperti hewan, tumbuhan hingga manusia (Das *et al.*, 2022). Bakteri berperan penting untuk kehidupan dengan berperan dalam siklus biogeokimia. Peran bakteri dalam daur ulang biomassa tidak dapat dilakukan oleh jamur atau protista, sehingga tanpa peran bakteri unsur hara makro dan unsur hara mikro yang tersedia di darat dan perairan akan habis. Tanpa adanya bakteri, sumber makanan sulit didapatkan karena sebagian besar ternak ruminansia tidak dapat hidup tanpa simbiosis dengan bakteri serta tanaman yang akan dengan cepat kekurangan nutrisi yang berdampak pada kematian (Gilbert & Neufeld, 2014).

4. *Plant Growth Promoting Rhizobia* (PGPR)

Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) dikenal sebagai bakteri yang mendiami rizosfer yang meningkatkan

pertumbuhan tanaman melalui berbagai mekanisme seperti pelarutan fosfat, produksi *siderophore*, fiksasi nitrogen biologis, rekayasa rizosfer, produksi *1-Aminocyclopropane-1-karboksilat deaminase* (ACC), *quorum sensing* (QS), produksi fitohormon, aktivitas antifungi, produksi *volatile organic compound* (VOC), induksi resistensi sistemik, mendorong simbiosis mikroba-tanaman yang menguntungkan, mengganggu produksi toksin oleh patogen, meningkatkan toleransi stress, menekan pertumbuhan patogen dan lain-lain. (Bulgarelli *et al.*, 2015; Kour *et al.*, 2019; Oleńska *et al.*, 2020; Pérez-Montaña *et al.*, 2014; Vetterlein *et al.*, 2020). Peran PGPR di tanah secara umum dibagi menjadi dua, yakni sebagai biokontrol dan biofertilizer (Imade & Babalola, 2021)

Sebagai agen biokontrol, PGPR membantu pengendalian mikroorganisme fitopatogenetik melalui sekresi metabolit yang bersifat antagonis (enzim litik, siderofor, senyawa volatil, hidrogen sianida, dan antibiotik), induksi resistensi sistemik, dan berkompetisi dengan patogen dalam memperebutkan nutrisi dan ruang (Bhanse *et al.*, 2022; A. Tariq *et al.*, 2014; Voccianti *et al.*, 2022). Beberapa spesies PGPR seperti *Ectocarpus fasciculatus*, *Streptomyces hygroscopicus*, *Pseudomonas flourences*, *P. putida*, *P. aeruginosa*, dan *Azospirillum lipoferum* dilaporkan menghambat pertumbuhan miselium *Aspergillus ochraceus* dan *Fusarium verticilloides* yang diketahui merupakan patogen pada jagung (Noumavo *et*

al., 2015). Selain itu Akhtar *et al.*, (2018) menyatakan bahwa fungi patogen *Fusarium oxysporum* dapat dikendalikan dengan inokulasi benih jagung yang ditanam pada tanah dengan *Serratia sp.*

Peran PGPR sebagai *biofertilizer* terdapat pada kemampuan PGPR dalam menyediakan nutrisi yang dibutuhkan tanaman. PGPR mengubah nitrogen atmosfer (N_2) menjadi amonia (NH_3) yang diserap tanaman (Imade & Babalola, 2021). Nitrogen mempengaruhi semua fungsi tanaman mulai dari metabolisme hingga alokasi sumber daya, pertumbuhan, dan perkembangan serta termasuk unsur hara esensial yang dibutuhkan untuk pertumbuhan tanaman (Ahemad & Kibret, 2014; Yousaf *et al.*, 2021). PGPR juga melarutkan fosfat tidak larut menjadi bentuk terlarut seperti $H_2PO_4^-$, HPO_4^- yang dapat diserap tanaman (Alori *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2013). Selain itu beberapa spesies PGPR seperti *Bacillus sp.* menghasilkan fitohormon yang berperan meningkatkan pertumbuhan (Chowdhury *et al.*, 2015; Marpaung, 2021; Pieterse *et al.*, 2014; Saxena *et al.*, 2020).

Beberapa genus bakteri yang diketahui memiliki aktivitas PGPR antara lain *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Allorhizobium*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azorhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Delftia*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Frankia*,

Gluconacetobacter, *Klebsiella*, *Mesorhizobium*, *Micrococcus*, *Methylobacterium*, *PaeniBacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Streptomyces*, *ThioBacillus*, dan *Variovorax* (Nadeem *et al.*, 2014).

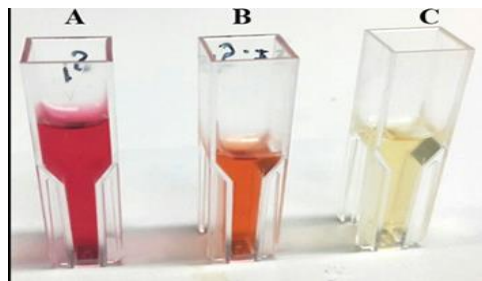
5. Skrining Kandidat PGPR

Skrining diartikan sebagai proses penyaringan atau penyeleksian. Skrining digunakan untuk mencari kandidat suatu bakteri yang memiliki aktivitas sesuai tujuan pengujian untuk selanjutnya diproses ke tahap selanjutnya. Skrining PGPR umumnya dilakukan dengan beberapa tahap pengujian untuk memastikan suatu isolat termasuk PGPR atau tidak. Banyak metode pengujian yang digunakan dalam proses skrining kandidat PGPR, diantaranya adalah uji penambatan nitrogen, pelarutan kalium, pelarutan fosfat, serta produksi *Indole Acetid Acid* (IAA) dan amonia (Agustiyan, 2016).

Skrining bakteri penambat nitrogen umumnya dilakukan dengan mengkultur bakteri pada media bebas N yang mengandung indikator positif berupa *bromtimol blue* (BTB). Media yang umum digunakan untuk pengujian ini adalah JNFB (*James Nitrogen Free Bacteria*), *Yeast Extract Manitol Agar* (YEMA), dan Burks Media (Kifle & Laing, 2016). Bakteri pelarut fosfat diuji dengan menumbuhkan isolat pada media Pikovskaya yang mengandung fosfat anorganik sehingga bakteri kandidat dapat melarutkan fosfat tersebut menjadi organik (Sharma *et al.*, 2013). Selanjutnya pengujian

bakteri pelarut kalium diuji menggunakan media Aleksandrow yang memiliki selektivitas dalam mengisolasi bakteri yang mampu melarutkan kalium dari mineral kalium yang tidak larut. (Hu *et al.*, 2006).

Banyak metode digunakan untuk mendeteksi produksi IAA oleh bakteri, salah satunya adalah uji kolorimetri. Adalah Gordon & Weber, (1951), orang pertama yang melakukan uji kolorimetri menggunakan reagen Salkowski untuk mendeteksi IAA. Metode ini banyak digunakan untuk mendeteksi bakteri dengan kemampuan produksi IAA. Hasil uji Salkowski akan menghasilkan warna merah muda – merah seperti pada Gambar 2.1 (Kamnev *et al.*, 2001). Salah satu metode pengujian produksi amonia oleh bakteri adalah menggunakan reagen Nessler. Pengujian ini didasarkan pada reaksi antara gugus merkuri pada reagen Nessler (K_2HgI_4) dengan NH_2 dalam amonia. Hasil reaksi reagen Nessler dan amonia akan menghasilkan koloid berwarna oranye – coklat (Vogel *et al.*, 1989).



Gambar 2. 3 Hasil pengujian Indole Acetid Acid (Kamnev *et al.*, 2001)

6. Peran PGPR pada Jagung

Peran PGPR pada jagung tidak jauh berbeda dengan tanaman lain. Beberapa spesies PGPR seperti *Azospirillum* memiliki kemampuan untuk memfiksasi nitrogen. Penelitian Cassán *et al.*, (2009) pada bakteri *Azospirillum brasiliense* Az39 serta penelitian Renoud *et al.*, (2022) & Rozier *et al.*, (2017) pada bakteri *Azospirillum lipoferum* CRT1 menunjukkan kemampuan untuk mempercepat proses perkecambahan benih dan perkembangan awal bibit jagung. Kedua strain tersebut mampu memproduksi *Indole Acetid Acid*, *Giberelic Acid* dan *Zinc* ke dalam media kultur dengan konsentrasi yang cukup untuk memberikan perubahan morfologi dan fisiologi pada jaringan benih muda.

Selain berperan dalam mendorong kemampuan benih dan akar, PGPR juga berperan dalam peningkatan hasil panen jagung. Penelitian Chen *et al.*, (2021) terhadap strain PGPR *Sinorhizobium* sp. A15, *Bacillus* sp. A28, *Sphingomonas* sp. A55, dan *Enterobacter* sp. P24 yang diisolasi dari rizosfer jagung di Cina Timur Laut dan diinokulasi secara terpisah secara signifikan terbukti meningkatkan pertumbuhan jagung. Strain A15, A28, dan A55 secara signifikan meningkatkan hasil panen sebanyak 22–29%. Inokulasi strain tersebut juga meningkatkan kelimpahan spesies bakteri di rhizosfer jagung dari *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, dan *Verrucomicrobiae* pada tingkat kelas dan *Mucilaginibacter* pada tingkat genus. Bakteri-

bakteri tersebut diketahui berkorelasi positif dengan produksi biomassa dan hasil panen jagung (Salvo *et al.*, 2018 & Tao *et al.*, 2017).

Penelitian lain terkait peran menguntungkan PGPR pada pertumbuhan dan hasil tanaman tanaman jagung telah dilakukan oleh Breedts *et al.*, (2017) yang menemukan peningkatan hasil mulai dari 24 hingga 34% menggunakan *Paenibacillus alvei*, *Bacillus safensis*, *Bacillus pumilus*, dan *Brevundimonas vesicularis*. Penelitian oleh Kuan *et al.*, (2016) mendapatkan hasil PGPR memberikan alternatif biologis untuk memfiksasi N₂ dari atmosfer dan menunda remobilisasi N pada tanaman jagung untuk meningkatkan hasil panen hingga 30,9% dengan pengurangan dosis pupuk nitrogen. *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, dan *Bacillus velezensis* diketahui berpengaruh positif terhadap bobot tajuk dan akar serta serapan hara pada tanaman jagung (Lobo *et al.*, 2019).

7. Identifikasi Bakteri Menggunakan Gen 16S rRNA

Standar baru identifikasi bakteri mulai dikembangkan pada tahun 1980an. Para peneliti menemukan adanya hubungan filogenetik pada bakteri yang diketahui lewat perbandingan daerah tertentu dari kode genetik yang dihasilkan meliputi gen 5S, 16S dan 23S rRNA (Woese *et al.*, 1985). Diantara ketiga gen tersebut, 16S *Ribosomal Ribonucleic Acid* (16S rRNA) merupakan yang paling banyak digunakan

untuk identifikasi bakteri karena gen 5S dan 23S dinilai terlalu sulit untuk digunakan. Selain untuk identifikasi, gen yang mengkodekan rRNA digunakan juga untuk penentuan filogeni, taksonomi, dan memperkirakan jarak keragaman antar spesies bakteri (Akihary & Kolondam, 2020). Langkah-langkah dalam identifikasi bakteri secara molekuler terdiri dari ekstraksi DNA, amplifikasi dengan gen 16S rRNA, ekektroforesis, sekuensing DNA, dan analisis bioinformatika (Noer, 2021).

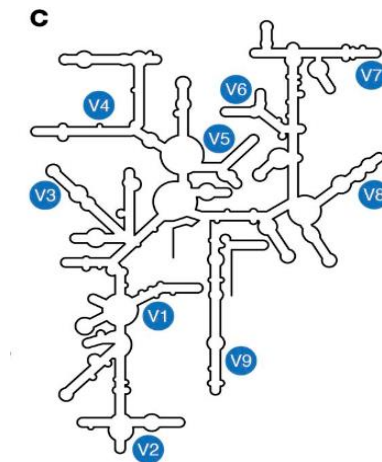
a. Gen 16S rRNA

16S rRNA merupakan gen yang mengkodekan molekul RNA ribosom subunit kecil dari ribosom yang bertanggung jawab atas proses penting dalam mengubah pesan genetik menjadi komponen sel fungsional melalui penerjemahan mRNA menjadi protein. Oleh karena itu, RNA ribosom merupakan komponen dari semua sistem yang dapat mereplikasi diri, mudah diisolasi, dan urutannya berubah secara perlahan seiring berjalannya waktu, sehingga memungkinkan pendeteksian keterkaitan di antara spesies-spesies yang sangat jauh (Woese & Fox, 1977).

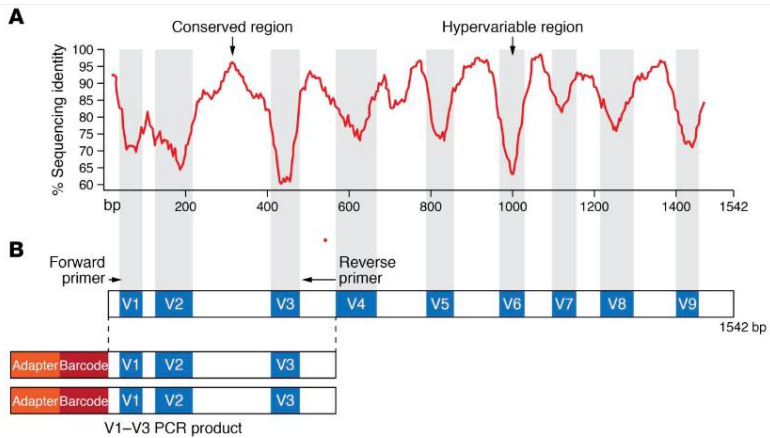
Gen 16S rRNA terdapat pada semua spesies bakteri. Spesies bakteri yang berbeda memiliki satu hingga beberapa salinan gen 16S rRNA (Yarza *et al.*, 2014). Gen 16S rRNA memiliki panjang sekitar 1500 base pair dan mencakup sembilan daerah *hypervariabel* dengan berbagai konservasi (V1-V9) seperti pada Gambar 2.2. Wilayah *conserved* seperti

ditunjukkan pada Gambar 2.3 berguna untuk menentukan taksa dengan peringkat lebih tinggi, sedangkan wilayah *hypervariable* dapat membantu mengidentifikasi genus atau spesies (Kim *et al.*, 2011).

Sekuensing gen 16S rRNA sejauh ini merupakan salah satu metode yang paling umum yang menargetkan *housekeeping gene* untuk mempelajari filogeni bakteri dan klasifikasi genus / spesies. Gen 16S rRNA digunakan sebagai alat untuk mengidentifikasi bakteri pada tingkat spesies dan membantu membedakan antara spesies bakteri yang berkerabat dekat. Selama tahun 2001-2007, penggunaan gen 16S rRNA berhasil mengidentifikasi 215 spesies bakteri baru, 29 di antaranya diklasifikasikan ke dalam genera baru (Wang *et al.*, 2014).



Gambar 2. 4 Skema struktur gen 16S rRNA (Wensel *et al.*, 2022)



Gambar 2. 5 Persentase urutan daerah *conserved* dan *hypervariable* dari gen 16S rRNA bakteri (Wensel *et al.*, 2022)

b. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA merupakan metode untuk memurnikan DNA dengan menggunakan metode fisik dan/atau kimia dari sampel dan memisahkan DNA dari membran sel, protein, dan komponen seluler lainnya. Friedrich Miescher pada tahun 1869 merupakan orang pertama yang melakukan ekstraksi DNA. Prinsip utama dari ekstraksi DNA melibatkan pelisisan sel dan pelarutan DNA yang diikuti dengan metode kimia atau enzimatik untuk menghilangkan makromolekul, lipid, RNA, atau protein pengotor (Gupta, 2019).

Proses lisis bertujuan melepas DNA dari sel dengan cara menghancurkan membran sel dengan enzim lysozyme. Enzim ini akan memotong peptidoglikan yang menjadi penyusun utama dinding sel bakteri untuk selanjutnya dilakukan

penghancuran lapisan lemak pada membran sel menggunakan SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*). Langkah terakhir adalah menghilangkan protein dari DNA dengan menambahkan proteinase K yang dapat mengendapkan protein (Clark & Pazdernik, 2016). Tahap selanjutnya setelah ekstraksi DNA adalah mengkonfirmasi hasil ekstraksi dengan elektroforesis.

c. Elektroforesis

Elektroforesis mengacu pada proses pemisahan molekul bermuatan berdasarkan mobilitasnya dalam medan listrik. Elektroforesis digunakan untuk berbagai tujuan seperti pemisahan, pemurnian, dan karakterisasi asam nukleat dan protein. Elektroforesis memanfaatkan molekul bermuatan yang dibiarkan bermigrasi di bawah pengaruh medan listrik menuju elektroda masing-masing baik secara bebas maupun melalui media pendukung seperti gel (Rana & Joshi, 2023).

Elektroforesis gel agarose menjadi metode yang umum digunakan untuk memisahkan protein, DNA, atau RNA. Molekul asam nukleat yang berukuran kecil dipisahkan dengan bantuan medan listrik di mana molekul bermuatan negatif bermigrasi menuju kutub anoda (positif). Aliran migrasi ditentukan oleh berat molekul di mana molekul dengan berat kecil bermigrasi lebih cepat daripada molekul yang lebih besar (Gummadi & Kandula, 2020).

d. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

PCR dikenal sebagai salah satu teknik yang digunakan untuk memperbanyak segmen DNA tertentu secara *in vitro* (Ghannam & Varacallo, 2022). Metode PCR dapat menghasilkan jutaan salinan fragmen DNA tertentu dari beberapa μl *DNA template* (Kadri & Kadri, 2019). Teknik PCR didasarkan pada replikasi DNA secara enzimatik. Melalui teknik PCR, segmen pendek DNA akan diamplifikasi menggunakan enzim yang dimediasi primer. Selanjutnya DNA Polimerase akan mensintesis untaian DNA baru yang komplementer dengan *DNA template* (Joshi & Deshpande, 2011).

Dalam proses PCR diperlukan komponen utama yang meliputi *DNA template*, primer, buffer, nukleotida (dNTPs) dan enzim Taq Polimerase. *DNA template* merupakan DNA hasil ekstraksi yang akan diamplifikasi. Selanjutnya primer merupakan fragmen DNA berukuran 18-30 basa yang bersifat komplementer terhadap fragmen *DNA template* yang akan diamplifikasi (Ghannam & Varacallo, 2022). Primer berperan sebagai titik awal replikasi dan juga sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi dan sebagai penyedia gugus hidroksil (-OH) pada ujung 3' untuk proses eksistensi DNA (Eling Sasmito *et al.*, 2014).

Enzim Taq polimerase berfungsi untuk mensintesis dan mengamplifikasi untaian DNA. Penggunaan enzim ini harus

disesuaikan dengan buffer dan *DNA template* yang digunakan. Penggunaan yang berlebihan dapat mengamplifikasi DNA pada sekuen yang bukan target, menghasilkan produk yang tidak spesifik. Enzim Taq polimerase diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus* yang tahan panas (Engelke *et al.*, 1990). *Deoxynucleotide triphosphate* (dNTPs) merupakan campuran yang mengandung dATP (*deoxyadenosine triphosphate*), dGTP (*deoxyguanosine triphosphate*), dCTP (*deoxycytidine triphosphate*), dan dTTP (*deoxythymidine triphosphate*) yang berfungsi sebagai *building block* dalam proses PCR. dNTP akan menempel pada gugus -OH pada ujung 3' primer dan membentuk untai yang komplementer dengan *DNA template* (Mohsen *et al.*, 2019). Reaksi PCR membutuhkan pH tertentu agar bisa berjalan, sehingga memerlukan buffer PCR. Selain itu diperlukan juga ion Mg^{2+} yang didapat dari $MgCl_2$ yang berfungsi sebagai kofaktor untuk proses stimulasi DNA polimerase (Schmidt *et al.*, 2014).

Proses PCR dibagi menjadi tiga fase: *denaturation*, *annealing*, dan *extension*. Produk dari setiap langkah sintesis berfungsi sebagai template untuk langkah-langkah berikutnya, sehingga amplifikasi secara eksponensial tercapai. Namun banyak peneliti yang menambahkan fase *pre-denaturation* dan *final extension* seperti Hou *et al.*, (2018); Sebastião *et al.*, (2015); & Yuan *et al.*, (2016). Pada tahap denaturasi, dua untai DNA dipisahkan dengan memanaskannya pada suhu 94-95°C

untuk melepaskan ikatan hidrogen antar untai DNA sehingga diperoleh DNA beruntai tunggal (*single-strand DNA*) (Ghannam & Varacallo, 2022). Tahap kedua adalah penempelan primer (*annealing*) pada template DNA yang telah terurai menjadi untai tunggal. Proses ini terjadi pada suhu antara 36-72°C (Korbie & Mattick, 2008). Menurut Strien *et al.*, (2013) suhu optimal *annealing* berkisar antara 40-60°C, tetapi jika template DNA memiliki kandungan GC yang tinggi, suhunya ditingkatkan menjadi 72°C. Hal ini karena semakin banyak kandungan basa G dan C ikatan hidrogenennya akan semakin kuat.

Tahap PCR ketiga dilakukan pada suhu 72°C, yang disebut pemanjangan. Pada suhu 72°C, enzim Taq polymerase akan mengikat DNA untai tunggal yang telah dipreparasi dan mengkatalisis replikasi menggunakan *Deoxynucleotide triphosphate* yang ada dalam campuran reaksi. Dibutuhkan sekitar 20-40 siklus PCR untuk mendapatkan jumlah DNA yang dapat dianalisis (sekitar 0,1 µg). Setiap siklus secara teoritis menggandakan jumlah DNA yang ada pada siklus sebelumnya (Kadri, 2019). Beberapa peneliti menyarankan untuk menambahkan siklus pemanjangan terakhir pada suhu 72°C, terutama bila sekuen yang diinginkan berukuran besar (lebih besar dari 1 kb) untuk hasil yang lebih maksimal (Verkuil *et al.*, 2008).

e. DNA Sekuensing

DNA sekuensing merupakan metode yang digunakan untuk menganalisis susunan genetik organisme atau jenis sel tertentu yang dapat diterapkan secara luas pada virus, bakteri, jamur, parasit, vektor hewan, dan inang manusia (Evans *et al.*, 2017). DNA menyimpan informasi genetik dalam bentuk urutan nukleotida, dan sekuensing DNA adalah proses untuk menentukan urutan nukleotida dalam molekul DNA (Novel *et al.*, 2010). DNA target yang telah diamplifikasi menggunakan PCR akan disekuensing sehingga dapat diketahui urutan basa nukleotida yang terkode, yang berguna untuk identifikasi spesies.

Terdapat dua metode utama pada DNA sekuensing yang ditemukan pada tahun 1970-an, Maxam-Gilbert dengan metode degradasi kimiawi dan gel poliakrilamida menggunakan label radioaktif (Maxam & Gilbert, 1977), serta Sanger dengan metode terminasi rantai menggunakan label fluoresen (Sanger & Coulson, 1975). Metode Sanger lebih diminati hingga saat ini karena dinilai lebih aman dibandingkan Maxam-Gilbert yang menggunakan bahan radioaktif (Heather & Chain, 2016).

Metode Sanger merupakan teknik sekuensing menggunakan primer oligonukleotida untuk mencari daerah DNA tertentu. Metode Sanger dimulai dengan denaturasi DNA untai ganda. DNA untai tunggal kemudian dianil dengan primer

oligonukleotida dan dipanjangkan dengan menggunakan campuran *deoxynucleotide triphosphates* (dNTPs) yang menyediakan nukleotida dATP (*deoxyadenosine triphosphate*), dGTP (*deoxyguanosine triphosphate*), dCTP (*deoxycytidine triphosphate*), dan dTTP (*deoxythymidine triphosphate*) sebagai *building block* struktur untai ganda yang baru. Selain itu, sejumlah kecil *dideoxynucleotide triphosphates* (ddNTPs) pemutus rantai untuk setiap nukleotida yang ditambahkan pewarna *fluoresen* juga disertakan. Urutan ini akan terus diperpanjang dengan dNTP sampai ddNTP menempel. Karena dNTP dan ddNTP memiliki peluang yang sama untuk menempel pada urutan, setiap urutan akan berakhir dengan panjang yang berbeda-beda. Berdasarkan konvensi, A ditunjukkan dengan fluoresensi hijau, T dengan warna merah, G dengan warna hitam, dan C dengan warna biru. Laser di dalam mesin otomatis yang digunakan untuk membaca urutan mendeteksi intensitas fluoresen yang diterjemahkan menjadi "*peak*" yang selanjutnya dapat dianalisis (Mohammadi & Bavi, 2022).

Metode Sanger saat ini umumnya mendukung analisis sekuens DNA hingga 800-1.000 bp. Keterbatasan utama pada metode Sanger adalah sekuens berkualitas rendah pada 15-40 bp pertama karena pengikatan primer serta ketidakmampuan untuk membedakan perbedaan pasangan basa tunggal pada segmen yang lebih panjang (> 900 bp) (Gomes & Korf, 2017).

f. Analisis Bioinformatika

Kode DNA yang diperoleh dari sekuensing merupakan urutan huruf-huruf yang mewakili struktur primer molekul DNA yang terdiri dari empat huruf berupa A,G,T, dan C yang masing-masing mewakili satu nukleotida *deoxyadenosine triphospate*, *deoxyguanocyne triphospate*, *deoxycytidine triphospate*, dan *deoxythymidine triphospate* (Abbott, 1995). Karakterisasi awal dari sekuen DNA umumnya dilakukan dengan pencarian dan pencocokan gen yang didapat dengan basis data yang bertujuan untuk mengetahui apakah urutan DNA tersebut tersedia atau tidak sehingga dapat diketahui spesies dari gen yang didapat (Koonin & Galperin, 2003).

Beberapa pendekatan untuk memprediksi kesesuaian urutan gen telah dikembangkan dan program populer yang paling sering digunakan untuk analisis hasil sekuensing ini salah satunya adalah BLAST. BLAST merupakan singkatan dari *Basic Local Alignment Search Tool* yang mengacu pada rangkaian program yang digunakan untuk menghasilkan keselarasan antara urutan nukleotida atau protein. Program BLAST akan membandingkan urutan nukleotida atau protein dengan urutan dalam database dan menghitung signifikansi statistik dari kecocokan tersebut (Clarridge, 2004).

Sekuen pembanding yang digunakan pada umumnya disimpan dalam database seperti *GenBank* yang dapat diakses melalui <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, *Database Databank of*

Japan (DDJB) <http://www.ddjb.nig.ac.jp/> serta *European Bioinformatics Institute* (EBI) yang dapat diakses melalui <http://www.ebi.ac.uk/> dimana ketiga database ini saling terhubung dan bertukar data (Chen & Huang, 2009).

B. Kajian Penelitian yang Relevan

Tabel 2. 1 Kajian penelitian yang relevan

Penulis	Judul	Metode	Hasil	Research Gap
(Reid <i>et al.</i> , 2021)	Inorganic Chemical Fertilizer Application to Wheat Reduces the Abundance of Putative Plant Growth Promoting Rhizobia	Menanam gandum pada pot berisi tanah yang diberi perlakuan pemupukan dan tidak dalam rumah kaca, selanjutnya mendeteksi kelimpahan bakteri menggunakan gen 16S rRNA	Penambahan pupuk NPK secara nyata mengurangi proporsi bakteri pelarut hara.	Sampel yang diambil dari percobaan di rumah kaca kemungkinan besar akan memberikan hasil yang berbeda dengan sampel yang diambil langsung di lapangan, selanjutnya perbedaan jenis tanaman yang akan digunakan juga membuka peluang adanya perbedaan pada hasil penelitian.

Tabel 2.1 Lanjutan

(Nascim ento <i>et</i> <i>al.</i> , 2020)	Effect of Chemical Fertilization on the Impacts of Plant Growth- Promoting Rhizobacteria in Maize Crops	Melakukan inokulasi beberapa spesies bakteri pada tanah terpupuk dan tidak terpupuk kimia dengan bakteri untuk dihitung total nitrogen dan fosfat pada akar dan daun jagung	Bakteri menunjukkan kinerja yang baik terkait dengan pertumbuhan tanaman di bawah kondisi pemupukan	Penelitian ini belum mengamati terkait ada tidaknya perbedaan spesies bakteri dari tanah terpupuk dan tidak terpupuk serta isolat yang digunakan tidak diisolasi langsung dari lapangan sehingga asal isolat yang berbeda ini dimungkinkan menghasilkan aktivitas yang berbeda.
--	--	--	--	--

Tabel 2.1 Lanjutan

(W. Lin <i>et al.</i> , 2019)	The effects of chemical and organic fertilizer usage on rhizosphere soil in tea orchards	Menggunakan High throughput sequencing technology & Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) untuk menghitung kelimpahan spesies bakteri serta kandungan bahan organik tanah	Aplikasi pupuk organik meningkatkan pH dan kelimpahan beberapa bakteri serta memperbaiki kandungan tanah	Objek pengujian yang digunakan berbeda, penelitian ini dilakukan terhadap tanaman teh, kondisi tanah antara perkebunan teh dan ladang jagung terdapat banyak perbedaan yang mempengaruhi hasil penelitian, kemudian penelitian ini belum meneliti terkait aktivitas bakteri yang ditemukan.
-------------------------------------	--	---	---	---

Tabel 2.1 Lanjutan

(Guo <i>et al.</i> , 2018)	Bacterial Rather Than Fungal Community Composition Is Associated With Microbial Activities And Nutrient-Use Efficiencies In A Paddy Soil With Short-Term Organic Amendments	Mengkarakterisasi peran bakteri dengan parameter geometric mean of the assayed enzyme activities (GMea) dan rasio penggunaan karbon melalui carbon use efficiency:nitrogen -use efficiency ratio (CUE:NUE) & mengidentifikasi spesies bakteri menggunakan Gen 16S & ITS rRNA	GMea meningkat secara signifikan pada tanah yang diubah secara organik. Sebaliknya, CUE:NUE paling tinggi pada tanah yang diolah secara kimiawi	Penelitian ini menggunakan sampel tanah dari daerah beriklim subtropis, perbedaan iklim akan mempengaruhi jenis bakteri dan tingkat aktivitas yang berbeda sehingga hal ini menjadi kebaruan dari penelitian yang dilakukan. Yang kedua sampel yang digunakan dalam penelitian tersebut merupakan tanah dengan praktek pertanian gandum dan jagung bergilir, sehingga memiliki pengaruh secara langsung terhadap aktivitas beberapa spesies PGPR.
----------------------------	---	--	---	--

Tabel 2.1 Laniutan

(Z. Liu <i>et al.</i> , 2017)	Effects of inorganic and organic amendment on soil chemical properties, enzyme activities, microbial community and soil quality in yellow clayey soil	Melakukan eksperimen pemupukan dengan pupuk kimia yang dikombinasikan dengan pupuk hijau, jerami, dan kotoran babi pada lahan jagung dengan tipe tanah lempung untuk selanjutnya melakukan pengukuran kesuburan tanah dan kelimpahan bakteri dengan menggunakan metode PLFA (<i>Phospholipid Fatty Acid Analysis</i>)	Perlakuan pupuk kimia yang dicampur dengan kotoran babi menunjukkan hasil analisis kelimpahan komunitas terbaik dibandingkan dengan jerami dan pupuk hijau serta secara signifikan mengubah aktivitas enzim dan hasil panen padi setelah tiga musim panen.	Metode pada penelitian ini berfokus untuk membandingkan campuran pupuk kimia dengan bahan lain dan belum meneliti terkait perbedaan komunitas dan aktivitas enzimatik bakteri dari tanah yang tidak terpupuk. Tanaman uji yang dipilih berbeda dengan penelitian yang akan dilakukan dimana komunitas bakteri yang mengkolonisasi akar padi dan jagung memiliki perbedaan.
-------------------------------	---	---	--	--

Tabel 2.1 Lanjutan

(Y. Zhang <i>et al.</i> , 2017)	Fertilization shapes bacterial community structure by alteration of soil pH	Menentukan keanekaragaman bakteri tanah yang telah dipupuk dengan pupuk kimia NPK dan pupuk kandang selama 7 tahun pada lahan rotasi jagung dan sayuran dengan 454 pyrosequencing wilayah V1-V3 dari Gen16S rRNA	Menemukan bahwa struktur komunitas bakteri dipengaruhi oleh pH tanah yang berubah seiring praktek pemupukan yang dilakukan.	Penelitian ini berfokus membandingkan komunitas bakteri pada tanah yang dipupuk kimia dan pupuk kandang melalui berubahnya pH tanah serta belum secara spesifik meneliti terkait adanya perbedaan aktivitas antara bakteri dari kedua kedua sampel tanah tersebut.
---------------------------------	---	--	---	--

C. Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini adalah:

H_0 : tidak terdapat perbedaan aktivitas *Plant Growth Promoting Rhizobia* dari tanah terpupuk dan tidak terpupuk kimia dalam menginduksi pertumbuhan jagung.

H_1 : terdapat perbedaan aktivitas *Plant Growth Promoting Rhizobia* dari tanah terpupuk dan tidak terpupuk kimia dalam menginduksi pertumbuhan jagung.

D. Pandangan Islam terhadap Kerusakan Lingkungan

Unity of Science penelitian ini mengambil salah satu ayat Al-Qur'an tentang Allah yang memperingatkan bahwa kerusakan lingkungan disebabkan ulah manusia yang terdapat dalam surat Ar-Rum ayat 41 yang berbunyi :

ظَهَرَ الْفَسَادُ فِي الْبَرِّ وَالْبَحْرِ بِمَا كَسَبَتْ أَيْدِي النَّاسِ لِيُذِيقَهُمْ بَعْضَ
الَّذِي عَمِلُوا لَعَلَّهُمْ يَرْجِعُونَ

Artinya : Telah nampak kerusakan di darat dan di laut disebabkan karena perbuatan tangan manusia, supaya Allah merasakan kepada mereka sebahagian dari perbuatan mereka, agar mereka kembali (Q.S. Ar-Rum : 41)(Al-Qur'an dan Terjemahnya, Kemenag RI, 1992).

Dalam kitab *Tafsir Ibnu Katsir* dijelaskan *asbabun nuzul* ayat ini yang menjadi petunjuk berkurangnya hasil pertanian disebabkan perbuatan manusia yang serakah dan melampaui

batas (dalam kasus ini penggunaan pupuk kimia berkepanjangan) (Al-Dimasyqî, 1978). Selanjutnya Ahmad Mustafâ Al-Marâgî menambahkan dalam *Tafsir al-Marâgî* bahwa kerusakan-kerusakan yang terjadi disebabkan manusia yang lalai dan selalu menuruti hawa nafsu seperti menginginkan hasil panen yang sebanyak-banyaknya sehingga tidak sadar telah menimbulkan kerusakan bagi dirinya sendiri (Al-Marâgî, 1974).

BAB III

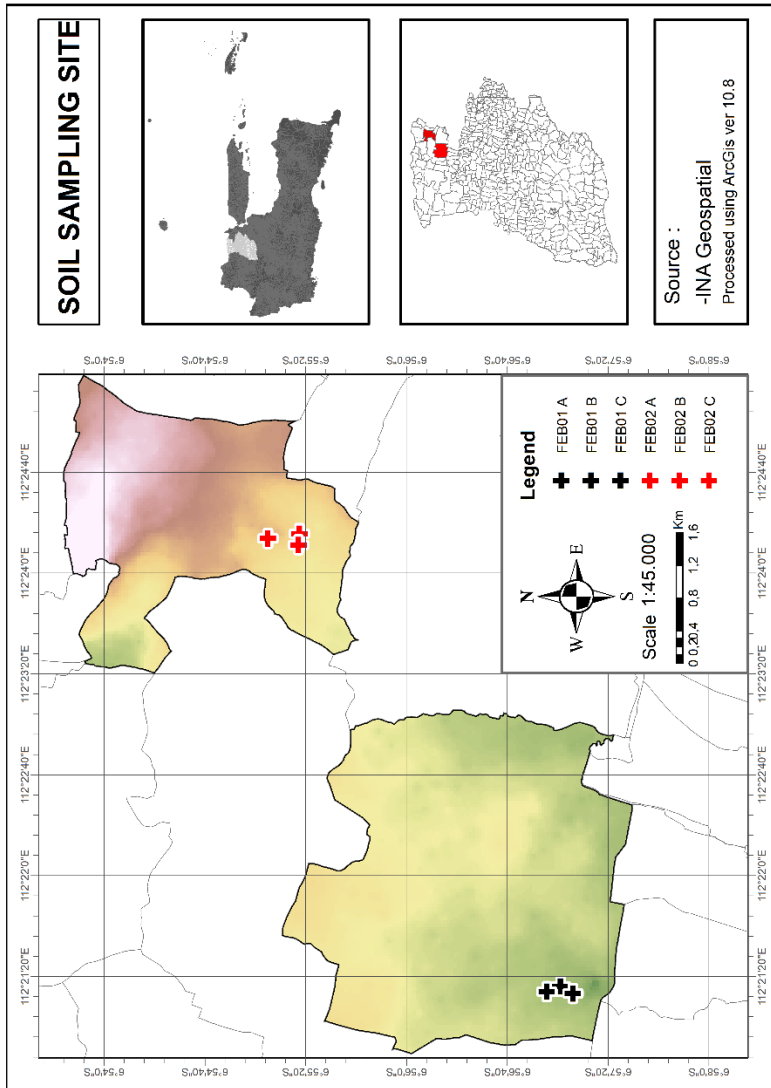
METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Pengambilan sampel tanah terpupuk kimia (FEB01) dilakukan di ladang pertanian Desa Solokuro, Kec. Solokuro, Kab. Lamongan (Gambar 3.1a). Kemudian sampel tanah tidak terpupuk kimia (FEB02) diambil di kawasan hutan Desa Dagan, Kec. Solokuro. Kab Lamongan (Gambar 3.1b). Peta penelitian selengkapnya dapat dilihat Gambar 3.2. Tahapan isolasi bakteri dan isolasi DNA dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi UIN Walisongo Semarang. Tahap sekuensing dilakukan di 1st Base, Malaysia. Penelitian dilakukan pada September 2023 – Februari 2024.



Gambar 3. 1 Lokasi pengambilan sampel tanah terpupuk kimia (a) dan tanah tidak terpupuk (b)



Gambar 3. 2 Peta lokasi pengambilan sampel tanah terpupuk kimia dan tidak terpupuk (dokumentasi penelitian, diolah menggunakan ArcGis ver 10.8)

B. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah tabung reaksi (Iwaki), cawan petri (Anumbra), erlenmeyer (Schott Durant), gelas ukur (Schott Durant), gelas beaker (Schott Durant), ice box (Penguin), vortex (Bio-Rad BR-2000), neraca analitik (Mettler Toledo ME 204), autoklaf (Hirayama Hiclave™ HVE 50), *hot plate magnetic stirrer* (Benchmark H3760-HSE), inkubator (INB 400 Memmert), oven (UN 55 Memmert), freezer (ESCO HP2-4003-1), kulkas (Samsung RT29K503JBI/SE), cooled inkubator (FOC-120 E), *Bio Safety Cabinet* (ESCO AC2-4E8), spektrofotometer (Thermo Fisher Scientific GENESYS 30), kit elektroforesis (Mupid-EX), mikropipet (Bio-Rad), Tip (1000 µl, 200 µl, dan 10 µl), *refrigerated micro centrifuge* (Ependdordf 5424R), *laminar air flow* (LAF) (ESCO LVG-4AG-F8), *thermal cyclcer* (SimpliAmp ENGL326), *gel documentation* (Gel Doc™ EZ Imager), colony counter (Funke Gerber 8500-8174), mikroskop binokuler (Meiji Techno MT-30), optilab (SN: MTN 031210092 V2), spatula, batang spreader, ose bulat, jangka digital, conical tube 50 ml, cutter, dan penggaris 30 cm.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah akuades, NaCl (Himedia) Fisiologis, benih jagung hibrida (BISI 2), agar powder (Himedia), burk's agar (Merck), Pikovskaya

agar (Himedia), nutrien broth (Himedia), Aleksandrow agar (Himedia), *peptone bacteriological* (Himedia), *yeast extract granulated* (Merck), lactose broth (Merck), *indole-3 acetic acid* (Merck), *L-tryptophan* (Merck), reagen nessler (Himedia), reagen salkowski (Himedia), crystal violet (Himedia), iodine (Himedia), gram decolourizer (Himedia), gliserol (Merck), *bromothymol blue* (Merck), *hydrochloride acid* (HCL) (Merck), *sodium hydroxide* (NaOH) (Merck), *sodium hypochlorite* (NaOCl) (Merck), minyak immersi (Sigma Aldrich), microtube 1,5 ml, *Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit Protocol* (Geneaid Lot No: FH36208-S (100 Preps) yang berisi (proteinase K, lysozyme, gram+ buffer, GT buffer, GB buffer, elution buffer, GD column, W1 buffer, wash buffer, serta collection tube 1,5 ml)), gel red, tris-borate-EDTA (TBE 1X), primer forward 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), primer reverse 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), PCR mix (MyTaq HS Red Mix 2X [Bioline]), bubuk agarose, dan ddH₂O.

C. Metode

1. Koleksi Sampel Tanah

Koleksi sampel tanah terpupuk dan tidak terpupuk kimia (selanjutnya disebut FEB01 untuk tanah terpupuk dan FEB02 untuk tanah tidak terpupuk) dilakukan mengikuti protokol Dlamini *et al.*, (2023). Sampel FEB01 diambil dari rhizosfer jagung yang tumbuh di lahan pertanian Desa Solokuro, Kec.

Solokuro, Kab. Lamongan, Jawa Timur dengan mencabut jagung dan menggoncangkannya untuk menghilangkan tanah yang melekat, selanjutnya tanah yang masih menempel pada akar jagung diambil sebanyak 15 gram dari masing-masing lokasi sampling menggunakan spatula dan disimpan pada corning tube steril. Sampel FEB02 diambil di kawasan hutan Desa Dagan, Kec. Solokuro. Kab Lamongan, Jawa Timur pada daerah sekitar perakaran tumbuhan *Poaceae* menggunakan cara yang sama dengan sampel tanah terpupuk kimia. Setiap sampel tanah diambil dari tiga lokasi berbeda menggunakan teknik random sampling dan dicampur hingga homogen dalam *conical tube* 50 ml kemudian disimpan pada *ice box* berisi es dan dibawa ke laboratorium dalam waktu 24 jam.

2. Preparasi Media

Media yang digunakan pada penelitian ini adalah Burk's agar, Pikovskaya agar, dan Aleksandrow agar.

a. Preparasi Media Burk's Agar

Prosedur pembuatan media Burk's mengikuti protokol pabrikan (Himedia, 2020). Sebanyak 21,3 gram bubuk media Burk's Agar dilarutkan kedalam 1000 ml akuades kemudian dipanaskan hingga mendidih dan disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. pH media disesuaikan menjadi $7,0 \pm 0,2$ melalui penambahan 1N HCL dan 1N NaOH sebelum sterilisasi.

b. Preparasi Media Pikovskaya

Prosedur pembuatan media Pikovskaya mengikuti protokol pabrikan (Himedia, 2015). Sebanyak 31,1 gram bubuk media Pikovskaya agar dilarutkan dalam 1000 ml akuades kemudian dipanaskan hingga mendidih dan disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Sebelum dilakukan sterilisasi pH media terlebih dahulu disesuaikan menjadi $7,0 \pm 0,2$ melalui penambahan 1N HCL dan 1N NaOH.

c. Preparasi Media Aleksandrow Agar

Prosedur pembuatan media Aleksandrow agar mengikuti protokol pabrikan (Himedia, 2019). Sebanyak 29,60 gram bubuk media Aleksandrow agar dilarutkan kedalam 1000 ml akuades kemudian dipanaskan hingga mendidih dan disterilisasi selama 15 menit pada suhu 121°C . Sebelum dilakukan sterilisasi pH media terlebih dahulu disesuaikan menjadi $7,0 \pm 0,2$ melalui penambahan 1N HCL dan 1N NaOH.

3. Isolasi Bakteri Kandidat PGPR

Isolasi bakteri yang berpotensi sebagai *Plant Growth Promoting Rhizobia* (PGPR) dilakukan menggunakan metode pengenceran bertingkat. Sampel yang dikumpulkan diencerkan hingga 10^{-5} yang merupakan rata-rata pengenceran untuk isolasi bakteri pada sampel tanah (Ben & Davidson, 2014). Metode *spread plate* digunakan untuk isolasi

PGPR menggunakan media selektif Burk's Agar, Pikovskaya agar, dan Aleksandrow agar.

a. Isolasi Bakteri Penambat Nitrogen

Diinokulasikan sebanyak 200 µl sampel hasil tiap pengenceran sampel FEB01 dan FEB02 ke media Burk's Agar untuk selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C selama lima hari (Widawati & Suliasih, 2018). Hasil positif ditandai dengan terbentuknya zona bening disekeliling koloni. Bakteri positif selanjutnya dimurnikan pada media Burk's agar yang baru guna mendapatkan kultur murni.

b. Isolasi Bakteri Pelarut Fosfat

Sebanyak 200 µl hasil tiap pengenceran sampel FEB01 dan FEB02 diinokulasikan ke media Pikovskaya agar dan selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C selama empat hari (Sharma *et al.*, 2017). Koloni dengan kemampuan pelarutan fosfat akan membentuk zona bening disekelilingnya. Koloni yang memiliki kemampuan pelarutan fosfat selanjutnya dikultur ulang pada media Pikovskaya agar baru guna mendapatkan kultur murni (Gupta *et al.*, 2022).

c. Isolasi Bakteri Pelarut Kalium

Sebanyak 200 µl hasil tiap pengenceran sampel FEB01 dan FEB02 diinokulasikan ke media Aleksandrow agar kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama empat hari. Bakteri yang tumbuh dan membentuk zona bening disekelilingnya menandakan kemampuan aktivitas

pelarutan kalium (Etesami *et al.*, 2017). Bakteri positif selanjutnya dikultur pada media Aleksandrow agar baru untuk mendapatkan kultur murni.

4. Uji Pendahuluan Isolat PGPR

Uji pendahuluan dilakukan dengan menggunakan tiga pengujian yaitu uji penambatan nitrogen, uji kemampuan melarutkan fosfat, dan uji kemampuan melarutkan kalium.

a. Uji Penambatan Nitrogen

Uji penambatan nitrogen dilakukan dengan metode dari Sun *et al.*, (2018). Kultur bakteri dari sampel FEB01 dan FEB02 yang disimpan sebelumnya ditumbuhkan dengan metode *spot inoculation* pada media Burk's agar dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam. Zona bening yang terbentuk disekitar koloni diukur menggunakan jangka digital dan dihitung menggunakan rumus Indeks Kelarutan Nitrogen oleh Aasfar *et al.*, (2021).

$$\text{Indeks Kelarutan Nitrogen (IKN)} = \frac{dk + dzb}{dk}$$

Keterangan : (Persamaan 3. 1)

dzb : diameter zona bening

dk : diameter koloni

Isolat dengan indeks penambatan nitrogen tertinggi dari masing-masing sampel selanjutnya dipurifikasi dan disimpan pada suhu -20°C dalam media gliserol 30%

sebagai *stock culture*. Apabila didapati ketidaksesuaian hasil pengujian menggunakan media Burks, maka media uji diganti menggunakan media Ashby agar yang merupakan media selektif bakteri pelarut nitrogen *Azotobacter* sp.. koloni dengan ciri permukaan datar, berwarna putih mengkilap, dengan bentuk koloni berupa bulatan-bulatan kecil selanjutnya dipurifikasi guna digunakan untuk uji lanjutan (Shi *et al.*, 2023).

b. Uji Pelarutan Fosfat

Uji pelarutan fosfat dilakukan mengikuti metode Gupta *et al.*, (2022). Kultur bakteri dari sampel FEB01 dan FEB02 yang disimpan sebelumnya ditumbuhkan pada media Pikovskaya agar dengan metode *spot inoculation* dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 72 jam. Zona bening yang terbentuk di sekeliling isolat diukur setiap 48 jam hingga 168 jam. Zona bening yang terbentuk dihitung menggunakan rumus Indeks Kelarutan Fosfat oleh Karpagam & Nagalakshmi, (2014)

$$\text{Indeks Kelarutan Fosfat (IKF)} = \frac{dk+dz_b}{dk}$$

Keterangan :

Persamaan 3. 2

dz_b : diameter zona bening

dk : diameter koloni

Berdasarkan hasil pengukuran IKF, diambil 1 isolat dari masing-masing sampel dengan nilai IKF tertinggi untuk dipurifikasi dan disimpan untuk *stock culture* pada suhu -20°C dalam media gliserol 30%.

c. Uji Pelarutan Kalium

Uji pelarutan kalium menggunakan metode dari Prajapati & Modi, (2012) dengan modifikasi dari Rajawat *et al.*, (2016). Isolat bakteri dari sampel FEB01 dan FEB02 yang disimpan sebelumnya ditumbuhkan dengan metode *spot inoculation* pada media Aleksandrow yang telah ditambahkan *bromothymol blue* (BTB) 100mg/L. Isolat selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C selama 72 jam. Zona bening yang terbentuk selanjutnya diukur menggunakan jangka digital dan dihitung berdasarkan rumus Kelarutan Kalium oleh Sood *et al.*, (2023).

$$\text{Indeks Kelarutan Kalium} = \frac{dzb + dk}{dk}$$

Keterangan :

Persamaan 3. 3

dzb : diameter zona bening

dk : diameter koloni

Berdasarkan hasil pengukuran indeks kelarutan kalium, diambil satu isolat dari masing-masing sampel dengan indeks kelarutan kalium tertinggi sebagai *stock culture* dan disimpan pada suhu -20°C dalam media gliserol 30%.

5. Uji Lanjutan Isolat PGPR

Enam isolat dengan hasil uji pendahuluan tertinggi selanjutnya diberi kode PGPR-N1, PGPR-P1 dan PGPR-K1 untuk isolat hasil uji penambatan nitrogen, fosfat dan kalium pada sampel tanah terpupuk kimia (FEB01), serta kode PGPR-N2, PGPR-P2 dan PGPR-K2 untuk isolat hasil uji yang sama pada sampel tanah tidak terpupuk (FEB02).

a. Uji produksi *Indole Acetid Acid* (IAA)

Uji produksi IAA dilakukan mengikuti protokol Gordon & Weber, (1951) menggunakan modifikasi Hyder *et al.*, (2021) dengan menambahkan L-Triptofan kedalam media pengujian. Enam isolat terdiri dari 3 isolat FEB01 dan 3 isolat FEB02 hasil pengujian sebelumnya ditumbuhkan pada media LB dengan 0,5 mg L-Triptofan/ml dan diinkubasi pada suhu $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 5 hari. Hasil inkubasi disentrifugasi pada kecepatan 3.000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang terdiri dari 2 ml alikuot ditambahkan dengan dua tetes asam ortofosfat dan 4 ml reagen Salkowaski kemudian diinkubasi pada suhu ruang dalam keadaan gelap selama 20 menit. Perubahan warna merah muda - merah mengindikasikan produksi IAA. Nilai absorbansi IAA diukur pada panjang gelombang 530 nm menggunakan spektrofotometer sebanyak tiga kali pengulangan pengukuran untuk selanjutnya konsentrasi

IAA diukur dengan kurva standar yang dibuat dari larutan IAA murni .

Kurva standar dibuat menggunakan IAA sintetis dengan konsentrasi 0, 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 µg/ml dan diabsorbansi pada panjang gelombang 530 nm dengan tujuan memperoleh nilai regresi sebagai acuan penghitungan nilai absorbansi sampel dengan rumus

$$Y' = a + bX$$

Persamaan 3. 4

menggunakan Microsoft Excel versi 2019. Nilai regresi selanjutnya digunakan sebagai acuan pengukuran sampel dengan memasukkan nilai rata-rata absorbansi sampel sebagai nilai y guna mencari nilai x yang merupakan nilai IAA yang dihasilkan sampel.

b. Uji produksi Amonia

Uji produksi amonia mengikuti protokol Bhattacharyya *et al.*, (2020) dengan menumbuhkan enam isolat yang terdiri dari 3 isolat FEB01 dan 3 isolat FEB02 hasil pengujian sebelumnya dalam 4% kaldu pepton dan diinkubasi pada suhu 30°C selama tujuh hari. Setelah inkubasi, ditambahkan 500 µl reagen Nessler kedalam suspensi bakteri, perubahan warna coklat ke kuning/oranye menunjukkan produksi amonia oleh bakteri dan semakin pekat warna yang dihasilkan menandakan jumlah ammonia yang semakin banyak.

6. Identifikasi Morfologi Koloni dan Sel

Identifikasi morfologi koloni dilakukan dengan mengamati bentuk, elevasi, dan warna koloni. Kemudian dilanjutkan dengan identifikasi morfologi sel melalui tiga tahap pewarnaan gram mengikuti protokol Tripathi & Sapra, (2022) yang meliputi :

a. Preparasi

Isolat diambil sebanyak satu ose dan diratakan diatas slide yang telah ditetesi akuades steril membentuk lingkaran. Slide selanjutnya dibakar diatas bunsen secara melingkar untuk mengeringkan isolat dan memperkuat penempelan isolat pada slide.

b. Pewarnaan Gram

Crystal violet ditetaskan pada slide yang telah mengering dan didiamkan selama 60 detik, selanjutnya crystal violet dibuang dan slide dibilas dengan air mengalir untuk menghilangkan sisa noda. Selanjutnya ditambahkan iodine sebagai penguat warna dan didiamkan selama 60 detik untuk selanjutnya dibuang dan dibilas guna menghilangkan sisa iodine. Selanjutnya ditetaskan *decolorizer* untuk menghilangkan pewarna selama lima detik dan langsung dibilas dengan air mengalir untuk menghindari pelarutan warna berlebih. Langkah terakhir ditambahkan Basic Fuchsin selama 60 detik dan dibilas

dengan air mengalir. Air sisa pembilasan dikeringkan menggunakan kertas saring.

c. Pengamatan Mikroskopis

Slide diamati dibawah mikroskop menggunakan perbesaran 40x untuk mencari sel bakteri yang terbaik, selanjutnya dilanjutkan dengan perbesaran 100x dengan penambahan minyak immersi untuk memperjelas hasil pengamatan.

7. Uji Aktivitas PGPR Terhadap Pertumbuhan Jagung

Uji aktivitas PGPR menggunakan protokol dari Joko *et al.*, (2015) dengan modifikasi pada tahap sterilisasi biji jagung. Langkah pengujian adalah sebagai berikut :

a. Persiapan Tanaman Uji pada Kultur *in vitro*

Benih jagung (BISI 2) disterilisasi dengan larutan NaOCl 2% selama 2 menit, benih yang tenggelam di dasar gelas beaker kemudian direndam selama 30 detik dalam ethanol 95% dan selanjutnya dibilas menggunakan akuades steril dan ditiriskan pada kertas saring steril. Selanjutnya benih dikecambahkan dalam cawan petri yang telah dialasi dengan kertas saring steril yang dibasahi dengan akuades steril, tiap cawan petri diisi lima benih jagung dan diinkubasi pada suhu 30°C dalam inkubator selama dua hari (Parnell *et al.*, 2023).

b. Pemanenan pelet bakteri.

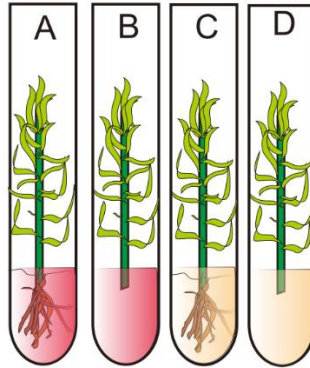
Enam isolat dari sampel FEB01 dan FEB02 hasil uji aktivitas dibiakkan dalam media YPA (*Yeast Peptone Agar*) 2% selama 48 jam pada suhu 30°C, selanjutnya diambil koloni tunggal untuk diperbanyak pada media YPB (*Yeast Peptone Broth*) dan digojog selama 24 jam. Suspensi bakteri disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Pelet yang diperoleh diresuspensi dengan akuades steril hingga mencapai volume 400 ml untuk digunakan pada perlakuan terhadap kecambah jagung.

c. Pengujian Aplikasi PGPR

Jagung berumur dua hari diukur tinggi batang, panjang akar serta dihitung jumlah daunnya untuk digunakan pada sepuluh perlakuan dengan tiap perlakuan diulang tiga kali :

1. Akar jagung tidak dipotong, kemudian direndam dalam larutan bakteri selama 1 jam dan ditumbuhkan pada media agar tanpa triptofan (perlakuan A1).
2. Akar jagung dipotong, kemudian direndam dalam larutan bakteri selama 1 jam dan ditumbuhkan pada media agar tanpa triptofan (perlakuan A2).
3. Akar jagung tidak dipotong kemudian direndam dalam larutan bakteri selama 1 jam dan ditumbuhkan pada media agar triptofan 0,01% (perlakuan B1).

4. Akar jagung dipotong kemudian direndam dalam larutan bakteri selama 1 jam dan ditumbuhkan pada media agar triptofan 0,01% (perlakuan B2).
5. Akar jagung tidak dipotong kemudian ditumbuhkan pada media agar tanpa triptofan dan disiram dengan 0,5ml larutan bakteri satu hari setelah tanam (perlakuan C1).
6. Akar jagung dipotong kemudian ditumbuhkan pada media agar triptofan 0,01% dan disiram dengan 0,5ml larutan bakteri satu hari setelah tanam (perlakuan C2).
7. Akar jagung dipotong, kemudian ditumbuhkan pada media agar tanpa triptofan (kontrol A1).
8. Akar jagung tidak dipotong, kemudian ditumbuhkan pada media agar tanpa triptofan (kontrol A2).
9. Akar jagung dipotong kemudian ditumbuhkan pada media agar triptofan 0,01% (kontrol B&C1).
10. Akar jagung tidak dipotong kemudian ditumbuhkan pada media agar triptofan 0,01% (kontrol B&C2).



Gambar 3. 3 Desain pengujian aktivitas bakteri pada pertumbuhan jagung (Dokumentasi Penelitian)

Keterangan :

- A. Bibit jagung tanpa pemotongan akar di agar triptofan.
 - B. Bibit jagung dengan akar dipotong di agar triptofan.
 - C. Bibit jagung tanpa pemotongan akar di agar air.
 - D. Bibit jagung dengan akar dipotong di agar air.
- d. Variabel pengamatan

Pengamatan dilakukan selama tujuh hari terhadap lima variabel meliputi panjang akar, tinggi tanaman, berat basah, berat kering serta jumlah daun. Variabel tinggi tanaman diamati dengan melakukan dokumentasi terhadap seluruh tanaman selama tujuh hari dalam tabung reaksi, variabel panjang akar diamati dengan mengeluarkan jagung dari tabung reaksi dan difoto pada hari ketujuh, selanjutnya hasil dokumentasi panjang akar dan tinggi tanaman diukur menggunakan software ImageJ, tinggi tanaman diukur dari

pangkal batang hingga ujung daun muda tertinggi, panjang akar diukur mulai pangkal hingga ujung akar primer (Roberts *et al.*, 2023). Selanjutnya berat basah tajuk dan akar pada hari ke tujuh dan berat kering tajuk dan akar setelah dioven selama dua hari pada suhu 80°C untuk menghilangkan kandungan air ditimbang menggunakan neraca analitik.

8. Analisis Statistik

Data yang diperoleh dari uji aktivitas PGPR terhadap pertumbuhan jagung meliputi panjang akar, tinggi tanaman, berat kering, berat basah, serta jumlah daun selanjutnya dianalisis menggunakan *one way Analysis of Variance* (ANOVA) pada aplikasi SPSS versi 22 dengan taraf signifikansi 95% ($P < 0,05$) untuk mengetahui perbedaan hasil pemberian isolat dari tanah terpupuk dan tidak terpupuk terhadap variabel yang diamati. Apabila hasil uji anova menyatakan perbedaan tidak signifikan yang ditandai dengan nilai signifikansi $> 0,05$, dilakukan uji post-hoc berupa uji Duncan untuk membandingkan rata-rata pada setiap perlakuan. Sebelum dilakukan uji *one way* ANOVA, terlebih dahulu dilakukan uji normalitas Shapiro-Wilk dan Kolmogorov-smirnov guna melihat kenormalan distribusi data. Apabila didapati data berdistribusi normal yang dibuktikan dengan nilai sig $> 0,05$ maka uji *one way* ANOVA dapat dilakukan, namun apabila data tidak berdistribusi normal yang ditandai dengan nilai sig $< 0,05$

maka uji *one way* ANOVA diganti menggunakan uji statistik non-parametrik Kruskal-Walis.

Selanjutnya dilakukan uji *one way Analysis of Variance* (ANOVA) untuk menentukan isolat asal tanah terpupuk dan tidak terpupuk yang memiliki pengaruh tertinggi terhadap keempat variabel serta variasi pemotongan akar, penggunaan media agar dan triptofan serta perlakuan perendaman dan penyiraman benih guna mengetahui signifikansi hasil variasi yang dilakukan dengan menggunakan data panjang akar sebagai data inputnya. Apabila hasil uji ANOVA menyatakan perbedaan antar isolat tidak signifikan dilakukan uji Duncan guna melihat rata-rata pengaruh setiap isolat (Waday *et al.*, 2022). Berdasarkan hasil analisis statistik diambil dua isolat dengan pengaruh terbesar terhadap pertumbuhan jagung masing-masing dari tanah terpupuk dan tidak terpupuk guna dilakukan identifikasi secara molekular.

9. Identifikasi Molekuler Menggunakan Gen 16S rRNA

a. Isolasi Genom Bakteri

Genom bakteri diekstraksi menggunakan protokol *Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit Protocol*. Protokol isolasi dibagi menjadi lima bagian sebagai berikut :

1) Preparasi Sampel

Satu isolat dari masing-masing sampel dengan hasil uji aktivitas tertinggi ditumbuhkan pada media NB dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam. Selanjutnya

biakan divortex hingga homogen kemudian disiapkan microtube 1,5 ml dan diberi label sesuai sampel masing-masing. Isolat bakteri gram negatif dan gram positif diperlakukan secara berbeda.

a) Gram Negatif

Sebanyak 200µl biakan bakteri yang telah dihomogenkan dimasukkan ke microtube 1,5 ml kemudian disentrifugasi pada kecepatan 15.000 rcf selama satu menit. Selanjutnya supernatan yang dihasilkan dibuang dan jika pelet yang didapat masih kurang langkah tersebut diulangi hingga pelet dirasa cukup. Setelah pelet mencukupi selanjutnya ditambahkan 180µl GT Buffer kedalam microtube dan dihomogenkan dengan vortex. Setelah homogen kemudian ditambahkan 20µl Proteinase K kedalam microtube dan selanjutnya diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit dengan setiap tiga menit sekali microtube dibalik untuk meratakan proses pemanasan.

b) Gram Positif

Sebanyak 200µl biakan bakteri yang telah dihomogenkan dimasukkan kedalam microtube 1,5 ml kemudian disentrifugasi pada kecepatan 15.000 rcf selama satu menit. Selanjutnya supernatan yang dihasilkan dibuang dan jika pelet yang didapatkan dirasa kurang maka diulangi lagi langkah pertama. Langkah selanjutnya sebanyak 0,8 mg bubuk Lysozyme ditimbang dan

dimasukkan kedalam microtube baru kemudian ditambahkan 200µl Gram+ Buffer dan dihomogenkan dengan vortex. Kemudian sebanyak 200µl larutan Lysozyme dipindahkan kedalam microtube berisi pelet dan dihomogenkan dengan vortex dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit dengan setiap 10 menit sekali microtube dibalik untuk meratakan pemanasan. Selanjutnya ditambahkan 20µl Proteinase K dan dihomogenkan kemudian diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit dan dibolak-balik tiap 3 menit.

2) Tahap Lisis

Sebanyak 200µl GB Buffer ditambahkan kedalam sampel hasil preparasi dan dihomogenkan selama 10 detik menggunakan vortex. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 70°C selama 10 menit dan dibolak-balik tiap tiga menit sekali guna memastikan sampel benar-benar lisis.

Pada tahap ini Elution Buffer yang digunakan pada tahap elusi dipanaskan pada suhu 70°C.

3) Tahap DNA Binding

Sebanyak 200µl etanol absolut dingin ditambahkan kedalam sampel dan dikocok dengan kuat sesegera mungkin, apabila muncul endapan selanjutnya dihancurkan dengan mikropipet. Selanjutnya diletakkan GD column pada collection tube dua ml dan campuran sebelumnya dipindahkan menggunakan mikropipet dan disentrifugasi

pada kecepatan 15.000 rcf selama dua menit. Collection tube yang berisi cairan dibuang dan GD column dipindahkan ke collection tube yang baru.

4) Tahap Washing

Ditambahkan sebanyak 400µl W1 Buffer kedalam GD column sebelumnya untuk kemudian disentrifugasi pada kecepatan 15.000 rcf selama 30 detik. Cairan pada collection tube dibuang dan sebanyak 600µl Wash Buffer ditambahkan ke GD column untuk selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 15.000 rcf selama 30 detik. Selanjutnya cairan pada collection tube dibuang dan GD column disentrifugasi kembali pada kecepatan 15.000 rcf selama 3 menit untuk mengeringkan matriks kolomnya.

5) Tahap Elusi

Dipindahkan GD column ke *microtube* 1,5 ml yang baru dan selanjutnya ditambahkan sebanyak 100µl Elution Buffer yang sebelumnya telah dipanaskan ke bagian tengah matriks kolom dan didiamkan selama tiga menit untuk memastikan Elution Buffer benar-benar terserap. Selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 15.000 rcf selama 30 detik untuk mengelusi DNA yang diisolasi.

b. Konfirmasi Hasil Isolasi dengan Elektrofesis

Konfirmasi hasil isolasi dengan elektrofesis dilakukan dengan dua tahap meliputi :

1. Pembuatan Gel Agarosa

Sebanyak satu gram *agarose* bubuk ditimbang dan dimasukkan dalam erlenmeyer 250 ml, kemudian ditambahkan 100 ml Tris-borate-EDTA (TBE 1X) dan digojog hingga larut. Larutan kemudian dipanaskan menggunakan microwave selama delapan menit pada tegangan 300 volt dengan tiap satu menit erlenmeyer dilakukan penggojogan untuk memastikan gel agarose larut dengan sempurna. Setelah larut gel agarose didiamkan hingga suam-suam kuku kemudian ditambahkan 2 μ l Gel Red dan digojog. Selanjutnya gel agarose dituang dalam cetakan yang telah dipasang sisir dan didiamkan hingga menjendal.

2. Proses Elektroforesis

Setelah gel agarose menjendal, sisir pada cetakan dilepas dengan perlahan dan gel agarose dipindahkan kedalam *electrophoresis chamber*. Selanjutnya ditambahkan Tris-borate-EDTA 1x hingga gel agarose terendam. Berikutnya sebanyak 3 μ l genome DNA hasil ekstraksi dicampur dengan 1 μ l *loading dye* dan dimasukkan dalam sumuran. Setelah semua sampel DNA dimasukkan selanjutnya dimasukkan sebanyak 3 μ l DNA marker kedalam sumuran pertama. *Electrophoresis chamber* dinyalakan pada tegangan 100 volt selama 30 menit, setelah

proses elektroforesis selesai hasilnya diamati dibawah sinar UV menggunakan UV Transiluminator.

c. Amplifikasi Gen 16S rRNA

Hasil ekstraksi yang diperoleh selanjutnya diamplifikasi pada mesin *Thermal Cycler* menggunakan Gen 16S rRNA dengan volume total 25 µl menggunakan masing-masing 0,5 µl primer universal 27f (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') dan 1492r (5'-GGGCGGWTGTACAAGGC-3') (Weisburg *et al.*, 1991) dan 12,5µl PCR mix MyTaq HS Red Mix 2X (Bioline) yang ditambah 9,5µl ddH₂O serta 2 µl DNA template hasil isolasi. Proses PCR dikondisikan mulai dari *pra-denaturation* (94°C, 5 menit), *denaturation* (94°C, 30 detik), *annealing* (55°C, 45 detik), *extension* (72°C, 90 detik), dan *final extension* (72°C, 10 menit). Hasil amplifikasi selanjutnya dikonfirmasi menggunakan gel elektroforesis 1% dengan tegangan 100 volt selama 30 menit.

10. Sekuensing dan Analisis Data Sekuensing

a. Sekuensing

Dua hasil amplifikasi masing-masing satu dari sampel FEB01 dan FEB02 dengan kriteria single band, tidak terdapat *smear* pada gel agarose dan DNA berwarna putih menyala selanjutnya dikirim ke perusahaan 1st Base Malaysia untuk disekuensing menggunakan metode *sanger sequencing* (Putri *et al.*, 2020).

b. Analisis Data Sekuensing

Data sekuensing gen 16S rRNA dari sampel FEB01 dan FEB02 yang diperoleh dalam format AB1 selanjutnya dibaca dan diolah menggunakan *software* BioEdit 7.2 (Hall, 1999) dan Geneious Prime 2019 (<https://www.geneious.com/>) untuk memperoleh sekuen contig. Setelah sekuen contig didapatkan selanjutnya dibandingkan dengan data sekuen yang tersedia di *Gene Bank* dengan perangkat lunak *Basic Local Alignment Search Tools for Nucleotide* (BLASTn). Sekuen hasil BLASTn selanjutnya diunduh berdasarkan nilai *e-value* (*expectation value*), *query cover*, serta *percent identity* tertinggi yang muncul (Chika, 2023). Data hasil analisis BLASTn selanjutnya akan diperkuat menggunakan *database* EzBio Cloud pada website <https://www.ezbiocloud.net/> (Yoon *et al.*, 2017) serta dilakukan analisis lokasi nukleotida yang berbeda menggunakan perangkat lunak MultAlin pada website <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html> (Corpet, 1988).

c. Input Data Sekuen ke NCBI

Sekuen selanjutnya dilakukan analisis chimera menggunakan DECIPHER versi 2.31.3 pada website <http://www2.decipher.codes/FindChimeras.html> (Wright *et al.*, 2012). Apabila tidak didapati adanya chimera, selanjutnya sekuen didaftarkan ke database NCBI guna memperoleh *accession number* melalui menu BankIt pada website

<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/genbank> mengikuti pedoman NCBI untuk 16S rRNA pada website <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/html/help/genbank-source-table.html#modifiers>.

d. Rekonstruksi Pohon Filogenetik

Sekuen yang diperoleh dari analisis sekuensing dan sekuen contig disejajarkan dengan Clustal-W pada aplikasi MEGA 11 (Tamura *et al.*, 2021) untuk selanjutnya dilakukan rekonstruksi filogenetik menggunakan metode *Neighbor-Joining* dengan 1000x *bootstrap* (Zahid *et al.*, 2015). Selanjutnya dilakukan analisis pembatasan spesies menggunakan perangkat lunak ASAP (*Assemble Species by Automatic Partitioning*) pada website <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/> (Puillandre *et al.*, 2021).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Deskripsi Hasil Penelitian

1. Parameter Lingkungan Koleksi Sampel Tanah Terpupuk dan Tidak Terpupuk Kimia

Parameter lingkungan lokasi pengambilan sampel tanah terpupuk (FEB01) dan tidak terpupuk kimia (FEB02) diukur berdasarkan empat parameter meliputi suhu tanah, pH tanah, suhu udara serta intensitas cahaya, hasil pengamatan dapat dilihat pada tabel 4.1.

Tabel 4. 1 Parameter lingkungan lokasi pengambilan sampel tanah

Parameter yang diamati	Lokasi Pengambilan sampel	
	Terpupuk	Tidak Terpupuk
Suhu tanah (°C)	40±1,8 ^a	36±2,3 ^a
Suhu udara (°C)	37±2,4 ^a	36±1,9 ^a
pH tanah (1-12)	6,3±0,7 ^a	7,2±1,2 ^a
Intensitas cahaya (cd)	410 ^a	70 ^b

a : tidak ada beda nyata secara statistik pada taraf kepercayaan 95%

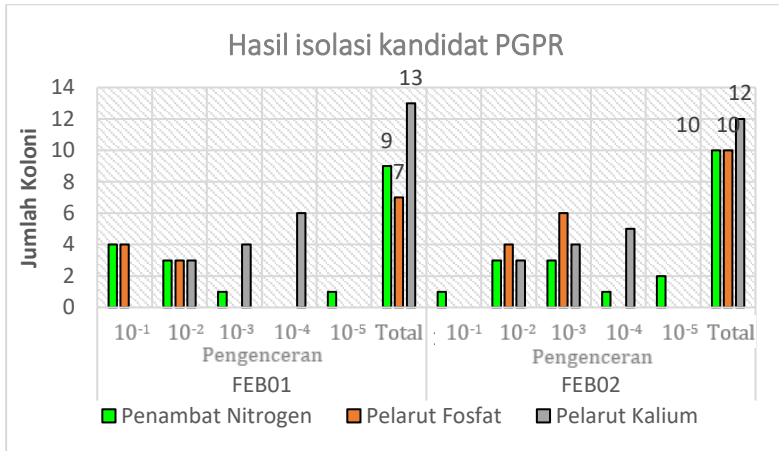
Berdasarkan analisis statistik menggunakan ANOVA *one way* terhadap hasil pengamatan parameter lingkungan pada tabel 4.1 diketahui keseluruhan parameter pengamatan pada lokasi pengambilan sampel tanah terpupuk dan tidak terpupuk kimia tidak berbeda nyata kecuali intensitas cahaya. Selanjutnya sebagai data pendukung, curah hujan kabupaten Lamongan 2023 dapat dilihat pada tabel 4.2.

Tabel 4. 2. Curah hujan kabupaten Lamongan 2023 (BMKG, 2024)

Bulan	Curah Hujan	Bulan	Curah Hujan
Januari	201-300 mm	Juli	21-50 mm
Februari	301-400 mm	Agustus	0-20 mm
Maret	301-400 mm	September	0-20 mm
April	201-300 mm	Oktober	21-50 mm
Mei	51-100 mm	November	51-100 mm
Juni	0-20 mm	Desember	201-300 mm

2. Isolasi Bakteri Kandidat PGPR

Sampel tanah terpupuk kimia (FEB01) dan tanah tidak terpupuk (FEB02) hasil pengenceran bertingkat sebanyak 200µl yang diisolasi menggunakan media Burks untuk penambat nitrogen, Pikovskaya untuk pelarut fosfat, dan Aleksandrow untuk pelarut kalium seperti pada Lampiran 1 berhasil mendapatkan 61 isolat positif yang terdiri dari 29 isolat dari FEB01 dan 32 isolat dari sampel FEB02 seperti yang ditampilkan pada Gambar 4.1 yang ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni.



Gambar 4. 1 Hasil isolasi bakteri asal tanah terpupuk kimia (FEB01) dan tidak terpupuk (FEB02) terhadap aktivitas penambat nitrogen pada media Burks, pelarut fosfat pada media Pikovskaya, dan pelarut kalium pada media Aleksandrow

Gambar 4.1 menunjukkan koloni positif bakteri penambat nitrogen yang diperoleh dari media Burks berjumlah 19 koloni dengan sembilan koloni dari sampel FEB01 dan 10 koloni dari sampel FEB02. Kemudian diperoleh 17 koloni bakteri pelarut fosfat dari media Pikovskaya dengan sepuluh koloni dari sampel FEB02 dan tujuh koloni dari sampel FEB01. Selanjutnya bakteri pelarut kalium yang diperoleh dari media Aleksandrow berjumlah 25 koloni yang terdiri dari 13 koloni dari sampel FEB01 dan 12 koloni dari sampel FEB02.

Berdasarkan Gambar 4.1 juga didapati beberapa hasil pengenceran dari tiap media yang tidak berhasil menumbuhkan isolat dengan zona bening yang ditunjukkan dengan tidak adanya diagram pada pengenceran terkait

seperti bakteri pelarut kalium asal tanah tidak terpupuk kimia (FEB02) pada pengenceran 10^{-1} dan 10^{-5} . Selain itu diketahui pengenceran terbaik pada penelitian ini adalah 10^{-2} dan 10^{-3} yang ditandai dengan adanya isolat yang membentuk zona bening dari masing-masing media pengujian. Selanjutnya diketahui probabilitas pertumbuhan kandidat PGPR tertinggi yakni bakteri penambat nitrogen pada media Burks yang ditandai dengan tumbuhnya koloni dengan zona bening pada setiap pengenceran kecuali 10^{-4} dari kedua sampel. Selanjutnya kandidat PGPR dengan probabilitas tertinggi kedua yakni bakteri pelarut kalium pada media Aleksandrow dengan setiap pengenceran tumbuh kecuali 10^{-1} dan 10^{-5} dari kedua sampel, kemudian kandidat PGPR pelarut fosfat memiliki probabilitas tumbuh terendah pada media Pikovskaya dengan hanya tumbuh pada pengenceran 10^{-2} dan 10^{-3} pada sampel FEB01 serta 10^{-3} dan 10^{-4} pada sampel FEB02. Koloni positif hasil isolasi selanjutnya dipurifikasi pada masing-masing media baru untuk mendapatkan kultur murni.

3. Uji Pendahuluan Isolat PGPR

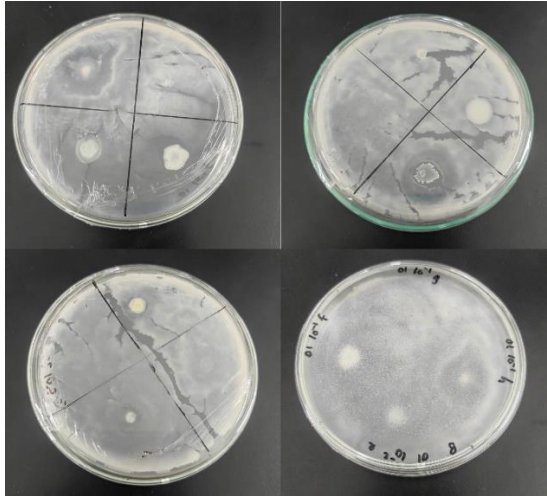
Uji pendahuluan dilakukan menggunakan media Burks, Pikovskaya dan Aleksandrow terhadap isolat hasil purifikasi yang diinkubasi selama dua hari seperti pada Lampiran 2. Beberapa isolat yang dipurifikasi tidak tumbuh sehingga tidak dapat dilakukan uji pendahuluan.

a. Uji Penambatan Nitrogen

Uji pendahuluan bakteri pelarut nitrogen yang dilakukan menggunakan media Burks agar terhadap isolat asal tanah terpupuk kimia (FEB01) dan tidak terpupuk (FEB02) mengalami kegagalan dan harus dilakukan pengujian ulang dikarenakan keseluruhan isolat mengalami *overgrowth* seperti pada tabel 4.3 dan saling menyatu seperti ditunjukkan pada Gambar 4.2 yang diduga disebabkan oleh inokulasi isolat yang terlalu banyak pada media sehingga tidak dapat dilakukan pengukuran diameter koloni dan zona beningnya.

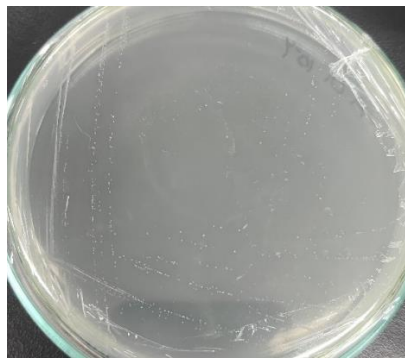
Tabel 4. 3 Isolat *overgrowth* asal tanah terpupuk kimia (FEB01) dan tanah tidak terpupuk (FEB02) pada media Burks agar

Kode Isolat	Keterangan	Kode Isolat	Keterangan
FEB01a	<i>Overgrowth</i>	FEB02a	<i>Overgrowth</i>
FEB01b	<i>Overgrowth</i>	FEB02b	<i>Overgrowth</i>
FEB01c	<i>Overgrowth</i>	FEB02c	<i>Overgrowth</i>
FEB01d	<i>Overgrowth</i>	FEB02d	<i>Overgrowth</i>
FEB01e	<i>Overgrowth</i>	FEB02e	<i>Overgrowth</i>
FEB01f	<i>Overgrowth</i>	FEB02f	<i>Overgrowth</i>
FEB01g	<i>Overgrowth</i>	FEB02g	<i>Overgrowth</i>
FEB01h	<i>Overgrowth</i>	FEB02h	<i>Overgrowth</i>
FEB01i	<i>overgrowth</i>	FEB02i	<i>Overgrowth</i>
		FEB02j	<i>Overgrowth</i>



Gambar 4. 2 Contoh isolat *overgrowth* pada media Burks

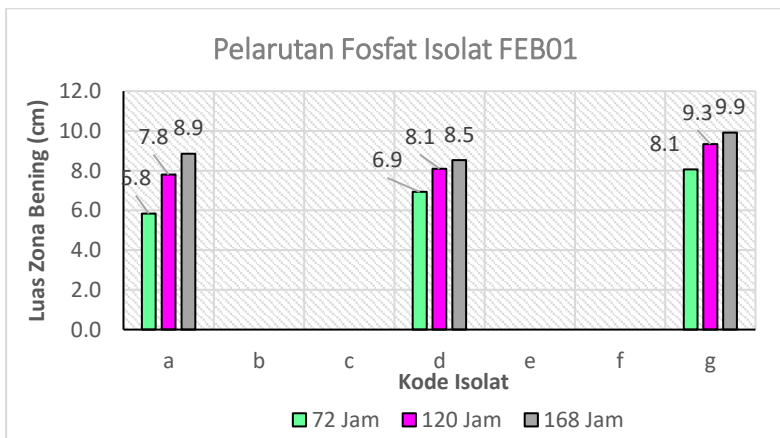
Pengujian ulang bakteri penambat nitrogen dilakukan dengan mengganti media Burks menggunakan media Ashby agar yang merupakan media selektif untuk bakteri penambat nitrogen *Azotobacter* sp., koloni yang menunjukkan ciri sebagai *Azotobacter* sp. seperti pada gambar 4.3 dipurifikasi guna dilakukan uji lanjutan.

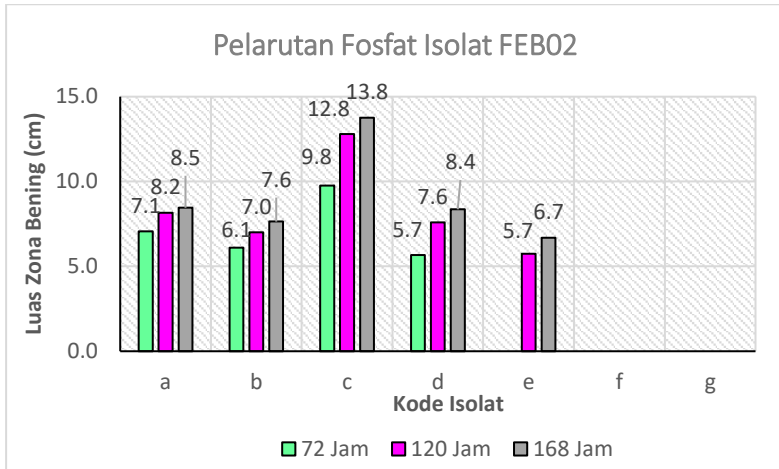


Gambar 4. 3 Koloni *Azotobacter* pada media Ashby agar

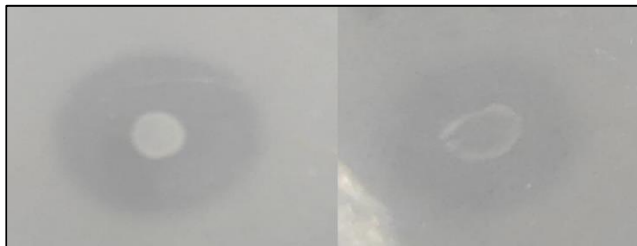
b. Uji Pelarutan Fosfat

Uji pelarutan fosfat dilakukan terhadap 17 isolat bakteri yang terdiri dari tujuh isolat sampel tanah terpupuk (FEB01) dan sepuluh isolat sampel tanah tidak terpupuk (FEB02) yang ditumbuhkan pada media Pikovskaya agar dengan metode *spot inoculation*. Hasil uji dengan melakukan pengukuran luas zona bening seperti pada Lampiran 3 setelah inkubasi selama 72 jam dan selanjutnya tiap 48 jam hingga 168 jam sehingga didapatkan tiga hasil pengukuran yang dapat dilihat pada Gambar 4.4.





Gambar 4. 4 Zona bening hasil aktivitas pelarutan fosfat PGPR asal tanah terpupuk kimia (FEB01) dan tanah tidak terpupuk (FEB02)



Gambar 4. 5 Isolat g asal tanah terpupuk kimia (FEB01) [a] dan isolat c asal tanah tidak terpupuk (FEB02) [b]

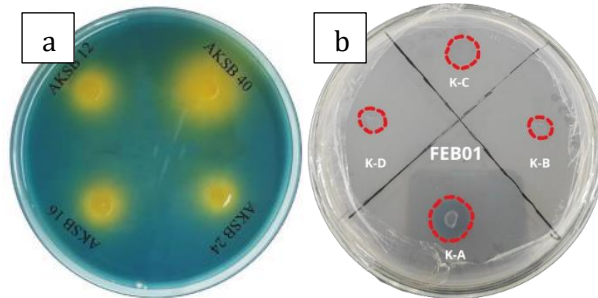
Berdasarkan Gambar 4.3 diketahui tiga isolat FEB01 dengan kode a,d dan g serta lima isolat FEB02 dengan kode a,b,c,d, dan h tumbuh dan menunjukkan aktivitas pelarutan fosfat yang ditandai terbentuknya zona bening, sedangkan isolat yang tidak memiliki diagram pada masing-masing waktu pengamatan hanya tumbuh namun tidak membentuk zona bening.

Hasil penghitungan indeks kelarutan fosfat tertinggi terhadap isolat FEB01 terdapat pada isolat dengan kode “g” dengan koloni berbentuk bulat, tepian rata, elevasi memuncak, berukuran kecil, tembus cahaya dan berwarna putih seperti pada Gambar 4.5 dengan luas zona bening setelah 168 jam sebesar 9,9 mm. Selanjutnya hasil penghitungan tertinggi terhadap isolat FEB02 terdapat pada isolat dengan kode “c” dengan koloni berbentuk bulat, tepian dan elevasi rata, tembus cahaya dan berwarna putih seperti pada Gambar 4.4 dengan luas zona bening sebesar 12,9 mm. Hasil uji kelarutan fosfat menunjukkan isolat asal tanah tidak terpupuk memiliki aktivitas pelarutan lebih tinggi dibandingkan isolat asal tanah terpupuk kimia. Kedua isolat tersebut selanjutnya ditumbuhkan ulang dalam media NA sebagai *stock culture*.

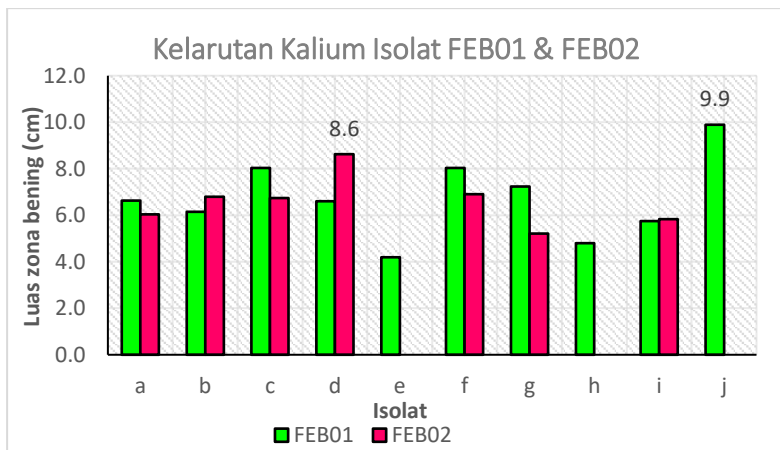
c. Uji Pelarutan Kalium

Uji pelarutan kalium dilakukan terhadap 20 isolat hasil purifikasi yang terdiri dari 10 isolat asal tanah terpupuk kimia (FEB01) dan 10 isolat asal tanah tidak terpupuk (FEB02) menggunakan media Aleksandrow agar yang dimodifikasi dengan menambahkan 100mg/L *bromothymol blue* dengan harapan zona bening yang terbentuk akan berwarna kuning kebiruan seperti pada Gambar 4.6, namun hasil pengujian yang dilakukan tidak menunjukkan adanya perubahan warna media menjadi biru serta zona bening yang terbentuk tidak berwarna kuning yang menandakan kegagalan pada modifikasi yang

dilakukan seperti Gambar 4.6. Selanjutnya hasil penghitungan luas zona bening berdasarkan indeks kelarutan kalium dapat dilihat pada Gambar 4.7.



Gambar 4. 6 Modifikasi media Aleksandrow oleh Rajawat *et al.*, (2016) (a) dan modifikasi yang mengalami kegagalan (b)



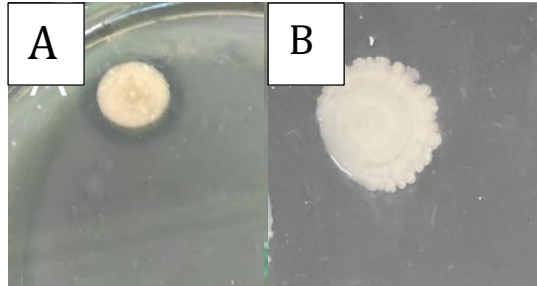
Gambar 4. 7 Zona bening hasil pelarutan kalium isolat PGPR asal tanah terpupuk kimia (FEB01) dan tanah tidak terpupuk (FEB02)

Berdasarkan Gambar 4.7 diketahui semua isolat asal FEB01 tumbuh dan memiliki aktivitas pelarutan kalium yang

ditandai dengan pembentukan zona bening disekeliling koloni, sedangkan pada isolat asal FEB02 terdapat tiga isolat dengan kode e, h dan j yang tumbuh namun tidak membentuk zona bening.

Kemudian hasil penghitungan zona bening tertinggi isolat asal FEB01 terdapat pada isolat dengan kode “j” dengan koloni berbentuk *circullar*, tepian *entire*, elevasi *convex*, berukuran sedang dan berwarna krem seperti pada Gambar 4., diikuti oleh isolat “c dan f” 8,0 mm, g 7,6 mm, a dan d 6,4 mm, b 6,1 mm, i 5,9 mm, serta isolat e dengan kelarutan kalium terendah sebesar 4,2 mm.

Selanjutnya isolat asal FEB02 yang tumbuh serta menunjukkan aktivitas pelarutan kalium tertinggi terdapat pada isolat “d” dengan luas zona bening sebesar 8,6 mm dengan koloni berbentuk *circullar*, tepian *rhizoid*, elevasi *raised*, berukuran sedang dan berwarna krem seperti pada Gambar 4.8 selanjutnya isolat f dan b 6,9 mm, c 6,8 mm, a 6,0 mm, i 6,8 mm, dan isolat “g” dengan kelarutan kalium terendah sebesar 5,2 mm.



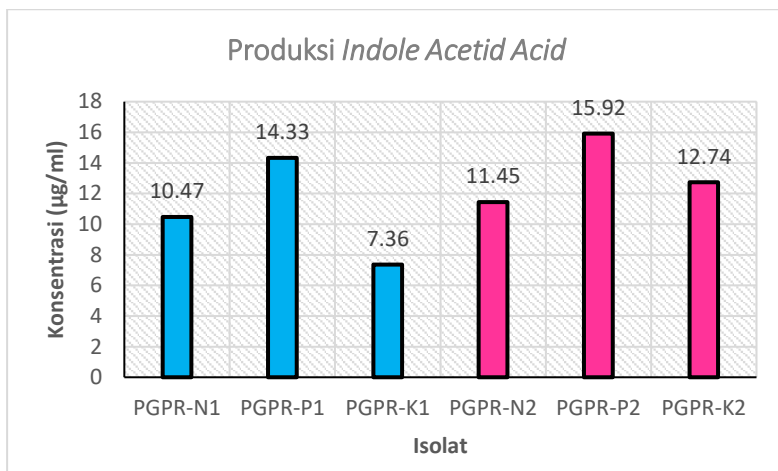
Gambar 4. 8 Isolat j asal tanah terpupuk kimia (FEB01) [a] dan isolat d asal tanah tidak terpupuk (FEB02) [b]

4. Uji Lanjutan Isolat PGPR

Dilakukan uji lanjutan terhadap enam isolat dengan hasil uji pendahuluan tertinggi yang diberi kode PGPR-N1, PGPR-P1 dan PGPR-K1 untuk isolat hasil uji penambatan nitrogen, fosfat dan kalium asal tanah terpupuk kimia (FEB01), serta kode PGPR-N2, PGPR-P2 dan PGPR-K2 untuk isolat hasil uji yang sama pada tanah tidak terpupuk (FEB02).

a. Uji Produksi *Indole Acetid Acid*

Produksi *Indole Acetid Acid* (IAA) pada isolat asal tanah terpupuk kimia (FEB01) dan tanah tidak terpupuk (FEB02) menggunakan metode kolorimetri yang diukur menggunakan kurva standar seperti pada Lampiran 2 dengan nilai regresi =0,9922 dan nilai $y = 0,0132x + 0,0148$ dapat dilihat pada Gambar 4.9.



Gambar 4. 9 Produksi *Indole Acetid Acid* isolat PGPR asal tanah terpupuk kimia (FEB01) dan tidak terpupuk (FEB02)

Berdasarkan Gambar 4.9 diketahui keseluruhan isolat FEB01 dan FEB02 memiliki aktivitas produksi IAA dengan produksi IAA tertinggi hingga terendah secara berurutan adalah PGPR-P2 dengan 159 µg/ml, PGPR-P1, PGPR-K2, PGPR-N2, PGPR-N1 dan PGPR-K1 dengan 73 µg/ml.

b. Uji Produksi Ammonia

Produksi ammonia oleh isolat asal tanah terpupuk kimia (FEB01) dan tidak terpupuk (FEB02) menggunakan metode Nessler guna mengetahui kemampuan isolat terpilih dalam mengubah nitrogen atmosfer (NH_2) menjadi ammonia (NH_3) dapat dilihat pada tabel 4.4.

Tabel 4. 4 Produksi ammonia isolat PGPR asal tanah terpupuk kimia (FEB01) dan tidak terpupuk (FEB02)

Isolat	Warna	Produksi ammonia
PGPR-K1	Oranye	+++
PGPR-K2	Oranye	+++
PGPR-P1	Coklat muda	+
PGPR-P2	Coklat muda	+
PGPR-N1	Coklat muda	+
PGPR-N2	Oranye	+++
Kontrol -	Coklat bening	-

Keterangan : + : sedikit; ++ : sedang; +++ : banyak; - : negatif



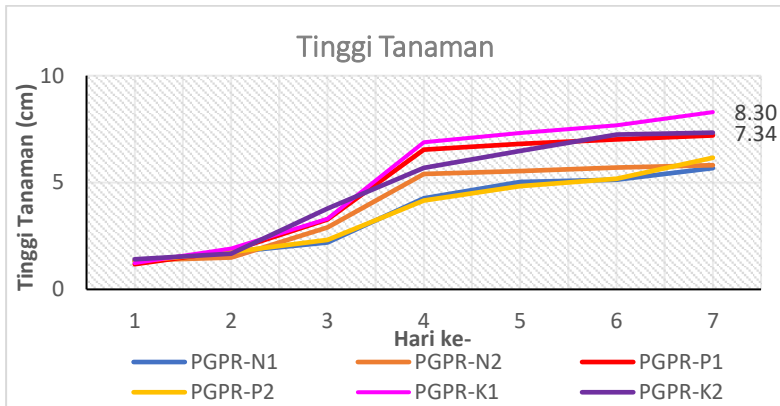
Gambar 4. 10 Produksi ammonia isolat tanah terpupuk kimia (FEB01) dan tidak terpupuk (FEB02) menggunakan metode Nessler

Hasil positif uji ammonia yang ditandai dengan berubahnya warna media menjadi coklat-kuning-oranye seperti pada Gambar 4.10 menunjukkan semua isolat asal FEB01 dan FEB02 memiliki kemampuan memproduksi ammonia dibandingkan dengan kontrol negatif. Isolat dengan

produksi ammonia tertinggi yaitu PGPR-K1, PGPR-K2 dan PGPR-N1 ditandai dengan warna kuning-oranye yang lebih pekat dibandingkan isolat lain, selanjutnya isolat PGPR-P1, PGPR-P2, dan PGPR-N2 menghasilkan ammonia dalam jumlah yang rendah ditandai dengan warna media yang tidak sampai berwarna kekuningan.

5. Uji Aktivitas PGPR Terhadap Pertumbuhan Jagung

Aktivitas enam isolat asal tanah terpupuk kimia (FEB01) dan tidak terpupuk (FEB02) terhadap pertumbuhan jagung pada variabel tinggi tanaman ditunjukkan pada Gambar 4.11, panjang akar pada Gambar 4.12, berat basah dan berat kering pada Gambar 4.13, serta jumlah daun pada Gambar 4.14.



Gambar 4. 11 Aktivitas isolat asal tanah terpupuk kimia (FEB01) dan tidak terpupuk (FEB02) terhadap tinggi jagung hari ke 1-7

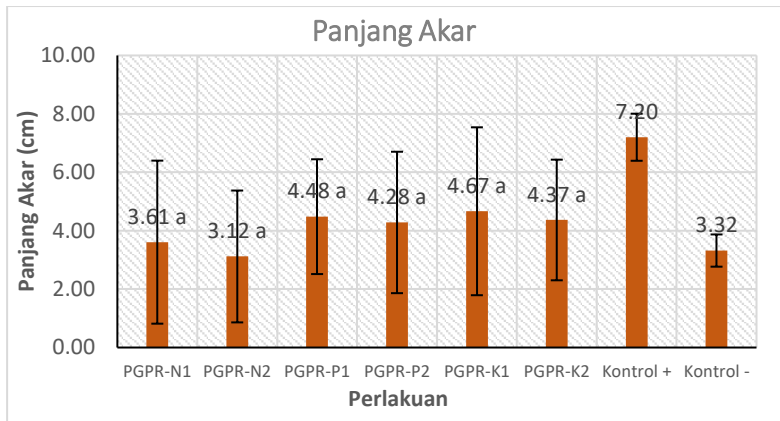
Tinggi jagung berdasarkan Gambar 4.11 pada hari pertama hingga ketujuh membentuk kurva pada fase logaritmik dengan rata-rata peningkatan tertinggi keenam

perlakuan isolat terjadi pada hari keempat. Hasil tertinggi secara berurutan terdapat pada isolat PGPR-K1 sebesar 8,30 cm dengan peningkatan tinggi 1,177 cm/hari dengan peningkatan terbesar pada hari keempat sebesar 3,576 cm, tertinggi kedua pada isolat PGPR-K2 sebesar 7,34 cm, meningkat 0,987 cm/hari dan peningkatan terbesar 2,114 cm pada hari ketiga.

Isolat dengan tinggi jagung tertinggi ketiga adalah isolat PGPR-P1 dengan tinggi 7,20 cm dan rata-rata pertumbuhan 1,004 cm/hari dengan peningkatan terbesar 3,262 cm pada hari keempat, kemudian isolat PGPR-P2 dengan tinggi 6,60 cm yang meningkat 0,808 cm/hari dan peningkatan terbesar 1,847 cm pada hari keempat. Isolat PGPR-N2 dengan tinggi 5,810 dan rata-rata peningkatan 0,743 cm/hari dengan peningkatan tertinggi 0,743 cm pada hari keempat berada pada urutan kelima dan isolat PGPR-N1 dengan tinggi 5,670 dan rata-rata pertumbuhan 0,726 cm/hari dengan pertumbuhan terbesar 2,059 cm pada hari keempat menjadi isolat dengan hasil terendah.

Selanjutnya berdasarkan asal isolatnya FEB01 dengan tanaman tertinggi yaitu PGPR-K1 dengan panjang 6,092 cm, selisih +0,459 cm terhadap PGPR-P1 dengan panjang 5,633 cm dan +2,283 cm terhadap PGPR-N1 dengan panjang 3,089 cm. Kemudian isolat FEB02 tertinggi yaitu PGPR-K2 dengan panjang 5,682 cm, selisih +1,150 cm terhadap PGPR-P2 dengan

panjang 4,532 cm dan +1,619 cm terhadap PGPR-N2 dengan panjang 4,063 cm. Analisis ANOVA pada [Tabel Lampiran 18](#) menunjukkan hasil tinggi tanaman antar isolat berbeda nyata dengan nilai sig 0,003, selanjutnya dari uji Duncan diketahui isolat PGPR-K1, PGPR-K2, PGPR-P1 dan PGPR-P2 tidak berbeda nyata dengan nilai sig 0,056 dan isolat PGPR-P2, PGPR-N1 dan PGPR-N2 tidak berbeda nyata dengan nilai sig 0,363.

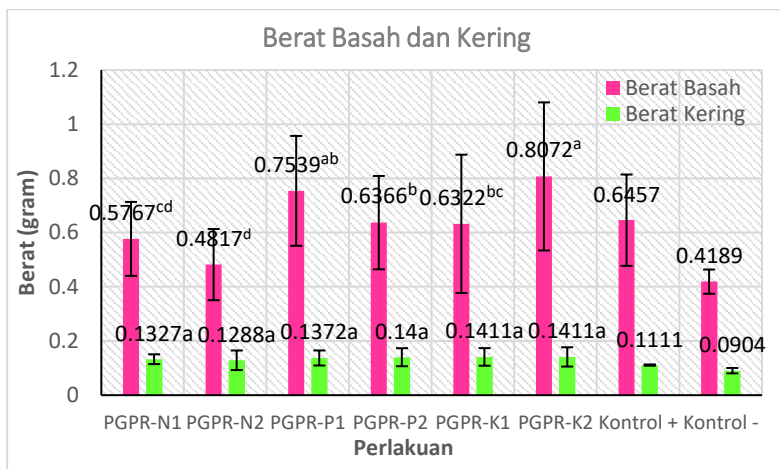


Gambar 4. 12 Aktivitas isolat asal tanah terpupuk kimia (FEB01) dan tidak terpupuk (FEB02) terhadap panjang akar jagung hari ketujuh

Berdasarkan Gambar 4.12 diketahui perlakuan penambahan isolat PGPR FEB01 dan FEB02 pada jagung berpengaruh positif terhadap panjang akar dibandingkan dengan kontrol negatif kecuali isolat PGPR-N2. Diketahui panjang akar isolat FEB01 tertinggi yaitu PGPR-K1 dengan panjang 4,665 cm, selisih -2,535 cm terhadap kontrol positif

dan +1,345 cm terhadap kontrol negatif, kemudian selisih +0,185 cm terhadap PGPR-P1 dengan panjang 4,480 cm dan +1,058 terhadap PGPR-N1 dengan panjang 3,607 cm. kemudian panjang akar tertinggi pada isolat FEB02 yaitu PGPR-K2 dengan panjang 4,366 cm, selisih -2,833 cm terhadap kontrol positif dan +1,047 cm terhadap kontrol negatif serta selisih +0,084 terhadap PGPR-P2 dengan panjang 4,282 cm, dan +1,249 cm terhadap PGPR-N2 dengan panjang 3,117 cm. Analisis statistik pada Tabel Lampiran 17 menunjukkan panjang akar pada keseluruhan isolat tidak berbeda nyata dengan nilai sig 0,370.

Selanjutnya tiga isolat dengan panjang akar terendah adalah isolat PGPR-P2 dengan panjang 4,282 cm dengan selisih -0,084 cm terhadap PGPR-K2, -2,918 cm terhadap kontrol positif dan +0,962 cm terhadap kontrol negatif, kemudian isolat PGPR-N1 dengan panjang 3,607 cm yang memiliki selisih -0,675 cm terhadap PGPR-P2, -3,593 cm terhadap kontrol positif dan +0,287 terhadap kontrol negatif, serta isolat PGPR-N2 dengan panjang 3,117 cm yang memiliki selisih -0,490 cm terhadap PGPR-N2, -4,083 cm terhadap kontrol positif dan -0,230 cm terhadap kontrol negatif. Selanjutnya berat basah dan berat kering ditunjukkan pada Gambar 4.13.



Gambar 4. 13 Aktivitas isolat asal tanah terpupuk kimia (FEB01) dan tidak terpupuk (FEB02) terhadap berat basah dan berat kering jagung

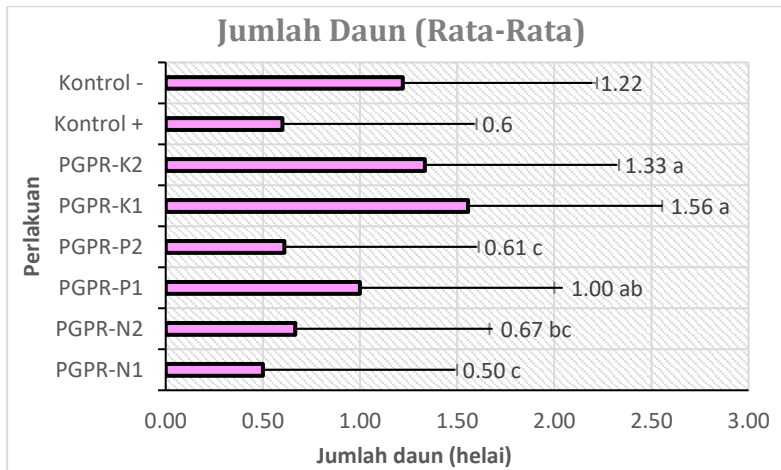
Gambar 4.13 menunjukkan perlakuan penambahan isolat menghasilkan berat basah yang bervariasi dengan isolat PGPR-P1 dan PGPR-K2 memiliki berat basah lebih besar dibandingkan kontrol positif dan keenam perlakuan memiliki berat basah lebih besar dibandingkan kontrol negatif. Diketahui berat basah tertinggi pada isolat asal tanah terpupuk (FEB01) yaitu isolat PGPR-P1 dengan berat 0,754 gram, selisih +0,018 terhadap kontrol positif dan +0,335 gram terhadap kontrol negatif, kemudian selisih +0,122 gram terhadap PGPR-K1 dengan berat 0,632 gram dan +0,177 gram terhadap PGPR-N1 dengan berat 0,577 gram. Kemudian isolat asal tanah tidak terpupuk (FEB02) dengan berat basah tertinggi yaitu isolat PGPR-K2 dengan berat 0,807 gram, selisih +0,162 gram

terhadap kontrol positif dan +0,338 terhadap kontrol negatif, kemudian selisih +0,171 gram terhadap PGPR-P2 dengan berat 0,637 gram dan +0,326 gram terhadap PGPR-N2 dengan berat 0,482 gram.

Hasil uji ANOVA pada Tabel Lampiran 19 didapati berat basah antar isolat berbeda nyata dengan nilai sig 0,000, selanjutnya berdasarkan uji Post-Hoc Duncan diketahui isolat PGPR-N1 dan PGPR-N2 tidak berbeda nyata dengan nilai sig 0,163, kemudian isolat PGPR-N1, PGPR-K1, dan PGPR-P2 tidak berbeda nyata dengan sig 0,408, selanjutnya isolat PGPR-K1, PGPR-P2, dan PGPR-P1 tidak berbeda nyata dengan nilai sig 0,091, dan isolat PGPR-P1 dan PGPR-K2 tidak berbeda nyata dengan nilai sig 0,432. Setelah dilakukan pengukuran berat basah selanjutnya jagung dikeringkan dalam oven selama 2 hari dengan suhu 80°C guna menghilangkan kandungan air didalamnya.

Selanjutnya berat kering sampel FEB01 tertinggi yaitu isolat PGPR-K1 dengan berat 0,1411 gram, mengalami penyusutan 77,68%, selisih +0,004 gram terhadap PGPR-P1 yang menyusut 81,80% dengan berat 0,1372 gram dan +0,008 gram terhadap PGPR-N1 dengan berat 0,1327 gram dan penyusutan 76,99%, Kemudian pada isolat FEB02, isolat dengan berat kering tertinggi yaitu PGPR-K2 dengan berat 0,1411 gram yang menyusut 82,52%, selisih +0,001 gram terhadap PGPR-P2 dengan berat 0,1400 gram dengan

penyusutan 78,01% dan +0,012 gram terhadap PGPR-N2 dengan berat 0,1288 gram dan penyusutan 73,26%. Hasil uji ANOVA pada Tabel Lampiran 20 menunjukkan berat kering antar isolat tidak berbeda nyata dengan nilai sig 0,800. Selanjutnya hasil jumlah daun dapat dilihat pada Gambar 4.14.



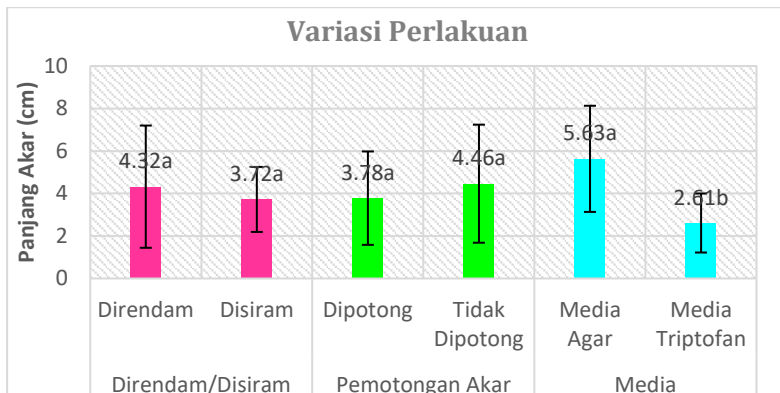
Gambar 4. 14 Aktivitas isolat asal tanah terpupuk kimia (FEB01) dan tidak terpupuk (FEB02) terhadap jumlah daun jagung hari ketujuh

Berdasarkan Gambar 4.14 diketahui keseluruhan perlakuan isolat asal tanah terpupuk kimia (FEB01) dan tanah tidak terpupuk (FEB02) memiliki jumlah daun lebih tinggi dibandingkan kontrol positif kecuali perlakuan PGPR-N1, namun keseluruhan perlakuan memiliki rata-rata jumlah daun yang lebih sedikit dibandingkan kontrol negatif kecuali perlakuan PGPR-K1 dan PGPR-K2. Perlakuan isolat FEB01 dengan jumlah daun tertinggi secara berurutan dari yang

terbesar yakni PGPR-K1, PGPR-P1, dan PGPR-N1. Kemudian pada perlakuan isolat FEB02 jumlah daun berurutan dari yang terbesar yakni PGPR-K2, PGPR-P2, dan PGPR-N1. Hasil uji ANOVA pada Tabel Lampiran 21 menunjukkan jumlah daun antar isolat berbeda nyata dengan nilai signifikansi 0,006. Selanjutnya berdasarkan uji Duncan diketahui perlakuan PGPR-N1, PGPR-N2 PGPR-P2 dan PGPR-P1 tidak berbeda nyata dengan nilai sig 0,166, isolat PGPR-N2, PGPR-P1 dan PGPR-K1 tidak berbeda nyata dengan nilai sig 0,054 dan isolat PGPR-K1 dan PGPR-K2 tidak berbeda nyata dengan nilai sig 0,110.

Berdasarkan hasil analisis statistik antar isolat dari masing-masing sampel didapatkan isolat paling potensial dari sampel FEB01 adalah PGPR-K1 dengan empat dari lima uji yang dilakukan menjadi yang terbesar dibandingkan isolat lain kecuali berat basah, namun perbedaan berat basah yang didapatkan dengan isolat PGPR-P1 tidak signifikan sehingga dapat diabaikan, selanjutnya isolat paling potensial dari sampel FEB02 adalah PGPR-K2 dengan kelima hasil pengujian lebih unggul dibandingkan isolat lain.

Selanjutnya hasil uji variasi pemotongan akar, penggunaan media agar dan triptofan serta perendaman dan penyiraman terhadap hasil akhir panjang akar dapat dilihat pada Gambar 4.15.



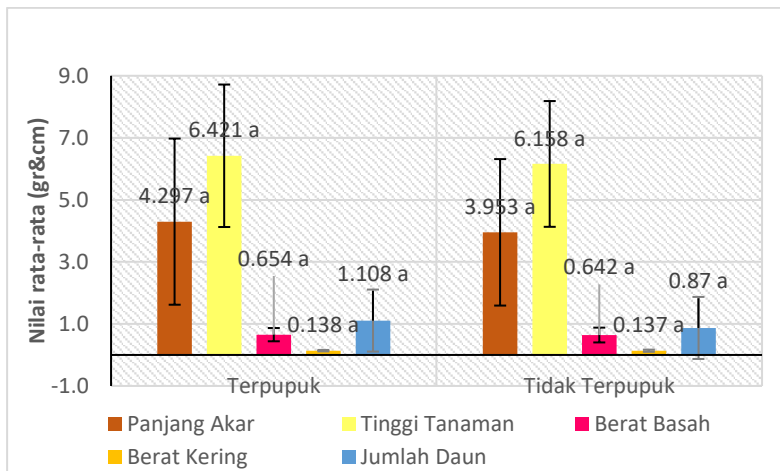
Gambar 4. 15 Panjang akar jagung pada variasi perlakuan perendaman, penyiraman, pemotongan akar serta penggunaan media agar dan triptofan

Berdasarkan Gambar 4.15 diketahui variasi perlakuan perendaman dan penyiraman jagung dengan isolat bakteri menunjukkan bahwa rata-rata panjang akar pada perlakuan perendaman dengan rata-rata 4,32 cm lebih panjang 0,60 cm dibandingkan perlakuan penyiraman yang memiliki rata-rata 3,72 cm, kemudian variasi pemotongan akar pada perlakuan tanpa pemotongan dengan hasil 4,46 cm, lebih panjang 0,68 cm dibandingkan perlakuan pemotongan akar dengan hasil 3,78 cm, selanjutnya variasi penggunaan media agar dan triptofan menunjukkan penggunaan media agar dengan hasil 5,63 cm lebih panjang 3,02 cm dibandingkan penggunaan media triptofan dengan hasil 2,61 cm.

Berdasarkan analisis *one way* ANOVA panjang akar variasi perendaman dan penyiraman pada Tabel Lampiran 10

dengan nilai signifikansi 0,241 dan variasi pemotongan akar pada Tabel Lampiran 11 dengan nilai signifikansi 0,388 dinyatakan tidak berbeda nyata dikarenakan nilai sig >0,05. Untuk variasi penggunaan media agar dan triptofan pada Tabel Lampiran 12 hasilnya berbeda nyata dengan nilai signifikansi >0,05 yaitu 0,000.

Kemudian hasil analisis terhadap tiga isolat asal tanah terpupuk (FEB01) yang dibandingkan dengan tiga isolat asal tanah tidak terpupuk (FEB02) terhadap lima variabel meliputi panjang akar, tinggi tanaman, jumlah daun, berat basah dan berat kering dapat dilihat pada Gambar 4.16.



Gambar 4. 16 Aktivitas isolat asal tanah terpupuk kimia (FEB01) dan tidak terpupuk (FEB02) terhadap produktivitas jagung

Berdasarkan analisis data pada Gambar 4.16 diketahui isolat FEB01 memiliki keunggulan dibandingkan isolat FEB02 pada kelima variabel yang diuji, pada panjang akar isolat

FEB01 dengan rata-rata 4,297 cm lebih panjang 0,334 cm dibandingkan isolat FEB02 dengan rata-rata 3,963 cm, kemudian tinggi tanaman isolat FEB01 dengan rata-rata 6,421 cm lebih tinggi 0,263 cm terhadap isolat FEB02 dengan tinggi 6,158 cm, kemudian isolat FEB01 dengan rata-rata jumlah daun 1,108 helai memiliki jumlah daun lebih banyak 0,238 helai terhadap isolat FEB02 dengan jumlah daun rata-rata 0,870, selanjutnya isolat FEB01 memiliki berat basah sebesar 0,654 gram yang lebih berat 0,012 gram terhadap isolat FEB02 dengan berat basah 0,0642 gram, terakhir berat kering isolat FEB01 dengan berat 0,138 gram lebih berat 0,002 gram terhadap isolat FEB02 dengan berat 0,036 gram.

Selanjutnya hasil analisis *one way* ANOVA pada kelima variabel memiliki nilai sig $>0,05$ dan dinyatakan tidak berbeda signifikan, dengan panjang akar pada Tabel Lampiran 13 memiliki nilai sig 0,480, kemudian tinggi tanaman pada Tabel Lampiran 14 dengan nilai sig 0,529, selanjutnya nilai sig berat basah pada Tabel lampiran 15 sebesar 0,77. Kemudian berat kering serta jumlah daun tidak dilakukan uji ANOVA dikarenakan hasil tes normalitas pada isolat FEB01 sebesar 0,003 pada variabel berat kering dan 0,000 pada isolat FEB01 dan FEB02 untuk jumlah daun sehingga tidak memenuhi prasyarat uji ANOVA dan dilakukan uji Kruskal-Walis pada Tabel Lampiran 16 sebagai pengganti dengan nilai sig 0,956

untuk berat basah dan nilai sig 0,332 pada Tabel Lampiran 22 untuk jumlah daun.

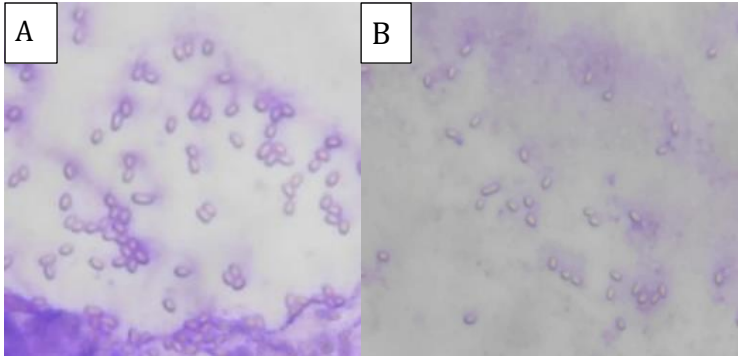
6. Identifikasi Morfologi Koloni dan Sel

Morfologi koloni isolat PGPR-K1 dan PGPR-K2 selanjutnya diidentifikasi secara visual untuk mengetahui bentuk, tepian, warna, serta teksturnya, hasil identifikasi dapat dilihat pada tabel 4.5 dan Gambar 4.17.

Tabel 4. 5 Identifikasi morfologi koloni PGPR-K1 dan PGPR-K2

Ciri yang diamati	Isolat	
	PGPR-K1	PGPR-K2
Bentuk	bulat	bulat
Elevasi	cembung	cembung
Tepian	rata	rata
Warna	krem	krem
Texture	halus	halus

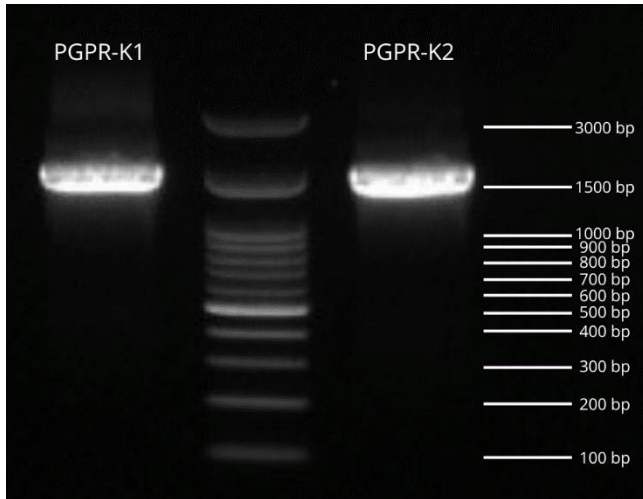
Selanjutnya dilakukan pengamatan mikroskopis guna mengetahui bentuk sel serta menentukan jenis gram isolat, hasil pengamatan mikroskopis seperti yang terlihat pada Gambar 4.17 dengan perbesaran 1000x menunjukkan kedua isolat memiliki bentuk sel batang dan termasuk gram positif yang ditandai dengan warna ungu pada dinding selnya. Setelah dilakukan identifikasi morfologi serta sel selanjutnya pengujian dilanjutkan ke tahap molekuler.



Gambar 4. 17 Morfologi sel dan pewarnaan gram dengan hasil gram positif berbentuk basil isolat PGPR-K1 (a) dan PGPR-K2 (b) pada perbesaran 400x

7. Identifikasi Molekular Menggunakan Gen 16S rRNA

Tahapan selanjutnya adalah identifikasi secara molekuler yang diawali dengan isolasi DNA mengikuti protokol *Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit* dan dilanjutkan amplifikasi menggunakan Gen 16S rRNA. Hasil amplifikasi selanjutnya divisualisasi menggunakan elektroforesis menggunakan buffer TAE selama 30 menit pada tegangan 100 volt dengan DNA *ladder* 3000 bp yang ditunjukkan pada Gambar 4.18.



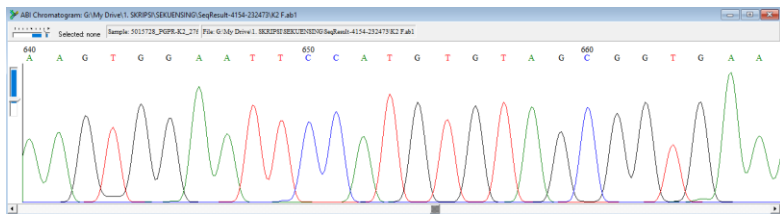
Gambar 4. 18 Visualisasi elektroforesis ampikon isolat PGPR-K1 dan PGPR-K2

Visualisasi dengan elektroforesis menunjukkan hasil amplifikasi DNA pada kedua sampel tergolong baik yang ditandai dengan terbentuknya pita tunggal yang tebal. Selain itu DNA hasil amplifikasi sejajar dengan *ladder* pada ukuran 1500bp, sesuai dengan ukuran target gen 16S rRNA yang berada pada rentang 1500-1550bp. DNA hasil isolasi selanjutnya diamplifikasi ulang dengan volume 50 μ l untuk disekuensing.

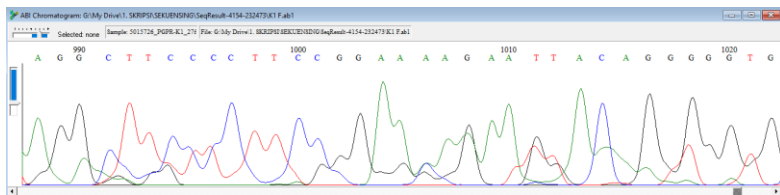
8. Sekuensing dan Analisis Data Sekuensing

Hasil amplifikasi ulang selanjutnya disekuensing menggunakan metode sanger. Hasil sekuensing yang didapatkan berupa elektroferogram dalam format AB1 seperti pada Gambar 4.19 dengan *peak* berwarna merah mewakili

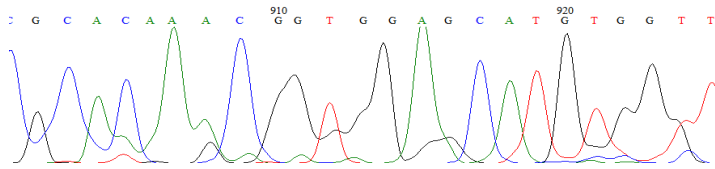
nukleotida *deoxythymidylic acid* (T), biru *deoxycytidine acid* (C), hitam *deoxyguanosine acid* (G), serta hijau *deoxyadenylic acid* (A) yang terpisah antara sekuen forward dan reverse, elektroferogram yang didapatkan dari kedua sampel tidak terlalu baik dikarenakan banyak *peak* yang saling bertumpuk seperti pada Gambar 4.20 yang disebabkan *distorted peak* seperti pada Gambar 4.21, *dye blob* pada Gambar 4.22, *non-acceptable noise* pada Gambar 4.23, serta *stutter peak* pada Gambar 4.24 (Al-Shuhaib & Hashim, 2023). Diperoleh 1061 bp sekuen forward dan 1190 bp sekuen reverse pada sampel PGPR-K1 serta 1179 bp sekuen forward dan 1183 bp sekuen reverse pada sampel PGPR-K2.



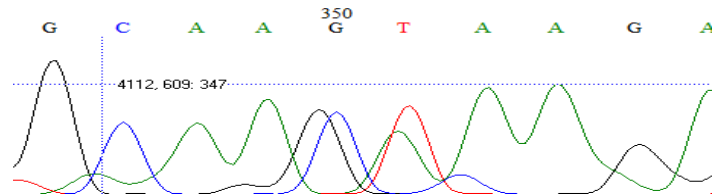
Gambar 4. 19 Elektroferogram hasil sekuensing dalam format AB1



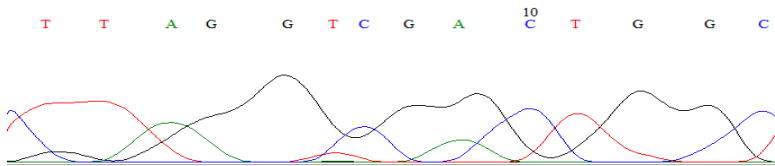
Gambar 4. 20 Elektroferogram dengan peak yang saling bertumpuk pada sekuen reverse PGPR-K1



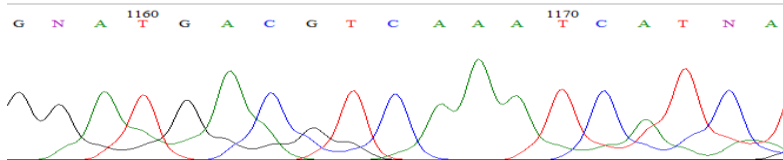
Gambar 4. 21 *Stutter peak* pada sekuen forward isolat PGPR-K1



Gambar 4. 22 *Misleading heterozygous peaks* pada sekuen forward isolat PGPR-K1



Gambar 4. 23 *Dye blob* pada sekuen forward isolat PGPR-K1



Gambar 4. 24 Nukleotida dengan kode "N" pada sekuen reverse PGPR-K2

Elektroferogram selanjutnya dianalisis dengan menghapus 16 basa sekuen forward dan 36 basa sekuen reverse pada PGPR-K1 serta 13 basa sekuen forward dan 17 basa sekuen pada PGPR-K2. Hasil sekuen contig PGPR-K1 yang berjumlah 1388 bp pada Lampiran 6 dan PGPR-K2 1419 bp

pada Lampiran 7 selanjutnya dianalisis komposisi nukleotidanya menggunakan MEGA 11 dengan hasil pada tabel 4.6. Kemudian analisis dilanjutkan menggunakan menu BLASTn pada website <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>, 16S-Based ID pada website <https://www.ezbiocloud.net/>, serta analisis pembatasan spesies menggunakan ASAP (*Assemble Species by Automatic Partitioning*) pada website <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/>.

Tabel 4. 6 Komposisi nukleotida sekuen PGPR-K2, PGPR-K2, serta isolat pembanding

Sekuen	Komposisi Nukleotida (%)				Total
	A	T	G	C	
PGPR-K1	25,79	20,89	30,57	22,83	1388
PGPR-K2	25,65	21,00	25,65	22,83	1419
<i>B. albus</i>	21.06	22.68	25.85	30.42	1420
<i>B. cereus</i> 4589	20.89	22.84	25.79	30.48	1388
<i>B. cereus</i> AM3	20.89	22.84	25.79	30.48	1388
<i>B. cereus</i> ATCC 14579T.45	20.89	22.84	25.79	30.48	1388
<i>B. cereus</i> NL1	20.99	22.82	25.70	30.49	1420
<i>B. cereus</i> SK4-6.2	20.88	22.81	25.73	30.58	1403
<i>B. cereus</i> sXaM21	21.00	22.83	25.65	30.51	1419
<i>B. cereus</i> XS 24-5	20.99	22.82	25.70	30.49	1420
<i>B. cereus</i> YR1	20.99	22.82	25.70	30.49	1420
<i>B. mobilis</i>	20.92	22.75	25.85	30.49	1420
<i>B. paramycoides</i>	20.92	22.82	25.85	30.42	1420
<i>B. paranthracis</i>	20.99	22.82	25.77	30.42	1420
<i>B. thuringiensis</i>	20.89	22.84	25.79	30.48	1388
<i>B. wiedmannii</i>	20.99	22.68	25.92	30.42	1420

Selanjutnya analisis menggunakan BLASTn pada tabel 4.7 terhadap sekuen contig PGPR-K1 menunjukkan nilai similaritas 100% terhadap *Bacillus cereus* strain 4589, ATCC 14579T.45, AM3 serta SK4-6.2 dan *B. thuringiensis* Zlynn 1000-39, sedangkan PGPR-K2 menunjukkan similaritas 100% terhadap *Bacillus cereus* strain XaM21, 4589, XS24-5, YR1 dan NL1.

Tabel 4. 7 Hasil analisis BLASTn pada sekuen PGPR-K1 dan PGPR-K2

Acc. Number	Percent Identify	Query Cover	E. Value	Species
PGPR K1				
MT545090.1	100%	100%	0.0	<i>B.cereus</i> 4589
MN543757.1	100%	100%	0.0	<i>B.cereus</i> ATCC 14579T.45
MN907471.1	100%	100%	0.0	<i>B. cereus</i> AM3
MN421119.1	100%	100%	0.0	<i>B.cereus</i> SK4-6.2
KY316460.1	100%	100%	0.0	<i>B.thuringiensis</i> Zlynn 1000-39
PGPR K2				
MW559391.1	100%	100%	0.0	<i>B.cereus</i> XaM21
MT545090.1	99,93%	100%	0.0	<i>B.cereus</i> 4589
MT000038.1	99,93%	100%	0.0	<i>B.cereus</i> XS 24-5
MH174083.1	99,93%	100%	0.0	<i>B.cereus</i> YR1
MZ749713.1	99,93%	100%	0.0	<i>B.cereus</i> NL1

Kemudian analisis sekuen contig pada website EzBio Cloud terhadap PGPR-K1 dan PGPR-K2 dapat dilihat pada tabel 4.8, dikonfirmasi kedua sekuen yang didapatkan merupakan *Bacillus cereus* dengan similaritas 99,78% dengan rasio variasi nukleotida 3 dari 1388 bp pada PGPR-K1 dan 99,58% dengan rasio variasi nukleotida 4 dari 1419 bp pada PGPR-K2. Selanjutnya posisi variasi nukleotida hasil analisis MultAlin dapat dilihat pada tabel 4.9.

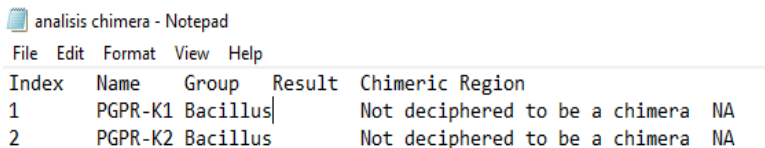
Tabel 4. 8 Hasil analisis sekuen PGPR-K1 dan PGPR-K2 menggunakan EzBio Cloud

Acc. Number	Similarity	Var ratio	Species
PGPR-K1			
AE016877	99,78%	3/1388	<i>B.cereus</i>
LOBC01000053	99,71%	4/1388	<i>B.wiedmannii</i>
MAOI01000012	99,71%	4/1388	<i>B. paramycoides</i>
MACE01000012	99,71%	4/1388	<i>B.paranthraxis</i>
MAOE01000087	99,71%	4/1388	<i>B. albus</i>
PGPR-K2			
AE016877	99,58%	6/1419	<i>B.cereus</i>
LOBC01000053	99,51%	7/1419	<i>B.wiedmannii</i>
MAOI01000012	99,51%	7/1419	<i>B. paramycoides</i>
MACE01000012	99,51%	7/1419	<i>B.paranthraxis</i>
MAOE01000087	99,51%	7/1419	<i>B. albus</i>

Tabel 4. 9 Variasi nukleotida pada sekuen PGPR-K1 dan PGPR-K2 terhadap isolat pembanding

Sekuen	Posisi nukleotida										
	1	4	6	7	8	9	10	20	142	965	1412
B. cereus	A	C	T	G	C	A	A	A	C	A	T
PGPR-K1				T	G	C	-	-	.	.	
PGPR-K2	C	T	C	T	G	C	.	-	.	.	-
B. wiedmanni	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A
B. paramycoides	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	A
B. paranthracis	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.
B. albus	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.

Sekuen PGPR-K1 dan PGPR-K2 selanjutnya didaftarkan pada NCBI guna mendapatkan *accession number*. Analisis chimera menggunakan DECHIPER versi 2.31.3 terhadap sekuen PGPR-K1 dan PGPR-K2 pada Gambar 4.25 menunjukkan tidak adanya chimera pada sekuen yang didapatkan.



Index	Name	Group	Result	Chimeric Region
1	PGPR-K1	Bacillus	Not deciphered to be a chimera	NA
2	PGPR-K2	Bacillus	Not deciphered to be a chimera	NA

Gambar 4. 25 Analisis chimera terhadap sekuen PGPR-K1 dan PGPR-K2

Selanjutnya hasil submit sekuen ke database NCBI pada Gambar 4.26 didapatkan *accession number* PP446653 untuk sekuen PGPR-K1 dan PP446654 untuk sekuen PGPR-K2.

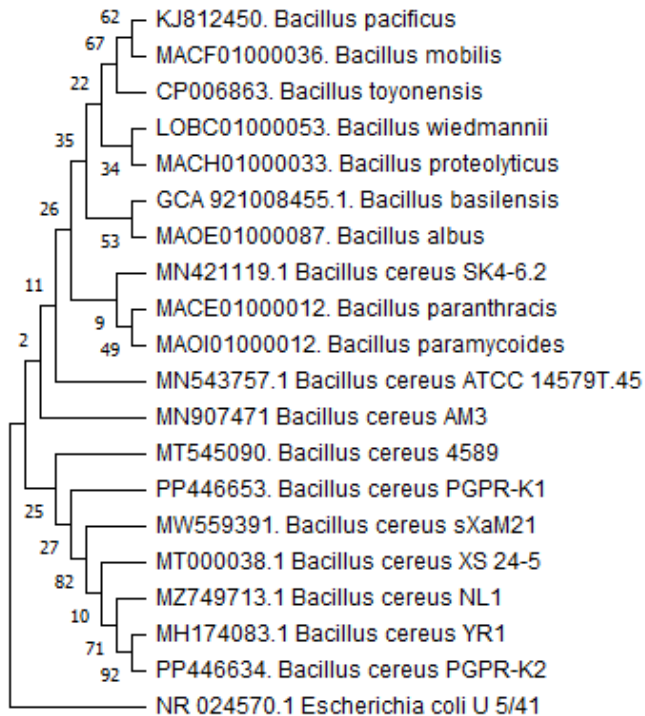
LOCUS	PP446653	1388 bp	DNA	linear	BCT 07-MAR-2024
DEFINITION	Bacillus cereus strain PGPR-K1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.				
ACCESSION	PP446653				
VERSION	PP446653				
KEYWORDS	.				
SOURCE	Bacillus cereus				
ORGANISM	Bacillus cereus Bacteria; Bacillota; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus cereus group.				
REFERENCE	1 (bases 1 to 1388)				
AUTHORS	Febriyansa,A., Syaifudin,A., Febriana,A. and Mukaromah,A.S.				
TITLE	Plant Growth Promoting Rhizobia Activity From Chemically Fertilized And Unfertilized Soil On Maize Growth				
JOURNAL	Unpublished				
REFERENCE	2 (bases 1 to 1388)				
AUTHORS	Febriyansa,A., Syaifudin,A., Febriana,A. and Mukaromah,A.S.				
TITLE	Direct Submission				
JOURNAL	Submitted (07-MAR-2024) Biology, Faculty of Science and Technology, Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang, Jl. Prof. Dr. Hamka, Tambakaji, Ngaliyan, Semarang City, Central Java 50185, Indonesia				
COMMENT	Sequences were screened for chimeras by the submitter using DECIPHER 2.31.3.				

//					
LOCUS	PP446654	1419 bp	DNA	linear	BCT 07-MAR-2024
DEFINITION	Bacillus cereus strain PGPR-K2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.				
ACCESSION	PP446654				
VERSION	PP446654				
KEYWORDS	.				
SOURCE	Bacillus cereus				
ORGANISM	Bacillus cereus Bacteria; Bacillota; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus cereus group.				
REFERENCE	1 (bases 1 to 1419)				
AUTHORS	Febriyansa,A., Syaifudin,A., Febriana,A. and Mukaromah,A.S.				
TITLE	Plant Growth Promoting Rhizobia Activity From Chemically Fertilized And Unfertilized Soil On Maize Growth				
JOURNAL	Unpublished				
REFERENCE	2 (bases 1 to 1419)				
AUTHORS	Febriyansa,A., Syaifudin,A., Febriana,A. and Mukaromah,A.S.				
TITLE	Direct Submission				
JOURNAL	Submitted (07-MAR-2024) Biology, Faculty of Science and Technology, Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang, Jl. Prof. Dr. Hamka, Tambakaji, Ngaliyan, Semarang City, Central Java 50185, Indonesia				
COMMENT	Sequences were screened for chimeras by the submitter using DECIPHER 2.31.3.				

Gambar 4. 26 *Accession number* sekuen PGPR-K1 dan PGPR-K2

Kemudian sekuen hasil analisis BLASTn serta EzBio Cloud selanjutnya digunakan sebagai pembanding pada

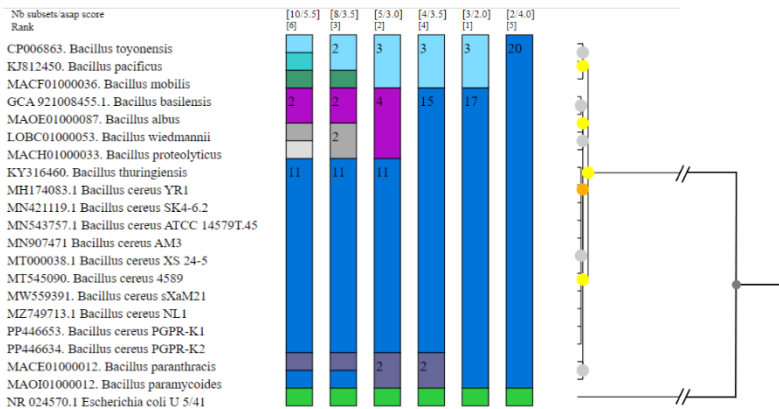
rekonstruksi pohon filogenetik menggunakan MEGA 11 dengan algoritma UPGMA dan pengulangan 1000x *bootstrap* dengan hasil seperti pada Gambar 4.27 serta analisis pembatasan spesies dengan hasil pada Gambar 4.28 dan analisis jarak genetik seperti pada Tabel Lampiran 23.



Gambar 4. 27 Pohon filogenetik dengan 1000x *bootstrap* (Maximum Likelihood – Kimura 2)

Berdasarkan hasil rekonstruksi pohon filogenetik yang diperoleh diketahui isolat PGPR-K1 dan PGPR-K2 berada pada satu klad yang sama dengan *Bacillus cereus* strain sXaM21 dan

Bacillus cereus 4589 sehingga semakin menguatkan hasil analisis BLASTn, namun beberapa cabang pohon hasil rekonstruksi filogenetik yang didapatkan memiliki nilai *bootstrap* yang rendah. Selain itu diketahui *Bacillus cereus* dan *Bacillus thuringiensis* memiliki kedekatan taksonomi yang ditandai dengan kedekatan klad yang dihasilkan.



Gambar 4. 28 Hasil analisis ASAP terhadap sekuen PGPR-K1 dan PGPR-K2

Berdasarkan Gambar 4.28 diketahui hasil analisis ASAP terbagi menjadi enam bentuk yang berbeda dengan hasil terbaik berdasarkan skor ASAP terdapat pada pengelompokan tiga partisi dengan skor 2,00, namun apabila diperhatikan lebih cermat hasil tersebut kurang maksimal dikarenakan kelompok *Bacillus cereus* dan *Bacillus* lain ditempatkan pada satu kelompok yang sama. Setelah dilakukan konfirmasi secara manual, didapati hasil terbaik terdapat pada pengelompokan lima partisi dengan skor ASAP 3,00 dengan sekuen PGPR-K1

dan PGPR-K2 berada dalam satu kelompok dengan *Bacillus cereus* strain lain yang ditandai dengan warna biru tua, kemudian *B. basilensis*, *B. albus*, *B. wiedmanni* dan *B. proteolyticus* berada pada satu klad yang sama ditandai dengan warna ungu, selanjutnya *B. toyonensis*, *B. pasificus*, dan *B. mobilis* pada klad yang sama dengan warna biru muda, serta *B. paratrachis* dan *B. paramycoides* pada klad yang sama dengan warna abu-abu. Namun setiap pengelompokan menempatkan *Bacillus thuringiensis* yang seharusnya terpisah dengan kelompok *Bacillus cereus* berada dalam satu kelompok.

B. Pembahasan Hasil Penelitian

1. Parameter Lingkungan Lokasi Sampel Tanah Terpupuk dan Tidak Terpupuk Kimia

Parameter lingkungan dari kedua lokasi menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan, namun secara deskriptif diketahui pH pada tanah terpupuk kimia lebih rendah dibandingkan tanah tidak terpupuk, hal tersebut dimungkinkan terjadi karena akumulasi penggunaan pupuk kimia berkepanjangan yang menyebabkan penurunan pH (Pahalvi *et al.*, 2021). pH tanah berkaitan erat dengan kemampuan penyerapan unsur hara tanah oleh tanaman. Penyerapan ion ammonium, kalium dan fosfat diketahui menurun sejalan dengan penurunan pH tanah (Barrow & Hartemink, 2023). Selain itu pH rendah diketahui menurunkan struktur mikroba dengan mempengaruhi taksa mikroba

tertentu seperti *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, dan *Acidobacteria* (Siciliano *et al.*, 2014) yang dibuktikan oleh Yun *et al.*, (2016) yang mendapati penurunan keanekaragaman *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia* dan *Planctomycetes* pada tanah dengan pH 5,6.

Selanjutnya suhu tanah dan suhu udara tergolong tinggi dikarenakan pada saat pengambilan sampel tanah sedang terjadi El-Nino yang mengakibatkan penurunan curah hujan sehingga terjadi kekeringan berkepanjangan seperti pada tabel 4.2. Namun suhu yang didapati masih dalam rentang normal serta tidak berpengaruh pada aktivitas PGPR dalam mengunduksi tanaman yang dibuktikan dengan penelitian Zhang *et al.*, (2023) yang mendapati aktivitas PGPR dalam meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan tanaman pada kisaran suhu 5°C-14°C di bawah tekanan dingin dan 40°C-50°C di bawah tekanan panas.

Kemudian intensitas cahaya yang berbeda signifikan disebabkan lokasi pengambilan sampel tanah tidak terpupuk yang berada di hutan sehingga cahaya matahari terhalang pepohonan. Intensitas cahaya yang tinggi sejalan dengan kelembaban udara dan mempengaruhi pertumbuhan tanaman serta biomassa mikroba tanah (Irawan *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2023). Penelitian Wu *et al.*, (2023) menunjukkan pertumbuhan jagung meningkat seiring dengan meningkatnya kelembapan karena kelembapan tinggi menjaga stomata tetap terbuka

untuk proses fotosintesis dan meminimalkan proses penguapan. Selain itu laju fotosintesis jagung jenuh cahaya menurun secara bertahap dan sangat signifikan ketika durasi cahaya tinggi harian diperpendek. Kemudian penelitian Ma *et al.*, (2018) menyatakan intensitas cahaya yang tinggi mengurangi biomassa mikroba tanah yang dianalisis dengan asam lemak fosfolipid.

2. Isolasi Bakteri Kandidat PGPR

Isolasi yang dilakukan bertujuan sebagai seleksi awal bakteri yang memiliki aktivitas PGPR pada tiga parameter meliputi penambat nitrogen, pelarut fosfat, dan pelarut kalium. Parameter yang digunakan didasarkan pada fungsi ketiganya sebagai nutrisi utama pada pertumbuhan tanaman. Digunakan tiga media selektif pada tahap isolasi kandidat PGPR yang terdiri dari media Burks, Pikovskaya, dan Aleksandrow agar.

Kemampuan penambat nitrogen penting diujikan karena nitrogen yang merupakan makro nutrien utama dalam bentuk mineral anorganik yakni amonia (NH_4^+) dan nitrat (NO_3^-) hanya tersedia ~2% di tanah dan 98% nitrogen dalam bentuk organik membutuhkan waktu mineralisasi yang lambat sehingga tidak efektif (Liu *et al.*, 2014). Penggunaan pupuk nitrogen sintetis yang diproduksi menggunakan prinsip Haber-Bosch dengan menggabungkan nitrogen atmosfer (N_2) dan hidrogen (H_2) juga menggunakan terlalu banyak energi dalam proses produksinya (Vázquez *et al.*, 2021). Hal tersebut

menjadikan kemampuan penambatan nitrogen oleh bakteri penting untuk diketahui guna dijadikan sebagai alternatif sumber nitrogen.

Hasil isolasi bakteri pelarut nitrogen pada penelitian ini lebih sedikit dibandingkan penelitian pada rizosfer jagung oleh Arsita *et al.*, (2020) dengan 20 koloni serta Sangoquiza-Caiza *et al.*, (2023) yang memperoleh 19 koloni. Penggunaan media Burk's agar yang merupakan media selektif tanpa nitrogen dengan komposisi seperti pada Tabel Lampiran 1 memanfaatkan kemampuan bakteri penambat nitrogen yang menggunakan nitrogen dari atmosfer untuk metabolismenya (Lihan *et al.*, 2021). Media Burk's telah digunakan sebagai media selektif untuk isolasi bakteri penambat nitrogen dari tanah pada penelitian sebelumnya oleh Arsita *et al.*, (2020); Chakraborty *et al.*, (2019) & Kayasth *et al.*, (2014).

Selanjutnya kemampuan pelarutan fosfat oleh bakteri penting diujikan karena fosfat merupakan elemen kunci pada proses fotosintesis, respirasi dan biosintesis asam nukleat serta berperan dalam regulasi enzim (Lambers, 2022). Tanah memiliki cadangan fosfat dengan kandungan yang bervariasi mulai dari 0,02-0,5% dengan rata-rata 0,05% dan pada lapisan atas sebanyak 50-3000 mg/kg tanah (Ahmed *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2018). Namun hanya 0,1% dari total fosfat tersebut yang diserap tanaman karena cadangan yang tersedia berbentuk kompleks organik (PO_4^{3-}), sedangkan tanaman hanya

menyerap fosfat anorganik dalam bentuk ion monobasa (H_2PO_4^-) dan ion dibasa (HPO_4^{2-}) (Pérez-Montaño *et al.*, 2014). Hal tersebut menjadikan peran bakteri pelarut fosfat penting guna memecah kompleks fosfat anorganik melalui mekanismenya.

Hasil isolasi bakteri pelarut fosfat pada penelitian ini lebih banyak dibandingkan isolasi yang dilakukan dari rizosfer jagung oleh Haswania *et al.*, (2021) yang memperoleh tiga koloni serta Panjaitan *et al.*, (2020) dengan 16 koloni, namun lebih sedikit dibandingkan penelitian Manzoor *et al.*, (2017) dengan 54 koloni. Pikovskaya merupakan media selektif untuk menguji kemampuan bakteri dalam melarutkan fosfat yang dengan komposisi seperti pada Tabel Lampiran 2 dengan trikalsium fosfat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) sebagai persediaan fosfat tidak terlarut (Santos *et al.*, 2020). Media Pikovskaya digunakan sebagai media isolasi bakteri pelarut fosfat dari rizosfer jagung pada penelitian Manzoor *et al.*, (2017) & Silva *et al.*, (2021). Koloni yang membentuk zona bening disekitarnya menandakan adanya aktivitas pelarutan trikalsium fosfat melalui sekresi asam organik pada media Pikovskaya (Paul & Sinha, 2017).

Pelarutan kalium digunakan sebagai parameter pengujian karena kalium merupakan makro nutrien terbesar ketiga yang dibutuhkan oleh tanaman (Dhillon *et al.*, 2019) yang berperan dalam mengatur metabolisme, fisiologis, dan

fotosintesis tanaman (Wang *et al.*, 2015). Di dalam tanah, terdapat empat bentuk kalium, yaitu K tidak tersedia, K tersedia, K tidak ditukar, dan K ditukar (Kour *et al.*, 2020). K tidak tersedia meliputi feldspar, mika, biotit, muskovit, dan nepheline. Dari keempat jenis K, hanya sekitar 0,1–0,2% yang digunakan tanaman karena K yang lain terdapat dalam bentuk tidak larut (Rawat *et al.*, 2016) sehingga kemampuan pelarutan fosfat oleh bakteri menjadi penting.

Selanjutnya hasil isolasi bakteri pelarut kalium pada penelitian ini lebih sedikit dibandingkan penelitian Herdiyantoro *et al.*, (2018) dan Saheewala *et al.*, (2023) yang memperoleh 50 dan 65 koloni. Aleksandrow merupakan media selektif bakteri pelarut kalium dengan *potassium alumino silicate* sebagai sumber kalium tidak larut. Aleksandrow banyak digunakan sebagai media isolasi pelarut kalium dari rizosfer, seperti penelitian Sun *et al.*, (2020) & Yaghoubi Khanghahi *et al.*, (2021). Bersama dengan bahan lain pada Tabel Lampiran 3, media Aleksandrow memanfaatkan mekanisme utama pelarutan kalium oleh bakteri yang terjadi melalui produksi asam organik melalui mekanisme asidolisis yang mampu mengkonversi *potassium alumino silicate* menjadi bentuk kalium larut serta menurunkan pH media (Meena *et al.*, 2014, 2015).

3. Uji Pendahuluan Isolat PGPR

a. Uji Penambatan Nitrogen

Pengujian penambatan nitrogen dilakukan pada pH 7,0 disesuaikan dengan penelitian Ha *et al.*, (2018) yang menyatakan pH tersebut merupakan pH optimal pertumbuhan bakteri pada media Burk's Agar. Selanjutnya waktu dan suhu inkubasi didasarkan pada penelitian Aasfar *et al.*, (2021) & Evandro *et al.*, (2019) yang menyatakan suhu terbaik untuk aktivitas bakteri penambat nitrogen adalah 30°C. Namun hasil pengujian yang dilakukan tidak sesuai dengan teori dan mengalami kegagalan.

Kegagalan uji pendahuluan penambatan nitrogen terjadi karena *overgrowth* yang kemungkinan disebabkan beberapa hal seperti nutrisi berlebih pada media, waktu dan suhu inkubasi yang tidak sesuai, jumlah isolat yang diinokulasikan, serta aktivitas metabolisme tiap bakteri yang berbeda (Davis *et al.*, 2005). Pengujian ulang selanjutnya dilakukan menggunakan media Ashby agar.

Ashby's merupakan media selektif dengan komposisi seperti pada Tabel Lampiran 4 untuk isolasi *Azotobacter*, bakteri penambat nitrogen non-simbiotik yang menggunakan mannitol sebagai sumber karbon dan nitrogen atmosfer sebagai sumber nitrogen. Koloni *Azotobacter* dicirikan memiliki permukaan datar, berwarna putih mengkilap, dengan bentuk koloni berupa bulatan-bulatan kecil (Hermiati *et al.*,

2021). Media Ashby banyak digunakan sebagai media selektif bakteri penambat nitrogen seperti pada penelitian Hadija *et al.*, (2021); Roychowdhury *et al.*, (2017) & Shi *et al.*, (2023).

Kemampuan bakteri penambat nitrogen untuk memfiksasi nitrogen atmosfer didapatkan melalui enzim nitrogenase sebagai katalis. Nitrogenase merupakan kompleks enzim dengan dua komponen logam: dinitrogenase MoFe (protein molibdenum-besi) yang berfungsi sebagai komponen katalitik dan dinitrogenase reduktase (protein Fe). Kedua komponen logam ini dikodekan oleh gen *nif*, yaitu gen *nifD* dan *nifK* yang mengkode dinitrogenase MoFe serta gen *nifH* yang mengkode dinitrogenase reduktase Fe (Burén & Rubio, 2018; Seefeldt *et al.*, 2018). Selain *Azotobacter*, isolat yang tumbuh pada media Ashby diduga berasal dari genus *Azospirillum*., *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Ideonella*, *Klebsiella*., *Methanosarcina*, *Pseudomonas*, atau *PaeniBacillus*. (Ghorai & Ghosh, 2023).

b. Uji Pelarutan Fosfat

Pengujian aktivitas pelarutan fosfat dilakukan menggunakan media Agar Pikovskaya yang mengandung tri-kalsium fosfat (TCP) sebagai sumber fosfat tidak larut. Selanjutnya penggunaan suhu dan waktu inkubasi didasarkan pada penelitian Fasim *et al.*, (2002) tentang aktivitas maksimal pelarutan fosfat oleh bakteri.

Aktivitas pelarutan fosfat antar isolat dari masing-masing sampel tanah pada penelitian ini bervariasi yang menandakan adanya perbedaan aktivitas tiap isolat dalam melarutkan fosfat pada media dengan mekanisme utama pelarutan fosfat melalui pelepasan asam organik yang diatur oleh gen PQQ sebagai produk metabolisme mikroba yang sebagian besar terjadi melalui respirasi oksidatif dan fermentasi sehingga terbentuk zona bening disekeliling koloni (Pande *et al.*, 2017).

Zona bening yang didapatkan pada penelitian ini lebih besar dibandingkan penelitian Qingwei *et al.*, (2023) yang mendapatkan hasil zona bening pada waktu inkubasi 120 jam sebesar 1,5 mm, namun lebih kecil dibandingkan penelitian Tariq *et al.*, (2022) dengan luas zona bening sebesar 240 mm pada waktu inkubasi 120 jam dan 260 mm pada waktu inkubasi 168 jam.

Pengukuran zona bening dilakukan sebanyak tiga kali bertujuan untuk mengetahui aktivitas pelarutan fosfat pada tiap fase pertumbuhan, hasil yang didapatkan menunjukkan pelarutan fosfat tertinggi terjadi pada fase eksponensial yang selanjutnya hanya terjadi kenaikan tidak signifikan saat bakteri mulai memasuki fase stationer. Hal tersebut terjadi karena fase eksponensial merupakan fase ketika sel melakukan pembelahan biner yang menyebabkan aktivitas metabolisme tinggi karena DNA, RNA, serta metabolit lain yang

diperlukan untuk pertumbuhan dihasilkan untuk pembelahan (Allen & Waclaw, 2019). Penggunaan luas zona bening sebagai parameter pengukuran didasarkan pada penelitian yang dilakukan Barrow., (2017); Scanlan *et al.*, (2015); & Tucher *et al.*, (2017) yang menyatakan adanya korelasi positif antara penurunan pH dengan konsentrasi fosfat terlarut dalam media yang disebabkan oleh produksi asam organik oleh bakteri (Penn & Camberato, 2019).

Beberapa asam organik yang diproduksi seperti asam format, asam 2-ketoglukonat, sitrat, oksalat, laktat, isovalerat, suksinat, glikolat dan asam asetat mengakibatkan penurunan pH di sekitar koloni sehingga terbentuk zona bening disekeliling koloni (K. Patel *et al.*, 2015). Selain itu penelitian oleh Richardson & Hadobas, (1997) mendapati kemampuan sekresi enzim fitase oleh bakteri *Pseudomonas* sp.. Fitase merupakan enzim yang menghilangkan gugus fosfat dari *myo-inositol* 1,2,3,4,5,6-heksakisfosfat (*phytate acid*), yang merupakan bentuk penyimpanan utama fosfat dalam tanaman yang digunakan sebagai energi untuk metabolisme (Choudhary & Johri, 2009).

Isolat yang memiliki aktivitas pelarutan fosfat diduga berasal dari genus *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Flavobacterium*, *Rhodococcus*, atau *Serratia* (Oteino *et al.*, 2015). Pernyataan

tersebut dibuktikan oleh Qingwei *et al.*, (2023) yang mendapatkan aktivitas pelarutan fosfat oleh *Bacillus* sp. dan *Rhizobium* sp. serta Mohamed *et al.*, (2019) pada *Enterobacter aerogenes*.

c. Uji Pelarutan Kalium

Pengujian aktivitas pelarutan kalium dilakukan menggunakan media Aleksandrow agar yang mengandung *potassium alumino silicate* (AlKO_6Si_2) sebagai kalium tidak terlarut. Pemilihan suhu dan pH didasarkan pada penelitian Wang *et al.*, (2022) tentang suhu optimal pertumbuhan dan metabolisme bakteri pelarut kalium serta Sood *et al.*, (2023) tentang pH optimal bakteri pelarut kalium pada media Aleksandrow agar.

Kegagalan modifikasi yang dilakukan terhadap media Aleksandrow dengan penambahan *bromothymol blue* sebanyak 100 mgL^{-1} disebabkan kesalahan perhitungan, modifikasi seharusnya dilakukan dengan menambahkan 2 mL^{-1} sehingga *bromothymol blue* yang ditambahkan tidak cukup untuk membuat perubahan warna pada media. Kesalahan dalam modifikasi yang dilakukan tidak berpengaruh terhadap indeks kelarutan kalium karena fungsi utama dari *bromothymol blue* hanya sebagai pewarna untuk memudahkan pengamatan zona bening (Rajawat *et al.*, 2016).

Zona bening yang terbentuk pada penelitian ini lebih kecil dibandingkan penelitian Sun *et al.*, (2020) dengan

rentang zona bening pada hari ketujuh sebesar 169 – 423 mm serta penelitian Khanghahi *et al.*, (2021) yang memperoleh rentang zona bening sebesar 143-192 mm pada hari yang sama. Selain itu nilai indeks pelarutan kalium pada setiap isolat dari masing-masing sampel bervariasi yang disebabkan perbedaan kemampuan masing-masing isolat dalam memproduksi jenis serta jumlah asam organik. Namun perbedaan nilai indeks juga dipengaruhi jenis kalium tidak larut yang digunakan, penelitian Setiawati & Mutmainnah, (2016) menggunakan feldspar, leucite, dan trachyte sebagai sumber kalium tidak larut memberikan hasil pelarutan yang berbeda terhadap isolat yang sama. Hal tersebut dikuatkan oleh Ismangil & Hanudin, (2005) yang menyatakan bahwa mekanisme pelarutan kalium dipengaruhi oleh jenis mineral, pH, serta jenis dan jumlah asam organik yang disekresikan.

Mekanisme pelarutan kalium oleh bakteri hampir sama dengan pelarutan fosfat, yakni melalui pembentukan asam organik (Kumar *et al.*, 2016; Meena *et al.*, 2016). Asam organik yang dihasilkan melepaskan proton yang menggantikan kalium tidak larut dari mineral seperti micas, illite, feldspar, dan ortoklas serta mempercepat pelapukan mineral kalium melalui pembentukan kompleks logam-organik Al^{3+} , Si^{4+} , Ca^{2+} , dan Fe^{2+} yang melemahkan struktur kisi mineral pembawa kalium dan melepaskan kalium ke tanah (Etesami *et al.*, 2017; Sattar *et al.*, 2019). Beberapa asam organik yang dihasilkan

oleh bakteri pelarut fosfat adalah asam oksalat, sitrat, tartarat, format, dan malat (Shanware *et al.*, 2014). Asam organik yang disekresikan menurunkan pH media menyebabkan pembentukan zona bening disekitar koloni (Sheng & He, 2006), hal tersebut mendasari penggunaan zona bening sebagai standar pengukuran.

Penggunaan media Aleksandrow juga didasarkan pada kemampuan bakteri yang mensekresikan lebih banyak asam organik untuk hidrolisis kalium saat berada dalam media dengan sumber kalium tidak larut. Gen yang berhubungan dengan asam organik seperti *acetid acid kinase* (*ackA*) dan *citrid acid synthase* (*gltA*) yang terlibat dalam sintesis asam sitrat, serta *malate dehydrogenase* (*mdh*) dan *phosphoenolpyruvate carboxylase* (*ppc*) yang terlibat dalam sintesis asam malat diregulasi secara signifikan ketika sumber kalium tidak terlarut digunakan (Chen *et al.*, 2022).

Isolat yang menunjukkan aktivitas pelarutan kalium diduga berasal dari genus *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Rhizobium*, *PaeniBacillus*, *Pseudomonas*, atau *Mesorhizobium* (Raji & Thangavelu, 2021). Hal tersebut didukung beberapa penelitian yang menunjukkan kemampuan bakteri dalam melarutkan kalium seperti Pramanik *et al.*, (2019) yang menyatakan *Bacillus pseudomycoides* melarutkan kalium sebesar 33-322,40 mg/L, serta penelitian Xiao *et al.*,

(2017) yang mendapati pelarutan kalium dari *Mesorhizobium* sp., *PaeniBacillus* sp., dan *Arthrobacter* sp..

Selain melarutkan kalium, bakteri pelarut kalium berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkecambahan jagung, seperti penelitian Feng *et al.*, (2019) yang menguji *Bacillus mojavensis* JK07 dan mendapati strain tersebut meningkatkan toleransi stress jagung terhadap garam, selanjutnya penelitian Meena *et al.*, (2018) terhadap *Agrobacterium tumefaciens* OPVS10 yang meningkatkan pertumbuhan dan berat benih jagung serta Yallappa *et al.*, (2015) yang mendapat hasil peningkatkan panjang, lingkar, berat tongkol, serta hasil benih per tongkol dan per hektar.

4. Uji Lanjutan Isolat PGPR

a. Uji Produksi Indole Acetic Acid

Produksi *Indole-3-Acetic Acid* (IAA) oleh bakteri merupakan salah satu mekanisme bakteri dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman sehingga penting diketahui kemampuannya. IAA merupakan hormon pertumbuhan yang bertanggung jawab atas pembelahan sel, pemanjangan akar, dan proliferasi akar. Hal tersebut dibuktikan oleh penelitian Guerra *et al.*, (2023) yang mendapati bakteri penghasil IAA *Lysinibacillus* sp meningkatkan panjang akar jagung. *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter*,

Erwinia, *Pseudomonas*, dan *Rhizobium* merupakan beberapa bakteri yang mampu memproduksi IAA (Park *et al.*, 2021).

Pengujian kemampuan produksi IAA yang dilakukan menggunakan metode kolorimetri dengan penambahan 5% L-Triptofan sebagai prekursor menunjukkan semua isolat kandidat PGPR hasil isolasi menunjukkan hasil positif, hasil tersebut serupa dengan penelitian Karnwal & Dohroo, (2018) & Zhang *et al.*, (2021) menggunakan isolat asal jagung dan padi. Konsentrasi IAA pada penelitian ini tergolong rendah dibandingkan penelitian yang dilakukan oleh Astriani & Murtiyaningsih, (2018) dengan hasil produksi IAA sebesar 398 µg/ml. namun lebih tinggi dibandingkan penelitian oleh Chandra *et al.*, (2018) yang mendapati produksi IAA sebesar 19µg/ml.

Hasil rendah yang didapati pada penelitian ini dimungkinkan karena konsentrasi L-Triptofan yang terlalu tinggi serta waktu inkubasi yang kurang optimal. Hal tersebut didukung oleh Lebrazi *et al.*, (2020) yang mendapati semakin tinggi konsentrasi L-Triptofan menyebabkan penurunan jumlah produksi IAA oleh *Rhizobium* sp. serta waktu inkubasi optimal pada hari kesembilan. Selain konsentrasi L-Triptofan serta waktu inkubasi, produksi IAA sangat dipengaruhi jenis gula yang digunakan sebagai media pertumbuhan, penelitian

Penambahan L-Triptofan pada media pengujian didasarkan pada fungsinya sebagai prekursor untuk

biosintesis auksin. Triptofan merupakan asam amino aromatik yang diproduksi melalui jalur shikimate yang selanjutnya masuk kedalam protein selama sintesis sebagai *backbone* untuk metabolit sekunder tanaman termasuk indoleamin, auksin, alkaloid, benzoksazinoid, dan glukosinolat (Erland & Saxena, 2019).

Metode kolorimetri menggunakan reagen Salkowski pertama kali digunakan oleh Gordon & Weber, (1951). Reagen Salkowski terdiri dari 0,5 M besi klorida (FeCl_3) dan asam perklorat 35% (HClO_4) yang pada saat bereaksi dengan IAA menghasilkan warna merah muda karena pembentukan kompleks IAA melalui reduksi Fe^{3+} . Warna yang dihasilkan dari reaksi positif menunjukkan adanya berbagai senyawa indol sebagai produk metabolisme triptofan yang dapat diukur dengan spektrofotometer (Gang *et al.*, 2019). Panjang gelombang yang digunakan untuk mengukur nilai absorbansi didasarkan pada penelitian Patel *et al.*, (2018) dengan metode yang sama dan mendapati panjang gelombang terbaik berada pada 516 nm.

Secara umum beberapa jalur yang digunakan dalam konversi triptofan menjadi IAA pada beberapa PGPR terdiri dari jalur *indole-3-pyruvate acid* (IPyA) ($\text{l-Trp} \rightarrow \text{IPyA} \rightarrow \text{indole-3-asetaldehida (IAAld)} \rightarrow \text{IAA}$) pada *Enterobacter cloacae* dan *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, kemudian jalur *indole-3-acetamide* (IAM) ($\text{l-Trp} \rightarrow \text{IAM} \rightarrow \text{IAA}$) pada *Streptomyces* spp,

jalur *tryptamine* (TAM) (l-Trp → TAM → IAAld → IAA) pada *Bacillus cereus*, jalur *tryptophan side chain oxidase* (TSO) (l-Trp → IAAld → IAA) oleh *Pseudomonas fluorescens* CHA0 serta jalur *indole-3-acetonitrile* (IAN) (l-Trp → IAN → IAA) pada beberapa strain *Agrobacterium* dan *Rhizobium* (Zhang *et al.*, 2021).

b. Uji Produksi Ammonia

Produksi amonia (NH_3) merupakan salah satu kemampuan penting dari PGPR dan termasuk mekanisme tidak langsung dalam peningkatan pertumbuhan tanaman (Hyder *et al.*, 2020). PGPR mengubah nitrogen bebas menjadi bentuk anorganik berupa ammonia dan nitrat (Liu & Von Wirén, 2017). Bersama dengan nitrat, ammonia merupakan unsur nitrogen yang menjadi penyumbang 70% penyerapan anion dan kation tanaman sehingga kemampuan PGPR dalam memproduksi ammonia penting diketahui (Hachiya & Sakakibara, 2017). Hal tersebut didukung Li *et al.*, (2023) yang menunjukkan pemberian ammonia pada jagung mempercepat perkecambahan benih serta meningkatkan tinggi bibit dan panjang akar dibandingkan dengan kontrol tanpa perlakuan.

Pengujian aktivitas produksi ammonia yang dilakukan dengan metode Nessler menunjukkan semua isolat memiliki kemampuan produksi ammonia yang berbeda. Hasil tersebut serupa dengan penelitian Agbodjato *et al.*, (2015) & Dutta & Thakur, (2017) menggunakan isolat asal rhizosfer jagung dan teh. PGPR memproduksi amonia dengan menghidrolisis urea

menjadi amonia dan karbon dioksida (Rodrigues *et al.*, 2016). Beberapa genus PGPR yang diketahui memproduksi ammonia antara lain *Bacillus*, *Burkholderia*, *Paraburkholderia*, *Priestia*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Sporosarsina* dan *Stappia* (Abdelwahed *et al.*, 2022).

Metode uji ammonia menggunakan reagen Nessler pertama kali dikembangkan oleh Cappuccino & Sherman, (1992). Reagen nessler yang digunakan terdiri dari merkuri (II) iodida atau kalium iodida dalam larutan basa, umumnya natrium hidroksida atau kalium hidroksida yang apabila bereaksi dengan amonia akan membentuk senyawa berwarna kuning-oranye melalui reaksi



(Persamaan 4.1)

yang dapat ditentukan konsentrasinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 410-425 nm. Semakin tinggi konsentrasi ammonia warna larutan meningkat dari kuning menjadi kuning-oranye/coklat kemerahan (Khalil *et al.*, 2021). Penggunaan metode Nessler didasari pada kelebihanannya yang mendeteksi konsentrasi amonia pada batas deteksi yang sebanding dengan metode lain seperti *indophenol blue* namun dengan proses yang relatif lebih cepat (Cui *et al.*, 2018).

5. Uji Aktivitas PGPR Terhadap Pertumbuhan Jagung

Aktivitas PGPR terhadap pertumbuhan jagung diamati selama tujuh hari yang didasarkan pada fase perkembangan jagung yang berada pada fase V1-V2 pada umur tujuh hari setelah proses perkecambahan. Pada fase V1-V2 pertumbuhan akar cukup cepat dan jumlah daun yang terbuka sempurna sekitar 2-4 helai sehingga dapat dibandingkan hasil pertumbuhan antar pengujian (Edwards, 2009).

Pengujian yang dilakukan menunjukkan isolat PGPR meningkatkan panjang dan jumlah akar dibandingkan kontrol didukung Jochum *et al.*, (2019) yang mendapati peningkatan panjang, diameter serta jumlah akar pada jagung yang diinokulasi *Bacillus* sp. strain 12D6 dan *Enterobacter* sp. strain 16i serta Zerrouk *et al.*, (2020) dengan hasil serupa menggunakan *Bacillus toyonensis* strain Bt04.

Kemampuan PGPR dalam meningkatkan panjang akar disebabkan aktivitas produksi auksin yang dapat meningkatkan pertumbuhan akar (Chandra *et al.*, 2018). Hal tersebut sejalan dengan hasil uji produksi auksin pada pengujian sebelumnya yang mendapati semua isolat memiliki kemampuan produksi auksin dengan memanfaatkan triptofan yang ditambahkan sebagai prekursor yang dikodekan oleh gen *trp* dan disintesis melalui lima jalur dengan *indole-3-acetamide* (IAM) dan *indole-3-pyruvate* (IPyA) sebagai jalur yang paling banyak digunakan (Patten *et al.*, 2013).

Mekanisme peningkatan panjang akar jagung oleh auksin seperti yang dijelaskan oleh Cowling *et al.*, (2023) dimulai saat auksin dibawa oleh gen ZmPINOID ke inti sel untuk menginduksi degradasi peptida represor (AUX/IAA) sebagai pengatur transkripsi gen yang mengkode faktor respons auksin (ARF) yang merupakan sebagai gen pengatur proses pertumbuhan dan perkembangan tanaman, selanjutnya AUX/IAA mengekspresikan gen ZmARF23 yang terkait perkembangan akar primer (Li *et al.*, 2023; Liang *et al.*, 2023) serta ZmARF2, ZmARF4 dan ZmARF5 yang terkait pembentukan akar lateral (Li *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2022). Selain itu auksin menempel pada reseptor membran ABP1 dan mengaktifkan reaksi kaskade yang menginduksi overekspresi enzim H⁺ + ATPase. Kedua mekanisme tersebut meningkatkan ion H⁺ yang masuk kedalam ruang apoplastik sehingga terjadi pengasaman yang meningkatkan fleksibilitas dinding sel dan menginduksi munculnya titik mitosis aktif yang menjadi akar sekunder baru (Canellas *et al.*, 2020; Nardi *et al.*, 2016; Taiz *et al.*, 2015).

Selanjutnya hasil tinggi jagung yang diinokulasi dengan isolat PGPR lebih tinggi dibandingkan kontrol, perlakuan isolat PGPR meningkatkan tinggi jagung 15,4%-72,1% pada hari ke tujuh, hasil serupa didapat pada penelitian Noumavo *et al.*, (2013) menggunakan *Azospirillum lipoferum* dengan peningkatan 65,33% dan 57,33% menggunakan *Pseudomonas*

fluorescens dan *Pseudomonas putida* pada hari ke-14, serta penelitian Chen *et al.*, (2021) menggunakan *Sinorhizobium* sp. A15, *Bacillus* sp. A28, *Sphingomonas* sp. A55 dan *Enterobacter* sp. P24 dengan peningkatan tinggi jagung 41,6%–47,2% pada hari ke 50.

Perlakuan PGPR juga meningkatkan biomassa sebesar 42,38%-55,88% terhadap kontrol pada berat kering dan 15,02%-93,00% pada berat basah daun, batang dan juga akar pada hari ketujuh, hasil serupa didapatkan oleh Tang *et al.*, (2020) menggunakan *Burkholderia cepacia* PB3 yang dikombinasikan dengan pupuk kimia dan organik dengan berat kering meningkat sebesar 29,87% pada hari ke 51 serta penelitian Huang *et al.*, (2015) menggunakan *Bacillus pumilus* M-B23 dengan peningkatan berat basah 22,9% dan 31,5% pada berat kering batang dan daun hari ke-25 pada kondisi greenhouse.

Peningkatan biomassa serta tinggi jagung merupakan hasil dari peningkatan asam amino yang dimodulasi oleh PGPR, Lephatsi *et al.*, (2022) menjelaskan PGPR mengubah metabolisme jagung melalui peningkatan jalur biosintesis yang mempengaruhi metabolisme primer dan sekunder. PGPR secara signifikan meningkatkan metabolisme *glycine* (Gly), *cystein* (Cys), dan *tyrosine* (Tyr) yang berperan penting dalam sintesis *lysine* (Lys), *methionine* (Met), *isoleucine* (Ile) dan flavonoid dengan *glycine* yang berperan meningkatkan

pembentukan klorofil dan merangsang pertumbuhan vegetatif, PGPR juga meningkatkan kadar asam fenolat yang berperan dalam pembelahan sel serta *salycilic acid* yang memodulasi respirasi pada fase vegetatif jagung sehingga meningkatkan pertumbuhan dan biomassa jagung.

Selanjutnya hasil tidak signifikan uji *one way* ANOVA pada variasi perendaman dan penyiraman dengan hasil panjang akar lebih tinggi dibandingkan penyiraman dimungkinkan terjadi karena pada saat dilakukan perendaman akar selama dua jam terjadi penempelan bakteri ke akar jagung melalui skema kemotaksis secara maksimal. Hasil berbeda didapatkan Li *et al.*, (2019) & Li *et al.*, (2023) yang mendapati peningkatan signifikan panjang akar pada biji jagung yang direndam selama tiga jam pada *Bradyrhizobium japonicum* dan *Bacillus megaterium* dibandingkan perlakuan tanpa perendaman. Selanjutnya hasil lebih rendah pada perlakuan penyiraman diduga karena kurangnya volume suspensi bakteri yang menyebabkan rendahnya kepadatan PGPR sehingga penempelan PGPR ke akar kurang maksimal. Dugaan tersebut didukung penelitian Dias *et al.*, (2023) yang mendapati perlakuan *Azospirillum baldaniorum* 10^8 sel mL^{-1} secara signifikan meningkatkan panjang dan diameter akar jagung dibandingkan perlakuan 10^6 sel mL^{-1} .

Kemudian hasil tidak signifikan pada variasi pemotongan akar menunjukkan semua isolat yang digunakan

berpengaruh positif terhadap poses pemanjangan akar yang disebabkan produksi IAA oleh bakteri, hasil ini sesuai dengan uji lanjutan produksi IAA yang mendapati kemampuan produksi IAA pada semua isolat. PGPR diketahui memobilisasi nutrisi ke akar tanaman (Li *et al.*, 2019).

Kemudian perbedaan signifikan yang didapati pada variasi penggunaan media agar dan triptofan tidak sesuai dengan teori yang menyatakan penambahan L-Triptofan meningkatkan sintesis IAA oleh bakteri sehingga terjadi pemanjangan akar (Naveed *et al.*, 2015 & Zhang *et al.*, 2021). Perbedaan signifikan pada penggunaan media agar dimungkinkan terjadi karena produksi IAA berlebih pada media triptofan, hal ini didukung penelitian Alarcón *et al.*, (2019) menyatakan pemberian auksin sintesis 1-*naphthalene acetic acid* dalam dosis tinggi ($0,5\mu\text{M}$) secara signifikan menurunkan panjang akar primer sekaligus menghambat pembentukan akar lateral jagung.

Selanjutnya aktivitas PGPR asal tanah terpupuk dan tidak terpupuk kimia dalam menginduksi pertumbuhan jagung pada Gambar 4.15 menunjukkan isolat asal tanah terpupuk (FEB01) memiliki aktivitas yang lebih tinggi secara statistik tidak signifikan pada kelima variabel uji meliputi panjang akar, tinggi tanaman, jumlah daun, berat basah serta berat kering jagung dibandingkan isolat asal tanah tidak terpupuk (FEB02). Hal tersebut sekaligus menjawab hipotesis pada penelitian ini

dengan hasil hipotesis 0 ditolak dan hipotesis 1 diterima yang artinya terdapat perbedaan secara deskriptif aktivitas *Plant Growth Promoting Rhizobia* dari tanah terpupuk dan tidak terpupuk kimia dalam menginduksi pertumbuhan jagung.

Hal tersebut dimungkinkan terjadi karena penyebab utama berkurangnya aktivitas PGPR pada tanah terpupuk kimia adalah pH yang rendah serta struktur tanah yang tidak mendukung, namun pada saat pengujian media yang digunakan memiliki pH netral serta tekstur yang mendukung pertumbuhan serta aktivitas PGPR sehingga metabolismenya berjalan dengan baik. Hal tersebut didukung penelitian Chandra *et al.*, (2018) yang mendapati produksi IAA pada isolat CA2004 sebesar 20µg/ml pada pH 5 dan 46µg/ml pada pH 7. Selain itu penelitian Getahun *et al.*, (2020) & Mustapha *et al.*, (2022) mendapati pertumbuhan bakteri pada pH 7 secara signifikan meningkat dibandingkan pada pH 4.

Selanjutnya hasil uji masing-masing isolat asal sampel FEB01 dengan K1 sebagai isolat paling potensial sejalan dengan hasil uji produksi ammonia yang dilakukan yang mendapati isolat K1 memiliki aktivitas produksi ammonia tinggi, meskipun pada uji produksi IAA isolat K1 memiliki hasil terendah sebesar 7,36 µg L⁻¹ namun produksi IAA tidak menjadi penentu hasil secara keseluruhan karena PGPR memiliki mekanisme langsung dan tidak langsung dalam menginduksi pertumbuhan tanaman seperti pada Gambar 4.23

yang tidak semuanya diujikan pada penelitian ini (Khoso *et al.*, 2024). Kemudian hasil uji masing-masing isolat asal sampel FEB02 dengan K2 sebagai isolat paling potensial didukung dengan hasil uji produksi ammonia yang tergolong tinggi serta hasil uji produksi IAA sebesar 12,42 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Selanjutnya pada tahap uji aktivitas PGPR terhadap pertumbuhan jagung ini dilakukan berbagai tahap pra uji seperti perendaman bakteri yang dilakukan agar bakteri menempel pada akar melalui skema kemotaksis dengan cara mengaktifkan jalur kemosensorik bakteri menggunakan fotosintat yang disekresikan akar sehingga bakteri akan membentuk *exopolysaccharides* dan *lipopolysaccharides* serta fibril selulosa untuk memulai penempelan dengan akar sehingga terbentuk biofilm yang merupakan penentu keberhasilan kolonisasi akar (Knights *et al.*, 2021).

Kemudian proses sterilisasi benih menggunakan NaOCl 2% selama 2 menit dan ethanol 70% selama 30 detik dilakukan guna memastikan benih steril dari bakteri atau jamur sehingga tidak menyebabkan bias pada hasil pengujian, sterilisasi penting dilakukan karena adanya potensi bakteri yang terbawa benih (Dutta *et al.*, 2014). Bakteri kontaminan seperti *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*, *Ralstonia solanacearum*, dan *Erwinia amylovora* menginfeksi tumbuhan dengan cara mensekresikan proteinnya kedalam sel inang melalui jalur sekresi tipe III (TTSS) saat benih mulai

berkecambah (Cornelis & Gijsegem, 2000). Penelitian Suriani *et al.*, (2023) menyatakan *Erwinia* menyebabkan busuk batang dan Longhi *et al.*, (2022) menyatakan *Xanthomonas vasicola pv. Vascularum* menyebabkan belang daun pada jagung.

Selanjutnya benih jagung dikecambahkan selama dua hari dengan akuades steril pada suhu 30°C, perkecambahan diawali dengan masuknya air hingga keluarnya plumula dan radikula dari dalam benih (Li *et al.*, 2019). Air diperlukan untuk meningkatkan permeabilitas benih dan mengaktifkan cadangan makanan yang disimpan dalam benih melalui aktivasi enzim untuk dikirim ke embrio (Khalid *et al.*, 2021). Perkecambahan mempengaruhi hasil dan kualitas tanaman serta menentukan penggunaan nutrisi dan air (Xue *et al.*, 2021). Perkecambahan dilakukan pada suhu 30°C karena jagung tidak berkecambah apabila suhu terlalu tinggi (>45°C) atau terlalu rendah (<6,2°C) (Meng *et al.*, 2022; Sánchez *et al.*, 2014) yang dibuktikan dengan penelitian (Khaeim *et al.*, 2022) dengan hasil melambatnya perkecambahan pada suhu >35°C dan <15°C.

Penggunaan isolat berumur 24 jam didasarkan pada fase logaritmik bakteri yang terjadi pada periode tersebut dimana sel menunjukkan tingkat pertumbuhan yang stabil, aktivitas metabolisme yang konsisten serta kepadatannya meningkat (Rolfe *et al.*, 2012). Selanjutnya media YPB dan YPA digunakan dengan yeast sebagai sumber nutrisi dan peptone sebagai

sumber nitrogen organik bagi bakteri (Andualem & Gessesse, 2013).

Kemudian penggunaan panjang akar sebagai variabel pengamatan utama didasarkan pada morfologi akar yang secara langsung mempengaruhi pertumbuhan tunas karena adanya hubungan alometrik yang responsif terhadap kondisi pertumbuhan tanaman (Silva *et al.*, 2017). Selain itu penelitian Li & Bao, (2015) menemukan bahwa tinggi tunas dan biomassa berkaitan erat dengan panjang akar serta penelitian Dong *et al.*, (2020) yang menyatakan adanya hubungan langsung antara morfologi akar dengan perkembangan daun. Selanjutnya tinggi tanaman digunakan sebagai variabel karena merupakan ukuran pertumbuhan yang paling mudah dilihat dan dibedakan antar tanaman (Sitompul & Guritno, 1995). Kemudian jumlah daun digunakan sebagai indikator tinggi rendahnya unsur hara pada suatu media, hal tersebut terjadi disebabkan kandungan hara yang tersedia dapat memacu aktivitas hormonal dalam pembentukan daun (Goldsworthy & Fisher., 1992) sehingga sesuai untuk dijadikan indikator dalam melihat isolat yang menghasilkan unsur hara tertinggi. Pengukuran berat kering dan basah dilakukan untuk mengukur biomassa tumbuhan. Biomassa merupakan indikator yang paling umum digunakan untuk mengetahui pertumbuhan tanaman karena merupakan gabungan

peristiwa tanaman selama siklus hidupnya dan mudah untuk diukur (Sitompul & Guritno, 1995).

6. Identifikasi Morfologi Koloni dan Sel

Identifikasi morfologi bertujuan sebagai langkah awal dalam mengidentifikasi bakteri sebelum dilakukan pengujian lanjutan seperti uji biokimia dan molekuler. Meskipun morfologi koloni dan sel bakteri tidak memiliki variabilitas struktural yang cukup untuk menentukan spesies, namun setiap bakteri memiliki karakteristik morfologi yang berbeda sehingga dapat digunakan sebagai data pendukung pengujian lanjutan (Ogodo *et al.*, 2022).

Identifikasi morfologi koloni dan sel yang terdapat pada tabel 4.5 juga diperoleh AlAli *et al.*, (2021); Lelapalli *et al.*, (2021) & Waday *et al.*, (2022) yang melakukan isolasi bakteri dari rizosfer dan mendapati sebagian besar karakteristik morfologi koloninya berbentuk bulat dengan tepian rata serta memiliki elevasi cembung.

Selanjutnya identifikasi morfologi sel dilakukan dengan pewarnaan gram dengan hasil isolat PGPR-K1 dan PGPR-K2 tergolong kedalam bakteri gram positif yang dibuktikan dengan warna ungu pada dinding selnya. Warna ungu tersebut disebabkan kristal violet yang tertahan pada peptidoglikan setebal 20-80 nm yang dimiliki bakteri gram positif dimana bakteri gram negatif hanya memiliki peptidoglikan <10 nm (Mai-Prochnow *et al.*, 2016).

Penggunaan pewarna gram sebagai metode identifikasi bakteri karena metode ini memanfaatkan perbedaan permeabilitas dinding sel antara bakteri gram positif dan negatif, dimana warna primer yang tertahan dalam lapisan peptidoglikan tebal bakteri gram positif tidak akan hilang sepenuhnya meskipun diberi *decolourizer*. Sedangkan pada bakteri gram negatif, pewarna primer hanya menempel pada lapisan lipopolisakarida luar yang larut dalam pelarut organik yang digunakan sebagai *decolourizer* dan selanjutnya bakteri gram negatif akan menyerap *counterstain* (Vijayakumar *et al.*, 2023).

Selanjutnya hasil pengamatan bentuk sel isolat PGPR-K1 dan PGPR-K2 yang berbentuk basil/batang disebabkan perbedaan *penicillin binding protein* yang menyusun peptidoglikan tiap bakteri, seperti peptidoglikan *Bacillus subtilis* yang tersusun atas 16 PBP serta *Staphylococcus aureus* yang tersusun atas lima PBP (Mitchell *et al.*, 2023; Wacnik *et al.*, 2022).

Hasil pengamatan sel selanjutnya digunakan sebagai identifikasi awal untuk memperkirakan genus bakteri bersama dengan hasil pewarnaan gram. Berdasarkan hasil pengamatan, didapati PGPR-K1 dan PGPR K-2 merupakan bakteri gram positif berbentuk basil yang merupakan ciri umum dari *Clostridium* sp, *Bacillus* sp, serta *Listeria* sp. (Tripathi & Sapra, 2022). Berdasarkan *List of prokaryotic names with standing in*

nomenclature (<https://lpsn.dsmz.de/>) terdapat 613 spesies yang tergolong dalam genus *Bacillus*. 334 spesies *Clostridium*, serta 30 spesies *Listeria*.

Kristal violet dalam perwarnaan gram berfungsi sebagai pewarna dasar bermuatan positif mengandung kromatofor yang akan tarik menarik dengan bakteri, selanjutnya iodine digunakan sebagai mordant yang akan memperkuat ikatan kristal violet dengan bakteri. Penggunaan *decolourizer* bertujuan untuk menghilangkan pewarna primer pada bakteri sehingga safranin yang berfungsi sebagai *counterstain* menempel pada dinding sel.

7. Identifikasi Molekuler Menggunakan Gen 16S rRNA

Proses identifikasi molekuler diawali dengan isolasi DNA mengikuti protokol kit dengan penambahan *lysozyme* pada bakteri gram positif serta penggunaan Proteinase K. *Lysozyme* berfungsi memecah dinding sel bakteri dengan membelah peptidoglikan tebal pada bakteri gram positif. Selanjutnya, penambahan Proteinase K membantu menonaktifkan RNase/DNase untuk mencegah degradasi asam nukleat (Gautam, 2022; Gill *et al.*, 2016).

Tahapan selanjutnya adalah proses PCR dengan menggunakan gen 16S rRNA, PCR dilakukan sebanyak 30 siklus dengan pertimbangan penggunaan siklus lebih dari 35x dapat menghasilkan produk sekunder serta kurang dari 30 siklus mengurangi kuantitas produk yang diinginkan (Lorenz,

2012). Gen 16S rRNA digunakan karena sifatnya yang *conserved* serta terdapat pada semua bakteri. Gen 16S rRNA merupakan komponen struktural utama pada subunit ribosom 30S bakteri yang diperlukan untuk inisiasi sintesis protein dan stabilisasi pasangan kodon-antikodon selama translasi mRNA (Jay & Inskeep, 2015). Karena fungsionalitas serta sifatnya yang *conserved*, gen 16S rRNA banyak digunakan sebagai penanda filogenetik serta mendefinisikan tiga domain kehidupan (Woese *et al.*, 1990). Gen 16S rRNA juga dipakai secara luas untuk identifikasi PGPR seperti penelitian Szilagyi-Zecchin *et al.*, (2014) yang mendapati bakteri *Bacillus* sp. dan *Enterobacter* sp., serta (Karnwal, 2017) dengan hasil *Pseudomonas flourences* dan *Bacillus subtilis* yang dilakukan pada sampel asal rizosfer jagung.

Konfirmasi hasil dengan elektroforesis pada gel agarose 0,8% menunjukkan pendaran DNA pada sampel PGPR-K1 dan PGPR-K2 sejajar dengan ladder pada ukuran 1500 bp. Hal tersebut menandakan keberhasilan proses amplifikasi yang dilakukan menggunakan primer universal 27f dan 1492r yang berukuran ± 1500 bp. Namun hasil elektroforesis masih menunjukkan adanya *smear* pada bagian atas dan bawah band yang terbentuk, hal tersebut diakibatkan proses amplifikasi yang tidak sempurna, jumlah siklus, suhu annealing dan extension yang tidak sesuai, serta DNA template yang berlebih sehingga dibutuhkan purifikasi guna memastikan hasilnya

(Zrimec *et al.*, 2013). Primer universal 27f dan 1492r sebelumnya telah digunakan untuk identifikasi PGPR seperti pada penelitian Hamada & Soliman, (2023) dengan hasil *Serratia marcescens* OK482790, Sembiring & Sumanto, (2022) dengan hasil *Pseudomonas aeruginosa* OIS 481 serta Zhang *et al.*, (2018) dengan hasil *Bacillus velezensis* NJAU-Z9.

8. Sekuensing dan Analisis Data Sekuensing

Produk PCR selanjutnya disekuensing menggunakan metode sanger, namun sebelum dilakukan sekuensing, sampel terlebih dahulu dilakukan purifikasi. Purifikasi penting dilakukan guna menghilangkan sisa dNTP yang tidak teramplifikasi, enzim polimerase, sisa primer, garam, serta pengotor lain yang tersisa. Sisa bahan PCR dapat terbaca saat proses sekuensing sehingga mengurangi panjang pembacaan hingga menyebabkan hasil sekuensing tidak terbaca. Beberapa metode purifikasi PCR adalah *bead-based*, *column-based*, dan metode enzimatik menggunakan enzim eksonuklease I sebagai pendegradasi sisa primer serta alkali fosfatase yang mendefosforilasi dNTPs (Wohlhieter *et al.*, 2021). Pada metode sanger sequencing, 2',3'- *dideoxynucleotides phosphates* (ddNTPs) digunakan untuk sintesis DNA. Dengan tidak adanya gugus 3'-hidroksil pada 2',3'- *dideoxynucleotides phosphates*, DNA tidak disintesis lebih lanjut karena tidak ada ikatan fosfodiester yang dibentuk dengan *deoxynucleotides phosphates* (dNTPs) berikutnya sehingga rantai akan terputus.

Keempat ddNTPs (ddATP, ddTTP, ddCTP, dan ddGTP) sebelumnya telah diberi label dengan pewarna *fluorochrome* yang berbeda sehingga dapat dibaca oleh laser, hasil pembacaan akan keluar dalam bentuk elektroferogram berisi urutan nukleotida dengan format AB1 (Dey, 2018).

Hasil elektroferogram pada format AB1 yang terdapat banyak *peak* bertumpuk disebabkan adanya *stutter peak* yang merupakan puncak-puncak kecil pada posisi sebelum atau sesudah puncak sinyal asli dengan tinggi kurang dari sepertiga tinggi puncak utama yang disebabkan oleh adanya struktur sekunder pada DNA template serta proses ekstensi yang tidak sempurna seperti pada Gambar 4.24. Selain *stutter peak* didapati juga *misleading heterozygous peaks* seperti Gambar 2.25 pada nukleotida nomor 350 dan 351 yang disebabkan beberapa faktor seperti kualitas DNA di bawah standar, kesalahan amplifikasi PCR, atau kesalahan sekuensing (Al-Shuhaib & Hashim, 2023), selain itu penggunaan primer universal pada penelitian ini dapat menjadi penyebab hasil sekuensing yang kurang maksimal. Schneyder *et al.*, (2021) menjelaskan pada sekuensing Gen 16S rRNA, genus bakteri tertentu diketahui kurang terwakili ketika menggunakan kombinasi primer yang tidak sesuai, sehingga spesifitas primer menjadi salah satu penentu utama keberhasilan sekuensing.

Selanjutnya elektroferogram dianalisis hingga menjadi sekuen contig dengan melakukan penghapusan pada beberapa

nukleotida menggunakan BioEdit versi 7.1, Geneious Prime 2019, serta MEGA 11. Penggunaan tiga software berbeda didasarkan pada penelitian Chen *et al.*, (2017) yang menyatakan penggunaan lebih dari satu software secara efektif mengurangi kesalahan analisis.

Penghapusan 16 basa sekuen forward dan 36 basa sekuen reverse pada PGPR-K1 serta 13 basa sekuen forward dan 17 basa sekuen pada PGPR-K2 dikarenakan adanya *multi-color spike* yang disebabkan *dye blob* seperti pada Gambar 4.26 yang dihasilkan dari akumulasi pewarna *dideoxynucleotides phosphates* berlebihan selama proses sekuensing dan biasanya terletak pada awal sekuen yang menyebabkan ketidakakuratan dalam pembacaan basa sehingga harus dihilangkan (Al-Shuhaib & Hashim, 2023). Selain *dye blob*, primer dimer, struktur sekunder, dan kontaminasi merupakan penyebab potensial munculnya *multi-color spike* pada elektroferogram (Orlova *et al.*, 2017).

Selain adanya *multi-color spike*, pada elektroferogram isolat PGPR-K1 dan PGPR-K2 didapati adanya basa dengan kode "N" yang menandakan kualitas nukleotida sangat rendah sehingga menimbulkan ambiguitas pembacaan hasil sekuensing. Meskipun terdapat kemungkinan bahwa beberapa basa yang diberi label "N" dapat diklarifikasi dengan memastikan elektroferogram secara manual namun beberapa peneliti menetapkan standar data sekuens yang baik harus

memiliki <5% basa yang diidentifikasi sebagai ambigu setelah memotong data primer dari ujung sekuen (Crossley *et al.*, 2020).

Sekuen PGPR-K1 yang diketahui memiliki similaritas 100% dengan *B. thuringiensis* disebabkan kedekatan jarak genetik antara *B. cereus* dan *B. thuringiensis*. Ehling-Schulz *et al.*, (2019) menyatakan genom kelompok *Bacillus cereus* sangat terkonservasi dan memiliki urutan gen 16S rRNA sangat mirip termasuk *B. cereus* dan *B. thuringiensis*. Guna membedakan kelompok *B. cereus* secara lebih teliti umumnya didasarkan pada perbedaan plasmidnya dimana *B. cereus* memiliki plasmid pCER270 yang mengkode komponen enzimatik yang diperlukan untuk biosintesis nonribosomal dari toksin cereulide (Ehling-Schulz *et al.*, 2006; Rasko *et al.*, 2007) sedangkan *B. thuringiensis* memiliki beberapa plasmid yang mengkode berbagai macam toksin insektisida Cry dan Cyt yang membentuk karakteristik kristal paraspora (Lereclus *et al.*, 1984). Selain melalui plasmid, sekuen yang menunjukkan lebih dari 99% kesamaan dalam urutan gen 16S rRNA sebenarnya dapat dibedakan pada tingkat spesies dengan hibridisasi DNA-DNA. Contohnya strain *B. globisporus* dan *B. psychrophilus* yang menunjukkan kesamaan sekuen 99,5% pada gen 16S rRNA, tetapi hanya 23-50% yang terkait secara genetik dengan hibridisasi DNA-DNA (Wisotzkey *et al.*, 1992).

Sekuen contig isolat PGPR-K1 dan PGPR-K2 asal tanah terpupuk dan tidak terpupuk kimia yang memiliki similaritas 100% dengan *B. cereus* sebelumnya pernah didapati oleh Abedinzadeh *et al.*, (2019) pada sampel rhizosfer jagung di Iran, Kumar *et al.*, (2020) pada rhizosfer bayam di India, Fasusi *et al.*, (2021) pada rhizosfer jagung dan kedelai di Afrika Selatan, serta Izza *et al.*, (2018) pada rhizosfer gulma di Malang, Indonesia.

Selanjutnya analisis keberadaan chimera sebagai prasyarat pendaftaran sekuen ke NCBI dengan hasil negatif pada sekuen PGPR-K1 dan PGPR-K2 menunjukkan amplifikasi yang dilakukan berhasil dan tidak terjadi kontaminasi. Chimera merupakan produk hibrida antara beberapa sekuen asli yang ditafsirkan secara keliru sebagai organisme baru. Chimeria merupakan artefak PCR yang diyakini terbentuk ketika ampikon yang dihentikan sebelum waktunya beranil ulang dengan DNA bakteri non-target yang terekstraksi dan kemudian disalin hingga selesai dalam siklus PCR berikutnya (Haas *et al.*, 2011). Banyak penelitian menyatakan bahwa sekuensing ampikon 16S dengan PCR memberikan Gambaran yang keliru tentang kelimpahan populasi mikroba karena adanya chimera (Chen *et al.*, 2020; Steinegger & Salzberg, 2020). Chimera menyebabkan perbedaan hasil cukup besar pada interpretasi biologis genom, khususnya dalam membuat kesimpulan yang salah tentang penempatan posisi filogenetik

sehingga harus dipastikan keberadaannya (Orakov *et al.*, 2021).

Data sekuen yang ditambahkan ke database NCBI mengikuti ketentuan untuk spesies apa pun yang sekuennya memiliki similaritas $\geq 97\%$ dengan sekuen yang dipublikasikan dengan identifikasi tingkat spesies, spesies tersebut diberi identifikasi tingkat spesies dari sekuen yang dipublikasikan; untuk spesies apa pun yang sekuennya memiliki similaritas ≥ 90 tetapi $< 97\%$ dengan sekuen yang dipublikasikan dengan identifikasi tingkat spesies atau genus, spesies tersebut diberi identifikasi tingkat genus dari sekuen yang dipublikasikan; untuk setiap spesies yang sekuennya memiliki similaritas $\geq 80\%$ tetapi $< 90\%$ dengan sekuen yang dipublikasikan dengan identifikasi tingkat spesies, genus, atau famili, spesies tersebut diberi sekuen identifikasi tingkat famili dari sekuen yang dipublikasikan (Andersen *et al.*, 2019).

Analisis selanjutnya dilanjutkan dengan rekonstruksi pohon filogenetik yang mendapati keberadaan sekuen PGPR-K1 dan PGPR-K2 pada satu klad dengan *B. cereus*. Rekonstruksi pohon filogenetik dilakukan menggunakan pendekatan Maximum Likelihood yang diusulkan oleh Felsenstein, (1973) didasarkan pada kemampuannya dalam memaksimalkan probabilitas dari setiap sekuen dengan memperhitungkan penataan ulang genom serta duplikasi, insersi, dan delesi untuk menghasilkan pohon filogenetik, sehingga akurasi yang

diperoleh lebih tinggi dibandingkan pendekatan lain (Lin *et al.*, 2013). Selanjutnya penggunaan 1000x *bootstrap* didasarkan pada fungsinya yang mereplikasi semua probabilitas pohon guna mendapatkan konsensus pohon yang paling banyak untuk memastikan suatu klad terletak pada posisi yang sebenarnya (Moraes & Selvatti, 2018). Hasil *bootstrap* yang rendah pada beberapa percabangan pohon diduga disebabkan sekuen yang digunakan memiliki sejarah evolusi berbeda yang dimungkinkan disebabkan adanya polimorfisme ancestors, rekombinasi dalam lokus, serta kemungkinan duplikasi dan hilangnya sekuen (Mirarab *et al.*, 2016).

Hasil rekonstruksi pohon filogenetik diperkuat menggunakan analisis ASAP dengan hasil serupa yang menempatkan sekuen PGPR-K1 dan PGPR-K2 pada kelompok *B. cereus* strain lainnya serta *B. thuringiensis* pada kelompok *B. cereus*. ASAP (*assemble species by automatic partitioning*) merupakan sebuah metode yang membagi beberapa spesies kedalam partisi-partisi berdasarkan penjajaran sekuens lokus tunggal yang dengan cepat menampilkan hasil dalam antarmuka eksplorasi grafis yang dapat digunakan sebagai hipotesis spesies yang relevan sebagai langkah pertama proses taksonomi (Puillandre *et al.*, 2021). Hasil pembagian partisi dengan skor ASAP terendah yang menempatkan sekuen PGPR-K1 dan PGPR-K2 serta *B. cereus* pembanding kedalam kelompok spesies *Bacillus* lain dimungkinkan terjadi karena

jarak genetik antar sekuen terlalu dekat sehingga menyebabkan kegagalan sistem dalam membagi partisinya.

B. cereus diklasifikasikan sebagai bakteri gram positif dengan GC% rendah yang termasuk dalam filum Firmicutes, bersifat aerobik atau anaerobik fakultatif, motil dan mampu membentuk spora dengan adanya oksigen yang terdiri dari setidaknya delapan spesies yang berkerabat dekat meliputi *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus*, dan *B. toyonensis*. *B. cereus* ditemukan di tanah, debu, udara, air, bahan yang membusuk, produk makanan, serta akar tanaman (Ehling-Schulz *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2015).

Hasil uji kemampuan PGPR yang diperoleh pada penelitian ini sejalan dengan penelitian lain seperti Zakavi *et al.*, (2022) yang mendapati kemampuan *B. cereus* dalam menambat kalium, kemudian Wagi & Ahmed, (2019) pada kemampuan produksi IAA sebesar 49.33 µg/ml, Kumar *et al.*, (2020) yang mendapati kemampuan produksi ammonia, Saleem *et al.*, (2017) yang mendapati pelarutan fosfat sebesar $519.4 \pm 11.8 \text{ mg L}^{-1}$, serta kemampuan penambat nitrogen sebesar $94.52 \pm 4.99 \text{ nmol}$ melalui gen *nifH* pada penelitian Yousuf *et al.*, (2017). Selain kemampuan PGPR yang diujikan pada penelitian ini, *B. cereus* diketahui memproduksi giberelin dan asam organik (Khan *et al.*, 2020), siderofor (Sivasankari &

Anandharaj, 2014), *volatile organic compounds* (VOCs) (Hu *et al.*, 2023), serta ACC deaminase (Tian *et al.*, 2022).

B. cereus diketahui mengkolonisasi akar tanaman dengan membentuk biofilm yang diekspresikan oleh gen *ptsH* melalui peningkatan regulasi produksi *MnSOD2* (Gao *et al.*, 2019). Aktivitas *B. cereus* dalam menginduksi pertumbuhan jagung telah banyak diteliti, aplikasi *B. cereus* diketahui meningkatkan panjang akar sebesar 41,01%, tinggi batang 47,06%, berat basah 77,81%, serta berat kering 193,7% pada hari kesepuluh oleh Kumar *et al.*, (2020), kemudian pada penelitian Akintokun *et al.*, (2020) didapati peningkatan tinggi batang sebesar 13,18% pada minggu kedelapan, serta Zakavi *et al.*, (2022) yang mendapati peningkatan bobot kering tajuk sebesar 133,89%, akar 237,08%, tinggi batang 125%, dan panjang akar 119,44% pada hari ke 20 dibandingkan kontrol. Selain pada jagung, *B. cereus* diketahui meningkatkan pertumbuhan kedelai (*Glycine max* L. Merr.), gandum (*Triticum aestivum* L.), kubis China (*Brassica rapa* L., *Chinensis* Group) (Ku *et al.*, 2018), kentang (*Solanum tuberosum* L.) (Ali *et al.*, 2021), kacang ercis (*Pisum sativum* L.) (Sherpa *et al.*, 2021), tomat (*Solanum lycopersicum* L.) (Ajilogba & Babalola, 2016) dan padi (*Oryza sativa* L. var. FARO 44) (Ibrahim & Ikhajiagbe, 2021).

Selain menginduksi pertumbuhan jagung, *B. cereus* diketahui memiliki aktivitas biokontrol terhadap jamur

Fusarium verticillioides penyebab busuk batang dan bonggol jagung (Figuerola-López *et al.*, 2016), memproduksi EPS (*extracellular polymeric substances*) menahan air tanah (Naseem *et al.*, 2024), meningkatkan toleransi stress garam (Lv *et al.*, 2024), mengurangi kadar H₂O₂ dan malondialdehid (MDA) yang merupakan penanda stress oksidatif (He *et al.*, 2021), serta meningkatkan toleransi stress panas (Khan *et al.*, 2020).

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

A. SIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, dapat disimpulkan bahwa

1. Aktivitas isolat *Plant Growth Promoting Rhizobia* (PGPR) asal tanah terpupuk kimia dalam menginduksi pertumbuhan jagung lebih tinggi tidak secara signifikan dibandingkan isolat asal tanah tidak terpupuk kimia.
2. Spesies *Plant Growth Promoting Rhizobia* (PGPR) dengan aktivitas induksi pertumbuhan jagung tertinggi asal tanah terpupuk kimia (PGPR-K1) dan asal tanah tidak terpupuk (PGPR-K2) berdasarkan Gen 16S rRNA diketahui merupakan *Bacillus cereus*.

B. SARAN

Beberapa saran guna mengembangkan penelitian ini meliputi

1. Pengujian kuantitatif pada aktivitas penambatan nitrogen, pelarutan fosfat, dan pelarutan kalium serta uji aktivitas PGPR lain seperti produksi ACC deaminase, siderofor, giberelin, β -1,3-Glucanase dan uji lain guna mengetahui keseluruhan mekanisme induksi pertumbuhan jagung oleh *Bacillus cereus* 4589 dan XAM21.
2. Penelitian lebih lanjut pada fase pertumbuhan jagung V3 hingga R6 serta penelitian secara langsung pada lahan

pertanian guna mengetahui aktivitas *Bacillus cereus* 4589 dan *Bacillus cereus* XAM21 dalam menginduksi pertumbuhan jagung secara in vivo, serta aplikasi ke tanaman lain seperti padi, tomat, dan kedelai.

3. Penggunaan primer Gen 16S rRNA yang lebih spesifik untuk mencegah hasil peak kurang maksimal serta diperlukan pengujian secara biokimia lanjutan dan analisis molekuler menggunakan hibridisasi DNA-DNA guna mengidentifikasi strain sekuen yang didapatkan.
4. Penelitian pada jenis tanah serta parameter lingkungan yang berbeda guna memastikan aktivitas PGPR pada tanah terpupuk kimia dan tidak terpupuk secara menyeluruh.
5. Analisis keseluruhan genom *Bacillus cereus* asal tanah terpupuk kimia dan tidak terpupuk untuk mengetahui adanya kemungkinan mutasi yang disebabkan faktor lingkungan.

DAFTAR PUSTAKA

- Aasfar, A., Bargaz, A., Yaakoubi, K., Hilali, A., Bennis, I., Zeroual, Y., & Meftah Kadmiri, I. (2021). Nitrogen Fixing *Azotobacter* Species as Potential Soil Biological Enhancers for Crop Nutrition and Yield Stability. *Frontiers in Microbiology*, 12.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.628379>
- Abbott, A. (1995). Sequence Analysis: New Methods for Old Ideas. *Annual Review of Sociology*, 21(1), 93–113.
<https://doi.org/10.1146/annurev.soc.21.1.93>
- Abdelwahed, S., Trabelsi, E., Saadouli, I., Kouidhi, S., Masmoudi, A. S., Cherif, A., Mnif, W., & Mosbah, A. (2022). A new pioneer colorimetric micro-plate method for the estimation of ammonia production by plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Main Group Chemistry*, 21(1), 55–68. <https://doi.org/10.3233/MGC-210077>
- Abedinzadeh, M., Etesami, H., & Alikhani, H. A. (2019). Characterization of rhizosphere and endophytic bacteria from roots of maize (*Zea mays* L.) plant irrigated with wastewater with biotechnological potential in agriculture. *Biotechnology Reports*, 21, e00305.
<https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2019.E00305>
- Abellan-Schneyder, I., Matchado, M. S., Reitmeier, S., Sommer, A., Sewald, Z., Baumbach, J., List, M., & Neuhaus, K. (2021).

Primer, Pipelines, Parameters: Issues in 16S rRNA Gene Sequencing. *MSphere*, 6(1).

<https://doi.org/10.1128/MSPHERE.01202-20>

Adoko, M. Y., Noumavo, A. D. P., Agbodjato, N. A., Amogou, O., Salami, H. A., Aguégué, R. M., Adjovi Ahoyo, N., Adjanohoun, A., & Baba-Moussa, L. (2022). Effect of the application or coating of PGPR-based biostimulant on the growth, yield and nutritional status of maize in Benin. *Frontiers in Plant Science*, 13.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1064710>

Agbodjato, N. A., Noumavo, P. A., Baba-Moussa, F., Salami, H. A., Sina, H., Sèzan, A., Bankolé, H., Adjanohoun, A., & Baba-Moussa, L. (2015). Characterization of potential plant growth promoting rhizobacteria isolated from Maize (*Zea mays* L.) in central and Northern Benin (West Africa). *Applied and Environmental Soil Science*, 2015.

<https://doi.org/10.1155/2015/901656>

Agustiyan, D. (2016). Penapisan dan Karakterisasi Rhizobakteria serta Uji Aktivitasnya dalam Mendukung Perkecambahan dan Pertumbuhan Benih Jagung (*Zea mays* L.). *Jurnal Biologi Indonesia*, 12(2), 241–248.

Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*,

- 26(1), 1–20.
<https://doi.org/10.1016/J.JKSUS.2013.05.001>
- Ahmed, W., Jing, H., Kaillou, L., Qaswar, M., Khan, M. N., Jin, C., Geng, S., Qinghai, H., Yiren, L., Guangrong, L., Mei, S., Chao, L., Dongchu, L., Ali, S., Normatov, Y., Mehmood, S., & Zhang, H. (2019). Changes in phosphorus fractions associated with soil chemical properties under long-term organic and inorganic fertilization in paddy soils of southern China. *PLoS ONE*, 14(5).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0216881>
- Ajilogba, C. F., & Babalola, O. O. (2016). RAPD Profiling of *Bacillus* spp with PGPR Potential and Their Effects on Mineral Composition of Tomatoes. *Journal of Human Ecology*, 56(1–2), 42–54.
<https://doi.org/10.1080/09709274.2016.11907036>
- Akhtar, N., Naveed, M., Khalid, M., Ahmad, N., Rizwan, M., & Siddique, S. (2018). Effect of bacterial consortia on growth and yield of maize grown in *Fusarium* infested soil. *Soil and Environment*, 37(1), 35–44.
<https://doi.org/10.25252/SE/18/872>
- Akihary, C. V., & Kolondam, B. J. (2020). Utilization of the 16S rRNA gene as a bacterial identification device for research in Indonesia. *Pharmacon*, 9(1), 16–22.
- Akintokun, P. O., Ezaka, E., Akintokun, A. K., & Oyedele, O. A. (2020). Effects of two rhizobacteria inoculants on maize

- growth performance at different concentrations of glyphosate. *Nigerian Journal of Biotechnology*, 37(1), 21–37. <https://doi.org/10.4314/njb.v37i1.3>
- AlAli, H. A., Khalifa, A., & Al-Malki, M. (2021). Plant growth-promoting rhizobacteria from *Ocimum basilicum* improve growth of *Phaseolus vulgaris* and *Abelmoschus esculentus*. *South African Journal of Botany*, 139, 200–209. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2021.02.019>
- Alarcón, M. V., Salguero, J., & Lloret, P. G. (2019). Auxin modulated initiation of lateral roots is linked to pericycle cell length in Maize. *Frontiers in Plant Science*, 10, 413484. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.00011/BIBTEX>
- Al-Dimasyqî, I. ibn K. al-Q. (1978). Tafsîr al-Qur'an al-Azîm, juz 3. In *Tafsîr al-Qur'an al-Azîm, juz 3* (p. 1438). Dâr al-Ma'rifah.
- Ali, A. M., Awad, M. Y. M., Hegab, S. A., Gawad, A. M. A. El, & Eissa, M. A. (2021). Effect of potassium solubilizing bacteria (*Bacillus cereus*) on growth and yield of potato. *Journal of Plant Nutrition*, 44(3), 411–420. <https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1822399>
- Allen, R. J., & Waclaw, B. (2019). Bacterial growth: a statistical physicist's guide. *Reports on Progress in Physics. Physical Society (Great Britain)*, 82(1), 016601. <https://doi.org/10.1088/1361-6633/AAE546>

- Al-Marâgî, A. M. (1974). Tafsîr al-Marâgî. In *Tafsîr al-Marâgî* (1st ed., p. 101). Mustafa Al-Babi Al-Halabi.
- Alori, E. T., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUN), 971.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00971/BIBTEX>
- Al-Shuhaib, M. B. S., & Hashim, H. O. (2023). Mastering DNA chromatogram analysis in Sanger sequencing for reliable clinical analysis. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1186/S43141-023-00587-6/FIGURES/1>
- Anas, M., Liao, F., Verma, K. K., Sarwar, M. A., Mahmood, A., Chen, Z. L., Li, Q., Zeng, X. P., Liu, Y., & Li, Y. R. (2020). Fate of nitrogen in agriculture and environment: agronomic, eco-physiological and molecular approaches to improve nitrogen use efficiency. *Biological Research*, 53(1).
<https://doi.org/10.1186/S40659-020-00312-4>
- Andersen, J. C., Oboyski, P., Davies, N., Charlat, S., Ewing, C., Meyer, C., Krehenwinkel, H., Lim, J. Y., Noriyuki, S., Ramage, T., Gillespie, R. G., & Roderick, G. K. (2019). Categorization of species as native or nonnative using DNA sequence signatures without a complete reference

- library. *Ecological Applications*, 29(5).
<https://doi.org/10.1002/EAP.1914>
- Andualem, B., & Gessesse, A. (2013). Production of microbial medium from defatted brebra (*Milletia ferruginea*) seed flour to substitute commercial peptone agar. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(10), 790.
[https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60157-4](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60157-4)
- Arsita, R., Karim, H., Hala, Y., Iriany, N., & Jumadi, O. (2020). Isolation and identification of nitrogen-fixing bacteria in the corn rhizosphere (*Zea mays* l.) originating from Jeneponto Regency, South Sulawesi. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 484(1).
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/484/1/012051>
- Astriani, M., & Murtiyaningsih, H. (2018). Pengukuran Indole-3-Acetic Acid (IAA) pada *Bacillus* sp dengan Penambahan L-Tryptopan. *Bio Edu Science*, 2(2), 116.
<https://doi.org/10.29405/j.bes/22116-1212233>
- Badan Pusat Statistik. (2021). *Analisis Produktivitas Jagung dan Kedelai di Indonesia 2021 (Hasil Survey Ubinan)*.
- Bai, Y. C., Chang, Y. Y., Hussain, M., Lu, B., Zhang, J. P., Song, X. B., Lei, X. S., & Pei, D. (2020). Soil chemical and microbiological properties are changed by long-term chemical fertilizers that limit ecosystem functioning. *Microorganisms*, 8(5).
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8050694>

- Barrow, N. J. (2017). The effects of pH on phosphate uptake from the soil. *Plant and Soil*, 410(1-2), 401–410. <https://doi.org/10.1007/S11104-016-3008-9>/METRICS
- Barrow, N. J., & Hartemink, A. E. (2023). The effects of pH on nutrient availability depend on both soils and plants. *Plant and Soil*, 487(1-2), 21–37. <https://doi.org/10.1007/S11104-023-05960-5>/FIGURES/14
- Ben-David, A., & Davidson, C. E. (2014). Estimation method for serial dilution experiments. *Journal of Microbiological Methods*, 107, 214–221. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2014.08.023>
- Bhanse, P., Kumar, M., Singh, L., Awasthi, M. K., & Qureshi, A. (2022). Role of plant growth-promoting rhizobacteria in boosting the phytoremediation of stressed soils: Opportunities, challenges, and prospects. *Chemosphere*, 303(Pt 1), 1). <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2022.134954>
- Bhattacharyya, C., Banerjee, S., Acharya, U., Mitra, A., Mallick, I., Halder, A., Halder, S., Ghosh, A., & Ghosh, A. (2020). Evaluation of plant growth promotion properties and induction of antioxidative defense mechanism by tea rhizobacteria of Darjeeling, India. *Scientific Reports*, 10(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72439-z>

- Boyanova, L. (2018). Direct Gram staining and its various benefits in the diagnosis of bacterial infections. *Postgraduate Medicine*, 130(1), 105–110. <https://doi.org/10.1080/00325481.2018.1398049>
- Breedt, G., Labuschagne, N., & Coutinho, T. A. (2017). Seed treatment with selected plant growth-promoting rhizobacteria increases maize yield in the field. *Annals of Applied Biology*, 171(2), 229–236. <https://doi.org/10.1111/AAB.12366>
- Brown, P. H., Zhao, F. J., & Dobermann, A. (2022). What is a plant nutrient? Changing definitions to advance science and innovation in plant nutrition. *Plant and Soil*, 476(1–2), 11–23. <https://doi.org/10.1007/s11104-021-05171-w>
- Bulgarelli, D., Garrido-Oter, R., Münch, P. C., Weiman, A., Dröge, J., Pan, Y., McHardy, A. C., & Schulze-Lefert, P. (2015). Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell Host and Microbe*, 17(3), 392–403. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.01.011>
- Burén, S., & Rubio, L. M. (2018). State of the art in eukaryotic nitrogenase engineering. *FEMS Microbiology Letters*, 365(2). <https://doi.org/10.1093/FEMSLE/FNX274>

- Cabeen, M. T., & Jacobs-Wagner, C. (2005). Bacterial cell shape. *Nature Reviews Microbiology* 2005 3:8, 3(8), 601–610. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1205>
- Canellas, L. P., Canellas, N. O. A., Luiz Eduardo, L. E. S., Olivares, F. L., & Piccolo, A. (2020). Plant chemical priming by humic acids. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 7(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/S40538-020-00178-4/FIGURES/9>
- Cappuccino, J. G., & Sherman, N. (1992). *Microbiology: A Laboratory Manual*. Benjamin/Cummings Pub. Co.
- Carrazco, A. M., Navarro-Noya, Y. E., Govaerts, B., Verhulst, N., & Dendooven, L. (2022). Nitrogen Fertilizer Application Alters the Root Endophyte Bacterial Microbiome in Maize Plants, but Not in the Stem or Rhizosphere Soil. *Microbiology Spectrum*, 10(6). <https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.01785-22>
- Cassán, F., Perrig, D., Sgroi, V., Masciarelli, O., Penna, C., & Luna, V. (2009). *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of Soil Biology*, 45(1), 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.08.005>

- Chakraborty, P., Sarker, R. K., Roy, R., Ghosh, A., Maiti, D., & Tribedi, P. (2019). Bioaugmentation of soil with *Enterobacter cloacae* AKS7 enhances soil nitrogen content and boosts soil microbial functional-diversity. *3 Biotech*, 9(7), 253. <https://doi.org/10.1007/S13205-019-1791-8>
- Chandra, S., Askari, K., & Kumari, M. (2018). Optimization of indole acetic acid production by isolated bacteria from *Stevia rebaudiana* rhizosphere and its effects on plant growth. *Journal of Genetic Engineering & Biotechnology*, 16(2), 581. <https://doi.org/10.1016/J.JGEB.2018.09.001>
- Chen, L., Hao, Z., Li, K., Sha, Y., Wang, E., Sui, X., Mi, G., Tian, C., & Chen, W. (2021). Effectsof growth-promoting rhizobacteria on maize growth and rhizosphere microbial community under conservation tillage in Northeast China. *Microbial Biotechnology*, 14(2), 535. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13693>
- Chen, L. X., Anantharaman, K., Shaiber, A., Murat Eren, A., & Banfield, J. F. (2020). Accurate and complete genomes from metagenomes. *Genome Research*, 30(3), 315–333. <https://doi.org/10.1101/GR.258640.119/-/DC1>
- Chen, Q., Lan, C., Zhao, L., Wang, J., Chen, B., & Chen, Y. P. P. (2017). Recent advances in sequence assembly: principles and applications. *Briefings in Functional*

- Genomics*, 16(6), 361–378.
<https://doi.org/10.1093/BFGP/ELX006>
- Chen, Y. J., & Huang, X. (2009). DNA Sequencing By Denaturation: Principle and Thermodynamic Simulations. *Analytical Biochemistry*, 384(1), 170.
<https://doi.org/10.1016/J.AB.2008.09.048>
- Chen, Y., Yang, H., Shen, Z., & Ye, J. (2022). Whole-Genome Sequencing and Potassium-Solubilizing Mechanism of *Bacillus aryabhatai* SK1-7. *Frontiers in Microbiology*, 12(January), 1–9.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.722379>
- Chika, S. (2023). Variasi Genetik Kultivar Jambu Semarang (*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M. Perry) Dari Kabupaten Demak Menggunakan Second Internal Transcribed Spacer (ITS-2) [Walisongo Islamic State].
[https://eprints.walisongo.ac.id/id/eprint/20438/1/1908016030_Syifara Chika_Lengkap Tugas Akhir - Syifara Chika UIN Walisongo Semarang.pdf](https://eprints.walisongo.ac.id/id/eprint/20438/1/1908016030_Syifara%20Chika_Lengkap%20Tugas%20Akhir%20-%20Syifara%20Chika%20UIN%20Walisongo%20Semarang.pdf)
- Choudhary, D. K., & Johri, B. N. (2009). Interactions of *Bacillus* spp. and plants – With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*, 164(5), 493–513.
<https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2008.08.007>
- Chowdhury, S. P., Hartmann, A., Gao, X. W., & Borriss, R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus*

- amyloliquefaciens* FZB42 - A review. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 6, Issue JUL). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00780>
- Clark, D. P., & Pazdernik, N. J. (2016). Chapter 5 - RNA-based technologies. *Biotechnology (Second Edition)*, 131–179.
- Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 840. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>
- Colombo, C., Palumbo, G., He, J. Z., Pinton, R., & Cesco, S. (2014). Review on iron availability in soil: Interaction of Fe minerals, plants, and microbes. *Journal of Soils and Sediments*, 14(3), 538–548. <https://doi.org/10.1007/S11368-013-0814-Z/METRICS>
- Cong, S. (2021). Factors affecting agriculture. *Journal Plant Biology Agricultural Science*, 2(9), 1–1.
- Cornelis, G. R., & Gijsegem, F. Van. (2000). Assembly And Function Of Type III Secretory Systems. In *Annu. Rev. Microbiol* (Vol. 54). www.annualreviews.org
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, 16(22), 10881. <https://doi.org/10.1093/NAR/16.22.10881>
- Cowling, C. L., Dash, L., & Kelley, D. R. (2023). Roles of auxin pathways in maize biology. *Journal of Experimental*

Botany, 74(22), 6989–6999.

<https://doi.org/10.1093/JXB/ERAD297>

Crossley, B. M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M. L., Clement, T., & Toohey-Kurth, K. (2020). Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(6), 767–775.

https://doi.org/10.1177/1040638720905833/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_1040638720905833-FIG1.JPEG

Cui, X., Tang, C., & Zhang, Q. (2018). A Review of Electrocatalytic Reduction of Dinitrogen to Ammonia under Ambient Conditions. *Advanced Energy Materials*, 8(22), 1800369. <https://doi.org/10.1002/AENM.201800369>

Das, T. K., Pradhan, S., Chakrabarti, S., Mondal, K. C., & Ghosh, K. (2022). Current status of probiotic and related health benefits. *Applied Food Research*, 2(2), 100185. <https://doi.org/10.1016/J.AFRES.2022.100185>

Davis, K. E. R., Joseph, S. J., & Janssen, P. H. (2005). Effects of Growth Medium, Inoculum Size, and Incubation Time on Culturability and Isolation of Soil Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 826. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.826-834.2005>

De Moraes Russo, C. A., & Selvatti, A. P. (2018). *Bootstrap* and rogue identification tests for phylogenetic analyses.

- Molecular Biology and Evolution*, 35(9), 2327–2333.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msy118>
- Dey, P. (2018). Sanger Sequencing and Next-Generation Gene Sequencing: Basic Principles and Applications in Pathology. In *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology* (pp. 227–231). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8252-8_23
- Dhillon, J. S., Eickhoff, E. M., Mullen, R. W., & Raun, W. R. (2019). World Potassium Use Efficiency in Cereal Crops. *Agronomy Journal*, 111(2), 889–896.
<https://doi.org/10.2134/AGRONJ2018.07.0462>
- Di Salvo, L. P., Cellucci, G. C., Carlino, M. E., & García de Salamone, I. E. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation and nitrogen fertilization increase maize (*Zea mays* L.) grain yield and modified rhizosphere microbial communities. *Applied Soil Ecology*, 126, 113–120.
<https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2018.02.010>
- Dias, A. C., Alves, G. C., Silva, T. F. R. da, & Reis, V. M. (2023). Inoculation effects of growthpromoting bacteria on corn root architecture: influence of nitrogen levels, bacterial populations, and plant genotypes. *Revista Brasileira de Ciência Do Solo*, 47.
<https://doi.org/10.36783/18069657rbcs20230059>

- Dlamini, S. P., Akanmu, A. O., Fadiji, A. E., & Babalola, O. O. (2023). Maize rhizosphere modulates the microbiome diversity and community structure to enhance plant health. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30(1), 103499. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2022.103499>
- Dong, N., Prentice, I. C., Wright, I. J., Evans, B. J., Togashi, H. F., Caddy-Retalic, S., McInerney, F. A., Sparrow, B., Leitch, E., & Lowe, A. J. (2020). Components of leaf-trait variation along environmental gradients. *The New Phytologist*, 228(1), 82–94. <https://doi.org/10.1111/NPH.16558>
- Dörr, T., Moynihan, P. J., & Mayer, C. (2019). Editorial: Bacterial Cell Wall Structure and Dynamics. *Frontiers in Microbiology*, 10, 487209. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.02051/BIBTEX>
- dos Santos, R. M., Diaz, P. A. E., Lobo, L. L. B., & Rigobelo, E. C. (2020). Use of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in Maize and Sugarcane: Characteristics and Applications. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4, 565611. <https://doi.org/10.3389/FSUFS.2020.00136/BIBTEX>
- Dutta, B., Gitaitis, R., Smith, S., & Langston, D. (2014). Interactions of seedborne bacterial pathogens with host and non-host plants in relation to seed infestation and seedling transmission. *PLoS ONE*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099215>

- Dutta, J., & Thakur, D. (2017). Evaluation of multifarious plant growth promoting traits, antagonistic potential and phylogenetic affiliation of rhizobacteria associated with commercial tea plants grown in Darjeeling, India. *PLoS ONE*, 12(8).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182302>
- Edwards, J. (2009). *Procrop Maize growth & development* (J. Edward, Ed.; 1st ed.). NSW Department of Primary Industries.
- Ehling-Schulz, M., Fricker, M., Grallert, H., Rieck, P., Wagner, M., & Scherer, S. (2006). Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXO1. *BMC Microbiology*, 6.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-20>
- Ehling-Schulz, M., Koehler, T. M., & Lereclus, D. (2019). The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* species with Pathogenic Potential. *Microbiology Spectrum*, 7(3).
<https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.GPP3-0032-2018>
- Eling Sasmito, D. K., Kurniawan, R., & Muhimmah, I. (2014). Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk Sekuensing DNA: Mini Review. In *Seminar Nasional Informatika Medis*.

- Engelke, D. R., Krikos, A., Bruck, M. E., & Ginsburg, D. (1990). Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Analytical Biochemistry*, 191(2), 396–400. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(90\)90238-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(90)90238-5)
- Erland, L. A. E., & Saxena, P. (2019). Auxin driven indoleamine biosynthesis and the role of tryptophan as an inductive signal in *Hypericum perforatum* (L.). *PLOS ONE*, 14(10), e0223878. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0223878>
- Etesami, H., Emami, S., & Alikhani, H. A. (2017). Potassium solubilizing bacteria (KSB):: Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects A review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 17(4), 897–911. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162017000400005>
- Evandro, A. D., Newton Martin, T., Monçon Fipke, G., Deolinda Leivas Stecca, J., Almeri Tabaldi, L., Russi Nunes, U., Eduardo Minussi Winck, J., & Fernando Teleken Grando, L. (2019). Effects of soil temperature and moisture on biological nitrogen fixation in soybean crop. *AJCS*, 13(08), 1835–2707. <https://doi.org/10.21475/ajcs.19.13.08.p1739>
- Evans, J. P., Powell, B. C., & Berg, J. S. (2017). Finding the Rare Pathogenic Variants in a Human Genome. *JAMA*, 317(18), 1904–1905. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2017.0432>

- Fasim, F., Ahmed, N., Parsons, R., & Gadd, G. M. (2002). Solubilization of zinc salts by a bacterium isolated from the air environment of a tannery. *FEMS Microbiology Letters*, 213(1), 1–6. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2002.TB11277.X>
- Fasusi, O. A., Amoo, A. E., & Babalola, O. O. (2021). Characterization of plant growth-promoting rhizobacterial isolates associated with food plants in South Africa. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 114(10), 1683–1708. <https://doi.org/10.1007/S10482-021-01633-4/FIGURES/5>
- Fauzul Izza, J., Qurata Aini, L., & Rizkyta Kusuma, R. (2018). Utilization Rhizobacteria on Weeds in UB Forest as Antagonistic Agents to Bacterial Wilt in Potato. In *Jurnal Biotropika* / (Vol. 6, Issue 2).
- Felsenstein, J. (1973). Maximum Likelihood and Minimum-Steps Methods for Estimating Evolutionary Trees from Data on Discrete Characters. *Systematic Biology*, 22(3), 240–249. <https://doi.org/10.1093/SYSBIO/22.3.240>
- Feng, K., Cai, Z., Ding, T., Yan, H., Liu, X., & Zhang, Z. (2019). Effects of potassium-solubilizing and photosynthetic bacteria on tolerance to salt stress in maize. *Journal of Applied Microbiology*, 126(5), 1530–1540. <https://doi.org/10.1111/JAM.14220>

- Figuerola-López, A. M., Cordero-Ramírez, J. D., Martínez-Álvarez, J. C., López-Meyer, M., Lizárraga-Sánchez, G. J., Félix-Gastélum, R., Castro-Martínez, C., & Maldonado-Mendoza, I. E. (2016). Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides*. *SpringerPlus*, 5(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S40064-016-1780-X/TABLES/3>
- Galindo, F. S., Strock, J. S., & Pagliari, P. H. (2022). Impacts of corn stover management and fertilizer application on soil nutrient availability and enzymatic activity. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06042-9>
- Gang, S., Sharma, S., Saraf, M., Buck, M., & Schumacher, J. (2019). Analysis of Indole-3-acetic Acid (IAA) Production in *Klebsiella* by LC-MS/MS and the Salkowski Method. *Bio-Protocol*, 9(9), 181–190. <https://doi.org/10.21769/BIOPROTOC.3230>
- Gao, T., Ding, M., Yang, C. H., Fan, H., Chai, Y., & Li, Y. (2019). The phosphotransferase system gene ptsH plays an important role in MnSOD production, biofilm formation, swarming motility, and root colonization in *Bacillus cereus* 905. *Research in Microbiology*, 170(2), 86–96. <https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2018.10.002>

- Gassner, A., Harris, D., Mausch, K., Terheggen, A., Lopes, C., Finlayson, R. F., & Dobie, P. (2019). Poverty eradication and food security through agriculture in Africa: Rethinking objectives and entry points. *Outlook on Agriculture*, 48(4), 309–315. https://doi.org/10.1177/0030727019888513/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_0030727019888513-FIG1.JPEG
- Gautam, A. (2022). *DNA Isolation by Lysozyme and Proteinase K*. 85–88. https://doi.org/10.1007/978-3-030-94230-4_11
- Getahun, A., Muleta, D., Assefa, F., & Kiros, S. (2020). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Isolated from Degraded Habitat Enhance Drought Tolerance of *Acacia* (*Acacia abyssinica* Hochst. Ex benth.) seedlings. *International Journal of Microbiology*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8897998>
- Ghannam, M. G., & Varacallo, M. (2022). Biochemistry, Polymerase Chain Reaction. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535453/>
- Ghorai, P., & Ghosh, D. (2023). Screening and isolation of potential nitrogen-fixing *Enterobacter* sp. GG1 from mangrove soil with its accelerated impact on green chili plant (*Capsicum frutescens* L.) growth amelioration.

- Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 11(6), 193–201. <https://doi.org/10.7324/JABB.2023.139674>
- Gilbert, J. A., & Neufeld, J. D. (2014). Life in a World without Microbes. *PLOS Biology*, 12(12), e1002020. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1002020>
- Gill, C., Van De Wijgert, J. H. H. M., Blow, F., & Darby, A. C. (2016). Evaluation of Lysis Methods for the Extraction of Bacterial DNA for Analysis of the Vaginal Microbiota. *PLoS ONE*, 11(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0163148>
- Goldsworthy, P. R., & Fisher, N. M. (1992). *Fisiologi Tanaman Budidaya Tropik* (Soedharoedjian, Ed.). Gadjah Mada University Press. <https://opac.perpusnas.go.id/DetailOpac.aspx?id=303724>
- Gomes, A., & Korf, B. (2017). Genetic Testing Techniques. *Pediatric Cancer Genetics*, 47–64. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48555-5.00005-3>
- Gordon, S. A., & Weber, R. P. (1951). Colorimetric Estimation Of Indole Acetic Acid. *Plant Physiology*, 26(1), 192. <https://doi.org/10.1104/PP.26.1.192>
- Gummadi, S., & Kandula, V. N. (2020). a Review on Electrophoresis, Capillary Electrophoresis and Hyphenations. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 11(12), 6038.

[https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.11\(12\).6038-56](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.11(12).6038-56)

- Guo, J., Liu, W., Zhu, C., Luo, G., Kong, Y., Ling, N., Wang, M., Dai, J., Shen, Q., & Guo, S. (2018). Bacterial rather than fungal community composition is associated with microbial activities and nutrient-use efficiencies in a paddy soil with short-term organic amendments. *Plant and Soil*, 424(1–2), 335–349. <https://doi.org/10.1007/S11104-017-3547-8/METRICS>
- Gupta, N. (2019). DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *Journal of Cytology*, 36(2), 116. https://doi.org/10.4103/JOC.JOC_110_18
- Gupta, R., Kumari, A., Sharma, S., Alzahrani, O. M., Noureldeen, A., & Darwish, H. (2022). Identification, characterization and optimization of phosphate solubilizing rhizobacteria (PSRB) from rice rhizosphere. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(1), 35. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2021.09.075>
- Gupta, S., & Roy, A. (2021). Deciphering the Role of Phytoanticipins, Phytoalexins, and Polyphenols in Plant-Insect Defense. *Plant-Pest Interactions: From Molecular Mechanisms to Chemical Ecology*, 305–335. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2467-7_13/COVER

- Ha, T. T. T., Lam, T. T., Huyen, N. T., & Canh, N. X. (2018). Characterization and identification of nitrogenfixing bacteria isolated from agricultural soil. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, 60(3), 48–54. [https://doi.org/10.31276/VJSTE.60\(3\).48](https://doi.org/10.31276/VJSTE.60(3).48)
- Haas, B. J., Gevers, D., Earl, A. M., Feldgarden, M., Ward, D. V., Giannoukos, G., Ciulla, D., Tabbaa, D., Highlander, S. K., Sodergren, E., Methé, B., DeSantis, T. Z., Petrosino, J. F., Knight, R., & Birren, B. W. (2011). Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Research*, 21(3), 494. <https://doi.org/10.1101/GR.112730.110>
- Hachiya, T., & Sakakibara, H. (2017). Interactions between nitrate and ammonium in their uptake, allocation, assimilation, and signaling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 68(10), 2501–2512. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERW449>
- Hadija, Kuswinanti, T., Jayadi, M., & Larekeng, S. H. (2021). Isolation, characterization and identification of nitrogen fixing bacteria with organic fertilizer applications in paddy soil. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 807(2). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/807/2/022024>

- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*.
- Hamada, M. A., & Soliman, E. R. S. (2023). Characterization and genomics identification of key genes involved in denitrification-DNRA-nitrification pathway of plant growth-promoting rhizobacteria (*Serratia marcescens* OK482790). *BMC Microbiology*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/S12866-023-02941-7>
- Haswania, Karim, H., Azis, A. A., Iriany, N., & Jumadi, O. (2021). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from corn rhizosfer. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 911(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/911/1/012063>
- He, A., Niu, S., Yang, D., Ren, W., Zhao, L., Sun, Y., Meng, L., Zhao, Q., Paré, P. W., & Zhang, J. (2021). Two PGPR strains from the rhizosphere of *Haloxylon ammodendron* promoted growth and enhanced drought tolerance of ryegrass. *Plant Physiology and Biochemistry*, 161, 74–85. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2021.02.003>
- Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1. <https://doi.org/10.1016/J.YGENO.2015.11.003>
- Herdiyantoro, D., Setiawati, M. R., Simarmata, T., Nurlaeny, N., Joy, B., Hamdani, J. S., & Handayani, I. (2018). The ability

- of potassium solubilizing rhizo-bacteria isolated from maize rhizosphere for microbial fertilizer. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 205(1).
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/205/1/012011>
- Hermiati, H., Nurtjahya, E., & Mansur, I. (2021). Abundance and potency of Non-Symbiotic Nitrogen-Fixing Bacteria in Padang Sapu-sapu, Pejem Village, Bangka. *Berkala Sainstek*, 9(2), 95.
<https://doi.org/10.19184/bst.v9i2.20057>
- Himedia. (2015). *Pikovskayas Agar M520*. 1–2.
- Himedia. (2019). Aleksandrow Agar. *HiMedia Laboratories*, 1–3.
- Himedia. (2020). Burks Medium. *HiMedia Laboratories*, 1–2.
www.himedialabs.com
- Hou, Q., Bai, X., Li, W., Gao, X., Zhang, F., Sun, Z., & Zhang, H. (2018). Design of primers for evaluation of lactic acid bacteria populations in complex biological samples. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG), 2045.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02045/BIBTEX>
- Hu, J., Dong, B., Wang, D., Meng, H., Li, X., & Zhou, H. (2023). Genomic and metabolic features of *Bacillus cereus*, inhibiting the growth of *Sclerotinia sclerotiorum* by synthesizing secondary metabolites. *Archives of Microbiology*, 205(1), 1–13.

<https://doi.org/10.1007/S00203-022-03351-5/FIGURES/5>

- Hu, X., Chen, J., & Guo, J. (2006). Two phosphate- and potassium-solubilizing bacteria isolated from Tianmu Mountain, Zhejiang, China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(9), 983–990. <https://doi.org/10.1007/S11274-006-9144-2>
- Huang, X. F., Zhou, D., Guo, J., Manter, D. K., Reardon, K. F., & Vivanco, J. M. (2015). *Bacillus* spp. from rainforest soil promote plant growth under limited nitrogen conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 118(3), 672–684. <https://doi.org/10.1111/JAM.12720>
- Hyder, S., Gondal, A. S., Rizvi, Z. F., Ahmad, R., Alam, M. M., Hannan, A., Ahmed, W., Fatima, N., & Inam-ul-Haq, M. (2020). Characterization of native plant growth promoting rhizobacteria and their anti-oomycete potential against *Phytophthora capsici* affecting chilli pepper (*Capsicum annum* L.). *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-020-69410-3>
- Hyder, S., Gondal, A. S., Rizvi, Z. F., Atiq, R., Haider, M. I. S., Fatima, N., & Inam-ul-Haq, M. (2021). Biological Control of Chili Damping-Off Disease, Caused by *Pythium myriotylum*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 587431. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.587431/BIBTEX>

- Ibrahim, M. S., & Ikhajiagbe, B. (2021). The growth response of rice (*Oryza sativa* L. var. FARO 44) in vitro after inoculation with bacterial isolates from a typical ferruginous ultisol. *Bulletin of the National Research Centre* 2021 45:1, 45(1), 1–20.
<https://doi.org/10.1186/S42269-021-00528-8>
- Imade, E. E., & Babalola, O. O. (2021). Biotechnological utilization: the role of *Zea mays* rhizospheric bacteria in ecosystem sustainability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(11), 4487–4500.
<https://doi.org/10.1007/S00253-021-11351-6>/METRICS
- International Code of Conduct for the Sustainable Use and Management of Fertilizers, Food And Agricultural of the United Nations 1 (2019).
<http://www.fao.org/3/ca5253en/ca5253en.pdf>
- Irawan, B., Tamin, R. P., & Hardiyanti, R. A. (2021). Morphological Responses of a Light-Demanding *Alstonia scholaris* and a Shade-Tolerant *Eusideroxylon zwageri* to the Air Humidity and Light Intensity. *Jurnal Manajemen Hutan Tropika*, 27(3), 193–193.
<https://doi.org/10.7226/JTFM.27.3.193>
- Ismangil, & Hanudin, E. (2005). *Degradasi Mineral Batuan oleh Asam-Asam Organik*.

- Jaja, E. T., & Barber, L. I. (2017). Organic and Inorganic Fertilizers in Food Production System in Nigeria. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* , 7(18).
www.iiste.org
- Jay, Z. J., & Inskeep, W. P. (2015). The distribution, diversity, and importance of 16S rRNA gene introns in the order Thermoproteales. *Biology Direct*, 10(1).
<https://doi.org/10.1186/S13062-015-0065-6>
- Jochum, M. D., McWilliams, K. L., Borrego, E. J., Kolomiets, M. V., Niu, G., Pierson, E. A., & Jo, Y. K. (2019). Bioprospecting Plant Growth-Promoting Rhizobacteria That Mitigate Drought Stress in Grasses. *Frontiers in Microbiology*, 10.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.02106/FULL>
- Joko, T., Istiqomah, D., Windari, U., & Ayu Hardini, P. (2015). Pengaruh PGPR Terhadap Pertumbuhan Plantlet Jagung Dan Antagonismenya Terhadap Jamur Terbawa Benih Secara In Vitro. *Seminar Nasional Hasil Penelitian Pertanian 2015, Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada*.
- Joshi, M., & Deshpande, J. D. (2011). Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles And Application. *International Journal of Biomedical Research*, 81–97.
www.ssjournals.com
- Kadri, K., & Kadri, K. (2019). Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. *Synthetic Biology - New*

<https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.86491>

- Kamnev, A. A., Shchelochkov, A. G., Perfiliev, Y. D., Tarantilis, P. A., & Polissiou, M. G. (2001). Spectroscopic investigation of indole-3-acetic acid interaction with iron(III). *Journal of Molecular Structure*, 563–564, 565–572. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(00\)00911-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(00)00911-X)
- Karnwal, A. (2017). Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from maize (*Zea mays* L.) rhizosphere and their plant growth promoting effect on rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Protection Research*, 57(2), 144–151. <https://doi.org/10.1515/JPPR-2017-0020>
- Karnwal, A., & Dohroo, A. (2018). Effect of maize root exudates on indole-3-acetic acid production by rice endophytic bacteria under influence of L-tryptophan. *F1000Research*, 7. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.13644.1>
- Karpagam, T., & Nagalakshmi, P. K. (2014). Isolation and characterization of phosphate solubilizing microbes from agricultural soil. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(3), 601–614.
- Kayasth, M., Gera, R., Dudeja, S. S., Sharma, P. K., & Kumar, V. (2014). Studies on salinization in Haryana soils on free-living nitrogen-fixing bacterial populations and their

- activity. *Journal of Basic Microbiology*, 54(3), 170–179.
<https://doi.org/10.1002/JOBM.201200158>
- Kementan. (2020). *Outlook Komoditas Tanaman Pangan Jagung Tahun 2020* (A. A. Susanti & A. Supriyatna, Eds.; 1st ed., Vol. 1). Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian Sekretariat Jenderal Kementerian Pertanian.
- Khaeim, H., Kende, Z., Jolánkai, M., Kovács, G. P., Gyuricza, C., & Tarnawa, Á. (2022). Impact of Temperature and Water on Seed Germination and Seedling Growth of Maize (*Zea mays* L.). *Agronomy* 2022, Vol. 12, Page 397, 12(2), 397.
<https://doi.org/10.3390/AGRONOMY12020397>
- Khalid, N., Tarnawa, Á., Kende, Z., Kassai, K. M., & Jolánkai, M. (2021). Viability of maize (*Zea mays* L) seeds influenced by water, temperature, and salinity stress. *Acta Hydrologica Slovaca*, 22(1), 113–117. <https://doi.org/10.31577/AHS-2021-0022.01.0013>
- Khalil, I. E., Xue, C., Liu, W., Li, X., Shen, Y., Li, S., Zhang, W., & Huo, F. (2021). The Role of Defects in Metal–Organic Frameworks for Nitrogen Reduction Reaction: When Defects Switch to Features. *Advanced Functional Materials*, 31(17), 2010052.
<https://doi.org/10.1002/ADFM.202010052>
- Khan, M. A., Asaf, S., Khan, A. L., Jan, R., Kang, S. M., Kim, K. M., & Lee, I. J. (2020). Thermotolerance effect of plant growth-promoting *Bacillus cereus* SA1 on soybean during heat

stress. *BMC Microbiology*, 20(1), 1–14.
[https://doi.org/10.1186/S12866-020-01822-](https://doi.org/10.1186/S12866-020-01822-7)
 7/FIGURES/6

Khoso, M. A., Wagan, S., Alam, I., Hussain, A., Ali, Q., Saha, S., Poudel, T. R., Manghwar, H., & Liu, F. (2024). Impact of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on plant nutrition and root characteristics: Current perspective. *Plant Stress*, 11, 100341.
<https://doi.org/10.1016/J.STRESS.2023.100341>

Kifle, M. H., & Laing, M. D. (2016). Isolation and screening of bacteria for their diazotrophic potential and their influence on growth promotion of maize seedlings in greenhouses. *Frontiers in Plant Science*, 6(JAN2016), 147315.
<https://doi.org/10.3389/FPLS.2015.01225/BIBTEX>

Kim, M., Morrison, M., & Yu, Z. (2011). Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. *Journal of Microbiological Methods*, 84(1), 81–87.
<https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2010.10.020>

Knights, H. E., Jorin, B., Haskett, T. L., & Poole, P. S. (2021). Deciphering bacterial mechanisms of root colonization. *Environmental Microbiology Reports*, 13(4), 428.
<https://doi.org/10.1111/1758-2229.12934>

- Koonin, E. V., & Galperin, M. Y. (2003). *Principles and Methods of Sequence Analysis*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20261/>
- Korbie, D. J., & Mattick, J. S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, 3(9), 1452–1456.
<https://doi.org/10.1038/NPROT.2008.133>
- Kour, D., Rana, K. L., Kaur, T., Yadav, N., Halder, S. K., Yadav, A. N., Sachan, S. G., & Saxena, A. K. (2020). Potassium solubilizing and mobilizing microbes: Biodiversity, mechanisms of solubilization, and biotechnological implication for alleviations of abiotic stress. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Trends of Microbial Biotechnology for Sustainable Agriculture and Biomedicine Systems: Diversity and Functional Perspectives*, 177–202.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820526-6.00012-9>
- Kour, D., Rana, K. L., Yadav, N., Yadav, A. N., Kumar, A., Meena, V. S., Singh, B., Chauhan, V. S., Dhaliwal, H. S., & Saxena, A. K. (2019). Rhizospheric Microbiomes: Biodiversity, Mechanisms of Plant Growth Promotion, and Biotechnological Applications for Sustainable Agriculture. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Agricultural Sustainability*, 19–65.
https://doi.org/10.1007/978-981-13-7553-8_2

- Krasilnikov, P., Taboada, M. A., & Amanullah. (2022). Fertilizer Use, Soil Health and Agricultural Sustainability. In *Agriculture (Switzerland)* (Vol. 12, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/agriculture12040462>
- Ku, Y., Xu, G., Tian, X., Xie, H., Yang, X., & Cao, C. (2018). Root colonization and growth promotion of soybean, wheat and Chinese cabbage by *Bacillus cereus* YL6. *PloS One*, 13(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0200181>
- Kuan, K. B., Othman, R., Rahim, K. A., & Shamsuddin, Z. H. (2016). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Inoculation to Enhance Vegetative Growth, Nitrogen Fixation and Nitrogen Remobilisation of Maize under Greenhouse Conditions. *PloS One*, 11(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0152478>
- Kumar, A., Patel, J. S., Bahadur, I., & Meena, V. S. (2016). The molecular mechanisms of ksms for enhancement of crop production under organic farming. *Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture*, 61–75. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2776-2_5/COVER
- Kumar, P., Pahal, V., Gupta, A., Vadhan, R., Chandra, H., & Dubey, R. C. (2020). Effect of silver nanoparticles and *Bacillus cereus* LPR2 on the growth of *Zea mays*. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77460-w>

- Kumar, S., Kumar, S., & Mohapatra, T. (2021). Interaction Between Macro- and Micro-Nutrients in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2021.665583>
- Kumolontang, W. J. N., Widiatmaka, W., Purwanto, Moh. Y. J., Paat, F. J., & Nangoi, R. (2022). *Klasifikasi Pupuk* (F. J. Paat, Ed.; 1st ed., Vol. 1). CV Mineral Mutiara Bumi. <https://www.researchgate.net/publication/361262168>
- Lambers, H. (2022). Phosphorus Acquisition and Utilization in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 73, 17–42. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-102720-125738>
- Lana Bentes Lobo, L., Mendes dos Santos, R., & Cid Rigobelo, E. (2019). Promotion of maize growth using endophytic bacteria under greenhouse and field conditions. *AJCS*, 13(12), 1835–2707. <https://doi.org/10.21475/ajcs.19.13.12.p2077>
- Lebrazi, S., Niehaus, K., Bednarz, H., Fadil, M., Chraibi, M., & Fikri-Benbrahim, K. (2020). Screening and optimization of indole-3-acetic acid production and phosphate solubilization by rhizobacterial strains isolated from *Acacia cyanophylla* root nodules and their effects on its plant growth. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00090-2>

- Lelapalli, S., Baskar, S., Jacob, S. M., & Paranthaman, S. (2021). Characterization of phosphate solubilizing plant growth promoting rhizobacterium *Lysinibacillus pashiae* strain PCPSMR15 isolated from *Oryza sativa*. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100080. <https://doi.org/10.1016/J.CRMICR.2021.100080>
- Lephatsi, M., Nephali, L., Meyer, V., Piater, L. A., Buthelezi, N., Dubery, I. A., Opperman, H., Brand, M., Huyser, J., & Tugizimana, F. (2022). Molecular mechanisms associated with microbial biostimulant-mediated growth enhancement, priming and drought stress tolerance in maize plants. *Scientific Reports* 2022 12:1, 12(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14570-7>
- Lereclus, D., Ribier, J., Klier, A., Menou, G., & Lecadet, M. M. (1984). A transposon-like structure related to the delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *The EMBO Journal*, 3(11), 2561–2567. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1984.TB02174.X>
- Levin, P. A., & Angert, E. R. (2015). Small but Mighty: Cell Size and Bacteria. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(7), 1–11. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A019216>
- Li, C., Liu, J., Bao, J., Wu, T., & Chai, B. (2023). Effect of Light Heterogeneity Caused by Photovoltaic Panels on the

- Plant–Soil–Microbial System in Solar Park. *Land*, 12(2), 367. <https://doi.org/10.3390/LAND12020367/S1>
- Li, F. L., & Bao, W. K. (2015). New insights into leaf and fine-root trait relationships: implications of resource acquisition among 23 xerophytic woody species. *Ecology and Evolution*, 5(22), 5344–5351. <https://doi.org/10.1002/ECE3.1794>
- Li, H., Zhao, Y., Jiang, X., Li, H., Zhao, Y., & Jiang, X. (2019). Seed soaking with *Bacillus* sp. strain HX-2 alleviates negative effects of drought stress on maize seedlings. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 79(3), 396–404. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392019000300396>
- Li, J., Chen, F., Li, Y., Li, P., Wang, Y., Mi, G., & Yuan, L. (2019). ZmRAP2.7, an AP2 Transcription Factor, Is Involved in Maize Brace Roots Development. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.00820>
- Li, J., Wu, F., He, Y., He, B., Gong, Y., Yahaya, B. S., Xie, Y., Xie, W., Xu, J., Wang, Q., Feng, X., Liu, Y., & Lu, Y. (2022). Maize Transcription Factor ZmARF4 Confers Phosphorus Tolerance by Promoting Root Morphological Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4). <https://doi.org/10.3390/IJMS23042361>
- Li, Y. C., Li, Z. W., Lin, W. W., Jiang, Y. H., Weng, B. Q., & Lin, W. X. (2018). [Effects of biochar and sheep manure on rhizospheric soil microbial community in continuous

- ratooning tea orchards]. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao = The Journal of Applied Ecology*, 29(4), 1273–1282.
<https://doi.org/10.13287/J.1001-9332.201804.036>
- Li, Y., Han, S., & Qi, Y. (2023). Advances in structure and function of auxin response factor in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 65(3), 617–632.
<https://doi.org/10.1111/JIPB.13392>
- Li, Z., Chi, Y., Su, X., Ye, Z., & Ren, X. (2023). Rhizobium Soaking Promoted Maize Growth by Altering Rhizosphere Microbiomes and Associated Functional Genes. *Microorganisms*, 11(7), 1654.
<https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11071654/S1>
- Li, Z. G., Lu, X. Q., & Chen, J. (2023). Gasotransmitter ammonia accelerates seed germination, seedling growth, and thermotolerance acquirement in maize. *Plant Signaling & Behavior*, 18(1).
<https://doi.org/10.1080/15592324.2022.2163338>
- Liang, T., Hu, Y., Xi, N., Zhang, M., Zou, C., Ge, F., Yuan, G., Gao, S., Zhang, S., Pan, G., Ma, L., Lübberstedt, T., & Shen, Y. (2023). GWAS across multiple environments and WGCNA suggest the involvement of ZmARF23 in embryonic callus induction from immature maize embryos. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und*

Angewandte Genetik, 136(4).
<https://doi.org/10.1007/S00122-023-04341-X>

- Lihan, S., Benet, F., Husaini, A. A. S. A., Apun, K., Roslan, H. A., & Hassan, H. (2021). Isolation and Identification of Plant Growth Promoting Rhizobacteria from Sago Palm (*Metroxylon sagu*, Rottb.). *Tropical Life Sciences Research*, 32(3), 39. <https://doi.org/10.21315/TLSR2021.32.3.3>
- Lin, W., Lin, M., Zhou, H., Wu, H., Li, Z., & Lin, W. (2019). The effects of chemical and organic fertilizer usage on rhizosphere soil in tea orchards. *PLOS ONE*, 14(5), e0217018.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0217018>
- Lin, Y., Hu, F., Tang, J., & Moret, B. M. E. (2013). Maximum Likelihood Phylogenetic Reconstruction from High-Resolution Whole-Genome Data and a Tree of 68 Eukaryotes. *Pacific Symposium on Biocomputing. Pacific Symposium on Biocomputing*, 285.
https://doi.org/10.1142/9789814447973_0028
- Liu, C. W., Sung, Y., Chen, B. C., & Lai, H. Y. (2014). Effects of nitrogen fertilizers on the growth and nitrate content of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(4), 4427–4440. <https://doi.org/10.3390/IJERPH110404427>
- Liu, Q., Xu, H., & Yi, H. (2021). Impact of fertilizer on crop yield and c:N:P stoichiometry in arid and semi-arid soil.

International Journal of Environmental Research and Public Health, 18(8).

<https://doi.org/10.3390/ijerph18084341>

Liu, Y., Lai, Q., Göker, M., Meier-Kolthoff, J. P., Wang, M., Sun, Y., Wang, L., & Shao, Z. (2015). Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/SREP14082>

Liu, Y., & Von Wirén, N. (2017). Ammonium as a signal for physiological and morphological responses in plants. *Journal of Experimental Botany*, 68(10), 2581–2592. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERX086>

Liu, Z., Rong, Q., Zhou, W., & Liang, G. (2017). Effects of inorganic and organic amendment on soil chemical properties, enzyme activities, microbial community and soil quality in yellow clayey soil. *PLOS ONE*, 12(3), e0172767.

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0172767>

Longhi, T. V., Robaina, R. R., Leite Júnior, R. P., & Balbi-Peña, M. I. (2022). Sensibility of *Xanthomonas vasicola* pv. vasculorum to chemicals and efficiency of the chemical control of bacterial leaf streak on corn plants. *Acta Scientiarum - Agronomy*, 44.

<https://doi.org/10.4025/actasciagron.v44i1.54952>

Lorenz, T. C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization

- Strategies. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 63(63), 3998. <https://doi.org/10.3791/3998>
- Ly, Y., Xu, N., Ha, M., Tan, Z., Guo, S., Wang, J., Wang, Y., Sang, T., & Shu, S. (2024). *Bacillus cereus* enhances salt tolerance of cucumber seedlings by improving antioxidant metabolism and decreasing the ion toxicity. *Scientia Horticulturae*, 328, 112885. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2024.112885>
- Ma, S., Verheyen, K., Props, R., Wasof, S., Vanhellemont, M., Boeckx, P., Boon, N., & De Frenne, P. (2018). Plant and soil microbe responses to light, warming and nitrogen addition in a temperate forest. *Functional Ecology*, 32(5), 1293–1303. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13061>/SUPPINFO
- Mai-Prochnow, A., Clauson, M., Hong, J., & Murphy, A. B. (2016). Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/SREP38610>
- Malhotra, H., Vandana, Sharma, S., & Pandey, R. (2018). Phosphorus nutrition: Plant growth in response to deficiency and excess. In *Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance* (pp. 171–190). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-9044-8_7
- Manzoor, M., Abbasi, M. K., & Sultan, T. (2017). Isolation of Phosphate Solubilizing Bacteria from Maize Rhizosphere

- and Their Potential for Rock Phosphate Solubilization–Mineralization and Plant Growth Promotion. *Geomicrobiology Journal*, 34(1), 81–95.
<https://doi.org/10.1080/01490451.2016.1146373>
- Marpaung, A. E. (2021). Peranan Pupuk Organik Cair dan Bakteri Pelarut Fosfat *Bacillus* sp terhadap Peningkatan Serapan P dan Produksi Tanaman Kentang (*Solanum Tuberosum*).
- Maxam, A. M., & Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(2), 560–564.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.74.2.560>
- Meena, V. S., Maurya, B. R., & Verma, J. P. (2014). Does a rhizospheric microorganism enhance K⁺ availability in agricultural soils? *Microbiological Research*, 169(5–6), 337–347.
<https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2013.09.003>
- Meena, V. S., Maurya, B. R., Verma, J. P., Aeron, A., Kumar, A., Kim, K., & Bajpai, V. K. (2015). Potassium solubilizing rhizobacteria (KSR): Isolation, identification, and K-release dynamics from waste mica. *Ecological Engineering*, 81, 340–347.
<https://doi.org/10.1016/J.ECOLENG.2015.04.065>
- Meena, V. S., Maurya, B. R., Verma, J. P., & Meena, R. S. (2016). Potassium solubilizing microorganisms for sustainable

- agriculture. *Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture*, 1–331.
<https://doi.org/10.1007/978-81-322-2776-2/COVER>
- Meena, V. S., Zaid, A., Maurya, B. R., Meena, S. K., Bahadur, I., Saha, M., Kumar, A., Verma, R., & Wani, S. H. (2018). Evaluation of potassium solubilizing rhizobacteria (KSR): enhancing K-bioavailability and optimizing K-fertilization of maize plants under Indo-Gangetic Plains of India. *Environmental Science and Pollution Research International*, 25(36), 36412–36424.
<https://doi.org/10.1007/S11356-018-3571-0>
- Meng, A., Wen, D., & Zhang, C. (2022). Dynamic Changes in Seed Germination under Low-Temperature Stress in Maize. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10).
<https://doi.org/10.3390/IJMS23105495>
- Mirarab, S., Bayzid, M. S., & Warnow, T. (2016). Evaluating Summary Methods for Multilocus Species Tree Estimation in the Presence of Incomplete Lineage Sorting. *Systematic Biology*, 65(3), 366–380.
<https://doi.org/10.1093/SYSBIO/SYU063>
- Mitchell, S. L., Kearns, D. B., & Carlson, E. E. (2023). Penicillin-binding protein redundancy in *Bacillus subtilis* enables growth during alkaline shock. *BioRxiv*.
<https://doi.org/10.1101/2023.03.20.533529>

- Mncube, T. L., Phiri, E. E., Mothapo, P. N., Rugare, J. T., Pieterse, P. J., & Mloza-Banda, H. R. (2024). Characterising Productivity Factors Affecting Maize (*Zea mays*) Production in a Smallholder Crop-Livestock System. *Agricultural Research*, 13(1), 124–136. <https://doi.org/10.1007/S40003-023-00674-7/TABLES/8>
- Mohamed, A. E., Nessim, M. G., Abou-el-seoud, I. I., Darwish, K. M., & Shamseldin, A. (2019). Isolation and selection of highly effective phosphate solubilizing bacterial strains to promote wheat growth in Egyptian calcareous soils. *Bulletin of the National Research Centre* 2019 43:1, 43(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S42269-019-0212-9>
- Mohammadi, M. M., & Bavi, O. (2022). DNA sequencing: an overview of solid-state and biological nanopore-based methods. *Biophysical Reviews*, 14(1), 99. <https://doi.org/10.1007/S12551-021-00857-Y>
- Mohsen, M. G., Ji, D., & Kool, E. T. (2019). Polymerase synthesis of four-base DNA from two stable dimeric nucleotides. *Nucleic Acids Research*, 47(18), 9495. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ741>
- Murnita, M., & Taher, Y. A. (2021). Dampak Pupuk Organik Dan Anorganik Terhadap Perubahan Sifat Kimia Tanah Dan Produksi Tanaman Padi (*Oryza sativa* L.). *Menara Ilmu*, 15(02), 67–76.

- Mustapha, Z., Zakaria, A. J., Othman, R., Mohd, K. S., & Zawawi, D. D. (2022). Effects of Growth Medium, pH, Temperature and Salinity on BRIS Soil Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) Growth. *International Journal of Agriculture and Biology*, 28(3), 149–155. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.1963>
- Nadeem, S. M., Ahmad, M., Zahir, Z. A., Javaid, A., & Ashraf, M. (2014). The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology Advances*, 32(2), 429–448. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2013.12.005>
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Schiavon, M., & Ertani, A. (2016). Plant biostimulants: physiological responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism. *Scientia Agricola*, 73(1), 18–23. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0006>
- Nascimento, F. C., Kandasamy, S., Lazarovits, G., & Rigobelo, E. C. (2020). Effect of Chemical Fertilization on the Impacts of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in Maize Crops. *Current Microbiology*, 77(12), 3878–3887. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02207-9>
- Naseem, M., Chaudhry, A. N., Jilani, G., Alam, T., Naz, F., Ullah, R., Zahoor, M., Zaman, S., & Sohail. (2024). Exopolysaccharide-producing bacterial cultures of

- Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa* in soil augment water retention and maize growth. *Heliyon*, 10(4), e26104. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2024.E26104>
- Naveed, M., Qureshi, M. A., Zahir, Z. A., Hussain, M. B., Sessitsch, A., & Mitter, B. (2015). L-Tryptophan-dependent biosynthesis of indole-3-acetic acid (IAA) improves plant growth and colonization of maize by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *Annals of Microbiology*, 65(3), 1381–1389. <https://doi.org/10.1007/S13213-014-0976-Y/TABLES/4>
- Naz, M., Dai, Z., Hussain, S., Tariq, M., Danish, S., Khan, I. U., Qi, S., & Du, D. (2022). The soil pH and heavy metals revealed their impact on soil microbial community. *Journal of Environmental Management*, 321. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2022.115770>
- Noer, S. (2021). Identifikasi Bakteri secara Molekular Menggunakan 16S rRNA. *EduBiologia: Biological Science and Education Journal*, 1(1), 1. <https://doi.org/10.30998/edubiologia.v1i1.8596>
- Noumavo, P. A., Agbodjato, N. A., Gachomo, E. W., Salami, H. A., Baba-Moussa, F., Adjanohoun, A., Kotchoni, S. O., & Baba-Moussa, L. (2015). Metabolic and biofungicidal properties of maize rhizobacteria for growth promotion and plant

- disease resistance. *African Journal of Biotechnology*, 14(9), 811–819. <https://doi.org/10.4314/ajb.v14i9>.
- Noumavo, P. A., Kochoni, E., Didagbé, Y. O., Adjanohoun, A., Allagbé, M., Sikirou, R., Gachomo, E. W., Kotchoni, S. O., Baba-Moussa, L., Noumavo, P. A., Kochoni, E., Didagbé, Y. O., Adjanohoun, A., Allagbé, M., Sikirou, R., Gachomo, E. W., Kotchoni, S. O., & Baba-Moussa, L. (2013). Effect of Different Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Maize Seed Germination and Seedling Development. *American Journal of Plant Sciences*, 4(5), 1013–1021. <https://doi.org/10.4236/AJPS.2013.45125>
- Ogodo, A. C., Agwaranze, D. I., Daji, M., & Aso, R. E. (2022). Microbial techniques and methods: basic techniques and microscopy. *Analytical Techniques in Biosciences: From Basics to Applications*, 201–220. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822654-4.00003-8>
- Oleńska, E., Małek, W., Wójcik, M., Swiecicka, I., Thijs, S., & Vangronsveld, J. (2020). Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review. *Science of The Total Environment*, 743, 140682. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.140682>
- Orakov, A., Fullam, A., Coelho, L. P., Khedkar, S., Szklarczyk, D., Mende, D. R., Schmidt, T. S. B., & Bork, P. (2021). GUNC:

detection of chimerism and contamination in prokaryotic genomes. *Genome Biology*, 22(1).
<https://doi.org/10.1186/S13059-021-02393-0>

Orlova M, Shershebnov A., Borisevich D, Stetsenko I, Plakhina D, Krasnenko A, & Korostin D. (2017). Workflow For Replicable Sanger Sequencing Of Ngs-Derived Mutations In Clinical Application. *Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB 2017)*, 123–123.

Oteino, N., Lally, R. D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K. J., & Dowling, D. N. (2015). Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology*, 6(JUL), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00745>

Pahalvi, H. N., Rafiya, L., Rashid, S., Nisar, B., & Kamili, A. N. (2021). Chemical fertilizers and their impact on soil health. *Microbiota and Biofertilizers, Vol 2: Ecofriendly Tools for Reclamation of Degraded Soil Environs*, 1–20. https://doi.org/10.1007/978-3-030-61010-4_1/COVER

Pande, A., Pandey, P., Mehra, S., Singh, M., & Kaushik, S. (2017). Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *Journal of Genetic Engineering & Biotechnology*, 15(2), 379. <https://doi.org/10.1016/J.JGEB.2017.06.005>

- Panjaitan, F. J., Bachtiar, T., Arsyad, I., & Lele, O. K. (2020). Isolasi Dan Karakteristik Bakteri Pelarut Fosfat (Bpf) Dari Rhizosfer Tanaman Jagung Fase Vegetatif Dan Fase Generatif. *Agroplasma*, 7(2), 53–60.
- Pantoja-Guerra, M., Valero-Valero, N., & Ramírez, C. A. (2023). Total auxin level in the soil–plant system as a modulating factor for the effectiveness of PGPR inocula: a review. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 2023 10:1, 10(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/S40538-022-00370-8>
- Park, S., Kim, A. L., Hong, Y. K., Shin, J. H., & Joo, S. H. (2021). A highly efficient auxin-producing bacterial strain and its effect on plant growth. *Journal of Genetic Engineering & Biotechnology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/S43141-021-00252-W>
- Parnell, J. J., Pal, G., Awan, A., Vintila, S., Houdinet, G., Hawkes, C. V., Balint-Kurti, P. J., Wagner, M. R., & Kleiner, M. (2023). Effective seed sterilization methods require optimization across maize genotypes. *BioRxiv*, 2023.12.14.571779. <https://doi.org/10.1101/2023.12.14.571779>
- Patel, D., Patel, A., Vora, D., Menon, S., Vadakan, S., Acharya, D., & Goswami, D. (2018). A resourceful methodology to profile indolic auxins produced by rhizo-fungi using spectrophotometry and HPTLC. *3 Biotech*, 8(10), 413. <https://doi.org/10.1007/S13205-018-1428-3>

- Patel, K., Goswami, D., Dhandhukia, P., & Thakker, J. (2015). *Techniques to Study Microbial Phytohormones*. 1–27. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24654-3_1
- Patten, C. L., Blakney, A. J. C., & Coulson, T. J. D. (2013). Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(4), 395–415. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.716819>
- Paul, D., & Sinha, S. N. (2017). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential from river Ganga, India. *Annals of Agrarian Science*, 15(1), 130–136. <https://doi.org/10.1016/J.AASCI.2016.10.001>
- Penn, C. J., & Camberato, J. J. (2019). A Critical Review on Soil Chemical Processes that Control How Soil pH Affects Phosphorus Availability to Plants. *Agriculture 2019, Vol. 9, Page 120*, 9(6), 120. <https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE9060120>
- Pérez-Montaño, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R. A., Del Cerro, P., Espuny, M. R., Jiménez-Guerrero, I., López-Baena, F. J., Ollero, F. J., & Cubo, T. (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*, 169(5–6), 325–336. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2013.09.011>

- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., & Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Popham, D. L., & Young, K. D. (2003). Role of penicillin-binding proteins in bacterial cell morphogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 6(6), 594–599. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2003.10.002>
- Prajapati, K. B., & Modi, H. A. (2012). Isolation And Characterization Of Potassium Solubilizing Bacteria From Ceramic Industry Soil\ . In *Online) An Online International Journal Available at* (Vol. 1, Issue 3). <http://www.cibtech.org/cjm.htm>
- Pramanik, P., Goswami, A. J., Ghosh, S., & Kalita, C. (2019). An indigenous strain of potassium-solubilizing bacteria *Bacillus pseudomycoides* enhanced potassium uptake in tea plants by increasing potassium availability in the mica waste-treated soil of North-east India. *Journal of Applied Microbiology*, 126(1), 215–222. <https://doi.org/10.1111/JAM.14130>
- Priambodo, S. R., Susila, K. D., & Soniari, N. N. (2019). Pengaruh Pupuk Hayati dan Pupuk Anorganik Terhadap Beberapa Sifat Kimia Tanah Serta Hasil Tanaman Bayam Cabut

- (*Amaranthus tricolor*) di Tanah Inceptisol Desa Pedungan. *E-Jurnal Agroekoteknologi Tropika* , 8(1).
<https://ojs.unud.ac.id/index.php/JAT>
- Puillandre, N., Brouillet, S., & Achaz, G. (2021). ASAP: assemble species by automatic partitioning. *Molecular Ecology Resources*, 21(2), 609–620.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.13281>
- Putri, A., Putri, A. L., Purbani, D. C., Kanti, A., Kusmiati, M., & Habibi, M. (2020). Isolation and Identification of Actinomycetes Associated with Moss on the Surface of the Borobudur Temple Stone. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 12(1), 10–20.
<https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v12i1.20334>
- Qingwei, Z., Lushi, T., Yu, Z., Yu, S., Wanting, W., Jiangchuan, W., Xiaolei, D., Xuejiao, H., & Bilal, M. (2023). Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from rhizosphere of poplar on road verge and their antagonistic potential against various phytopathogens. *BMC Microbiology*, 23(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1186/S12866-023-02953-3/FIGURES/4>
- Rahman, M. M., Nahar, K., Ali, M. M., Sultana, N., Karim, M. M., Adhikari, U. K., Rauf, M., & Azad, M. A. K. (2020). Effect of Long-Term Pesticides and Chemical Fertilizers Application on the Microbial Community Specifically

- Anammox and Denitrifying Bacteria in Rice Field Soil of Jhenaidah and Kushtia District, Bangladesh. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 104(6), 828–833. <https://doi.org/10.1007/s00128-020-02870-5>
- Rahmawati, D., & Widyasari, K. (2021). Analysis of Phosphorus on Prill and Liquid Fertilizer Article. *Indonesian Journal of Chemistry and Environment*, 4(2), 73–78.
- Rajawat, M. V. S., Singh, S., Tyagi, S. P., & Saxena, A. K. (2016). A Modified Plate Assay for Rapid Screening of Potassium-Solubilizing Bacteria. *Pedosphere*, 26(5), 768–773. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(15\)60080-7](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(15)60080-7)
- Raji, M., & Thangavelu, M. (2021). Isolation and screening of potassium solubilizing bacteria from saxicolous habitat and their impact on tomato growth in different soil types. *Archives of Microbiology*, 203(6), 3147–3161. <https://doi.org/10.1007/S00203-021-02284-9>
- 9/METRICS
- Rana, B., & Joshi, G. K. (2023). Electrophoresis: Basic principle, types, and applications. *Basic Biotechniques for Bioprocess and Bioentrepreneurship*, 183–193. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816109-8.00011-8>
- Rasko, D. A., Rosovitz, M. J., Økstad, O. A., Fouts, D. E., Jiang, L., Cer, R. Z., Kolstø, A. B., Gill, S. R., & Ravel, J. (2007). Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal *Bacillus cereus* isolates reveals a

- common evolutionary history among the *B. cereus*-group plasmids, including *Bacillus anthracis* pXO1. *Journal of Bacteriology*, 189(1), 52–64.
<https://doi.org/10.1128/JB.01313-06>
- Rawat, J., Sanwal, P., & Saxena, J. (2016). Potassium and its role in sustainable agriculture. *Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture*, 235–253.
https://doi.org/10.1007/978-81-322-2776-2_17/COVER
- Razaq, M., Zhang, P., Shen, H. L., & Salahuddin. (2017). Influence of nitrogen and phosphorous on the growth and root morphology of Acer mono. *PLoS ONE*, 12(2).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171321>
- Reid, T. E., Kavamura, V. N., Abadie, M., Torres-Ballesteros, A., Pawlett, M., Clark, I. M., Harris, J., & Mauchline, T. H. (2021). Inorganic Chemical Fertilizer Application to Wheat Reduces the Abundance of Putative Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 12.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.642587>
- Renoud, S., Abrouk, D., Prigent-Combaret, C., Wisniewski-Dyé, F., Legendre, L., Moënné-Loccoz, Y., & Muller, D. (2022). Effect of Inoculation Level on the Impact of the PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1 on Selected Microbial Functional Groups in the Rhizosphere of Field Maize. *Microorganisms*, 10(2), 325.

<https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10020325/S1>

- Richardson, A. E., & Hadobas, P. A. (1997). Soil isolates of *Pseudomonas* spp. that utilize inositol phosphates. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(6), 509–516.
<https://doi.org/10.1139/M97-073>
- Roberts, J. T., McCubbin, T. J., & Braun, D. M. (2023). A Plate Growth Assay to Quantify Embryonic Root Development of *Zea mays*. *Bio-Protocol*, 13(20).
<https://doi.org/10.21769/BIOPROTOC.4858>
- Rodrigues, A. A., Forzani, M. V., Soares, R. de S., Sibov, S. T., & Vieira, J. D. G. (2016). Isolamento e seleção de bactérias promotoras de crescimento vegetal associadas a cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuaria Tropical*, 46(2), 149–158.
<https://doi.org/10.1590/1983-40632016v4639526>
- Rolfe, M. D., Rice, C. J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A. D. S., Alston, M., Stringer, M. F., Betts, R. P., Baranyi, J., Peck, M. W., & Hinton, J. C. D. (2012). Lag Phase Is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation. *Journal of Bacteriology*, 194(3), 686.
<https://doi.org/10.1128/JB.06112-11>
- Romero-Cortes, T., Tamayo-Rivera, L., Morales-Ovando, M. A., Burgos, J. E. A., España, V. H. P., Peralta-Gil, M., & Cuervo-Parra, J. A. (2022). Growth and Yield of Purple Kculli Corn

- Plants under Different Fertilization Schemes. *Journal of Fungi*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/jof8050433>
- Roychowdhury, D., Banerjee, S. K., Paul, M., & Banerjee, S. K. (2017). Isolation Identification and Partial Characterization of Nitrogen Fixing Bacteria from Soil and Then the Production of Biofertilizer. *SJ Impact Factor*:6, 887. www.ijraset.com
- Rozier, C., Hamzaoui, J., Lemoine, D., Czarnes, S., & Legendre, L. (2017). Field-based assessment of the mechanism of maize yield enhancement by *Azospirillum lipoferum* CRT1. *Scientific Reports* 2017 7:1, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07929-8>
- Saheewala, H., Sanadhya, S., Upadhyay, S. K., Mohanty, S. R., & Jain, D. (2023). Polyphasic Characterization of Indigenous Potassium-Solubilizing Bacteria and Its Efficacy Studies on Maize. *Agronomy* 2023, Vol. 13, Page 1919, 13(7), 1919. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY13071919>
- Saleem, A. M., Riaz, M., Shahzad, S. M., Yasmeen, T., Ali, S., & Akhtar, M. J. (2017). Phosphorus-Mobilizing Rhizobacterial Strain *Bacillus cereus* GS6 Improves Symbiotic Efficiency of Soybean on an Aridisol Amended with Phosphorus-Enriched Compost. *Pedosphere*, 27(6), 1049–1061. [https://doi.org/10.1016/s1002-0160\(17\)60366-7](https://doi.org/10.1016/s1002-0160(17)60366-7)

- Salem, Al. N., Khalifa Agil, H., & Khalifa Ibrahim, H. (2021). Use of fertilizers or importance of fertilizers in agriculture. *International Journal of Advanced Academic Studies*, 3(2), 52–57. www.allstudyjournal.com
- Saloner, A., & Bernstein, N. (2021). Nitrogen supply affects cannabinoid and terpenoid profile in medical cannabis (*Cannabis sativa* L.). *Industrial Crops and Products*, 167, 113516.
<https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2021.113516>
- Sánchez, B., Rasmussen, A., & Porter, J. R. (2014). Temperatures and the growth and development of maize and rice: a review. *Global Change Biology*, 20(2), 408–417.
<https://doi.org/10.1111/GCB.12389>
- Sandilya, S. P., Bhuyan, P. M., Nageshappa, V., Gogoi, D. K., & Kardong, D. (2017). Impact of *Pseudomonas aeruginosa* MAJ PIA03 affecting the growth and phytonutrient production of castor, a primary host-plant of *Samia ricini*. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 17(2), 499–514.
<https://doi.org/10.4067/S0718-95162017005000036>
- Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94(3).
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90213-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2)
- Sangoquiza-Caiza, C. A., Pincay-Verdezoto, A. K., Park, C. H., & Zambrano-Mendoza, J. L. (2023). Diversity of nitrogen-

- fixing and phosphorus-solubilizing bacteria associated with the rhizosphere of Andean maize in Ecuador. *Brazilian Journal of Biology*, 83. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.273632>
- Sarr, P. S., Sugiyama, A., Begoude, A. D. B., Yazaki, K., Araki, S., & Nawata, E. (2019). Diversity and distribution of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) croplands in Cameroon as revealed by Illumina MiSeq. *Rhizosphere*, 10. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2019.100147>
- Sattar, A., Naveed, M., Ali, M., Zahir, Z. A., Nadeem, S. M., Yaseen, M., Meena, V. S., Farooq, M., Singh, R., Rahman, M., & Meena, H. N. (2019). Perspectives of potassium solubilizing microbes in sustainable food production system: A review. *Applied Soil Ecology*, 133, 146–159. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2018.09.012>
- Saxena, A. K., Kumar, M., Chakdar, H., Anuroopa, N., & Bagyaraj, D. J. (2020). *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. *Journal of Applied Microbiology*, 128(6), 1583–1594. <https://doi.org/10.1111/jam.14506>
- Scanlan, C., Brennan, R., Sarre, G. A., Scanlan, C., Brennan, R., & Sarre, G. A. (2015). Effect of soil pH and crop sequence on the response of wheat (*Triticum aestivum*) to phosphorus

- fertiliser. *Crop and Pasture Science*, 66(1), 23–31.
<https://doi.org/10.1071/CP14192>
- Schmidt, G., Stiverson, J., Angen, Ø., & Yu, Z. (2014). Number of PCR Cycles and Magnesium Chloride Concentration Affect Detection of *Salmonella* Genes Encoding Ribosomal Protection Proteins in Swine Manure. *Advances in Microbiology*, 04(12), 780–787.
<https://doi.org/10.4236/aim.2014.412086>
- Sebastião, F. A., Furlan, L. R., Hashimoto, D. T., Pilarski, F., Sebastião, F. A., Furlan, L. R., Hashimoto, D. T., & Pilarski, F. (2015). Identification of Bacterial Fish Pathogens in Brazil by Direct Colony PCR and 16S rRNA Gene Sequencing. *Advances in Microbiology*, 5(6), 409–424.
<https://doi.org/10.4236/AIM.2015.56042>
- Seefeldt, L. C., Hoffman, B. M., Peters, J. W., Raugei, S., Beratan, D. N., Antony, E., & Dean, D. R. (2018). Energy Transduction in Nitrogenase. *Accounts of Chemical Research*, 51(9), 2179–2186.
<https://doi.org/10.1021/ACS.ACCOUNTS.8B00112>
- Sembiring, A., & Sumanto, N. L. (2022). Identification of Potential Isolate Phosphate Solubilizing Bacteria Used 16S rRNA Gene. *Bioscientist : Jurnal Ilmiah Biologi*, 10(2), 941–949.
<https://doi.org/10.33394/BIOSCIENTIST.V10I2.6218>

- Setiawati, T. C., & Mutmainnah, L. (2016). Solubilization of Potassium Containing Mineral by Microorganisms From Sugarcane Rhizosphere. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 9, 108–117. <https://doi.org/10.1016/J.AASPRO.2016.02.134>
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. In *SpringerPlus* (Vol. 2, Issue 1). SpringerOpen. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>
- Sharma, S., Kumar, V., & Tripathi, R. (2017). Isolation of phosphate solubilizing microorganism (PSMs) from soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*.
- Sheng, X. F., & He, L. Y. (2006). Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild-type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(1), 66–72. <https://doi.org/10.1139/W05-117>
- Sherpa, M. T., Bag, N., Das, S., Haokip, P., & Sharma, L. (2021). Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from organically grown high yielding pole type native pea (*Pisum sativum* L.) variety Dentami of Sikkim, India. *Current Research in Microbial Sciences*, 2. <https://doi.org/10.1016/J.CRMICR.2021.100068>

- Shi, Z., Guo, X., Lei, Z., Wang, Y., Yang, Z., Niu, J., & Liang, J. (2023). Screening of high-efficiency nitrogen-fixing bacteria from the traditional Chinese medicine plant *Astragalus mongolicus* and its effect on plant growth promotion and bacterial communities in the rhizosphere. *BMC Microbiology*, 23(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/S12866-023-03026-1>
- Siciliano, S. D., Palmer, A. S., Winsley, T., Lamb, E., Bissett, A., Brown, M. V., van Dorst, J., Ji, M., Ferrari, B. C., Grogan, P., Chu, H., & Snape, I. (2014). Soil fertility is associated with fungal and bacterial richness, whereas pH is associated with community composition in polar soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 78, 10–20. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2014.07.005>
- Silva, J. L. A., Souza, A. F., Caliman, A., Voigt, E. L., & Lichston, J. E. (2017). Weak whole-plant trait coordination in a seasonally dry South American stressful environment. *Ecology and Evolution*, 8(1), 4–12. <https://doi.org/10.1002/ECE3.3547>
- Silva, U. C., Cuadros-Orellana, S., Silva, D. R. C., Freitas-Júnior, L. F., Fernandes, A. C., Leite, L. R., Oliveira, C. A., & Dos Santos, V. L. (2021). Genomic and Phenotypic Insights Into the Potential of Rock Phosphate Solubilizing Bacteria to Promote Millet Growth in vivo. *Frontiers in Microbiology*,

- 11, 574550.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.574550/BIBTEX>
- Sitompul, S, M., & Guritno, B. (1995). *Analisis Pertumbuhan Tanaman*. Gadjah Mada University Press.
<https://opac.perpusnas.go.id/DetailOpac.aspx?id=681596>
- Sivasankari, B., & Anandharaj, M. (2014). Isolation and Molecular Characterization of Potential Plant Growth Promoting *Bacillus cereus* GGBSTD1 and *Pseudomonas* spp. GGBSTD3 from Vermisources. *Advances in Agriculture*, 2014.
<https://doi.org/10.1155/2014/248591>
- Soenarjo. (1992). *Al Qur'an dan Terjemahnya*. CV.Asy-Syifa'.
- Sood, Y., Singhmar, R., Singh, V., & Malik, D. K. (2023). Isolation and Characterization of Potential Potassium Solubilizing Bacteria with Various Plant Growth Promoting Traits. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 20(1), 79–84.
<https://doi.org/10.13005/BBRA/3070>
- Steinegger, M., & Salzberg, S. L. (2020). Terminating contamination: large-scale search identifies more than 2,000,000 contaminated entries in GenBank. *Genome Biology*, 21(1), 115. <https://doi.org/10.1186/S13059-020-02023-1>
- Strien, J., Sanft, J., & Mall, G. (2013). Enhancement of PCR amplification of moderate GC-containing and highly GC-

- rich DNA sequences. *Molecular Biotechnology*, 54(3), 1048–1054. <https://doi.org/10.1007/S12033-013-9660-X>
- Sun, F., Ou, Q., Wang, N., Guo, Z. xuan, Ou, Y., Li, N., & Peng, C. (2020). Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from *Mikania micrantha* rhizospheric soil and their effect on M. micrantha plants. *Global Ecology and Conservation*, 23, e01141. <https://doi.org/10.1016/J.GECCO.2020.E01141>
- Sun, S., Chen, Y., Cheng, J., Li, Q., Zhang, Z., & Lan, Z. (2018). Isolation, characterization, genomic sequencing, and GFP-marked insertional mutagenesis of a high-performance nitrogen-fixing bacterium, *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A and visualization of bacterial colonization on cucumber roots. *Folia Microbiologica*, 63(6), 789–802. <https://doi.org/10.1007/S12223-018-0608-1/METRICS>
- Sun, X., Yue, S., & Mangan, M. (2020). A decentralised neural model explaining optimal integration of navigational strategies in insects. *ELife*, 9, 1–30. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.54026>
- Suriani, Patandjengi, B., Muis, A., Junaid, M., Mirsam, H., & Azrai, M. (2023). Morpho-physiological and molecular characteristics of bacteria causing stalk rot disease on corn in Gorontalo, Indonesia. *Biodiversitas Journal of*

- Biological Diversity*, 24(3), 1749–1758.
<https://doi.org/10.13057/BIODIV/D240349>
- Szilagyi-Zecchin, V. J., Ikeda, A. C., Hungria, M., Adamoski, D., Kava-Cordeiro, V., Glienke, C., & Galli-Terasawa, L. V. (2014). Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. *AMB Express*, 4(1), 26. <https://doi.org/10.1186/S13568-014-0026-Y>
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I., & Murphy, A. (2015). *Plant physiology and development*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20173165866>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSAB120>
- Tang, A., Haruna, A. O., Majid, N. M. A., & Jalloh, M. B. (2020). Effects of Selected Functional Bacteria on Maize Growth and Nutrient Use Efficiency. *Microorganisms*, 8(6), 854. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8060854>
- Tao, J., Liu, X., Liang, Y., Niu, J., Xiao, Y., Gu, Y., Ma, L., Meng, D., Zhang, Y., Huang, W., Peng, D., & Yin, H. (2017). Maize growth responses to soil microbes and soil properties after fertilization with different green manures. *Applied*

- Microbiology and Biotechnology*, 101(3), 1289–1299.
<https://doi.org/10.1007/S00253-016-7938-1>
- Tariq, A., Mussarat, S., Adnan, M., Abdelsalam, N. M., Ullah, R., & Khan, A. L. (2014). Ethnoveterinary Study of Medicinal Plants in a Tribal Society of Sulaiman Range. *Scientific World Journal*, 2014.
<https://doi.org/10.1155/2014/127526>
- Tariq, M. R., Shaheen, F., Mustafa, S., Sajid, A. L. I., Fatima, A., Shafiq, M., Safdar, W., Sheas, M. N., Hameed, A., & Nasir, M. A. (2022). Phosphate solubilizing microorganisms isolated from medicinal plants improve growth of mint. *PeerJ*, 10. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.13782/SUPP-1>
- Tian, Z., Chen, Y., Chen, S., Yan, D., Wang, X., & Guo, Y. (2022). AcdS gene of *Bacillus cereus* enhances salt tolerance of seedlings in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 36(1), 902–913. <https://doi.org/10.1080/13102818.2022.2144450>
- Tripathi, N., & Sapra, A. (2022). Gram Staining. *StatPearls*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/>
- Uchida, R. (2000). Plant Nutrient Management in Hawaii's Soils. In *Plant Nutrient Management in Hawaii's Soils, Approaches for Tropical and Subtropical Agriculture* (Vol. 1, pp. 31–55). University of Hawaii.
- van Pelt-Verkuil, E., van Belkum, A., & Hays, J. P. (2008). A Brief Comparison Between In Vivo DNA Replication and In

- Vitro PCR Amplification. *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*, 9. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6241-4_2
- van Teeseling, M. C. F., de Pedro, M. A., & Cava, F. (2017). Determinants of bacterial morphology: From fundamentals to possibilities for antimicrobial targeting. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUL), 278838. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.01264/BIBTEX>
- Vázquez, D., Ramirez, S., Rincon, D., & Los Santos, R. (2021). Global Energy and Climate Outlook 2021: Advancing towards climate neutrality Taking stock of climate policy pledges after COP26 and the corresponding energy-economy implications. *Publications Office of the European Union, Luxembourg*, . <https://doi.org/10.2760/410610>
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., & Nasrulhaq Boyce, A. (2016). Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability-A review. *Molecules*, 21(5), 1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules21050573>
- Vetterlein, D., Carminati, A., Kögel-Knabner, I., Bienert, G. P., Smalla, K., Oburger, E., Schnepf, A., Banitz, T., Tarkka, M. T., & Schlüter, S. (2020). Rhizosphere Spatiotemporal Organization—A Key to Rhizosphere Functions. *Frontiers in Agronomy*, 2, 8. <https://doi.org/10.3389/FAGRO.2020.00008/BIBTEX>

- Vijayakumar, T., Divya, B., Vasanthi, V., Narayan, M., Kumar, A. R., & Krishnan, R. (2023). Diagnostic Utility of Gram Stain for Oral Smears – A Review. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 11(3), 130. https://doi.org/10.4103/JMAU.JMAU_108_22
- Vocciante, M., Grifoni, M., Fusini, D., Petruzzelli, G., & Franchi, E. (2022). The Role of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) in Mitigating Plant's Environmental Stresses. *Applied Sciences* 2022, Vol. 12, Page 1231, 12(3), 1231. <https://doi.org/10.3390/APP12031231>
- Vogel, A. I. (Arthur I., Jeffery, G. H., & Vogel, A. Israel. (1989). *Vogel's textbook of quantitative chemical analysis*. Longman Scientific & Technical.
- von Tucher, S., Hörndl, D., & Schmidhalter, U. (2017). Interaction of soil pH and phosphorus efficacy: Long-term effects of P fertilizer and lime applications on wheat, barley, and sugar beet. *Ambio* 2018 47:1, 47(1), 41–49. <https://doi.org/10.1007/S13280-017-0970-2>
- Wacnik, K., Rao, V. A., Chen, X., Lafage, L., Pazos, M., Booth, S., Vollmer, W., Hobbs, J. K., Lewis, R. J., & Foster, S. J. (2022). Penicillin-Binding Protein 1 (PBP1) of *Staphylococcus aureus* Has Multiple Essential Functions in Cell Division. *MBio*, 13(4). <https://doi.org/10.1128/MBIO.00669-22/ASSET/C0C99CE1-5308-48E8-976C->

7941C4B321A6/ASSETS/IMAGES/MEDIUM/MBIO.0066
9-22-F006.GIF

- Waday, Y. A., Girma Aklilu, E., Bultum, M. S., Ramayya Ancha, V., & Beyene, D. (2022). Isolation and Characterization of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria from Coffee Plantation Soils and Its Influence on Maize Growth. *Applied and Environmental Soil Science*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/5115875>
- Wagi, S., & Ahmed, A. (2019). *Bacillus* spp.: Potent microfactories of bacterial IAA. *PeerJ*, 2019(7). <https://doi.org/10.7717/PEERJ.7258/SUPP-2>
- Wang, R. R., Wang, Q., He, L. Y., Qiu, G., & Sheng, X. F. (2015). Isolation and the interaction between a mineral-weathering *Rhizobium tropici* Q34 and silicate minerals. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(5), 747–753. <https://doi.org/10.1007/S11274-015-1827-0/METRCS>
- Wang, T., Cao, X., Chen, M., Lou, Y., Wang, H., Yang, Q., Pan, H., & Zhuge, Y. (2022). Effects of Soil Acidification on Bacterial and Fungal Communities in the Jiaodong Peninsula, Northern China. *Agronomy*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/agronomy12040927>
- Wang, X., Jordan, I. K., & Mayer, L. W. (2014). A Phylogenetic Perspective on Molecular Epidemiology. In *Molecular*

- Medical Microbiology* (pp. 517–536). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00029-9>
- Wang, Y., Yan, X., Su, M., Li, J., Man, T., Wang, S., Li, C., Gao, S., Zhang, R., Zhang, M., Wang, P., Jia, X., & Ren, L. (2022). Isolation of potassium solubilizing bacteria in soil and preparation of liquid bacteria fertilizer from food wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, 181, 108378. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2022.108378>
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697. <https://doi.org/10.1128/JB.173.2.697-703.1991>
- Wensel, C. R., Pluznick, J. L., Salzberg, S. L., & Sears, C. L. (2022). Next-generation sequencing: insights to advance clinical investigations of the microbiome. *Journal of Clinical Investigation*, 132(7). <https://doi.org/10.1172/JCI154944>
- Widawati, S., & Suliasih. (2018). The Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on Germination and Seedling Growth of *Sorghum bicolor* L. Moench. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 166(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/166/1/012022>
- Wisotzkey, J. D., Jurtshuk, P., Fox, G. E., Deinhard, G., & Poralla, K. (1992). Comparative sequence analyses on the 16S

rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclo Bacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(2), 263–269. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-2-263/CITE/REFWORKS>

Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(11), 5088–5090. [https://doi.org/10.1073/PNAS.74.11.5088/ASSET/959B8CE3-ADD2-45B8-A2B7-](https://doi.org/10.1073/PNAS.74.11.5088/ASSET/959B8CE3-ADD2-45B8-A2B7-1FD288954CE3/ASSETS/GRAPHIC/PNAS.5088T01.JPEG)

[1FD288954CE3/ASSETS/GRAPHIC/PNAS.5088T01.JPEG](https://doi.org/10.1073/PNAS.74.11.5088/ASSET/959B8CE3-ADD2-45B8-A2B7-1FD288954CE3/ASSETS/GRAPHIC/PNAS.5088T01.JPEG)

Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(12), 4576–4579. <https://doi.org/10.1073/PNAS.87.12.4576>

Woese, C. R., Stackebrandt, E., Macke, T. J., & Fox, G. E. (1985). A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Systematic and Applied Microbiology*, 6(2), 143–151. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(85\)80047-3](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(85)80047-3)

Wohlhieter, C. A., Uddin, F., Quintanal-Villalonga, À., Poirier, J. T., Sen, T., & Rudin, C. M. (2021). An optimized NGS sample

- preparation protocol for in vitro CRISPR screens. *STAR Protocols*, 2(2).
<https://doi.org/10.1016/J.XPRO.2021.100390>
- Wright, E. S., Yilmaz, L. S., & Noguera, D. R. (2012). DECIPHER, a search-based approach to chimera identification for 16S rRNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(3), 717–725.
<https://doi.org/10.1128/AEM.06516-11>
- Wu, H. Y., Qiao, M. Y., Zhang, Y. J., Kang, W. J., Ma, Q. H., Gao, H. Y., Zhang, W. F., & Jiang, C. D. (2023). Photosynthetic mechanism of maize yield under fluctuating light environments in the field. *Plant Physiology*, 191(2), 957.
<https://doi.org/10.1093/PLPHYS/KIAC542>
- Wu, W., Wu, J., Liu, X., Chen, X., Wu, Y., & Yu, S. (2017). Inorganic phosphorus fertilizer ameliorates maize growth by reducing metal uptake, improving soil enzyme activity and microbial community structure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 143, 322–329.
<https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2017.05.039>
- Xiao, Y., Wang, X., Chen, W., & Huang, Q. (2017). Isolation and Identification of Three Potassium-Solubilizing Bacteria from Rape Rhizospheric Soil and Their Effects on Ryegrass. *Geomicrobiology Journal*, 34(10), 873–880.
<https://doi.org/10.1080/01490451.2017.1286416>

- Xue, X., Du, S., Jiao, F., Xi, M., Wang, A., Xu, H., Jiao, Q., Zhang, X., Jiang, H., Chen, J., & Wang, M. (2021). The regulatory network behind maize seed germination: Effects of temperature, water, phytohormones, and nutrients. *The Crop Journal*, 9(4), 718–724.
<https://doi.org/10.1016/J.CJ.2020.11.005>
- Yaghoubi Khanghahi, M., Strafella, S., Allegretta, I., & Crecchio, C. (2021). Isolation of Bacteria with Potential Plant-Promoting Traits and Optimization of Their Growth Conditions. *Current Microbiology*, 78(2), 464.
<https://doi.org/10.1007/S00284-020-02303-W>
- Yallappa, M., Savalgi, V. P., Shruthi, P., Arpitha, P. S., & Hullur, N. (2015). Effect of potassium solubilizing bacteria on growth and yield of maize. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 9(December), 3103–3107.
https://www.researchgate.net/publication/284757044_Effect_of_potassium_solubilizing_bacteria_on_growth_and_yield_of_maize
- Yang, F., Shi, Y., Zhao, M., Cheng, B., & Li, X. (2022). ZmIAA5 regulates maize root growth and development by interacting with ZmARF5 under the specific binding of ZmTCP15/16/17. *PeerJ*, 10.
<https://doi.org/10.7717/PEERJ.13710>
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Whitman, W. B., Euzéby, J., Amann, R., &

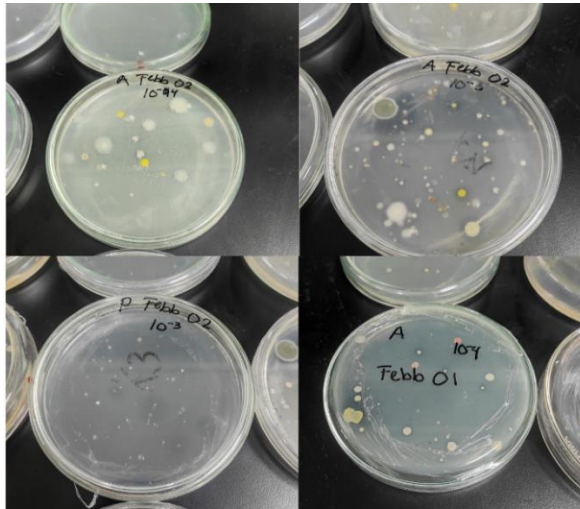
- Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology* 2014 12:9, 12(9), 635–645.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro3330>
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5), 1613.
<https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.001755>
- Young, K. D. (2006). The Selective Value of Bacterial Shape. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(3), 660–703.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00001-06/ASSET/245868D2-F676-4C3C-845F-4472A25CEA3A/ASSETS/GRAPHIC/ZMR0030621330009.JPG>
- Yousaf, M., Bashir, S., Raza, H., Shah, A. N., Iqbal, J., Arif, M., Bukhari, M. A., Muhammad, S., Hashim, S., Alkahtani, J., Alwahibi, M. S., & Hu, C. (2021). Role of nitrogen and magnesium for growth, yield and nutritional quality of radish. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(5), 3021.
<https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2021.02.043>
- Yousaf, M., Li, J., Lu, J., Ren, T., Cong, R., Fahad, S., & Li, X. (2017). Effects of fertilization on crop production and nutrient-

- supplying capacity under rice-oilseed rape rotation system. *Scientific Reports*, 7(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-01412-0>
- Yousuf, J., Thajudeen, J., Rahiman, M., Krishnankutty, S., P. Alikunj, A., & Mohamed, M. H. (2017). Nitrogen fixing potential of various heterotrophic *Bacillus* strains from a tropical estuary and adjacent coastal regions. *Journal of Basic Microbiology*, 57(11), 922–932.
<https://doi.org/10.1002/JOBM.201700072>
- Yu, J., Liu, Y., Wang, Z., Huang, X., Chai, D., Gu, Y., Zhao, K., Yu, X., Shuai, Z., Liu, H., Zhang, X., Penttinen, P., & Chen, Q. (2022). The Cropping Obstacle of Garlic Was Associated With Changes in Soil Physicochemical Properties, Enzymatic Activities and Bacterial and Fungal Communities. *Frontiers in Microbiology*, 13.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.828196>
- Yuan, S., Li, M., Fang, Z., Liu, Y., Shi, W., Pan, B., Wu, K., Shi, J., Shen, B., & Shen, Q. (2016). Biological control of tobacco bacterial wilt using *Trichoderma harzianum* amended bioorganic fertilizer and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae*. *Biological Control*, 92, 164–171.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2015.10.013>
- Yun, Y., Wang, H., Man, B., Xiang, X., Zhou, J., Qiu, X., Duan, Y., & Engel, A. S. (2016). The relationship between pH and bacterial communities in a single karst ecosystem and its

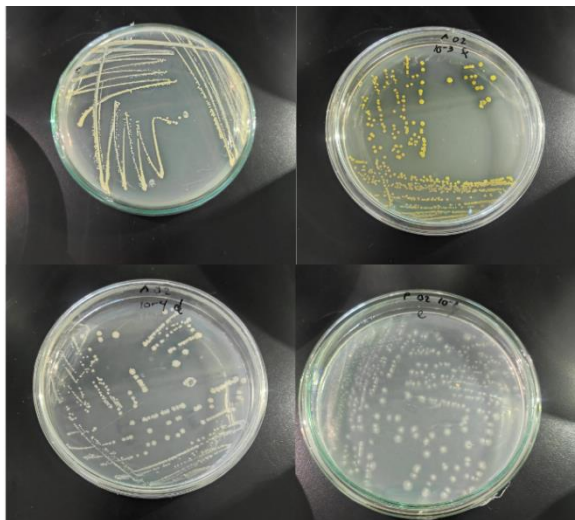
- implication for soil acidification. *Frontiers in Microbiology*, 7(DEC).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01955>
- Zahid, M., Kaleem Abbasi, M., Hameed, S., & Rahim, N. (2015). Isolation and identification of indigenous plant growth promoting rhizobacteria from Himalayan region of Kashmir and their effect on improving growth and nutrient contents of maize (*Zea mays* L.). *Frontiers in Microbiology*, 6(MAR), 126946.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.00207/BIBTEX>
- Zakavi, M., Askari, H., & Shahrooei, M. (2022). Maize growth response to different *Bacillus* strains isolated from a salt-marshland area under salinity stress. *BMC Plant Biology*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/S12870-022-03702-W>
- Zerrouk, I. Z., Rahmoune, B., Auer, S., Rößler, S., Lin, T., Baluska, F., Dobrev, P. I., Motyka, V., & Ludwig-Müller, J. (2020). Growth and aluminum tolerance of maize roots mediated by auxin- and cytokinin-producing *Bacillus toyonensis* requires polar auxin transport. *Environmental and Experimental Botany*, 176, 104064.
<https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2020.104064>
- Zhang, B. X., Li, P. S., Wang, Y. Y., Wang, J. J., Liu, X. L., Wang, X. Y., & Hu, X. M. (2021). Characterization and synthesis of indole-3-acetic acid in plant growth promoting

- Enterobacter sp. *RSC Advances*, 11(50), 31601.
<https://doi.org/10.1039/D1RA05659J>
- Zhang, X., Yang, Z., Wang, L., Yue, Y., Wang, L., & Xiulian Yang. (2023). The effects of plant growth-promoting rhizobacteria on plants under temperature stress: A meta-analysis. *Rhizosphere*, 28, 100788.
<https://doi.org/10.1016/J.RHISPH.2023.100788>
- Zhang, Y., Gao, X., Wang, S., Zhu, C., Li, R., & Shen, Q. (2018). Application of *Bacillus velezensis* NJAU-Z9 Enhanced Plant Growth Associated with Efficient Rhizospheric Colonization Monitored by qPCR with Primers Designed from the Whole Genome Sequence. *Current Microbiology*, 75(12), 1574–1583. <https://doi.org/10.1007/S00284-018-1563-4/FIGURES/4>
- Zhang, Y., Shen, H., He, X., Thomas, B. W., Lupwayi, N. Z., Hao, X., Thomas, M. C., & Shi, X. (2017). Fertilization shapes bacterial community structure by alteration of soil pH. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUL).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01325>
- Zhao, C., Chen, X., Ouyang, L., Wang, J., & Jin, M. (2017). Robust moving-blocker scatter correction for cone-beam computed tomography using multiple-view information. *PloS One*, 12(12).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0189620>

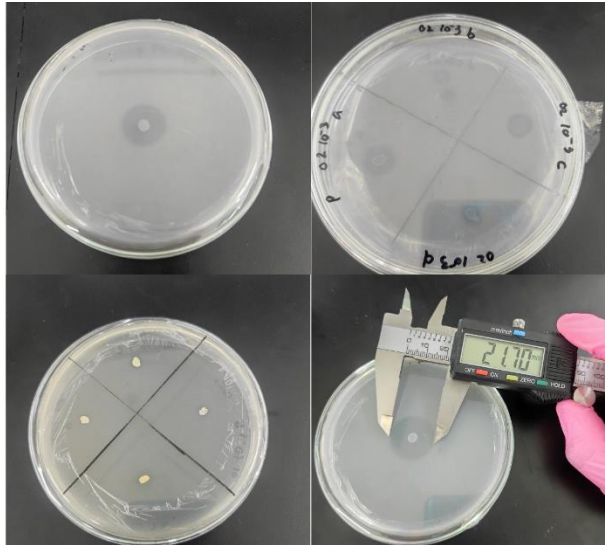
- Zhu, J., Li, M., & Whelan, M. (2018). Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. *Science of The Total Environment*, 612, 522–537.
<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.08.095>
- Zrimec, J., Kopinč, R., Rijavec, T., Zrimec, T., & Lapanje, A. (2013). Band smearing of PCR amplified bacterial 16S rRNA genes: dependence on initial PCR target diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 95(2), 186–194.
<https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2013.08.002>

LAMPIRAN

Gambar Lampiran 1. Isolasi kandidat PGPR pada media Burks agar, Pikovskaya agar, dan Aleksandrow agar



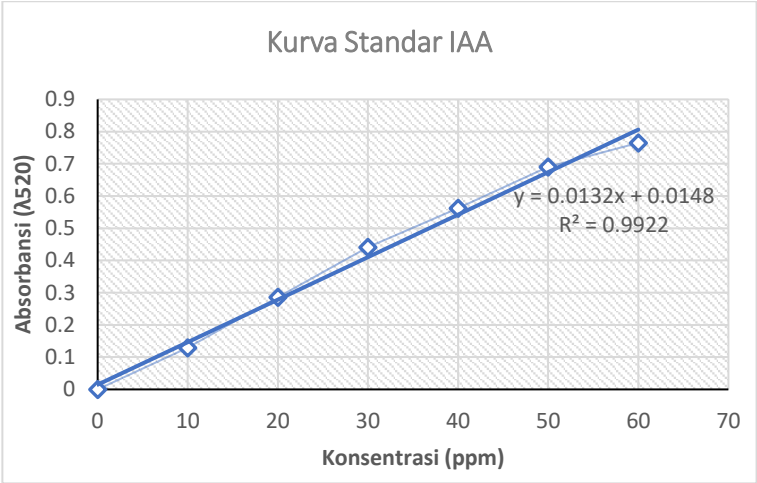
Gambar Lampiran 2. Purifikasi bakteri kandidat PGPR pada berbagai media



Gambar Lampiran 3. Pengukuran luas zona bening PGPR pada uji pendahuluan



Gambar Lampiran 4. Uji aktivitas PGPR terhadap produktivitas jagung



Gambar Lampiran 5. Kurva standari Indole Acetid Acid (IAA)

Tabel Lampiran 1. Perhitungan konsentrasi IAA tiap isolat terhadap kurva standar

Sampel	Abs (λ520)				Hasil (ppm)	Standar Deviasi
	1	2	3	Rata-rata		
PGPR-N1	0.1521	0.1544	0.1551	0.1539	10.47	0.001602
PGPR-N2	0.1657	0.1676	0.1676	0.1670	11.45	0.001095
PGPR-P1	0.2044	0.2050	0.2046	0.2047	14.33	0.000285
PGPR-P2	0.2255	0.2262	0.2263	0.2260	15.92	0.000441
PGPR-K1	0.1097	0.1131	0.1138	0.1122	7.36	0.002161
PGPR-K2	0.1818	0.1838	0.1855	0.1837	12.74	0.001882

Tabel Lampiran 2. Tinggi tanaman tiap isolat hari ke-1 hingga ke-7

Isolat	Tinggi Tanaman (cm) Hari ke-						
	1	2	3	4	5	6	7
PGPR-N1	1.317	1.753	2.197	4.256	5.023	5.126	5.670
PGPR-N2	1.35	1.496	2.901	5.4	5.529	5.695	5.810
PGPR-P1	1.178	1.805	3.271	6.533	6.811	7.012	7.200
PGPR-P2	1.312	1.753	2.317	4.164	4.834	5.171	6.160
PGPR-K1	1.233	1.908	3.302	6.878	7.325	7.676	8.300
PGPR-K2	1.408	1.667	3.781	5.693	6.478	7.248	7.340

Lampiran 6. Sekuen contig isolat PGPR-K1

ISOLAT PGPR-K1

>Consensus

tgcagtcgagcgcgatggattaagagcttgctcttatgaagtttagcggcg
 gacgggtgagtaaacacgtgggtaacctgcccataagactgggataact
 ccgggaaaccgggggctaataccggataacatthttgaaccgcatgggtc
 gaaattgaaaggcggcttcggctgtcacttatggatggacccgcgtcg
 cattagctagttggtgaggtaacggctcaccaaggcaacgatgcgtag
 ccgacctgagaggggtgatcgccacactgggactgagacacggcccag
 actcctacgggaggcagcagtagggaatcttcgcaatggacgaaagt
 ctgacggagcaacgccgcgtgagtgatgaaggctttcgggtcgtaaaa
 ctctgttgttagggaagaacaagtgcctagttgaataagctggcacctt
 gacgggtacctaaccagaaagccacggctaactacgtgccagcagccgc
 ggtaatacgtaggtggcaagcgttatccggaattattgggcgtaaagc
 gcgcgcaggtgggtttcttaagtctgatgtgaaagcccacgggtcaacc
 gtggagggtcatttgaaactgggagacttgagtgcagaagaggaaagt
 ggaattccatgtgtagcgggtgaaatgcgtagagatatggaggaaacacc
 agtggcgaaaggcgactttctggctgttaactgacactgaggcgcgaaa
 gcgtggggagcaaacaggattagataaccctggtagtccacgccgtaaa
 cgatgagtgcctaagtgttagagggtttccgcccttttagtgcgaagt
 aacgcattaagcactccgcctggggagtacggccgcaaggctgaaact
 caaaggaattgacggggggcccgcacaaagggtggagcatgtgggttaa
 ttcgaaagcaacgcgaagaaccttaccaggctcttgacatcctctgaaaa
 ccctagagatagggcttctccttcgggagcagagtgcaggtgggtgca
 tgggtgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtcccgcaac
 gagcgcaacccttgatcttagttgccatcattaagttgggcactctaa
 ggtgactgccggtgacaaaccggaggaagggtggggatgacgtcaaatac
 atcatgccccttatgacctgggctacacacgtgctacaatggacggta
 caaagagctgcaagaccgcgaggtggagctaatactcataaaaccgttc
 tcagttcggattgtaggctgcaactcgccctacatgaagctggaatcgc
 tagtaatcgcggatcagcatgccgcggtgaatacgttccggggccttg
 tacacaccgcccgtcacaccacgagagtttgaacacccgaagt

Lampiran 7. Sekuen contig isolat PGPR-K2

ISOLAT PGPR-K2

>Consensus

ctatactgcagtcgagcgatggattaagagcttgctcttatgaagtta
gcggcggacgggtgagtaacacgtgggtaacctgcccataagactggg
ataactccgggaaaccggggctaataccggataacattttgaaccgca
tggttcgaaattgaaaggcggcttcggctgtcacttatggatggaccc
gcgtcgcattagctagttgggtgaggtaacggctcaccaaggcaacgat
gcgtagccgacctgagaggggtgatcgccacactgggactgagacacg
gccagactcctacgggaggcagcagtagggaatcttcgcaatggac
gaaagtctgacggagcaacgccgcgtgagtgatgaaggctttcgggtc
gtaaaactctgttgttagggaagaacaagtgcctagttgaataagctgg
caccttgacgggtacctaaccagaaagccacggctaactacgtgccagc
agccgcggtaatacgtaggtggcaagcgttatccggaattattgggcg
taaagcgcgcgcagggtggtttcttaagtctgatgtgaaagcccacggc
tcaaccgtggaggggtcatttgaaactgggagacttgagtgcagaagag
gaaagtggaattccatgtgtagcgggtgaaatgcgtagagatatggagg
aacaccagtggcgaaggcgactttctggtctgtaactgacactgaggc
gcgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtccacgc
cgtaaacgatgagtgctaagtgttagaggggtttccgccctttagtgt
gaagttaacgcattaagcactccgcctggggagtagcggccgcaaggct
gaaactcaaaggaattgacgggggcccgcacaagcgggtggagcatgtg
gtttaattcgaagcaacgcgaagaaccttaccaggctcttgacatcctc
tgaaaaccctagagatagggcttctccttcgggagcagagtgcagggt
ggtgcatgggtgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtcc
cgcaacgagcgcaacccttgatcttagttgccatcattaagttgggca
ctctaagggtgactgccggtgacaaaccggaggaagggtggggatgacgt
caaatcatcatgccccttatgacctgggctacacacgtgctacaatgg
acggtacaaagagctgcaagaccgcgaggtggagctaattctcataaaa
ccgttctcagttcggattgtaggctgcaactcgcctacatgaagctgg
aatcgctagtaatcgcggtatcagcatgccgcggtgaatacgttcccg
gccttgtaacacccgcccgtcacaccacgagagtttgtaacacccgaa
gtcgggtggggtaaccttttgagccag

Tabel Lampiran 3 Komposisi media Burks agar

Bahan	Jumlah
Magnesium sulphate	0.2 g/L
Dipotassium hydrogen phosphate	0.8 g/L
Potassium dihydrogen phosphate	0.2 g/L
Calcium sulphate	0.13 g/L
Iron (III) Chloride	0.0145 g/L
Sodium molybdate	0.00253 g/L
Sucrose	20 g/L

Tabel Lampiran 4. Komposisi media Pikovskaya agar

Bahan	Jumlah
Yeast extract	0.5 g/L
Dextrose	10 g/L
Calcium phosphate	5 g/L
Ammonium sulphate	0.5 g/L
Potassium chloride	0.5 g/L
Magnesium sulphate	0.1 g/L
Manganese sulphate	0,01 g/L
Ferrous sulphate	0,01 g/L
Agar	15 g/L

Tabel Lampiran 5. Komposisi media Aleksandrow agar

Bahan	Jumlah
Magnesium sulphate	0.5 g/L
Calcium carbonate	0,1 g/L
Potassium alumino silicate	2 g/L
Ferric chloride	0.05 g/L
Calcium phosphate	2 g/L
Agar	20 g/L
Dextrose (Glucose)	5 g/L

Tabel Lampiran 6. Data morfologi koloni hasil purifikasi bakteri penambat nitrogen pada sampel FEB01

Kode	Bentuk	Tepian	Warna	Tekstur	Elevasi
N01a	Circular	Undulate	Cream	Smooth	Raised
N01b	Irregular	Lobate	Cream	Smooth	Raised
N01c	Circular	Rhizoid	Cream	Smooth	Flat
N01d	Irregular	Rhizoid	Cream	Rough	Raised
N01e	Irregular	Undulate	Cream	Mucoid	Convex
N01f	Irregular	Lobate	Cream	Mucoid	Convex
N01g	Circular	Entire	Cream	Butyrous	Convex
N01h	Irregular	Lobate	Cream	Rough	Flat
N01i	Circular	Entire	Cream	Mucoid	Convex

Tabel Lampiran 7. Data morfologi koloni hasil purifikasi bakteri penambat nitrogen pada sampel FEB02

Kode	Bentuk	Tepian	Warna	Tekstur	Elevasi
N02a	Missing data				
N02b	Circullar	Entire	Yellow	Smooth	Convex
N02c	Irregular	Flat	Cream	Smooth	Filamentous
N02d	Circullar	Entire	Cream	Butyrous	Pulvinate
N02e	Irregular	Lobate	Cream	Mucoid	Pulvinate
N02f	Circullar	Entire	Cream	Butyrous	Convex
N02g	Irregular	Undulate	Cream	Smooth	Flat
N02h	Irregular	Rhizoid	Cream	Smooth	Raised
N02i	Irregular	Rhizoid	Cream	Smooth	Flat
N02j	Irregular	Lobate	Yellow	Rough	Raised

Tabel Lampiran 8. Data morfologi koloni hasil purifikasi bakteri pelarut fosfat pada sampel FEB01

Kode	Bentuk	Tepian	Warna	Tekstur	Elevasi
P01a	Circullar	Undulate	White	Smooth	Convex
P01b	Circullar	Entire	Cream	Butyrous	Raised
P01c	Circullar	Entire	Cream	Butyrous	Raised
P01d	Circullar	Undulate	White	Smooth	Convex
P01e	Irregular	Lobate	White	Smooth	Raised
P01f	Circullar	Entire	White	Butyrous	Raised
P01g	Circullar	Entire	White	Smooth	Convex

Tabel Lampiran 9. Data morfologi koloni hasil purifikasi bakteri pelarut fosfat pada sampel FEB02

Kode	Bentuk	Tepian	Warna	Tekstur	Elevasi
P02a	Circullar	Entire	White	Butyrous	Raised
P02b	Circullar	Entire	White	Butyrous	Raised
P02c	Circullar	Entire	White	Butyrous	Raised
P02d	Circullar	Entire	White	Butyrous	Raised
P02e	Irregular	Lobate	Cream	Rough	Flat
P02f	Circullar	Entire	White	Butyrous	Raised
P02g	Circullar	Entire	White	Butyrous	Raised
P02h	Circullar	Entire	White	Smooth	Convex
P02i	Circullar	Entire	Cream	Smooth	Convex
P02j	Circullar	Entire	White	Butyrous	Raised

Tabel Lampiran 10. Data morfologi koloni hasil purifikasi bakteri pelarut kalium pada sampel FEB01

Kode	Bentuk	Tepian	Warna	Tekstur	Elevasi
K01a	Circullar	Entire	Cream	Butyrous	Flat
K01b	Circullar	Entire	Cream	Butyrous	Convex
K01c	Circullar	Entire	Cream	Butyrous	Convex
K01d	Circullar	Entire	Cream	Butyrous	Convex
K01e	Circullar	Lobate	Cream	Butyrous	Convex
K01f	Circullar	Entire	Yellow	Butyrous	Convex
K01g	Circullar	Entire	Cream	Mucoid	Convex
K01h	Circullar	Entire	Cream	Smooth	Convex
K01i	Irregular	Rhizoid	Yellow	Butyrous	Raised
K01j	Circullar	Entire	Cream	Smooth	Convex

Tabel Lampiran 11. Data morfologi koloni hasil purifikasi bakteri pelarut kalium pada sampel FEB02

Kode	Bentuk	Tepian	Warna	Tekstur	Elevasi
K02a	Circular	Lobate	Cream	Rough	Flat
K02b	Circular	Entire	Yellow	Butyrous	Convex
K02c	Irregular	Rhizoid	White	Smooth	Convex
K02d	Circular	Rhizoid	Cream	Smooth	Convex
K02e	Circular	Entire	Cream	Smooth	Convex
K02f	Circular	Entire	Yellow	Dry	Convex
K02g	Irregular	Rhizoid	Yellow	Smooth	Convex
K02h	Missing data				
K02i	Irregular	Rhizoid	Yellow	Smooth	Raised
K02j	Missing data				
K02k	Missing data				

Tabel Lampiran 12. Hasil uji ANOVA variasi perendaman dan penyiraman

Descriptives

Panjang Akar

	N	Mean	Std. Dev	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
Perendaman	72	4.3268	2.877	.3391	3.650	5.003	.060	12.370
Penyiraman	36	3.7211	1.530	.2551	3.203	4.239	1.120	6.710
Total	108	4.1249	2.518	.2423	3.644	4.605	.060	12.370

Test of Homogeneity of Variances

Panjang Akar

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
12.520	1	106	.001

ANOVA

Panjang Akar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8.805	1	8.805	1.393	.241
Within Groups	669.979	106	6.321		
Total	678.783	107			

Tabel Lampiran 13. Hasil uji ANOVA variasi pemotongan akar

Descriptives

Panjang Akar

	N	Mean	Std. Dev	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower	Upper		
					Bound	Bound		
Agar	54	5.6333	2.4982	.3399	4.9514	6.3152	1.1200	12.370
Triptofan	54	2.6164	1.3890	.1890	2.2373	2.9956	.0600	5.740
Total	108	4.1249	2.5186	.2423	3.6444	4.6053	.0600	12.370

Test of Homogeneity of Variances

Panjang Akar

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
12.683	1	106	.001

ANOVA

Panjang Akar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	245.738	1	245.738	60.151	.000
Within Groups	433.046	106	4.085		
Total	678.783	107			

Tabel Lampiran 14. Hasil uji ANOVA variasi media

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Panjang Akar	Tidak dipotong	.144	54	.007	.910	54	.001
	Dipotong	.077	54	.200*	.972	54	.233

*. This is a lower bound of the true significance.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Dev	Min	Max
Panjang Akar	108	4.1276	2.5173	.0600	12.3700
Dipotong/Tidak	108	1.50	.502	1	2

Ranks

	Dipotong/Tidak	N	Mean Rank
Panjang Akar	Tidak dipotong	54	57.10
	Dipotong	54	51.90
	Total	108	

Test Statistics^{a,b}

	Panjang Akar
Chi-Square	.745
df	1
Asymp. Sig.	.388

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

Dipotong/Tidak

Tabel Lampiran 15. Hasil uji ANOVA panjang akar isolat FEB01 & FEB02

Descriptives

Panjang Akar

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower	Upper		
					Bound	Bound		
FEB01	54	4.2972	2.6781	.3644	3.5662	5.0282	.3200	12.3700
FEB02	54	3.9525	2.3609	.3212	3.3081	4.5970	.0600	10.5100
Total	108	4.1249	2.5186	.2423	3.6444	4.6053	.0600	12.3700

Test of Homogeneity of Variances

Panjang Akar

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.596	1	106	.442

ANOVA

Panjang Akar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.207	1	3.207	.503	.480
Within Groups	675.577	106	6.373		
Total	678.783	107			

Tabel Lampiran 16. Hasil uji ANOVA tinggi batang isolat FEB01 & FEB02

Descriptives

Tinggi Batang

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower	Upper		
					Bound	Bound		
FEB01	54	6.4209	2.2964	.3125	5.794	7.047	1.790	10.90
FEB02	54	6.1575	2.0269	.2758	5.604	6.710	2.450	10.32
Total	108	6.2892	2.1597	.2078	5.877	6.701	1.790	10.90

Test of Homogeneity of Variances

Tinggi Batang

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.843	1	106	.360

ANOVA

Tinggi Batang

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.872	1	1.872	.399	.529
Within Groups	497.250	106	4.691		
Total	499.123	107			

Tabel Lampiran 17. Hasil uji ANOVA berat kering isolat FEB01 & FEB02

Tests of Normality							
	Terpupu k/Tidak	Kolmogorov- Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Berat Kering	FEB01	.152	54	.003	.939	54	.008
	FEB02	.110	54	.118	.973	54	.266

a. Lilliefors Significance Correction

Descriptive Statistics					
	N	Mean	Std. Deviation	Min	Max
Berat Kering	108	.1372	.0301	.0700	.2100
Terpupuk/Tidak	108	1.50	.502	1	2

Ranks			
	Terpupuk/Tidak	N	Mean Rank
Berat Kering	FEB01	54	54.67
	FEB02	54	54.33
	Total	108	

Test Statistics ^{a,b}	
	Berat Kering
Chi-Square	.003
df	1
Asymp. Sig.	.956

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

Terpupuk/Tidak

Tabel Lampiran 18. Hasil uji ANOVA berat basah isolat FEB01 & FEB02

Descriptives

Berat Basah

	N	Mean	Std. Dev	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
FEB01	54	.6542	.2136	.0290	.5959	.7125	.0700	1.0900
FEB02	54	.6418	.2387	.0324	.5766	.7070	.3000	1.3900
Total	108	.6480	.2255	.0217	.6050	.6910	.0700	1.3900

Test of Homogeneity of Variances

Berat Basah

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.826	1	106	.365

ANOVA

Berat Basah

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.004	1	.004	.081	.777
Within Groups	5.441	106	.051		
Total	5.445	107			

Tabel Lampiran 19. Hasil uji ANOVA panjang akar antar isolat

Tests of Normality							
	Isolat	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Panjang Akar	PGPR-N1	.171	18	.178	.899	18	.056
	PGPR-N2	.145	18	.200*	.939	18	.274
	PGPR-P1	.185	18	.105	.913	18	.098
	PGPR-P2	.185	18	.106	.898	18	.053
	PGPR-K1	.147	18	.200*	.913	18	.096
	PGPR-K2	.114	18	.200*	.977	18	.920

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Descriptives

Panjang Akar

	Mean	Std. Dev	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
				Lower Bound	Upper Bound		
PGPR-N1	3.607	2.790	.657	2.219	4.995	.320	9.370
PGPR-N2	3.117	2.257	.532	1.994	4.239	.060	7.350
PGPR-P1	4.480	1.965	.463	3.502	5.457	1.800	9.400
PGPR-P2	4.282	2.421	.570	3.078	5.486	1.470	10.020
PGPR-K1	4.665	2.873	.677	3.235	6.094	1.150	12.340
PGPR-K2	4.366	2.065	.486	3.339	5.393	.570	8.280
Total	4.086	2.425	.233	3.623	4.549	.060	12.340

ANOVA

Panjang Akar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	31.960	5	6.392	1.091	.370
Within Groups	597.341	102	5.856		
Total	629.301	107			

Panjang Akar

Duncan^a

Isolat	N	Subset for alpha = 0.05
		1
PGPR-N2	18	3.117222
PGPR-N1	18	3.607222
PGPR-P2	18	4.282333
PGPR-K2	18	4.366667
PGPR-P1	18	4.480000
PGPR-K1	18	4.665000
Sig.		.096

Means for groups in homogeneous subsets
are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size =
18,000.

Tabel Lampiran 20. Hasil uji ANOVA tinggi batang antar isolat

Tests of Normality							
	Isolat	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Tinggi Batang	PGPR-N1	.181	18	.122	.958	18	.559
	PGPR-N2	.114	18	.200 [*]	.942	18	.316
	PGPR-P1	.149	18	.200 [*]	.933	18	.221
	PGPR-P2	.129	18	.200 [*]	.943	18	.323
	PGPR-K1	.122	18	.200 [*]	.956	18	.524
	PGPR-K2	.193	18	.075	.960	18	.611

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Descriptives

Tinggi Batang

	N	Mean	Std. Dev	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
PGPR-N1	18	3.809	2.143	.505	2.743	4.875	.290	7.840
PGPR-N2	18	4.063	2.055	.484	3.041	5.085	1.440	8.400
PGPR-P1	18	5.633	2.525	.595	4.377	6.889	.960	9.260
PGPR-P2	18	4.532	2.192	.516	3.442	5.622	.910	7.690
PGPR-K1	18	6.092	2.096	.494	5.049	7.135	2.280	9.600
PGPR-K2	18	5.682	2.308	.544	4.534	6.830	.720	9.320
Total	108	4.968	2.343	.225	4.521	5.415	.290	9.600

ANOVA

Tinggi Batang

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	82.201	5	16.440	3.318	.008
Within Groups	505.333	102	4.954		
Total	587.535	107			

Tinggi Batang

	Isolat	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Duncan ^a	PGPR-N1	18	3.809444	
	PGPR-N2	18	4.063333	
	PGPR-P2	18	4.532778	4.532778
	PGPR-P1	18		5.633333
	PGPR-K2	18		5.682222
	PGPR-K1	18		6.092222
	Sig.		.363	.056

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 18,000.

Tabel Lampiran 21. Hasil uji ANOVA berat basah antar isolat

Tests of Normality							
	Isolat	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Berat	PGPR-N1	.183	18	.112	.923	18	.144
Basah	PGPR-N2	.153	18	.200*	.924	18	.154
	PGPR-P1	.103	18	.200*	.963	18	.666
	PGPR-P2	.157	18	.200*	.962	18	.645
	PGPR-K1	.130	18	.200*	.919	18	.122
	PGPR-K2	.119	18	.200*	.987	18	.994

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Descriptives

Berat Basah

	N	Mean	Std. Dev	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower	Upper		
					Bound	Bound		
PGPR-N1	18	.576	.1364	.0321	.508	.644	.3500	.8400
PGPR-N2	18	.481	.1313	.0309	.416	.546	.3200	.7800
PGPR-P1	18	.753	.2027	.0477	.653	.854	.3900	1.0900
PGPR-P2	18	.636	.1723	.0406	.550	.722	.3500	1.0300
PGPR-K1	18	.632	.2552	.0601	.505	.759	.0700	.9900
PGPR-K2	18	.807	.2732	.0644	.671	.943	.3000	1.3900
Total	108	.648	.2255	.0217	.605	.691	.0700	1.3900

ANOVA					
Berat Basah					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.255	5	.251	6.108	.000
Within Groups	4.190	102	.041		
Total	5.445	107			

Berat Basah

Duncan^a

Isolat	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
PGPR-N2	18	.481667			
PGPR-N1	18	.576667	.576667		
PGPR-K1	18		.632222	.632222	
PGPR-P2	18		.636667	.636667	
PGPR-P1	18			.753889	.753889
PGPR-K2	18				.807222
Sig.		.163	.408	.091	.432

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 18,000.

Tabel Lampiran 22. Hasil uji ANOVA berat kering antar isolat

Tests of Normality							
	Isolat	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Berat	PGPR-N1	.178	18	.136	.902	18	.063
Kering	PGPR-N2	.144	18	.200*	.944	18	.339
	PGPR-P1	.212	18	.031	.898	18	.052
	PGPR-P2	.160	18	.200*	.972	18	.830
	PGPR-K1	.131	18	.200*	.956	18	.519
	PGPR-K2	.154	18	.200*	.971	18	.814

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Descriptives

Berat Kering

	N	Mean	Std. Dev	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
PGPR-N1	18	.1327	.0180	.004	.1237	.1417	.1100	.1700
PGPR-N2	18	.1288	.0361	.008	.1109	.1468	.0700	.2000
PGPR-P1	18	.1372	.0278	.006	.1233	.1510	.0600	.1800
PGPR-P2	18	.1400	.0332	.007	.1234	.1565	.0700	.2100
PGPR-K1	18	.1411	.0325	.007	.1249	.1572	.0700	.1900
PGPR-K2	18	.1411	.0356	.008	.1233	.1588	.0700	.2000
Total	108	.1368	.0308	.002	.1309	.1427	.0600	.2100

ANOVA

Berat Kering

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.002	5	.000	.467	.800
Within Groups	.099	102	.001		
Total	.102	107			

Berat KeringDuncan^a

Isolat	N	Subset for alpha = 0.05
		1
PGPR-N2	18	.128889
PGPR-N1	18	.132778
PGPR-P1	18	.137222
PGPR-P2	18	.140000
PGPR-K1	18	.141111
PGPR-K2	18	.141111
Sig.		.313

Means for groups in homogeneous subsets
are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 18,000.

Tabel Lampiran 23. Hasil uji ANOVA jumlah daun antar isolat

DescriptivesJumlah
Daun

	N	Mean	Std. Dev	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
PGPR-N1	18	.500	.707	.166	.148	.851	0.00	2.00
PGPR-N2	18	.666	1.028	.242	.155	1.178	0.00	3.00
PGPR-P1	18	1.000	1.028	.242	.488	1.511	0.00	3.00
PGPR-P2	18	.611	.849	.200	.188	1.033	0.00	2.00
PGPR-K1	18	1.555	.983	.231	1.066	2.044	0.00	3.00
PGPR-K2	18	1.333	1.188	.280	.742	1.924	0.00	3.00
Total	108	.944	1.030	.099	.747	1.141	0.00	3.00

ANOVA

Jumlah Daun

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	16.444	5	3.289	3.451	.006
Within Groups	97.222	102	.953		
Total	113.667	107			

Test of Homogeneity of VariancesJumlah
Daun

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.715	5	102	.138

Jumlah Daun

Duncan^a

Sampel	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
PGPR-N1	18	.5000		
PGPR-P2	18	.6111		
PGPR-N2	18	.6667	.6667	
PGPR-P1	18	1.0000	1.0000	1.0000
PGPR-K2	18		1.3333	1.3333
PGPR-K1	18			1.5556
Sig.		.166	.054	.110

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 18.000.

Tabel Lampiran 24. Hasil uji ANOVA jumlah daun isolat FEB01 & FEB02

Tests of Normality

Sampel		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Jumlah Daun	FEB01	.235	54	.000	.834	54	.000
	FEB02	.330	54	.000	.758	54	.000

a. Lilliefors Significance Correction

Ranks

Sampel		N	Mean Rank
Jumlah Daun	FEB01	54	57.24
	FEB02	54	51.76
	Total	108	

Test Statistics^{a,b}

	Jumlah Daun
Chi-Square	.942
df	1
Asymp. Sig.	.332

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
Sampel

Tabel Lampiran 25. Jarak genetik sekuen PGPR-K1 dan PGPR-K2 terhadap sekuen pembanding

	PGPR- K1	PGPR- K2	XaM21	4589	ATCC	YR1	SK 46.2	AM3	XS 24-5	NL1	B thuringiensis
PGPR-K1											
PGPR-K2	0,0000										
XaM21	0,0000	0,0000									
4589	0,0000	0,0000	0,0000								
ATCC	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000							
YR1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000						
SK 46.2	0,0000	0,0007	0,0007	0,0000	0,0000	0,0014					
AM3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000				
XS 24-5	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0007	0,0000			
NL1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000		
<i>B thuringiensis</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	
<i>B toyonensis</i>	0,0029	0,0085	0,0085	0,0029	0,0029	0,0092	0,0029	0,0029	0,0085	0,0085	0,0029
<i>B basilensis</i>	0,0007	0,0057	0,0057	0,0007	0,0007	0,0064	0,0007	0,0007	0,0057	0,0057	0,0007
<i>B pasificus</i>	0,0022	0,0078	0,0078	0,0022	0,0022	0,0085	0,0021	0,0022	0,0078	0,0078	0,0022

<i>B wiedmannii</i>	0,0007	0,0064	0,0064	0,0007	0,0007	0,0071	0,0007	0,0007	0,0064	0,0064	0,0007
<i>B paratrachis</i>	0,0007	0,0057	0,0057	0,0007	0,0007	0,0064	0,0007	0,0007	0,0057	0,0057	0,0007
<i>B mobilis</i>	0,0029	0,0078	0,0078	0,0029	0,0029	0,0085	0,0029	0,0029	0,0078	0,0078	0,0029
<i>B proteolyticus</i>	0,0014	0,0071	0,0071	0,0014	0,0014	0,0078	0,0014	0,0014	0,0071	0,0071	0,0014
<i>B albus</i>	0,0007	0,0057	0,0057	0,0007	0,0007	0,0064	0,0007	0,0007	0,0057	0,0057	0,0007
<i>B paramycoides</i>	0,0007	0,0064	0,0064	0,0007	0,0007	0,0071	0,0007	0,0007	0,0064	0,0064	0,0007
<i>E coli</i>	0,2578	0,2675	0,2675	0,2578	0,2578	0,2683	0,2616	0,2578	0,2683	0,2683	0,2578

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas Diri

Nama : Ahmad Febriyansa
Alamat : Lamongan, Jawa Timur
E-mail : febriiiyan16@gmail.com
ahmad_febri_yansah_2008016034@student.walisongo.ac.id

B. Riwayat Pendidikan

Formal :

1. MA Tarbiyatut Tholabah, Lamongan (2017-2020)
2. UIN Walisongo Semarang

Non-Formal :

1. Pondok Pesantren Tarbiyatut Tholabah, Lamongan (2014-2020)

C. Publikasi Ilmiah

1. Purnomo, E., Febriyansa, A., Ainia, M., Setyaningrum., SA., Juwarsyah, A., Fatimah, NL., (2023) Quo Vadis Antara Industrialisasi Dan Kesehatan: Pemantauan Kualitas Perairan Menggunakan Indikator Biologi, Semarang, Penerbit Alinea, ISBN 978-623-8325-29-0
2. ..
3. ..
4. ..