

Seminar Nasional dalam Rangka Dies Natalis ke-46 UNS Tahun 2022

“Digitalisasi Pertanian Menuju Kebangkitan Ekonomi Kreatif”

Identifikasi Molekuler Menggunakan Gen 16S-rNA dan Seleksi Limbah Organik sebagai Carrier Terhadap Rhizobakteri Indigenous Asal Rhizosfer Padi Sawah

Maimuna Nontji¹, Amran Muis², dan Farizah Dhaivina A³

¹Prodi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Muslim Indonesia, Jl. Urip Sumoharjo Km. 5, Makassar

²Balai Penelitian Tanaman Serealia, Jl. Dr. Ratulangi No. 274, Maros, Makassar,

³Prodi Agribisnis, Fakultas Pertanian, Universitas Muslim Indonesia, Jl. Urip Sumoharjo Km. 5, Makassar

Email: mey.amin68@gmail.com

Abstrak

Penelitian terdahulu telah berhasil membuktikan secara in-vitro rhizobakteri indigenous yang diisolasi dari rhizosfer padi sawah, yaitu isolat kode KMV 5 dan GMP 2 berpotensi sebagai agen bioremediasi, biofertilizer dan memiliki aktivitas antimikroba tertinggi. Namun identitas strain isolat tersebut belum diketahui dan carrier yang tepat untuk menunjang pemanfaatannya sebagai agen hayati belum ditemukan. Penelitian ini bertujuan untuk (1) melakukan identifikasi molekuler terhadap isolat rhizobakteri indigenous KMV5 dan GMP2 untuk mengetahui strain dengan metode sekuensing gen 16S-rNA melalui tahapan ekstraksi DNA, amplifikasi gen 16S-rRNA dan PCR. (2) melakukan seleksi terhadap limbah organik yaitu air cucian beras, air kelapa dan molase sebagai carrier yang tepat bagi kedua rhizobakteri dengan metode pengamatan nilai absorbansi pada spektrofotometer UV-VIS dengan panjang gelombang 550 nm. Hasil penelitian diperoleh (1) rhizobakteri indigenous isolat KMV5 dan GMP2 teridentifikasi memiliki tingkat homologi 93%-95% dengan *Bacillus cereus* strain ATCC 14579 (2) media organik terbaik dan tepat sebagai carrier adalah air cucian beras.

Kata kunci: identifikasi molekuler, limbah organik, rhizobakteri

Pendahuluan

Metode identifikasi berbasis molekuler pada bakteri sudah banyak dilakukan saat ini, salah satunya berdasarkan hasil sekuensing gen 16S-rNA. Gen ini adalah gen yang bersifat lestari (*conserved*) dan dijumpai pada setiap organisme. Struktur yang lestari inilah menyebabkan gen 16S r-RNA tepat digunakan pada Polymerase Chain Reaction (PCR) dan analisis sekuensing untuk menentukan taksonomi, filogeni dan keanekaragaman antar spesies.

Metode ini juga dapat digunakan sebagai alternatif untuk identifikasi yang sulit secara fisiologi dan biokimia (Janda dan Abbott, 2007)

Gen 16S rRNA bersifat universal pada bakteri (Santos dan Ochman 2004). Gen ini juga memiliki hypervariable region yang merupakan ciri khas tiap mikroorganisme. Analisis sekuensing gen 16S rRNA sudah banyak digunakan di bidang mikrobiologi. Metode berbasis molekuler ini dinilai cepat dan akurat dalam mengidentifikasi bakteri. Dari segi waktu, analisis sekuensing memiliki keunggulan karena dapat dilakukan dalam waktu singkat (Clarridge, 2004). Identifikasi bakteri *S. pneumoniae* dengan analisis sekuensing gen 16S rRNA memberikan hasil yang lebih akurat (El Aila, 2010).

Penelitian rhizobakteri untuk pemanfaatan sebagai agen hayati tidak lengkap jika tidak disertai dengan penelitian terhadap carrier (media perbanyakan) yang mudah diperoleh dan ramah lingkungan. Limbah organik cair seperti air cucian beras, air kelapa dan molase merupakan bahan terbuang yang tersedia melimpah, mudah diperoleh dan ramah lingkungan. Beberapa limbah yang dapat digunakan untuk perbanyakan bakteri antagonis yaitu limbah air kelapa (Khaeruni *et al.*, 2013), limbah cair tahu (Budiarti, 2008), air cucian kedelai (Putrina dan Fardedi, 2007), dan air cucian beras (Yuniarti dan Blondine, 2007). Limbah organik cair tersebut memiliki kandungan nutrisi yang lengkap sehingga dapat menjadi media carrier.

Limbah air cucian beras merupakan hasil buangan yang berasal dari suatu proses produksi baik industri maupun domestik yang tidak memiliki nilai ekonomis lagi, air cucian beras mengandung banyak nutrisi yang terlarut didalamnya diantaranya 80% vitamin B1, 70% vitamin B3, 90% vitamin B6, 50% mangan, 50% fosfor, 60% zat besi (Nurhasanah, 2011). Air kelapa merupakan senyawa organik yang mengandung zeatin glukosida, zeatin ribosida, kadar K dan Cl tinggi, sukrosa, fruktosa, glukosa, protein, karbohidrat, mineral, vitamin, sedikit lemak, Ca dan P (Yong *et al.*, 2009). Molases mengandung sukrosa, glukosa, fruktosa dan rafinosa dalam jumlah yang besar serta sejumlah bahan organik non gula (Valli *et al.*, 2012).

Identifikasi molekul terhadap rhizobakteri yang menguntungkan bagi tanaman sangat perlu dilakukan untuk melengkapi informasi identitas strain suatu isolat. Selain itu penggunaan media organik sebagai carrier rhizobakteri sangat mendukung pemanfaatan rhizobakteri sebagai agen hayati. Berdasarkan penelitian sebelumnya rhizobakteri indigenous dengan kode isolat KMV5 dan GMP2 adalah isolat unggul hasil seleksi sepuluh isolat yang berpotensi sebagai agen bioremediasi (Nontji, 2015), biofertilizer dan memiliki aktivitas antimikroba tertinggi (Nontji, 2019).

Untuk menggali informasi lebih detail tentang isolat unggul tersebut maka dilakukan penelitian lanjutan dengan tujuan (1) melakukan identifikasi molekuler terhadap isolat rhizobakteri indigenous KMV5 dan GMP2 untuk mengetahui strainnya dengan metode sekuensing gen 16S-rRNA melalui tahapan ekstraksi DNA, amplifikasi gen 16S-rRNA dan PCR. (2) melakukan seleksi terhadap limbah organik yaitu air cucian beras, air kelapa dan molase sebagai carier yang tepat bagi rhizobakteri tersebut.

Metode Identifikasi Berbasis Molekuler

Identifikasi molekuler dilakukan dengan sekuensing gen 16S-rRNA yang terdiri atas tahapan ekstraksi DNA, amplifikasi gen 16S-rRNA dengan PCR dan sekuensing dengan mesin Sequenser.

Ekstraksi DNA. Isolat bakteri dikulturkan pada media Nutrient Broth selama 24 jam. Suspensi bakteri diambil 1,5 µl lalu dimasukkan ke tabung centrifuge, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 4 menit. Pelet disuspensikan dalam 1 ml buffer STE, tahap ini dilakukan berulang sampai tiga kali. DNA isolat bakteri diperoleh pada tahap akhir, selanjutnya disimpan pada suhu 4⁰C (Widawaty, 2008).

Amplifikasi gen 16S-rRNA dengan PCR. Primer yang digunakan adalah primer universal untuk domain bakteri berupa forward primer 63f (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') dan reverse primer 1387r (5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3') (Marchesi *et al.* 1998). Semua komponen dicampur ke dalam microtube dan dimasukkan ke mesin PCR. Tahapan PCR terdiri atas: pre-denaturasi 94⁰C, 2 menit; tahap denaturasi 92⁰C, 30 detik; tahap annealing 55⁰C, 30 detik, tahap elongasi 72⁰C, 1 menit. Proses PCR terdiri dari 30 siklus. Selanjutnya post PCR pada suhu 75⁰C, 20 menit dan tahap stop PCR pada suhu 4⁰C. Hasil PCR disimpan pada suhu -20⁰C, siap digunakan untuk tahap sekuensing DNA (Rahayu dan Nugroho, 2015).

Hasil PCR dicek pada gelombang elektroforesis selama 45 menit yang diwarnai dengan EtBr menggunakan UV transluminator.

Sekuensing dan Analisis Sekuen DNA. DNA murni hasil PCR dipurifikasi dan diskuen dengan mesin DNA sequenser (widyawati, 2008). Hasil sequen dicek urutan basa nukleotidanya menggunakan program BioEdit, lalu diolah menggunakan program *Basic Local Alligment Search Tool-Nucleotide* (BLAST-N) melalui situs layanan Centre for Biotechnology Information (NCBI).

Seleksi Limbah Organik sebagai Carrier

Peremajaan Isolat. Isolat KMV5 dan GMP2 dikulturkan pada media Nutrient Agar, lalu diinkubasi pada suhu ruangan selama 2 x 24 jam.

Persiapan limbah organik sebagai carrier. Limbah organik dimasukkan dalam erlenmeyer sebanyak 50 ml, lalu ditambahkan dengan Tryptic Soy Broth (TSB) 10%, selanjutnya ditambahkan aquades. Campuran media tersebut disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit, lalu didinginkan dan siap digunakan sebagai carrier.

Isolat KMV5 dan GMP2 dipanen pada umur 48 jam, lalu dimasukkan dalam aquades steril, selanjutnya diamati nilai absorbansinya (Optical density) dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 550 nm.

Inokulasi pada limbah organik. 10 ml suspensi isolate dimasukkan ke dalam limbah organik, lalu diinkubasi pada suhu ruang dan dishaker dengan kecepatan 200 rpm selama 48 jam, untuk mengukur pertumbuhan dan jumlah koloni bakteri. Perlakuan yang diuji adalah:

1. Perlakuan A: inokulum KMV5 + GMP2 + air kelapa + 10 % TSB
2. Perlakuan B: inokulum KMV5 + GMP2 + air cucian beras + 10% TSB
3. Perlakuan C: inokulum KMV5 + GMP 2 + molase + 10 % TSB

Setiap perlakuan diulang tiga kali, parameter yang diamati yaitu kerapatan sel bakteri dan jumlah koloni.

Kerapatan sel isolat KMV 5 dan GMP 2 diamati berdasarkan nilai absorbansinya pada spektrofotometer UV-VIS panjang gelombang 550 nm, umur 5 jam, 10 jam, 15 jam, 20 jam dan 25 jam masa inkubasi.

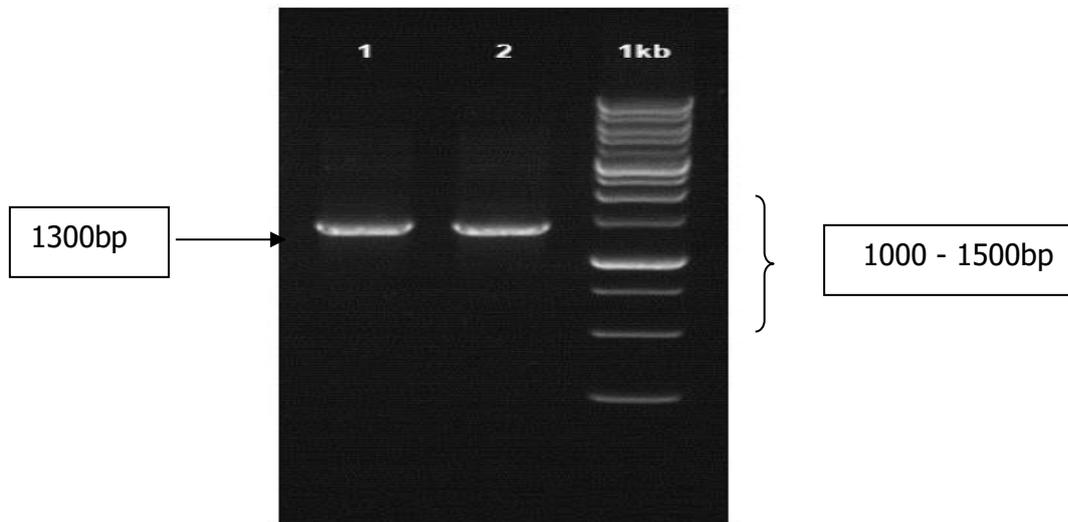
Jumlah koloni dihitung pada umur 2, 4, 6 dan 8 minggu dengan metode pengenceran. Limbah organik dihomogenkan dengan cara mengocok hingga tercampur rata, lalu diambil sebanyak 1 ml, lalu ditumbuhkan pada media Nutrient agar kemudian diinkubasi pada suhu ruang. Perhitungan jumlah koloni (log CFU/mL) dilakukan setelah umur 2 hari masa inkubasi. Viabilitas setiap isolat juga diamati pada umur penyimpanan 2- 6 minggu, dengan metode pengenceran.

Hasil dan Pembahasan

1. Hasil Identifikasi Molekul Gen 16S rNA

Elektroforegram PCR menggunakan primer gen 16S rRNA disajikan pada Gambar 1, terlihat bahwa gen universal tersebut mampu mengamplifikasi DNA isolat GMP 2 (No.1) dan KMV 5 (No. 2) yang ditandai dengan munculnya band pada plat agarosa pada posisi antara 1000-1500 bp. Panjang DNA hasil PCR yang divisualisasi berukuran ±1300 bp dengan

menggunakan perbandingan DNA marker yang berukuran 2000 bp. Ukuran 16S rDNA pada umumnya mencapai 1500 bp. Panjang urutan basa gen 16S rDNA adalah 1500-1550 bp (Clarridge, 2004).



Gambar 1. Visualisasi hasil PCR menggunakan primer 16S rRNA

Keterangan : No. 1 = Isolat GMP 2

No. 2 = Isolat KMV 5

Marker = 1kb

Tabel 1. Analisis hasil BLASTN Gen 16S rRNA Isolat GMP 2

No	Deskripsi	Nilai Maksimum	Panjang Nukleotida	Urutan Nukleotida	Nomor Akses
	Bacillus cereus strain ATCC				
1	14579	1932	98%	95%	NR 074540.1
2	Bacillus cereus strain JCM 2152	1932	98%	95%	NR 113266.1
3	Bacillus cereus strain CCM 2010	1932	98%	95%	NR 115714.1
	Bacillus cereus strain NBRC				
4	15305	1932	98%	95%	NR 112630.1
	Bacillus cereus strain ATCC				
5	14579	1932	98%	95%	NR 114582.1

Hasil BLASTN untuk isolat GMP 2 disajikan pada Tabel 1. Pada parameter query cover terlihat bahwa isolat GMP 2 memiliki kesamaan dengan *Bacillus cereus* strain ATCC 14579 (no.aksesi NR 074540.1) dengan tingkat homology 98%, artinya total panjang urutan nukleotida isolat GMP 2 cukup baik untuk disejajarkan dengan urutan nukleotida database yang dimiliki oleh bank gen NCBI (National Center for Biotechnology Information). Sedangkan pada parameter maximum identity tingkat homologinya sebesar 95%, artinya persen kesamaan urutan nukleotida isolat GMP 2 dapat disejajarkan dengan urutan nukleotida bank gen.

Tabel 2. Analisis hasil BLASTN Gen 16S rRNA Isolat KMV 5

No	Description	Nilai Maksimum	Panjang Nukleotida	Urutan Nukleotida	Nomor Akses
1	Bacillus cereus strain ATCC 14579	1393	93%	88%	NR 074540.1
2	Bacillus cereus strain JCM 2152	1393	93%	88%	NR 113266.1
3	Bacillus cereus strain CCM 2010	1393	93%	88%	NR 115714.1
4	Bacillus cereus strain NBRC 15305	1393	98%	88%	NR 112630.1
5	Bacillus cereus strain ATCC 14579	1393	98%	88%	NR 114582.1

Hasil BLASTN untuk isolat KMV 5 disajikan pada Tabel 2. Pada parameter *query cover* terlihat bahwa isolat KMV 5 memiliki kesamaan dengan *Bacillus cereus* strain ATCC 14579 (no.aksesi NR 074540.1) dengan tingkat homology 93%, artinya total panjang urutan nukleotida isolat KMV 5 cukup baik untuk disejajarkan dengan urutan nukleotida yang dimiliki oleh bank gen NCBI (National Center for Biotechnology Information). Sedangkan pada parameter *maximum identity* tingkat homologynya sebesar 88%, artinya persen kesamaan urutan nukleotida isolat GMP 2 dapat disejajarkan dengan urutan nukleotida bank gen.

Bacillus cereus merupakan bakteri gram positif yang berbentuk batang besar dengan ukuran panjang sel 3-5 mikron dan lebarnya 1 mikron. Bakteri ini menghasilkan spora yang berbentuk elips dan terletak di tengah-tengah sel. Spora hanya terbentuk bila terdapat oksigen di lingkungan sekitar (aerob fakultatif). *Bacillus cereus* termasuk salah satu organisme mesofilik yaitu dapat tumbuh pada suhu optimal 30-35 °C. *Bacillus cereus* mempunyai alat gerak berupa flagella yang jumlahnya lebih dari dua dan mengelilingi seluruh permukaan sel bakteri (Blackburn 2002). Potensi kitinolitik *Bacillus cereus* telah banyak dilaporkan, diantaranya dapat menghambat pertumbuhan jamur *Rhizoctonia solani* pada tanaman (Elkahoui *et al.*, 2012).

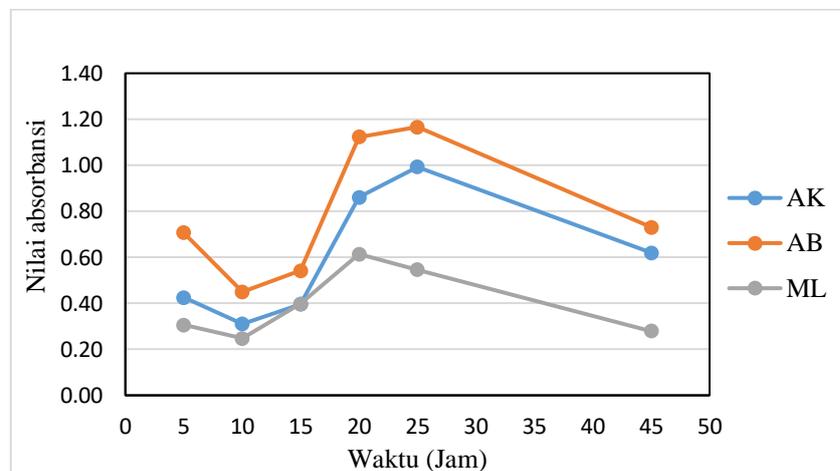
2. Kerapatan Sel dan Jumlah Koloni pada Berbagai Limbah Organik

Kerapatan sel rhizobakteri isolat KMV 5 dan GMP 2 berdasarkan nilai absorbansi disajikan pada Tabel 3, terlihat bahwa pada dasarnya isolat KMV5 dan GMP 2 dapat tumbuh baik pada semua limbah organik, hal tersebut ditandai dengan penambahan nilai absorbansi pada semua media organik baik media air kelapa (AK), media air cucian beras (AB) dan molase (ML).

Pada umur pengamatan 5-10 jam rata-rata nilai absorbansi menurun, hal ini disebabkan pada umur tersebut rhizobakteri berada pada fase adaptasi, namun setelah umur pengamatan 10 jam mulai meningkat. Nilai absorbansi tertinggi terlihat pada perlakuan limbah organik air cucian beras pada semua umur pengamatan. Pengamatan tertinggi pada umur 25 jam yaitu 1,77 dan terendah pada umur 5 jam yaitu 0,45.

Tabel 3. Nilai absorbansi rhizobakteri pada berbagai limbah organik

No.	Limbah organik	Nilai absorbansi (jam)				
		5	10	15	20	25
1	Air Kelapa (AK)	0,43	0,31	0,4	0,86	0,99
2	Air cucian beras (AB)	0,71	0,45	0,54	1,12	1,17
3	Mollase (ML)	0,31	0,25	0,4	0,61	0,55



Gambar 2. Grafik pola pertumbuhan Rhizobakteri pada berbagai limbah organik

Pada Gambar 2 terlihat grafik pola pertumbuhan rhizobakteri yang sama pada setiap limbah organik yaitu pertumbuhan menurun pada umur 5-10 jam, selanjutnya meningkat terus sampai pada umur 20 jam. Pertumbuhan pada media molase menurun setelah umur 20 jam, namun sebaliknya pada media air kelapa dan air cucian beras justru meningkat setelah umur 20 jam.

Perilaku dinamik sel mikroorganisme secara garis besar mengalami empat fase pertumbuhan yaitu: (1) fase lag dikenal sebagai fase adaptasi, merupakan fase penyesuaian terhadap lingkungan dengan proses yang lambat, (2) fase pertumbuhan cepat dikenal sebagai fase eksponensial, merupakan fase bertambah volume dan ukuran sel yang dapat diekspresikan dengan fungsi eksponensial, (3) fase statis dikenal sebagai fase stasioner, merupakan fase penurunan kecepatan pertumbuhan dimana jumlah sel yang berkembang biak hampir sama dengan jumlah yang mengalami kematian, (4) fase kematian

atau fase decline merupakan fase penurunan populasi dimana jumlah sel yang mati lebih besar dibandingkan yang hidup.

Berdasarkan pengamatan grafik pola pertumbuhan (Gambar 2), terlihat bahwa fase adaptasi terjadi pada pengamatan umur 5-15 jam, artinya bahwa fase adaptasi rhizobakteri pada ketiga limbah organik membutuhkan waktu yang sama yaitu ± 10 jam. Fase eksponensial terjadi pada pengamatan umur 15-25 jam pada air cucian beras dan air kelapa, artinya pada fase ini dibutuhkan waktu ± 10 jam dan terlihat nilai absorbansi tertinggi pada air cucian beras mencapai 1,17. Hal ini menandakan bahwa air cucian beras dapat menyediakan nutrisi yang dibutuhkan oleh rhizobakteri lebih baik dibandingkan dengan air kelapa.

Pertumbuhan rhizobakteri memasuki Fase eksponensial pada molase terjadi pada pengamatan umur 15-20 jam, artinya pada molase fase eksponensial membutuhkan waktu yang lebih singkat yaitu 5 jam dan nilai absorbansi terendah yaitu 0,6, artinya molase tidak dapat menyediakan nutrisi yang lebih lama dan lebih baik dibandingkan dengan kedua limbah organik lainnya.

Pertumbuhan rhizobakteri pada fase eksponensial memerlukan nutrisi yang banyak dan berkualitas karena fase ini merupakan fase pertumbuhan cepat baik ukuran maupun volume sel bakteri. Setelah fase adaptasi selesai, mikroorganisme memasuki fase eksponensial dimana laju pertumbuhan maksimum dan konstan, sehingga jumlah biomassa maksimum terdapat pada fase ini (Atlas *et al.*, 1998 dalam Nurhamida 2009).

Tabel 4. Hasil perhitungan jumlah koloni umur 24 dan 48 jam (CFU)

No.	Limbah Organik	Jumlah koloni (CFU)	
		24 jam	48 jam
1	Air Kelapa	$10,25 \times 10^{12}$	$4,45 \times 10^{12}$
2	Air cucian beras	$11,56 \times 10^{12}$	$4,63 \times 10^{12}$
3	Mollase	$09,18 \times 10^{12}$	$3,36 \times 10^{12}$
4	Kontrol	$06,06 \times 10^{12}$	$3,07 \times 10^{12}$

Perhitungan jumlah koloni rhizobakteri pada semua limbah organik menunjukkan peningkatan sampai pengamatan 24 jam, selanjutnya menurun pada pengamatan 48 jam. Jumlah koloni untuk semua limbah organik berada pada kisaran $09,18 \times 10^{12}$ - $10,25 \times 10^{12}$ CFU melebihi jumlah koloni pada kontrol ($06,06 \times 10^{11}$ CFU). Sedangkan yang tertinggi dicapai pada air cucian beras yaitu $11,56 \times 10^{12}$.

Berdasarkan pengamatan nilai absorbansi, grafik pola pertumbuhan dan perhitungan jumlah koloni, diperoleh limbah organik yang terbaik untuk pertumbuhan bakteri isolat

KMV5 dan GMP2, yaitu air cucian beras. Pada air cucian beras tersedia nutrisi kompleks seperti karbohidrat, vitamin, mineral dalam persentase yang tinggi dibandingkan nutrisi yang ada pada air kelapa dan molase. Menurut Yuwana (2016) air cucian beras mengandung karbohidrat dan protein yang sangat tinggi, protein ini mengandung asam amino yang akan berproses sebagai zat penagatur tumbuh yang berupa auksin, alanin dan giberelin. Hal tersebut diperkuat oleh Munawaroh *et al* (2010) limbah air cucian beras memiliki kandungan nutrisi yang melimpah di antaranya karbohidrat berupa pati (85-90%), sekitar 80% vitamin B1, 70% vitamin B3, 90% vitamin B6, 50% mangan (Mn), 50% fosfor (P), 60% zat besi (Fe), 100% serat, dan asam lemak esensial.

Ketersediaan nutrisi yang melimpah dan beragam pada air cucian beras menyebabkan perkembangan rhizobakteri pada setiap fase pertumbuhan baik pada fase lag, eksponensial, stasioner dan fase decline terlihat lebih tinggi dibandingkan dengan pertumbuhan pada air kelapa dan molase.

Rata-rata jumlah koloni rhizobakteri pada air cucian beras pada penyimpanan 2, 4 dan 6 minggu disajikan pada Tabel 3, terlihat semakin lama umur penyimpanan semakin meningkat jumlah koloni. Hal tersebut menandakan bahwa viabilitas kedua isolat dapat bertahan minimal sampai 6 minggu.

Tabel 5. Rata-rata Jumlah koloni pada media air cucian beras umur penyimpanan 2-6 minggu

No	Lama Penyimpanan (minggu)	Jumlah Koloni CFU/ml
1.	2	149
2.	4	247
3.	6	368

Kesimpulan

Berdasarkan analisis dan hasil uji yang telah dilakukan diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Rhizoakteri isolat KMV5 dan GMP2 memiliki tingkat homologi 93%-95% dengan *Bacillus cereus* strain ATCC 14579.
2. Limbah organik terbaik dan tepat sebagai carier (bahan pembawa) adalah media air cucian beras dengan viabilitas sampai enam minggu.

Daftar Pustaka

- Budiarti, R. S. 2008. Pengaruh konsentrasi starter *Acetobacter xylinum* terhadap ketebalan dan rendemen selulosa Nata de Soya. *Biospecies* 1(1):19-24.
- Blackburn, Clive de, McClure, P. J. 2002. *Foodborne Pathogens. Hazards, Risk Analysis and Control*. New York: CRC Press.
- Clarridge, J. E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 17(4): 840-623.
- El Aila. 2010. The Development of a 16S rRNA Gene Based PCR for the Identification of *Streptococcus pneumoniae* and Comparison with Four Other Species Specific PCR Assays. *BMC Infectious Diseases*. 104(10): 1-8.
- Elkahoui, S., N. Djébal, O. Tabbene, A. Hadjbrahim, B. Mnasri, R. Mhamdi, and F. Limam. 2011. Screening of bacterial isolates collected from marine bio-films for antifungal activity against *rhizoctonia solani*. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnol. Mol. Biol.* 5(2): 1-4.
- Janda, M. dan S. Abbott. 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*. 45(1): 2761-27.
- Khaeruni, A., Asrianti, dan A. Rahman. 2013. Efektivitas limbah cair pertanian sebagai media perbanyakan dan formulasi *Bacillus subtilis* sebagai agens hayati patogen tanaman. *Agroteknos*. 3(3): 144-151.
- Marchesi, J. R., T. Sato, A. J. Weightman, T. A. Martin, J. C. Fry, S. J. Hiom, and W. G. Wade. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ. Microbiol* 64: 795-9.
- Munawaroh dan A. Handayani. 2010. Ekstraksi minyak daun jeruk purut (*citrus hystrix* D.C.) dengan pelarut etanol dan N-heksana. *Jurnal Kompetensi Teknik*. 1(2): 73-78.
- Nontji, M., Baharuddin, Burhanuddin Rasyid, dan Pirman. 2015. Seleksi bakteri methanotrof (pereduksi emisi gas metan di lahan sawah) berdasarkan aktivitas enzim metan momooksigenase, *Jurnal Ilmu Lingkungan, Program Pasca Sarjana UNDIP*. 13(1): 86-91.
- Nontji, M., M. Amran, N. Nurmi, N. Nurjannah, Farizah, and D. amram. 2019. Evaluating The Potential of indigenous Rhizobacteria as Biofertilizer and biopesticide Agains *Rhizoctonia solani*, *Nusantara Bioscience*. 11(1): 79-83.
- Nurhamida. 2009. Optimasi Produksi Inokulan *Pseudomonas* sp dan Viabilitasnya dalam bahan Pembawa Gambut. *Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Bogor*
- Nurhasanah, Y. S. 2011. Air cucian beras dapat suburkan tanaman. *Institut Pertanian Bogor*. www.kabarkampus.com.

- Putrina, M. dan Fardedi. 2007. Pemanfaatan air kelapa dan air rendaman kedelai sebagai media perbanyak bakteri *Bacillus thuringiensis* Barliner. Ilmu- Ilmu Pertanian Indonesia 9(1): 64-70.
- Rahayu, D. A. dan E. D. Nugroho. 2015. Biologi molekuler dalam perspektif konservasi. Plataxia, Yogyakarta.
- Santos, S. R. and H. Ochman. 2004. Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and protein. Journal Environmental Microbiology. 6 (1): 754759.
- Valli, V., Gomez Caravaca A. M., DiNunzio M., F. Danesi, M. F. Caboni, and A. Bordoni. 2012. Sugar cane and sugar beet molasses, Antioxidant-rich Alternatives to Refined Sugar. J. Agric. Food Chem. 60: 12508-12515. dx.doi.org/10.1021/jf304416d.
- Widyawati, A. 2008. *Bacillus* sp. Asal Rhizosfer kedelai yang berpotensi sebagai Pemacu Pertumbuhan Tanaman dan Biokontrol Fungi Patogen Akar. Sekolah Pasca Sarjana IPB. Bogor.
- Yong, J. W. H., Ge, L., Ng, Y. F. and Tan, S. 2009. The Chemical Composition and Biological Properties of Coconut (*Cocos nucifera* L.) Water. Molecules. 14 (1): 5144–5164.
- Yuniarti, R. A. dan Blondine Ch. P. 2007. Pengembangbiakan *Bacillus thuringiensis* H-14 galur lokal menggunakan media air cucian beras dan patogenisitasnya terhadap jentik *Culex quinquefasciatus*. Media Litbang Kesehatan. 17(4): 14-20.
- Yuwana, D. R. 2016. Manfaat air cucian beras untuk menyuburkan tanaman. <http://mitalom.com/manfaat-air-cucian-beras-untuk-menyuburkan> tanaman (diakses 07 Februari 2017).