

Uji Bakteri Simbiotik dan Nonsimbiotik Pelarutan Ca vs. P dan Efek Inokulasi Bakteri pada Anakan Turi (*Sesbania grandiflora* L. Pers.)
(The Ability of Symbiotic and Nonsymbiotic Bacteria on Ca vs.P Solubilization and Effect Bacteria Inoculation on Turi (*Sesbania grandiflora* L.Pers.) Seedlings)

Sri Widawati

Research Center for Biology- Indonesian Institute of Sciences
CSC-LIPI, Jl.Raya Jakarta-Bogor km 46, Cibinong 16911
E-mail: widadomon@yahoo.com

Memasukkan: Mei 2015, **Diterima:** Juni 2015

ABSTRACT

Nitrogen-fixing bacteria that dissolve phosphate and produce IAA (plant growth hormones) are useful for biological organic fertilizer (BOF). Thirty nitrogen-fixing isolates have been isolated from the rhizosphere soil on Mount Salak, Bogor. This study aims to find nitrogen-fixing symbiotic and non-symbiotic bacteria that could potentially dissolve phosphorus (P) and produce hormones IAA. The N-fixing bacteria were tested to promote growth of turi (*Sesbania grandiflora*) during seedling. Turi is called astringency tree, because the entire tree is useful for land reclamation, produce tannin, gum, resin, vegetables, medicine, tonic, antipyretic, and as pulp material. Pikovskaya medium was used to evaluate the ability of nitrogen-fixing bacteria to dissolve phosphate. The effect of bacteria on the growth of seedlings *Sesbania grandiflora* were evaluated using pot experiment. Pot contained sterile sand were arranged as factorial with 3 replications and watered with sterile distilled water containing Muller solution in the green house. The results showed that, the highest populations of bacteria, P solubilization index, and PMEase produced by *Rhizobium*, *Azotobacter* and *Azospirillum* were isolated from the rhizosphere of tea plant. The isolates were identified as *Azotobacter chroococcum* and *Azospirillum lipoferum* and *Rhizobium* sp. All of the isolates produced plant growth hormone (IAA). Effects of inoculants ABC (*Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium* 1), ABD (*Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium* 2), BCD (*Azotobacter*, *Rhizobium* 1, *Rhizobium* 2), dan ABCD (*Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium* 1, *Rhizobium* 2), were very good on growth of Turi plant seedlings. All isolates formed root nodules, except the ABD and D isolats.

Keywords: Nitrogen fixing bacteria, Phosphate solubilizing bacteria, *Sesbania grandiflora* L.Pers.

ABSTRAK

Bakteri penambat nitrogen yang dapat melarutkan fosfat dan memproduksi hormon IAA bermanfaat untuk pengkayaan pupuk organik hayati (POH). Tiga puluh isolat penambat nitrogen telah diisolasi dari tanah rizosfer tanaman di Gunung Salak Bogor. Penelitian ini bertujuan untuk menemukan bakteri penambat nitrogen simbiotik dan non simbiotik yang berpotensi melarutkan fosfor (P) dan memproduksi hormon IAA. Bakteri penambat N telah diuji untuk meningkatkan pertumbuhan turi (*Sesbania grandiflora*) selama pembibitan. Turi disebut pohon astringency, karena seluruh pohon ini berguna untuk reklamasi lahan, menghasilkan tanin, gum, resin, sayuran, obat-obatan, tonik, antipiretik, dan sebagai bahan *pulp*. Media Pikovskaya digunakan untuk mengevaluasi kemampuan bakteri penambat nitrogen untuk melarutkan fosfat. Pengaruh bakteri pada pertumbuhan bibit *Sesbania grandiflora* dievaluasi menggunakan percobaan pot. Pot berisi pasir steril yang disusun secara faktorial dengan 3 ulangan dan disiram dengan air suling steril yang mengandung larutan Muller di rumah kaca. Hasil penelitian menunjukkan bahwa, populasi bakteri, indeks pelarutan P, dan PMEase tertinggi dihasilkan oleh *Rhizobium*, *Azotobacter* dan *Azospirillum* yang diisolasi dari rizosfer tanaman the. Isolat diidentifikasi sebagai *Azotobacter chroococcum* dan *Azospirillum lipoferum* serta *Rhizobium* sp. Semua isolat menghasilkan hormon pertumbuhan tanaman (IAA). Efek inokulan ABC (*Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium* 1), ABD (*Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium* 2), BCD (*Azotobacter*, *Rhizobium* 1, *Rhizobium* 2), dan ABCD (*Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium* 1, *Rhizobium* 2) sangat baik pada pertumbuhan anakan tanaman turi. Semua isolat membentuk bintil akar, kecuali isolate ABD dan D.

Kata Kunci: Fiksasi bakteri nitrogen, daya larut bakteri fosfat, *Sesbania grandiflora* L.Pers.

PENDAHULUAN

Bakteri penambat nitrogen yang dapat melarutkan fosfat dan memproduksi hormon IAA sangat penting untuk pembuatan pupuk

organik hayati (POH). Kepentingan POH sangat membantu pertumbuhan tanaman untuk tujuan reklamasi lahan terdegradasi.

Bakteri penambat nitrogen (BPN) ada yang bersifat simbiotik dan nonsimbiotik.

Keragaman dan populasinya tersebar di tanah subur dan tanah marginal, di dataran rendah hingga dataran tinggi. Kehidupan BPN dalam tanah dipengaruhi oleh tingkat keasaman dan kandungan hara utama seperti karbon (C), nitrogen (N), fosfor (P), kalium (K) dan sejumlah macam unsur mikro (Alexander 1977), selain juga dipengaruhi oleh kondisi aerasi, pH, dan kesuburan tanah. Beberapa spesies dapat beradaptasi dan belajar tumbuh pada berbagai habitat yang mempunyai perbedaan temperatur, keasaman, dan tekanan oksigen yang ekstrim (Wibowo 2012).

Bakteri *Rhizobium* merupakan bakteri penambat nitrogen simbiotik yang biasanya disebut bakteri bintil akar karena dapat menginfeksi akar tanaman legum dan membentuk bintil yang merupakan tempat terjadinya fiksasi nitrogen (Reeve *et al.* 2015). *Rhizobium* hidup di sekitar perakaran tanah subur atau marginal (Dean *et al.* 2014) dan merupakan bakteri terkenal dari kelompok Alphaproteobacteria dan Betaproteobacteria yang bertindak sebagai fixer simbiosis utama nitrogen dan memiliki kapasitas untuk membentuk simbiosis fiksasi nitrogen dengan legume (Reeve *et al.* 2015). Bakteri *Rhizobium* mampu memproduksi hormon tumbuh yang disebut Indol Acetic Acid atau IAA (Widawati & Muharam 2012) juga dapat melarutkan fosfat (Wani *et al.* 2007).

Bakteri *Azotobacter*, dan *Azospirillum* merupakan bakteri penambat nitrogen non simbiotik atau *free-living nitrogen-fixing rhizobacteria* yang mampu hidup di daerah perakaran, tanah subur, tanah marginal, tanah salin ataupun di tanah asam (Figueiredo *et al.* 2010). *Azospirillum* dan *Azotobacter* bersifat hidup bebas pada daerah perakaran dan mampu melakukan penambatan nitrogen (Sy *et al.* 2001). *Azospirillum* berpotensi besar sebagai pupuk hayati, karena *Azospirillum* mampu memproduksi hormon tumbuh IAA dan sekaligus sebagai pemantap agregat tanah (Widawati & Muharam 2012). Bakteri tersebut banyak berasosiasi dengan tumbuhan jenis rerumputan, termasuk beberapa jenis sereal, jagung, gandum dan rumput (Radwan 2002; Kumar 2014). Sedangkan bakteri *Azotobacter* adalah bakteri penambat nitrogen yang mampu

menghasilkan substansi zat pemacu tumbuh giberelin, sitokinin, dan asam indol asetat, sehingga dapat memacu pertumbuhan akar (Nosrati *et al.* 2014).

Bakteri *Rhizobium*, *Azotobacter*, dan *Azospirillum* akan membantu mengubah N_2 dari udara menjadi NH_3 dengan menggunakan enzim nitrogenase, kemudian NH_3 diubah menjadi glutamin dan alanin (Ward & Jensen 2014), sehingga dapat diserap oleh tanaman. Beberapa dari bakteri *Rhizobium*, *Azotobacter*, dan *Azospirillum* dapat melarutkan fosfat terikat sehingga menjadi tersedia bagi tanaman (Antoun 2009). Bakteri Pelarut fosfat akan berperan dalam pelarutan P terikat melalui sekresi asam dan mineralisasi komponen fosfat organik dengan mengubahnya menjadi bentuk anorganik (Panhwar *et al.* 2014). Bakteri tersebut berperan pada mineralisasi fosfat organik, yaitu melalui produksi enzim fosfatase asam dan basa. Enzim fosfatase dalam tanah berfungsi pada proses hidrolisis P organik menjadi fosfat anorganik yaitu $H_2PO_4^-$ dan $HPO_4^{=}$ yang menjadi tersedia bagi tanaman (Lal 2002; Rosmarkam & Yuwono 2002; Kümmerer 2004; Winarso 2005). Kunito *et al.* (2012) mengemukakan, bahwa salah satu hormon fosfatase yaitu fosfomonoesterase merupakan indikasi indeks kesuburan tanah dan sebagian besar mikroba dalam tanah menghasilkan PMEase asam (Hebrien & Neal 1990).

Bakteri *Rhizobium*, *Azotobacter* dan *Azospirillum* membantu menyediakan unsure N dan P bagi tanaman melalui penambatan N bebas dari udara dan pelarutan P terikat pada unsure lain. Selain itu juga dapat memproduksi hormone tumbuh IAA. Hosseini *et al.* (2014) mengemukakan bahwa bakteri yang mempunyai kemampuan seperti itu termasuk dalam kelompok *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) dan menurut Singh *et al.* (2011) bakteri tersebut bermanfaat sebagai *biofertilizer*.

Pemanfaatan bakteri penambat nitrogen dan sekaligus dapat melarutkan fosfat serta potensial memproduksi hormone tumbuh IAA akan memudahkan dalam memberikan pupuk organik hayati bagi suatu tanaman, karena didapat keuntungan ganda yaitu dapat menyediakan unsur N dan P serta pemacu

pertumbuhan (IAA) (Peix *et al.* 2001). Dampak bakteri simbiotik dan nonsimbiotik akan terlihat efektifitasnya jika diinokulasikan pada tanaman.

Tanaman turi (*Sesbania grandiflora*) adalah salah satu tanaman dari kelompok Leguminosae dan sering digunakan untuk mereklamasi tanah terdegradasi khususnya tanah yang bersifat alkali, kering, salin, serta toleransi pada pH asam. Menurut Reeta *et al.* (2013) tanaman turi juga mempunyai banyak manfaat seperti daun, biji, polong dapat dimakan dan bunganya untuk sayuran atau salad, daunnya untuk pupuk hijau, makanan ternak (daunnya mengandung 36% protein kasar (berat kering) dan 9600 IU vitamin A dalam setiap 100 g), pelindung dan penumpu tanaman vanili serta lada, kayunya merupakan kayu bakar terbaik (Nilai kalori adalah 17,91 MJ / kg, dengan kadar abu yang tinggi (6%) dan persentase yang rendah karbon (11,7%). Seratnya padat dalam 3-4 tahun dan mampu menghasilkan pulp jauh lebih tinggi dibandingkan bahan pulp lainnya. Kulitnya menghasilkan tannin dan pohonnya menghasilkan gum/resin. Turi merupakan pohon *astringency* dan seluruh bagian dari tanaman tersebut dapat dijadikan sebagai obat (Reeta *et al.* 2013) dan tanaman agroforestri (Orwa *et al.* 2009).

Penelitian ini bertujuan untuk menemukan bakteri penambat nitrogen simbiotik maupun non simbiotik yang berpotensi melarutkan fosfor (P), memproduksi hormon IAA, sebagai POH dan mempunyai efek positif pada pertumbuhan anakan tanaman Turi.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bakteri diisolasi dari rizosfer tanaman padi (*Oryza sativa* L.), ketela rambat (*Ipomoea batatas* L.), pisang (*Musa paradisiaca* L.), bintil kacang panjang (*Vigna unguiculata* (L.) Verdc.), bawang merah (*Allium cepa* L.), ketela pohon (*Manihot utilissima* Pohl.), pepaya (*Carica papaya* L.), kopi (*Coffea robusta* L.Linden), teh (*Camillia sinensis* (L.) Kuntze) dan kaliandra (*Calliandra grandiflora* (L’Her. Benth.) pada ketinggian 675, 940, dan 1129 m dpl di gunung Salak Bogor dengan letak geografis S:06°49’10.1”E:106°41’88.1” dan S:06°48’53.9” E:106°40’53.3”. Sampel tanah dikumpulkan secara acak, dan dipindahkan ke laboratorium untuk diisolasi serta dianalisa sifat fisik dan kimia tanah (Tabel 1).

Isolasi bakteri penambat nitrogen simbiotik ”*Rhizobium*” diseleksi pertumbuhannya dengan media YEMA *congo red* mengikuti metode Vincent (1970) dan sedikit dimodifikasi dengan

Tabel 1. Sifat fisikokimia tanah sebagai sumber mikroba dari mana sampel dikumpulkan

No.	Kode analisis	Nilai		Satuan
		Sampel 1	Sampel 2	
1	pH H ₂ O	5,44	5,38	
2	pH KCL	4,09	4,24	
3	C Organik	3,48	4,04	%
4	N Total	0,25	0,17	%
5	C/N Ratio	14	24	
6	P Tersedia	14,8	12,5	ppm
Basa dapat ditukarkan:				
7	Ca	4,03	5,03	me/100 g
8	Mg	1,01	1,44	me/100 g
9	K	0,29	0,22	me/100 g
10	Na	0,20	0,22	me/100 g
11	Total	5,58	6,94	me/100 g
12	Al	0,56	0,44	me/100 g
13	KTK	26,39	25,07	me/100 g
14	KB	20	27	%
Tekstur:				
15	Pasir	12	25	%
16	Debu	47	46	%
17	Liat	42	28	%

metode Hassan *et al.* (1986). Isolasi bakteri nonsimbiotik "*Azospirillum*" mengikuti metode Caceres (1982) dengan modifikasi metode Rao (1994). Isolasi "*Azotobacter*" mengikuti metode Aquilanti *et al.* (2004). Penghitungan populasi bakteri menggunakan metode *plate count* dengan seri pengenceran dari 10^{-1} sampai 10^{-7} dan waktu inkubasi 3-5 hari pada suhu kamar / 30°C (Vincent 1970; Rao 1994).

Isolat bakteri diidentifikasi dengan melihat karakteristik morfologi sebagai pengamatan bentuk sel dengan pewarnaan (coccus, batang, batang/pembentukan filamen dan spora pendek), gram, dan pengamatan sel hidup (motilitas, pembentukan spora, dan tunggal, berpasangan atau rantai) mengikuti metode *Bergey's manual* (Krieg & Holt 1984) dan dikombinasi dengan metode Woo (2008) dengan menggunakan 16S rDNA.

Pengukuran enzim nitrogenase menggunakan metode ARA (Acetylene Reduction Assays), yaitu reduksi asetilen (C_2H_2) oleh enzim nitrogenase yang dihasilkan oleh bakteri penambat nitrogen (Turner & Gibson 1980). Bakteri penambat nitrogen ditumbuhkan pada NFB semi cair (Nitrogen Free Broth) selama 3-4 hari, kemudian dimasukan 2 mL ekstrak bakteri (suspense sel) ke dalam botol-botol kecil, botol ditutup dengan karet dan almunium, dikencangkan dan dipres. Udara dalam botol (ukuran 15 ml) dibuang 10 % nya dengan *syringe* dan dengan alat yang sama digantikan dengan *gas acetylene* sebanyak 10%. Setelah satu jam inkubasi, kemudian gas asetilen yang terbentuk diambil 50 μ L dan diinjeksikan ke dalam lubang Gas Chromatography-148 (GC) melalui kolom *Porapak Q* 80% dan *chromatopac*

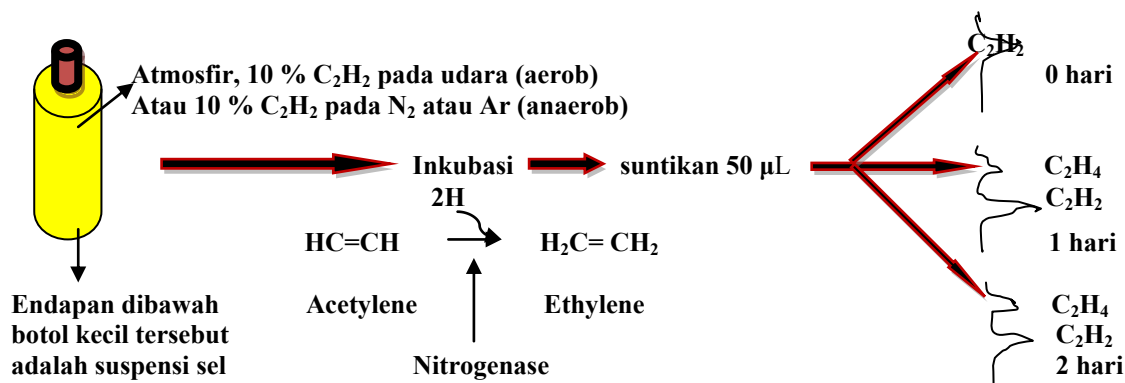
C-R6A. Kondisi temperatur kolom 35°C, injector 40°C, dan detector (FID) 200°C. Alat GC dikontrol oleh tekanan udara (100 Kpa), Hydrogen (100 Kpa) dan Nitrogen carrier/P (210 Kpa) dan Nitrogen carrier/M (200 Kpa). Cara pengukuran seperti pada skema Gambar 1.

Pengukuran kuantitatif kelarutan Ca-fosfat dilakukan dengan mengikuti metode Nguyen *et al.* (1992) dan Seshadri *et al.* (2002), yaitu isolat yang ditumbuhkan dalam media Pikovskaya padat dengan sumber P $Ca_3(H_2SO_4)_2$ dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 7 hari. Indikasi pelarutan Ca-P adalah terbentuknya zona bening di sekitar koloni. Pengukuran potensi estimasi kuantitatif pelarutan fosfat mengikuti metode Premono *et al.* (1996) yaitu Indek Pelarutan/IP= diameter koloni + diameter halozon dibagi diameter koloni.

Produksi enzim Fosfatase (phosphomono estearase) mengikuti metode Tabatabai & Bremner (1969), dan aktivitas unit PME-ase didefinisikan sebagai μ mol nitrophenol yang diproduksi oleh enzim 1 ml per jam.

Penentuan produksi hormon pertumbuhan IAA mengikuti metode Rao (1994) dan Etesami *et al.* (2009), yaitu dengan menumbuhkan isolat pada media TSB 50% dan menggunakan prekursor 200 ppm L-Tryptophan mengikuti metode Mehboob *et al.* (2010). Setelah inkubasi 3 hari ke dalam isolat disiram reagent salkowsky dan sebagai indikator bakteri potensial memproduksi IAA adalah timbulnya degradasi warna merah muda ke merah pada koloni bakteri.

Uji efek inokulasi bakteri *Rhizobium*, *Azotobacter* dan *Azospirillum* pada anakan turi dilakukan di rumah kaca Mikrobiologi, Puslit



Gambar 1. metode Acetylene Reduction Assays (ARA) dengan Gas Chromatography (Turner & Gibson 1980)

Biologi, LIPI. Biji turi dicuci dan dicekambahkan dalam cawan steril, kemudian kecambah turi diinokulasi dengan cara merendam kecambah dengan inokulan cair (bakteri tunggal dan mix) dari masing-masing isolat bakteri yang diuji selama 1 jam. Selanjutnya dua kecambah ditanam dalam pot berisi pasir steril dan disiramkan isolat perendaman tersebut, kemudian pasir ditutup dengan pasir berparafin. Kelembaban media tanam (24 %) dijaga dengan menyiramkan larutan hara Muller tanpa N mengikuti metode Saono *et al.* (1976). Percobaan ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan lima ulangan. Perlakuan isolat tunggal (*Azospirillum/A*, *Azotobacte/B*, *Rhizobium 1/C*, *Rhizobium 2/D*), isolat mix (AB, AC, AD, BC, BD, CD, ABC, ABD, BCD, ABCD) dan kontrol (tanpa bakteri). Pengukuran dilakukan setelah tanaman berumur 2 - 3 bulan (bentuk anakan) dengan peubah yang diamati mencakup tinggi tanaman, diameter tanaman, berat kering akar + bintil (jika ada), dan berat kering tunas. Analisa data menggunakan Analisis SPSS soft ware yang diuji dengan metode Duncan Multiple Range Test pada taraf uji 5 %.

HASIL

Analisa fisik dan kimia tanah menunjukkan bahwa tanah tersebut kurang subur (Tabel 1). Hasil isolasi dari sampel tanah rizosfer tanaman diperoleh 30 isolat yang terdiri atas 10 isolat *Rhizobium* spp., 10 isolat *Azotobacter* spp. dan 10 isolat *Azospirillum* spp.

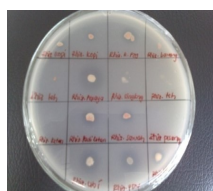
Penghitungan jumlah populasi bakteri penambat N rata-rata $10^5 - 10^6$ sel/gram tanah. Penghitungan populasi bakteri penambat N non simbiotik (*Azotobacter*, *Azospirillum*) lebih tinggi (10^6 sel/g tanah) dari yang simbiotik (*Rhizobium*= 10^5 sel/g tanah), kecuali pada rizosfer kaliandra dan kacang panjang (*Rhizobium*= 10^6 sel/g tanah). Sedangkan yang sama banyaknya (10^6 sel/g tanah) hanya pada rizosfer tanaman teh dan kopi (Tabel 2).

Aktivitas enzim nitrogenase

Aktivitas nitrogenase (Gambar 1) yaitu pengukuran kemampuan aktivitas enzim nitrogenase dengan menggunakan acetylen sebagai analog substrat N₂ yang disuntikkan pada kolom porapaq sebagai gas pembawa hidrogen dan nitrogen diperoleh panjang signal *acetylene* pada retensi waktu nol hari inkubasi. Ternyata setelah 1 hari,

Tabel 2. Populasi *Rhizobium*, *Azotobacter* dan *Azospirillum* pada perakaran tanaman

No	Lokasi	Daerah perakaran	Populasi Bakteri (sel/gram tanah)		
			<i>Rhizobium</i>	<i>Azotobacter</i>	<i>Azospirillum</i>
1	Persawahan	Padi	$3,0 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$
2	Perkebunan	Kopi	$1,6 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$
3	Perladangan	Ubi	$3,0 \times 10^5$	$3,4 \times 10^5$	$4,0 \times 10^6$
4	Perladangan	Pisang	$4,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^6$	$6,0 \times 10^6$
5	Perladangan	K. panjang	$1,4 \times 10^6$	$1,4 \times 10^5$	$4,0 \times 10^6$
6	Hutan	Kaliandra	$2,2 \times 10^6$	$4,4 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6$
7	Perladangan	Bawang	$1,4 \times 10^5$	$6,2 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5$
8	Perladangan	Singkong	$3,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$
9	Perladangan	Pepaya	$2,4 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6$	$8,6 \times 10^5$
10	Perkebunan	Teh	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$



Rhizobium



Azospirillum



Azotobacter



Inokulan cair bakteri penambat nitrogen siap diinokulasikan

Gambar 2. Uji kualitatif kemampuan bakteri penambat nitrogen melarutkan fosfat pada media Pikovskaya padat dengan Ca₃(PO₄)₂ sebagai sumber P

hasilnya tidak sesuai dengan Gambar 1. Hasil yang didapatkan hanya ada 1 tanda yang diduga *acetylene*, sedangkan tanda *etylene* tidak muncul. Pada retensi waktu 2 hari, terlihat

aktivitas enzim berubah, ada tanda tambahan yang letaknya lebih awal yang diduga signal etilen (C_2H_4). Secara kuantitas hasilnya belum terukur dengan jelas, karena masih ada beberapa

Tabel 3. Indeks Pelarutan (IP) fosfat oleh bakteri penambat Nitrogen

No.	Tanaman (3 jenis isolat/lokasi)	<i>Rhizobium</i>	<i>Azotobacter</i>	<i>Azospicillum</i>
1	Padi (<i>Oryzae sativa</i>)	1.00 d	1.90 a	1.17 b
2	Kopi (<i>Coffea robusta</i>)	2.66 ab	2.02 a	1.63 ab
3	Pepaya (<i>Carica papaya</i>)	1.33 cd	1.50 a	1.17 b
4	Teh (<i>camellia sinensis</i>)	3.33 a	2.23 a	2.33 a
5	Ketela pohon (<i>Manihot utilisima</i>)	1.17 cd	1.83 a	1.33 ab
6	Ketela rambat (<i>Ipomoea batatas</i>)	2.00 bcd	1.73 a	1.16 b
7	Pisang (<i>Musa paradisiacal</i>)	1.00 d	1.00 a	1.00 b
8	Kacang panjang (<i>Vigna unguiculata</i>)	2.17 bc	1.97 a	2.30 a
9	Kaliandra (<i>Caliandra grandiflora</i>)	1.66 cd	1.33 a	1.17 b
10	Bawang merah (<i>Allium cepa</i>)	1.16 cd	1.16 a	1.33 ab

Keterangan: Nilai-nilai yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda secara signifikan dengan DMRT pada tingkat 5%. (n=3)

Tabel 4. Kelarutan Ca-fosfat dan PMEase, produksi kualitatif IAA pada jenis bakteri yang sama dari rizosfir berbeda (1-10).

No.	Isolat	kelarutan Ca-fosfat (mg/l)	Produksi PMEase (ug/pnitrofenol/gram/hour)		pH	IAA
			Asam	Basa		
1	<i>Azotobacter</i> sp.	10.96f	0.41c	0.476b	5.4b	+
2	<i>Azotobacter</i> sp.	16.4c	0.47b	0.90a	5.3b	+
3	<i>Azotobacter</i> sp.	16.11d	0.25d	0.21d	5.4b	+
4	<i>Azotobacter</i> sp.	18.27a	0.82a	0.92a	4.6c	+
5	<i>Azotobacter</i> sp.	14.71e	0.12e	0.16e	5.2b	+
6	<i>Azotobacter</i> sp.	9.31g	0.27d	0.63b	5.2b	+
7	<i>Azotobacter</i> sp.	8.98h	0.12e	0.11f	5.8a	+
8	<i>Azotobacter</i> sp.	17.11b	0.11e	0.11f	5.2b	+
9	<i>Azotobacter</i> sp.	7.5i	0.42c	0.34c	4.8c	+
10	<i>Azotobacter</i> sp.	6.28j	0.44bc	0.51b	4.7c	+
1	<i>Rhizobium</i> sp.	5.38e	0.34c	0.21e	4.7bcd	+
2	<i>Rhizobium</i> sp.	5.6c	0.47b	0.43c	5.8a	+
3	<i>Rhizobium</i> sp.	4.67g	0.56a	0.41c	4.8bc	+
4	<i>Rhizobium</i> sp.	5.8a	0.58a	0.52a	4.2e	+
5	<i>Rhizobium</i> sp.	3.3i	0.57a	0.44c	5.03b	+
6	<i>Rhizobium</i> sp.	5.34f	0.58a	0.28d	4.3de	+
7	<i>Rhizobium</i> sp.	4.51h	0.39c	0.27d	4.4cde	+
8	<i>Rhizobium</i> sp.	5.73b	0.58a	0.48b	5.93a	+
9	<i>Rhizobium</i> sp.	5.45d	0.57a	0.42c	4.7bcd	+
10	<i>Rhizobium</i> sp.	1.6j	0.33c	0.29d	5.7a	+
1	<i>Azospirillum</i> sp.	10.69e	0.35g	0.13e	5.2bcd	+
2	<i>Azospirillum</i> sp.	12.12c	0.5e	0.24d	5.4bc	+
3	<i>Azospirillum</i> sp.	6.43f	0.4f	0.22d	5.1cde	+
4	<i>Azospirillum</i> sp.	14.63a	1.24a	0.96a	4.8e	+
5	<i>Azospirillum</i> sp.	11.56d	0.11i	0.11e	5.4bc	+
6	<i>Azospirillum</i> sp.	3.42h	0.36g	0.11e	5.1cde	+
7	<i>Azospirillum</i> sp.	2.78i	0.21h	0.12e	4.93de	+
8	<i>Azospirillum</i> sp.	12.17b	0.58d	0.53b	5.5b	+
9	<i>Azospirillum</i> sp.	4.35g	0.67b	0.53b	5.2bcd	+
10	<i>Azospirillum</i> sp.	2.2j	0.63c	0.49c	5.9a	+

Keterangan: Nilai-nilai yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama (1-10) tidak berbeda secara signifikan dengan DMRT pada tingkat 5%. (n=3).

kendala, tetapi semua bakteri penambat nitrogen yang diukur hasilnya membentuk *pig* atau signal etilen (C₂H₂) di hari ke 2.

Pelarutan Ca-fosfat, produksi PMEase, dan produksi kualitatif IAA

Indeks pelarutan (IP) fosfat oleh bakteri penambat nitrogen simbiotik dan non simbiotik pada media Pikovskaya padat dengan Ca₂(PO₄)₂ sebagai sumber P, setelah inkubasi 7 hari, menunjukkan bahwa semua bakteri yang diuji dapat melarutkan fosfat di media padat dengan adanya pembentukan zona bening disekitar sel bakteri (Tabel 3, Gambar 2). Nilai tertinggi indeks pelarutan fosfat dihasilkan oleh perwakilan bakteri *Rhizobium*, *Azotobacter* dan *Azospirillum* yang diisolasi dari perakaran tanaman teh (*Camellia sinensis*), yaitu 3,33; 2,23; dan 2,33. Bakteri *Rhizobium*, *Azotobacter* dan *Azospirillum* yang diisolasi dari perakaran kopi (*Coffea robusta*) juga mampu melarutkan P lebih tinggi dari pada bakteri lainnya, yaitu 2,67; 2,02; 1,63 dan yang terendah didapatkan pada isolate yang diisolasi dari rizosfer pisang dan padi (Tabel 3).

Bakteri penambat nitrogen simbiotik dan nonsimbiotik yang terisolasi (30 isolat) semuanya mampu melarutkan Ca-P pada media Pikovskaya cair yang mengandung Ca₃(H₂SO₄)₂ sebagai sumber P nya (Tabel 4). Nilai tertinggi pelarutan Ca-P dan produksi enzim fosfatase asam dan basa serta menurunnya pH diperoleh

bakteri *Azotobacter*, *Rhizobium* dan *Azospirillum* yang diisolasi dari rizosfer tanaman teh, yaitu: *Azotobacter* = 18,27 mg/L; 0,82 dan 0,92 unit; 4,6; *Rhizobium* = 5,8 mg/L; 0,58 dan 0,42 unit; 4,2; *Azospirillum* = 14,63 mg/L; 1,24 dan 0,96 unit; 4,8. Sedangkan nilai terendah didapatkan pada bakteri yang diisolasi dari rizosfer kaliandra dan bawang merah (Tabel 4). Semua bakteri yang terisolasi berpotensi memproduksi hormon pertumbuhan IAA (Tabel 4)

Efek bakteri pada anakan tanaman turi

Efek bakteri penambat N simbiotik dan nonsimbiotik yang juga dapat melarutkan P serta memproduksi hormon IAA pada anakan tanaman turi (*Sesbania grandiflora*) selama 3 bulan di rumah kaca, menunjukan hasil yang signifikan (Tabel 5). Inokulasi bakteri pada tanaman turi mempunyai efek positif (tinggi tanaman = 32 cm, diameter batang = 4,3 mm, berat kering akar = 1,5 gram, dan berat kering tunas = 3,4 gram) jika dibandingkan dengan tanaman kontrol, terutama pada tanaman yang diinokulasi dengan bakteri campuran *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium 1*, *Rhizobium 2* (ABCD) dan terbaik selanjutnya adalah yang diinokulasi oleh bakteri *Rhizobium 1* dan *Azotobacter*, inokulan ABC (*Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium 1*) dan BCD (*Azotobacter*, *Rhizobium 1*, *Rhizobium 2*), dan inokulan ABD (*Azospirillum*,

Tabel 5. Efek bakteri simbiotik dan non-simbiotik pada pertumbuhan turi (*Sesbania grandiflora*)

Kode	Perlakuan	Tinggi tanaman (Cm)	Diameter batang (mm)	Berat kering akar (gr)	Berat kering tunas (gr)	Bintil
A	<i>Azospirillum</i>	16 abc	3 abcd	0,3 abc	0,8 abcd	-
B	<i>Azotobacter</i>	16 abc	3 abcd	0,4 abc	1,5 defghi	-
C	<i>Rhizobium1</i>	20 bcd	3,5 bcdef	0,5 abc	1,7 fghij	+
D	<i>Rhizobium2</i>	12 a	2,5 ab	0,2 ab	0,4 ab	+
E	AB	13 ab	2,7 abc	0,4 abc	0,6 abc	-
F	AC	21 cd	3 abcd	0,5 abc	0,9 abcde	+
G	AD	12 a	2,7 abc	0,5 abc	1,0 bcdef	-
H	BC	27 def	3 abcd	0,2 ab	2,1 hij	+
I	BD	12 a	2,5 ab	0,6 c	1,5 defghi	-
J	CD	23 cde	3,8 def	1,0 d	1,3 cdefg	+
K	ABC	31 f	4,1 ef	1,2 de	2,4 j	+
L	ABD	30 ef	3,7 cdef	1,0 d	2,2 ij	-
M	BCD	29 ef	4,1 ef	1,3 de	2,4 j	+
N	ABCD	32 f	4,3 f	1,5 e	3,4 l	+
O	KONTROL	11 a	2,2 a	0,1 a	0,2 a	-

Azotobacter, *Rhizobium* 2) (Tabel 5). Pada tabel 5 juga diperlihatkan bahwa tidak semua *Rhizobium* yang diinokulasikan dapat membentuk bintil pada tanaman tersebut, kecuali pada tanaman yang diinokulasi oleh inokulan yang didalamnya mengandung bakteri *Rhizobium* sp.1.

PEMBAHASAN

Analisa fisik dan kimia tanah menunjukkan tanah dengan pH rendah atau asam dengan jumlah makro dan mikro nutrient yang kurang dari tanah subur. Menurut analisa Nathan (2009) pada pH rendah mikronutrien akan bereaksi dengan fosfor membentuk senyawa yang tidak larut dan tidak tersedia bagi tanaman dan pada pH tinggi (basa) endapan fosfor menjadi tidak larut sehingga P tidak tersedia bagi tanaman. Rendahnya pH juga mengganggu populasi dan aktivitas bakteri penambat nitrogen simbiotik dalam proses fiksasi nitrogen. Analisa Nathan (2009) mendukung jumlah populasi bakteri yang berkisar 10^5 - 10^6 sel/gram tanah pada penelitian ini. Hasil yang sama juga dihasilkan oleh penelitian Wibowo (2012), bahwa pH asam mengurangi nutrisi yang diperlukan oleh keberlangsungan hidup dan aktivitas bakteri dalam tanah dan jika kekurangan nutrisi tersebut akan membuat jumlah populasi bakteri di bawah standar (10^7). Hasil penelitian tersebut juga diperkuat oleh hasil penelitian Obaton (1977), bahwa jumlah populasi kurang dari 10^7 , menunjukkan tanah tersebut termasuk kurang subur, karena nutrisi dalam tanah rendah. Menurut Bever *et al.* (2012) dalam hasil penelitian, populasi dan aktivitas bakteri dalam perakaran dan tanah tergantung pada jenis dan banyaknya tanaman yang tumbuh pada habitat tersebut. Sedangkan tinggi rendahnya penambatan N dan pelarutan P dalam tanah tergantung dari populasi bakteri dalam tanah.

Azotobacter dan *Azospirillum* meskipun jumlahnya sedikit tetapi menyebar luas pada daerah rizosfer di beberapa tanaman rumput tropis dan tanaman lainnya (Jolly *et al.* 2010), sedangkan *Rhizobium* tersebar pada rizosfer legume, bintil dan tanah (Tóth & Stacey 2015). Seperti pada penelitian ini, bakteri yang didapat dari rizosfer tanaman teh (*Camellia sinensis*),

populasi bakteri *Azotobacter*, *Rhizobium*, dan *Azospirillum* jumlahnya dibawah standar tetapi lebih tinggi dari bakteri pada rizosfer tanaman lainnya. Hasil pelarutan P dan PMEase oleh bakteri tersebut juga lebih tinggi dibandingkan dengan bakteri yang sama dari rizosfer tanaman lain. Freire (1984) mengemukakan dalam hasil penelitiannya, bahwa keberhasilan penambatan N_2 udara oleh bakteri, tergantung pada interaksi antara beberapa faktor, yaitu keserasian galur dengan tanaman inang, kemampuan berkompetisi dengan bakteri indigenus, kemampuan tanaman inang untuk menyediakan nutrisi bagi bakteri yang bersimbiosis dengannya, serta kondisi lingkungan terutama semua faktor pembatas dalam tanah, seperti ketersediaan hara makro, mikro, kelembaban tanah, pH, dan suhu. Sedangkan keberhasilan bakteri melarutkan fosfat bergantung pada temperatur, kelembaban, pH, suplai makanan, dan kondisi lingkungan selama pertumbuhan bakteri seperti salinitas (Shrivastava & Kumar 2015).

Azospirillum yang diisolasi dari rizosfir tanaman teh (*Camellia sinensis*) Kuntze dan kacang panjang (*Vigna unguiculata*), mampu melarutkan P terikat dan produksi PMEase lebih tinggi dibandingkan isolat yang diisolasi dari rizosfer tanaman lainnya. Sedangkan isolat *Rhizobium* hanya dari rizosfer tanaman teh (*Camellia sinensis*) saja yang menghasilkan P terlarut tertinggi. *Azotobacter* yang terisolasi dari rizosfir semua tanaman sampel secara statistik rata-rata mampu melarutkan P dan produksi PMEase, meskipun tidak signifikan. Sedangkan P terlarut dan produksi PMEase tertinggi dihasilkan oleh *Azotobacter* yang diisolasi dari rizosfer tanaman teh (*Camellia sinensis*) Kuntze. Pelarutan P oleh bakteri *Azotobacter*, *Azospirillum*, dan *Rhizobium* dalam media Pikovskaya + $Ca_3(PO_4)_2$ 5 gram/L pada penelitian ini, hasilnya lebih tinggi dari hasil penelitian Baig *et al.* (2010), tetapi lebih rendah dari hasil penelitian Mardad *et al.* (2013) yang menggunakan media NBRIP + $Ca_3(PO_4)_2$ 5 gram/L. Baig *et al.* (2010), berpendapat bahwa, apabila diameter zona bening < 1 cm, maka pelarutan P oleh bakteri masuk dalam kategori rendah dan diameter zona bening sama dengan 1-2 cm masuk dalam kategori medium serta > 2 cm masuk dalam kategori tinggi.

Menurut hasil penelitian Rachmiati (1995)

serta Paul & Sinha (2013) semakin besar zona bening yang terbentuk dan semakin tinggi nilai indeks pelarutan (IP), mengindikasikan makin tinggi kemampuan isolat melarutkan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Menurut hasil penelitian Baig *et al.* (2010), pelarutan P hanya dengan menggunakan medium padat (indikasi halozon) belum akurat dibandingkan dengan mengukur P terlarut secara kuantitatif pada media cair, tetapi hasilnya akan lebih akurat jika kedua pengukuran tersebut berkorelasi.

Pelarutan fosfat terjadi karena adanya mikroorganisma yang menghasilkan asam organik seperti asetat, laktat, oksalat, tartrate, suksinat, sitrat, glukonat, ketogluconate, dan glikolat (Trivedi & Sa 2008) sehingga terbentuk halozon pada media (Katznelson *et al.* 1962 dan Baig *et al.* 2010). Sedangkan pada media cair pelarutan P ditunjukkan nilai yang mencerminkan pelarutan P sebenarnya, yaitu jumlah P yang larut dan dilepaskan dari substrat sebagai hasil dari aktivitas mikroba (Baig *et al.* 2010). Daerah bening (halozon) di sekitar koloni bakteri *Rhizobium*, *Azotobacter*, dan *Azospirillum* (bakteri penambat nitrogen) yang dianalisa dalam penelitian ini, terjadi karena adanya pelarutan partikel halus dari $\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_2$. Pada penelitian yang hampir sama, ternyata bakteri penambat nitrogen juga dapat melarutkan fosfat terikat sehingga tersedia bagi tanaman (Gyaneshwar *et al.* 1999).

Hasil penelitian pelarutan P tertinggi (18,27 mg/L) diikuti tingginya nilai produksi PMEase asam dan basa (0,82 dan 0,92 unit) dan menurunnya pH (4,6) pada media kultur bakteri pelarut fosfat. Hal ini terjadi karena ada aktivitas bakteri pelarut fosfat yang membebaskan asam-asam organik dalam kultur tersebut dan aktivitas tersebut mengabsorpsi glukosa sehingga pH kultur menurun. Seperti hasil penelitian Savin *et al.* (2000), menunjukkan bahwa semakin banyak P yang terlarut, maka semakin tinggi enzim fosfatase yang dihasilkan oleh bakteri tersebut. Penurunan pH terjadi karena hasil sintesis senyawa organik yang dilepaskan ke dalam medium Pikovskaya, kemudian terjadi proses oksidasi, reduksi, dan kompetisi organik (Cunningham & Kuyack 1992). Hal yang sama terjadi pada percobaan Jong *et al.* (2007) bahwa bakteri pelarut fosfat dapat melarutkan Ca_3

$(\text{PO}_4)_2$ setelah diinkubasi selama 5 hari dengan pH awal sebesar 7 dan menurun menjadi 4,4. Dengan demikian, penurunan pH kultur cair merupakan mekanisme penting pada pelarutan P terikat menjadi tersedia (Pérez *et al.* 2007). Hal ini menunjukkan, bahwa isolat yang dapat mengeluarkan fosfat inorganik dari $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ dalam medium cair merupakan bakteri potensial dalam melarutkan P terikat menjadi tersedia bagi tanaman (Ramachandran *et al.* 2007).

Seluruh bakteri *Azotobacter*, *Rhizobium*, dan *Azospirillum* yang diuji secara kualitatif hasilnya positif mampu memproduksi hormon tumbuh IAA. Hasil yang sama didapatkan pada penelitian Biswas *et al.* (2000), yaitu bakteri *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Bacterium*, *Mycobacterium*, dan *Pseudomonas* yang diuji semua mampu memproduksi hormon IAA. Pada hasil penelitian Tamboli *et al.* (2012), didapatkan bahwa bakteri nonsimbiotik seperti *Azotobacter* dan *Azospirillum* mampu menghasilkan zat pengatur tumbuh seperti GA dan IAA.

Efek inokulasi bakteri penambat N simbiotik dan nonsimbiotik yang dapat melarutkan P serta memproduksi hormon IAA pada anakan tanaman Turi (*Sesbania grandiflora*), menunjukkan hasil yang signifikan terutama pada tinggi tanaman, diameter batang, berat kering akar, berat kering tunas, dan pembintilan. Menurut Maor *et al.* (2004), hormon IAA yang diproduksi oleh bakteri tersebut menginduksi tanaman secara langsung dan dapat meningkatkan laju pertumbuhan tanaman. Inokulan bakteri campuran ABCD (*Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium 1*, *Rhizobium 2*) mempunyai efek baik pada pertumbuhan anakan tanaman Turi. Bakteri simbiotik (*Rhizobium*) yang diinokulasikan pada tanaman Turi efeknya tidak semua terjadi pembintilan pada akar. Seperti tanaman Turi yang diinokulasi oleh inokulan bakteri tunggal *Rhizobium 2* dan inokulan bakteri campuran ABD (*Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium 2*) tidak terbentuk bintil akar. Hal ini menunjukkan bahwa *Rhizobium 2* merupakan bakteri yang bersifat tidak efektif, sehingga tidak mampu menginfeksi akar dan membentuk bintil akar. Hasil penelitian Jordan (1982), didapatkan bahwa hanya bakteri *Rhizobium* yang bersifat efektif saja yang mampu menginfeksi akar dan membentuk bintil akar yang merupakan tempat

terjadinya fiksasi nitrogen.

Hasil uji efektivitas bakteri *Rhizobium*, *Azotobacter* dan *Azospirillum* pada anakan tanaman *Sesbania grandiflora*, menunjukkan hasil yang variatif. Hampir semua perlakuan inokulan yang mengandung isolat tunggal maupun gabungan berpengaruh terhadap pertumbuhan tanaman lebih baik dibandingkan dengan tanaman kontrol (tanpa inokulan). Hal tersebut menunjukkan adanya interaksi antar bakteri penambat N simbiotik dan non simbiosis yang juga dapat melarutkan fosfat, sehingga unsur esensial seperti N dan P yang tidak tersedia menjadi tersedia bagi tanaman.

Salah satu bakteri efektif dalam pertumbuhan dan pembentukan bintil akar tanaman Turi (*Sesbania grandiflora*) yang terisolasi dari tanah rizosfir teh teridentifikasi sebagai *Azotobacter chroococcum* dan *Azospirillum lipoferum* (nonsimbiotik), dan *Rhizobium* sp. (simbiotik). Jadi bakteri *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum* sebagai bakteri penambat nitrogen dan pelarut fosfat mempunyai peran dan fungsi penting dalam mendukung terlaksananya pertanian ramah lingkungan melalui berbagai proses, seperti dekomposisi bahan organik, mineralisasi senyawa organik, fiksasi hara, pelarut hara, nitrifikasi dan denitrifikasi (OECD 2015) dan sebagai bahan dasar POH akan sangat membantu pertumbuhan tanaman untuk tujuan reklamasi lahan terdegradasi.

KESIMPULAN

Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa, populasi bakteri, indeks pelarutan P, dan PMEase tertinggi dihasilkan oleh *Rhizobium*, *azotobacter* dan *Azospirillum* yang diisolasi dari rizosfer tanaman teh (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze (sampel nomor 4). Isolat tersebut teridentifikasi sebagai *Azotobacter chroococcum* dan *Azospirillum lipoferum* (non-simbiotik) dan *Rhizobium* sp. (Simbiotik). Seluruh isolat secara kualitatif dapat memproduksi hormon IAA. Inokulan kombinasi bakteri ABC, ABD, BCD, dan ABCD, memberikan efek yang baik pada tinggi tanaman, diameter batang, berat kering akar+bintil, dan berat kering tanaman bagian atas Turi (*Sesbania grandiflora*). Semua isolat dapat membentuk bintil, kecuali pada isolate ABD dan D (*Rhizobium* 2).

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, M. 1977. *Introduction to Soil Microbiology*. New York. John Willey and Sons. . 333-349
- Antoun, H. 2009. Taxonomy of phosphate solubilizing bacteria. Antoun@rsvs.ulaval.ca (diunduh Mei 2015).
- Baig, KS., M. Arshad, ZA. Zahir & MA. Cheema. 2010. Comparative efficacy of qualitative and quantitative methods for rock phosphate solubilization with phosphate solubilizing rhizobacteria. *Soil & Environ.* 29(1): 82 – 86.
- Bever, JD., GP. Thomas, & ER. Morton. 2012. Microbial population and community dynamics on plant roots and their feedbacks on plant communities. *Annual Review Microbiol.* 66: 265–283.
- Biswas, JC., JK. Ladha, & FB. Dazzo. 2000. Rhizobial inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. *Journal Soil Science Society of America.* 64: 1644-1650.
- Cunningham, JE. & C. Kuyack. 1992. Production of citric and oxalic acid and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. *Applied and Environmental Microbiol.* 58: 1451-58.
- Dean, JM., MC. Mescher & CM. De Moraes. 2014. Plant dependence on rhizobia for nitrogen influences induced plant defenses and herbivore performance. *International Journal of Molecular Sciences*, 15: 1466 – 1480.
- Etesami, H., HA. Alikhani, & AA. Akbari. 2009. Evaluation of plant growth hormones production (IAA) ability by iranian soils rhizobial strains and effects of superior strains application on wheat growth indexes. *World Applied Sciences Journal* 6 (11): 1576-1584.
- Figueiredo Márcia do VB., L. Seldin, FF. de Araujo, & R de LR. Mariano. 2010. Plant growth promoting rhizobacteria: Fundamentals and Applications. Dalam : Maheshwari DK. (ed.). *Plant Growth and Health Promoting Bacteria, Microbiology*. Monographs 18, Verlag Berlin Heidelberg.

- Freire, JRJ. 1984. *Important Limiting Factors in Soil. Biological Nitrogen Fixation: Ecology, Technology, and Physiology*. Plenum Press. New York.
- Gyaneshwar, P., LJ. Parekh, G. Archana, PS. Poole, MD. Collins, RA. Hutson, & GN. Kumar. 1999. Involvement of a phosphate starvation inducible glucose dehydrogenase in soil phosphate solubilization by *Enterobacter asburiae*. *FEMS Microbiology Letters* 171: 223–229.
- Hebrien, SA. & JL. Neal. 1990. Soil pH and posfatase activity. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 21: 439-456.
- Hosseini, A., A. Maleki, K. Fasihi & R. Naseri. 2014. The Co-application of Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Inoculation with *Rhizobium* Bacteria on Grain Yield and Its Components of Mungbean (*Vigna radiate* L.) in Ilam Province, Iran World Academy of Science, Engineering and Technology. *International Journal of Biological, Food, Veterinary and Agricultural Engineering*. 8 (7).
- Jolly, SN., NA. Shanta & ZUM. Khan. 2010. Quantification of heterotrophic bacteria and *Azospirillum* from the rhizosphere of taro (*Colocasia esculenta* L. Schott) and the nitrogen fixing potential of isolated *Azospirillum*. *International Jouenal of Botany*. 6 (2) : 117-121.
- Jong, SJ., SS. Lie, HY. Kim, TS. Ahn & HG. Song. 2007. Plant growth promotion in soil by some inoculated microorganisms. *The Journal Microbiology* 41 (4): 271-276.
- Katznelson, H., E. Peterson & JW. Rouatt. 1962. Phosphate dissolving microorganisms on seed and in the root zone of plants. *Candian Journal of Botany* 40: 1181-1186.
- Kumar M. 2014. Bacteria involving in nitrogen fixation and their evolutionary correlation. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3(3): 824-830.
- Ku"mmerer, K. 2004. Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 54: 311–320.
- Kunito, T., T. Tobitani, H. Moro & H.Toda. 2012. Phosphorus limitation in microorganisms leads to high phosphomonoesterase activity in acid forest soils. *Pedobiologia-International Journal Of Soil Biology*. 55(5): 263-270
- Lal, L. 2002. *Phosphate biofertilizers*. Agrotech Publisher Academy, Udaipur. India.
- Maor R., S. Haskin, H. Levi-Kedmi & A. Sharon. 2004. In planta production of indole-3-acetic acid by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *Aeschynomene*. *Applied Environt Microbiol* 70: 1852-1854.
- Mardad, I., A. Serrano & A. Soukri. 2013. Solubilization of inorganic phosphate and production of organic acids by bacteria isolated from a Moroccan mineral phosphate deposit. *African Journal of Microbiology Research* 7(8) : 626-635.
- Mehboob A., LJ. Stal & S. Hasnain. 2010. Production of Indole-3-Acetic Acid by the *Cyanobacterium arthrospira platensis* Strain MMG-9. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20(9): 1259–1265
- Nathan, MV. 2015. *Soils, Plant Nutrition and Nutrient Management, Core manual, Master gardener*. Published by MU extention university of Missouri, Columbia
- Nosrati, R., P. Owlia, H. Sadari, I. Rasooli & MA. Malboobi. 2014. Phosphate solubi lization characteristics of efficient nitro gen fixing soil *Azotobacter* strains Iran. *Journal Microbiology* 6 : 285-295.
- Nguyen, C., W. Yan, FL.Tacon & F. Lapeyrie. 1992. Genetic viability of phosphatesolu bilizing activity by monocaryotic and dicatyotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) PD. Orton. *Plant Soil*. 143: 193 – 199.
- Obaton, M. 1977. *In Biological Nitrogen Fixation in Farming System of the Tropics*. Ayanaba and Dart, Eds. Willey. London.
- OECD. 2015. Biosafety and the Environmental Uses of Micro-Organisms: Conference Proceedings, OECD Publishing. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264213562-en>. www.fao.org/docrep/meeting/028/mg339e.pdf (diunduh 28/5/2015)
- Orwa, C., A. Mutua, R. Kindt, R. Jamnadass & A. Simons. 2009. *Agroforestry Database: A tree reference and selection guide version 4.0*. Animal feed resources information system

- World Agroforestry Centre, Kenya
- Panhwar, A., UA. Naher, S. Jusop, R. Othman, Md. Abdul Latif, & MR. Ismail. 2014. Biochemical and Molecular Characterization of Potential Phosphate-Solubilizing Bacteria in Acid Sulfate Soils and Their Beneficial Effects on Rice Growth Qurban. *PLOS ONE*. 9, Issue 10, e97241. www.plosone.org (diunggah 28/5/2015)
- Paul, D., & SN. Sinha. 2013. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of some bacterial strains isolated thermal power plant effluent exposed water of river Ganga. *CIBTech Journal of Microbiology*. 2(3): 1-7.
- Peix, A., AA. Rivas-Boyer, PF. Mateos, C. Rodriguez-Barrueco, E. Martinez-Molina, & E. Velazquez. 2001. Growth promotion of chickpea and Barley by a phosphate solubilizing strain of Mesorhizobium mediterraneum under growth chamber conditions. *Soil Biology and Biochemistry*. 33: 103-110.
- Pérez, E., M. Sulbarán, MM. Ball, & LA. Yarzábal. 2007. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the southeastern Venezuelan region. *Soil Biology and Biochemistry* 39: 2905-2914.
- Premono, ME., AM. Moawad & PLG. Vlek. 1996. Effect of phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indonesian Journal of Crop Science*. 11: 13-23.
- Rachmiati, Y. 1995. Bakteri pelarut fosfat dari rizosfer tanaman dan kemampuannya dalam melarutkan fosfat. Prosiding Kongres Nasional VI HITI, Jakarta, 12-15 Desember 1995.
- Radwan, FI. 2002. Response of some maize cultivars to VA mycorrhizal inoculation, biofertilization and soil nitrogen application. *Alexandria Journal of Agricultural Research*. 43: 43-56.
- Ramachandran, K., V. Srinivasan, S. Hamza & M. Anandaraj. 2007. Phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere soil and its growth promotion on black pepper (*Piper nigrum* L.) cutting. *Plant and Soil Sciences*. 102: 325 -331.
- Rao, S. 1994. *Mikroba Tanah Dan Pertumbuhan Tanaman*. Universitas Indonesia Press.
- Reeta M., S. Ravindra, M. Akhilesh & RA. Murthy. 2013. Agastya (*Sesbania grandiflora* Linn.): Ayurvedic Approach. *Universal Journal of Pharmacy*. 2(4): 1-5.
- Reeve, W., J. Ardley, R. Tian, L. Eshragi, JW. Yoon, P. Ngamwisetkun, R. Seshadri, NN. Ivanova, & NC. Kyrpides. 2015. A Genomic Encyclopedia of the Root Nodule Bacteria: assessing genetic diversity through a systematic biogeographic survey. *Standards Genomic Sciences*. 9: 10:14.
- Rosmarkam A., NW. Yuwono. 2002. *Ilmu Kesuburan Tanah*. Kanisius. Yogyakarta.
- Saono, S., H. Karsono & D. Suseno. 1976. Studies on the effect of different rhizobial strains on *Phaseolus lunatus* in sand culture. *Annales Bogoriense* 6 (3): 143-154.
- Savin, MC., H. Taylor, JH. Görres & JA. Amador. 2000. Seasonal variation in acid phosphatase activity as a function of landscape position and nutrient inputs. *Journal Agronomy*. 92: 391-393.
- Seshadri, S., S. Ignacimuthu & C. Lakshminarsimhan. 2002. Variations in heterotrophic and phosphatesolubilizing bacteria from Chennai, southeast coast of India. *Indian Journal of Marine Sciences*. 31: 69-72.
- Shrivastava, P. & R. Kumar. 2014. A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi Journal of Biological Sciences* (2015) 22: 123–131.
- Singh J. S., VC. Pandey, & DP. Singh. 2011. Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 140: 339–353.
- SPSS. 1996. *SPSS: SPSS 7±0 for Windows 95*. Chicago: SPSS, Inc.
- Sy, A., E. Giraud, P. Jourand, N. Garcia, A. Willem, P. de Lajudie, Y. Prin, M. Neyra, M. Gillis, B. Boivin-Masson & B. Dreyfus. 2001. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with

- legumes. *Journal of Bacteriology*. 183, 214-220.
- Tabatabai, MA. & JM. Bremmer. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*. 1: 301-307.
- Tamboli, A., BR. Pallavi, C. Sonal, GS. Jai & RD. Prakash. 2012. Effect of endosulfan on indole acetic acid and gibberellin secretion by *Azospirillum* SPP NCIM-2548 and *Azotobacter* SPP NCIM-2452. *International Research Journal of Environment Sciences*. 1 (3): 1-4
- Tóth, K., & G. Stacey. 2015. Does plant immunity play a critical role during initiation of the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Frontiers in Plant Science*. 6:1-7.
- Trivedi, P. & TM. Sa. 2008. *Pseudomonas corrugata* (NRRL B-30409) mutants increased phosphate solubilization, organic acid production and plant growth at lower temperatures. *Current Microbiology*. 56: 140-144.
- Turner GI. & AH. Gibson. 1980. Measurement of nitrogen fixation by indirect means. Dalam : FJ. Bergensen (Ed.). *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Vincent, JM. 1970. *A manual for the practical study of the rootnodule bacteria*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Wani, PA., MS. Khan & A. Zaidi. 2007. Chromium reduction, plant growth promoting potentials and metal solubilization by *Bacillus* sp. Isolated from alluvial soil. *Current Microbiology*. 54: 237-243.
- Ward, BB., & MM. Jensen. 2014. The microbial nitrogen cycle. *Frontiers in Microbiology*. 5: 1-2.
- Widawati, S. & A. Muharam. 2012. Uji laboratorium *Azospirillum* sp. yang diisolasi dari beberapa ekosistem. *Jurnal Hortikultura*. 22(3): 258-267
- Winarso S. 2005. *Kesuburan Tanah: Dasar Kesehatan dan Kualitas Tanah*. Penerbit Gava Media. Yogyakarta.
- Woo PCY., SKP. Lau, JLL. Teng, H. Tse & KY. Yuen. 2008. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection* 14: 908-934.