

Peningkatan Serapan N pada Kedelai yang Diinokulasi Bakteri *Diazotrof Endofit* di Medium Vermiculit

Increasing of N-uptake by Inoculation of Diazotroph Endophytic Bacteria in Vermiculite Media

DWI N. SUSILOWATI¹, R. SARASWATI², R.D. HASTUTI², DAN E. YUNIARTI²

ABSTRAK

Dari hasil seleksi intensif 15 isolat terpilih bakteri *diazotrof endofit* asal tanaman kedelai terhadap kemampuannya menambat N₂ dan menghasilkan auksin didapatkan lima isolat terpilih, yaitu KACP₁₂ (0,2569 µmol jam⁻¹ kultur⁻¹), KACP₁₃ (0,3026 µmol jam⁻¹ kultur⁻¹), KACP₂₁ (0,4592 µmol jam⁻¹ kultur⁻¹), KACP₃₂ (0,3131 µmol jam⁻¹ kultur⁻¹), dan KAMG₂ (0,4843 µmol jam⁻¹ kultur⁻¹). Inokulasi lima isolat terpilih pada benih kedelai di medium vermiculit menunjukkan bahwa tanaman kedelai yang diinokulasi KAMG₂ memiliki aktivitas spesifik nitrogenase tertinggi yaitu 2,54 ± 1,2 µmol jam⁻¹ tanaman⁻¹ dibandingkan lainnya dan kontrol (tanpa inokulasi). Namun inokulasi bakteri *diazotrof endofit* KACM dan KACP₃₂ tanaman kedelai meningkatkan serapan N tanaman kedelai lebih tinggi. Meskipun penelitian ini masih pada fase awal pertumbuhan tanaman kedelai, ternyata inokulasi bakteri *diazotrof endofit* pada tanaman kedelai di media vermiculit tampaknya dapat menjadi metode yang bagus untuk memperkenalkan *strain-strain* terpilih yang dapat memacu pertumbuhan dan penambatan N₂.

Kata kunci : *Diazotrof, Endofit, Tanaman kedelai*

ABSTRACT

Intensive selection of selected 15 isolates on N₂-fixing activities and auxin production to diazotroph endophytic bacteria showed that five isolates were superior, that is KACP₁₂ (0.2569 µmol hour⁻¹ culture⁻¹), KACP₁₃ (0.3026 µmol hour⁻¹ culture⁻¹), KACP₂₁ (0.4592 µmol hour⁻¹ culture⁻¹), KACP₃₂ (0.3131 µmol hour⁻¹ culture⁻¹), and KAMG₂ (0.4843 µmol hour⁻¹ culture⁻¹). Inoculated five superior isolates into soybean seeds in vermiculite media showed that soybean plant inoculated by KAMG₂ has the highest nitrogenase specific activity compared to others and control, that is 2,54 ± 1,2 µmol hour⁻¹ plant⁻¹. However inoculation with KACM and KACP₃₂ showed higher N-uptake of soybean plant. Although this research has conducted within the early stage of soybean plant growth, it is obvious that inoculated diazotroph endophytic bacteria in vermiculite media seem to be a good method to introduce selected strain envisaging growth promoting and nitrogen fixation.

Keywords : *Diazotroph, Endophytic, Soybean plant*

PENDAHULUAN

Tanaman kedelai membutuhkan hara N yang cukup besar, dan kebutuhan ini dapat dipenuhi dari aktivitas bakteri penambat N₂, baik yang berada di sekitar perakaran dan bintil akar (*rhizosfer*) maupun di dalam jaringan tanaman (*diazotrof endofit*). Penambatan N₂ secara biologis oleh sejumlah spesies bakteri *diazotrof endofit* memiliki keunggulan dibandingkan bakteri *rhizosfer*, karena keberadaannya di dalam jaringan interseluler tanaman yang tidak mudah hilang, sementara hara N yang berada bebas di alam sangat bersifat labil, mudah tercuci air hujan dan erosi, dan mudah menguap ke udara. Selain itu, sejumlah bakteri endofit juga mampu menghasilkan Asam Indol Asetat (AIA) yang merupakan fitohormon golongan auksin yang berperan dalam perpanjangan sel dan organ, pembentukan akar, pergerakan tropisme, dormansi apikal, mempercepat proses pembungaan, partenokarpi, absisi, pembentukan kalus (Robert, 1975), dan inisiasi akar, pembelahan sel, dan diferensiasi jaringan vaskuler (Arshad and Frankenberger, 1993).

Bakteri endofit perlu untuk dipelajari lebih jauh dalam rangka konservasi sumber daya hayati, karena jenis bakteri yang hidup berasosiasi dengan tanaman inang ini diketahui mampu menambat N₂ udara pada tanaman padi, sorgum, jagung, kedelai, dan ubi jalar, serta kemampuannya di dalam memproduksi senyawa bioaktif yang terdapat pada tanaman dan memproduksi metabolit sekunder.

1. Peneliti pada Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor.
2. Peneliti pada Balai Penelitian Tanah, Bogor.

Dalam tulisan ini dibahas tentang peningkatan pertumbuhan dan serapan N tanaman kedelai yang diinokulasi bakteri *diazotrof endofit* di medium vermiculit.

BAHAN DAN METODE

Seleksi intensif bakteri *endofit* pada tanaman kedelai

Seleksi bakteri *endofit* kedelai dimulai dari isolasi, karakterisasi sampai seleksi intensif terhadap kemampuannya menambat N₂ dan menghasilkan AIA.

Isolasi bakteri *endofit* dilakukan berdasarkan metode James dan Olivares (1997). Mula-mula batang dan akar tanaman kedelai dicuci dengan air mengalir, dibilas dengan air bebas ion, dipotong-potong dengan ukuran 2-3 cm, dan dikeringkan dengan kertas tisu. Selanjutnya 10 g potongan jaringan tanaman tersebut disterilisasi permukaannya dengan cara digoyang selama 30 menit di dalam Erlenmeyer 250 ml berisi air bebas ion steril, setelah itu dibilas dengan aquades steril sebanyak dua kali, dan disterilisasi dengan 0,2% HgCl₂ (30 menit untuk akar, 60 menit untuk batang). Kemudian dilakukan pembilasan kembali dengan aquades steril sebanyak enam kali, dan diblender hingga homogen. Setelah itu dilakukan pengenceran secara serial dari 10⁻¹ hingga 10⁻³ dan dari setiap pengenceran diambil 100 µl untuk diinokulasikan pada medium pertumbuhan JNFB (*James Nitrogen Free Malat Bromthymol Blue*, per liter media terdiri atas 5,0 g asam malat; 0,6 g K₂HPO₄; 1,8 g KH₂PO₄; 0,2 g MgSO₄.7H₂O; 0,1 g NaCl; 0,2 g CaCl₂.2H₂O; 0,066 g FeEDTA; 0,02 g ekstrak khamir; 4,5 g KOH; 2 ml BTB; 2 ml mikronutrien; pH 5,8) semi padat pH 5,8 di dalam tabung-tabung reaksi (Baldani *et al.*, 1992). Inkubasi dilakukan pada suhu ruang selama kurang lebih 10 hari. Jika pada medium semi padat tersebut telah terbentuk pelikel berwarna putih di bawah permukaan media dan terjadi perubahan warna media dari kuning menjadi biru atau hijau, maka selanjutnya dipindahkan ke dalam cawan petri berisi medium JNFB padat. Setelah itu koloni tunggal

dipindahkan ke media JNFB padat dalam bentuk agar miring untuk disimpan di dalam refrigerator suhu 4°C. Untuk mengetahui keberhasilan isolasi yang telah dikerjakan, bakteri *diazotrof endofit* dalam media JNFB miring diinokulasikan kembali ke dalam media JNFB semi padat dan terbentuk pelikel.

Seleksi kemampuan menambat N₂ dari udara

Seleksi bakteri *endofit* terhadap kemampuannya menambat N₂ dilakukan dengan metode Asai Reduksi Asetilen (ARA) (FAO, 1983). Isolat-isolat bakteri *endofit* ditumbuhkan pada medium JNFB cair pada suhu ruang selama satu hari. Selanjutnya kultur berumur satu hari dengan populasi sekitar 10⁹ sel ml⁻¹ tersebut diinokulasikan sebanyak 100 µl pada 10 ml medium JNFB semi padat dan diinkubasi selama 10 hari pada suhu ruang. Analisis reduksi asetilen dilakukan setelah terbentuk suatu bentukan pelikel berwarna putih pada inkubasi 10 hari. Analisis ini diawali dengan melakukan penggantian tutup kapas dengan tutup karet. Selanjutnya diambil 10% udara yang tersisa pada tabung dengan menggunakan jarum suntik dan diganti dengan gas asetilen, diikuti dengan perlakuan inkubasi selama satu jam. Etilen yang terbentuk dideteksi dan diukur dengan menggunakan gas kromatografi (GC).

Seleksi kemampuan menghasilkan AIA

Seleksi bakteri *endofit* penghasil auksin dilakukan secara kolorimetri dengan spektrofotometer (Gordon and Weber, 1951). Bakteri ini ditumbuhkan pada media JNFB cair dan diinkubasi pada suhu 32°C selama 5-7 hari sampai media berubah menjadi biru atau hijau. Kemudian dilakukan sentrifugasi kultur dengan kecepatan 10.000 x g selama 10 menit. Setelah itu supernatan dipindahkan ke dalam tabung reaksi bersih dan steril, dan diberi pereaksi Salkowski (20 ml FeCl 0,1M; 400 ml H₂SO₄ pekat; 580 ml aquades, dalam 1.000 ml) dengan volume sama. Inkubasi campuran supernatan dan pereaksi dilakukan selama satu jam, kemudian diukur absorbansinya pada λ=530 nm menggunakan Hitachi Spektrofotometri 150-200 dengan menggunakan standar Heteroauksin (Sigma).

Pertumbuhan dan serapan N tanaman kedelai yang diinokulasi bakteri *diazotrof endofit* di medium vermiculit

Isolat-isolat bakteri *endofit* terpilih ditumbuhkan pada media JNFB cair hingga populasinya mencapai 10^9 sel ml^{-1} . Sebelum ditanam, dilakukan pemilihan benih kedelai varietas Wilis. Sterilisasi permukaan benih dilakukan dengan cara merendam benih tersebut ke dalam larutan 5% H_2O_2 selama lima menit, setelah itu benih tersebut dicuci dengan air steril sebanyak 10 kali. Benih yang telah disterilisasi permukaannya siap untuk ditanam dan diinokulasi dengan kultur bakteri *endofit*.

Media tumbuh tanaman pada penelitian ini adalah media vermiculit yang dimasukkan ke dalam botol selai. Vermiculit ditimbang sebanyak 10 g, disterilisasi, selanjutnya diberi air steril secukupnya hingga merata dan sedikit lembab.

Benih kedelai yang sudah disteril ditanam di dalam botol vermiculit sebanyak tiga benih per botol. Selanjutnya botol-botol tersebut disimpan pada suhu 30°C dalam ruang gelap dan dibiarkan hingga tumbuh kecambah kurang lebih tiga hari. Setelah itu dilakukan inokulasi kecambah kedelai dengan 1 ml kultur bakteri *endofit*. Selanjutnya botol-botol vermiculit dipindahkan ke rumah kaca dan tetap dijaga kelembabannya.

Tanaman kedelai pada media vermiculit dibiarkan hingga 30 hari. Pemeliharaan yang dilakukan meliputi penyiangan dan penyiraman dengan larutan Jensen's N free-nutrient (per liter terdiri atas 1,0 g CaHPO_4 ; 0,29 g K_2HPO_4 ; 0,29 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,29 g NaCl ; 1,0 g *trace element*; dan 0,1 g FeCl_3), sehingga media tumbuh tetap lembab.

Pengamatan dilakukan terhadap pertumbuhan tanaman kedelai pada fase awal (30 hari) di medium vermiculit yang meliputi aktivitas penambatan N_2 (enzim nitrogenase), bobot kering tajuk, kadar klorofil, dan serapan N tanaman. Aktivitas penambatan N_2 diukur dengan metode ARA; bobot kering tajuk diukur dengan metode pengeringan oven pada suhu 70°C selama 2-3 hari; kadar klorofil diukur dengan menggunakan spektrofotometer; dan

kadar N dianalisis dengan Kjeltex Auto Analyzer model 1030.

Percobaan dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga ulangan dan tujuh perlakuan jenis inokulan yaitu : I₀ = kontrol tanpa isolat (KAl₀); I₁ = kontrol dengan isolat campuran dan diautoklaf (KACM); I₂ = Inokulasi KACP₁₂; I₃ = Inokulasi KACP₁₃; I₄ = Inokulasi KACP₂₁; I₅ = Inokulasi KACP₃₂; I₆ = Inokulasi KAMG₂.

Analisis lebih lanjut untuk mengetahui jenis perlakuan yang menimbulkan perbedaan dilakukan dengan Beda Nyata Terkecil (BNT).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil isolasi terhadap sampel akar dan batang tanaman kedelai yang diambil dari daerah sekitar Bogor dan Malang telah diperoleh 15 isolat. Medium isolasi yang digunakan adalah JNFB semi padat yang dapat memperlihatkan reaksi yang berbeda dari setiap isolat. Beberapa isolat *endofit* tidak merubah warna media (tetap berwarna kuning) dan isolat lainnya merubah warna media menjadi biru atau hijau (Tabel 1).

Perubahan warna media menjadi biru atau hijau pada isolat *diazotrof endofit* KACP₁₁, KACP₁₂, KACP₁₃, KACP₂₁, KACP₂₂, KACP₃₁, KACP₃₂, KACP₃₃, KACMG₁, KACMG₃, KAMG₁, KAMG₂, KBMG₂, KBCP₃₂, dan KBCP₃₃ terjadi karena adanya proses alkalinisasi yaitu terjadinya oksidasi pada medium yang mengandung malat (Krieg and Dobereiner, 1984). Selain perubahan warna, beberapa isolat mampu membentuk pelikel berwarna putih di bawah permukaan medium JNFB semi padat. Terbentuknya pelikel menunjukkan kondisi yang baik untuk aktivitas nitrogenase. Hal ini disebabkan di dalam medium tidak ada kelebihan oksigen, laju difusi oksigen sama dengan laju respirasi organisme. Pembentukan pelikel pada permukaan medium JNFB semi padat juga dijumpai pada percobaan Kirchof *et al.* (1997) pada berbagai *strain Herbaspirillum*.

Tabel 1. Hasil isolasi dan seleksi bakteri *diazotrof endofit* dari tanaman kedelai

Table 1. The result of isolation and selection diazotroph endophyte bacteria from soybean plant

No.	Kode isolat	Bagian tanaman yang diambil	Lokasi tanaman	Perubahan warna media JNFB semi padat
1.	KACP ₁₁	Akar	Ciapus	Biru
2.	KACP ₁₂	Akar	Ciapus	Biru
3.	KACP ₁₃	Akar	Ciapus	Biru
4.	KACP ₂₁	Akar	Ciapus	Biru
5.	KACP ₂₂	Akar	Ciapus	Biru
6.	KACP ₃₁	Akar	Ciapus	Hijau
7.	KACP ₃₂	Akar	Ciapus	Hijau
8.	KACP ₃₃	Akar	Ciapus	Hijau
9.	KACMG ₁	Akar	Cimanggu	Biru
10.	KACMG ₃	Akar	Cimanggu	Biru
11.	KAMG ₁	Akar	Malang	Hijau
12.	KAMG ₂	Akar	Malang	Hijau
13.	KBMG ₂	Batang	Malang	Hijau
14.	KBCP ₃₂	Batang	Ciapus	Hijau
15.	KBCP ₃₃	Batang	Ciapus	Hijau

Aktivitas nitrogenase dan produksi auksin dari bakteri *diazotrof endofit* terpilih

Dari 15 isolat bakteri *diazotrof endofit*, terpilih lima isolat unggul dalam aktivitas menambat N₂ udara dan menghasilkan auksin (Tabel 2).

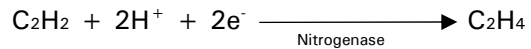
Tabel 2. Hasil pengukuran aktivitas nitrogenase dan produksi AIA bakteri *endofit*

Table 2. The result of nitrogenase activity and IAA production of endophyte bacteria

No.	Kode isolat	Aktivitas spesifik nitrogenase μmol jam ⁻¹ kultur ⁻¹	AIA ppm
1.	KACP ₁₁	0,2271	0,558
2.	KACP ₁₂	0,2569	0,289
3.	KACP ₁₃	0,3026	1,290
4.	KACP ₂₁	0,4592	0,247
5.	KACP ₂₂	0,0545	0,403
6.	KACP ₃₁	0,2169	0,293
7.	KACP ₃₂	0,3131	0,407
8.	KACP ₃₃	0,0795	0,600
9.	KACMG ₁	0,0816	0,391
10.	KACMG ₃	0,0556	0,224
11.	KAMG ₁	0,0523	0,232
12.	KAMG ₂	0,4843	0,217
13.	KBMG ₂	0,0643	0,111
14.	KBCP ₃₂	0,2090	0,152
15.	KBCP ₃₃	0,0579	0,175

Keterangan : Populasi kultur *endofit* 10⁹ sel ml⁻¹

Kemampuan bakteri *diazotrof endofit* dalam menambat N₂ diukur berdasarkan kemampuan enzim nitrogenase dalam mereduksi asetilen (C₂H₂) menjadi etilen (C₂H₄) sebagaimana reaksi berikut :



Semua isolat mempunyai kemampuan menambat N₂ udara, tetapi bervariasi mulai dari 0,0523 μmol jam⁻¹ kultur⁻¹ sampai 0,4843 μmol jam⁻¹ kultur⁻¹ (Tabel 2). Dari hasil pengukuran diperoleh lima isolat yang mempunyai potensi menambat nitrogen tinggi, yaitu KACP₁₂ (0,2569 μmol jam⁻¹ kultur⁻¹), KACP₁₃ (0,3026 μmol jam⁻¹ kultur⁻¹), KACP₂₁ (0,4592 μmol jam⁻¹ kultur⁻¹), KACP₃₂ (0,3131 μmol jam⁻¹ kultur⁻¹), dan KAMG₂ (0,4843 μmol jam⁻¹ kultur⁻¹). Populasi mikroba yang tumbuh di dalam kultur *endofit* adalah 10⁹ sel ml⁻¹. Ozawa *et al.* (2000) berhasil mengisolasi sejumlah isolat *endofit* kedelai dengan kemampuan menambat N₂ udara yang dinyatakan dalam kisaran nilai ARA sebesar 0,0039-0,087 μmol jam⁻¹ kultur⁻¹.

Pengujian isolat dalam hal kemampuannya memproduksi auksin dilakukan dengan metode kolorimetri. Dari 15 isolat diketahui semua isolat mampu memproduksi auksin. Namun kandungannya

beragam mulai dari 0,111-1,290 ppm (Tabel 2). Isolat yang tergolong tinggi kemampuannya ada enam, yaitu KACP₁₁ (0,558 ppm), KACP₁₃ (1,290 ppm), KACP₂₂ (0,403 ppm), KACP₃₂ (0,407 ppm), KACP₃₃ (0,600 ppm), dan KACMG₁ (0,391 ppm).

Pertumbuhan dan serapan N tanaman kedelai yang diinokulasi bakteri *diazotrof endofit* di medium vermiculit

Berdasarkan hasil analisis sidik ragam, pengaruh inokulasi terhadap kadar klorofil dan berat kering (BK) tajuk tidak nyata (Tabel 3).

Aktivitas spesifik nitrogenase dari beberapa jenis bakteri *diazotrof endofit* pada tanaman kedelai berkisar antara $0,82 \pm 0,1$ hingga $2,54 \pm 1,2$ $\mu\text{mol jam}^{-1}$ tanaman⁻¹ (Tabel 3). Tanaman kedelai yang diinokulasi KAMG₂ memiliki aktivitas spesifik nitrogenase tertinggi yaitu $2,54 \pm 1,2$ $\mu\text{mol jam}^{-1}$ tanaman⁻¹ dibandingkan lainnya. KACP₁₃, KACP₁₂, dan KACP₂₁ memiliki aktivitas spesifik nitrogenase lebih tinggi dibandingkan kontrol. Hal ini menunjukkan adanya kontribusi penambatan N₂ oleh bakteri *diazotrof endofit* yang diinokulasikan ke dalam tanaman kedelai. Besarnya aktivitas enzim nitrogenase tergantung pada ekspresi dari setiap bakteri *diazotrof endofit*. Diketahui bahwa sekitar 90% penambatan N₂ pada tanaman terjadi selama periode perkembangan reproduktif dan 10% pada dua bulan pertama masa vegetatif (Salisbury and Rose, 1995). Pada penelitian ini tanaman kedelai ditanam selama 30 hari sampai masa vegetatif

sehingga penambatan N₂ yang terjadi baru 10%. Nitrogen masuk ke dalam sel tumbuhan bersama-sama CO₂ melalui stomata, kemungkinan enzim yang ada hanya dapat mereduksi CO₂ sehingga N₂ keluar lagi secepat laju masuknya.

Kadar klorofil dan BK tajuk tanaman kedelai pada pertumbuhan awal ini belum menunjukkan perbedaan yang nyata antar perlakuan, karena tanaman masih berumur 30 hari. Menurut Ozawa *et al.* (2000), kontribusi bakteri *diazotrof endofit* sangat nyata setelah fase pembungaan. Fase pembungaan tanaman kedelai varietas Wilis pada 42 hari setelah tanam.

Tanaman yang diinokulasi bakteri *diazotrof endofit* campuran (KACM) dan inokulasi *strain* KACP₃₂ menunjukkan serapan N yang lebih tinggi daripada lainnya dan kontrol. Serapan N tertinggi diperoleh pada perlakuan inokulasi KACP₃₂ sebesar 11,513 mg N tanaman⁻¹ diikuti perlakuan inokulasi KACM sebesar 10,510 mg N tanaman⁻¹ dibandingkan kontrol dengan serapan N sebesar 10,443 mg N tanaman⁻¹. Hasil ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan Oliveira *et al.* (2002), bahwa inokulasi bakteri *diazotrof endofit* menyumbang lebih dari 30% total N yang ada di dalam mikropropagasi tanaman tebu yang ditumbuhkan pada pot-pot kecil. Selain itu juga sejalan dengan hasil penelitian Ozawa *et al.* (2000), yang menyatakan bahwa inokulasi isolat bakteri *diazotrof endofit* terkadang memberikan respon tanaman dengan aktivitas penambatan N₂ dan kadar N lebih tinggi daripada tanaman kontrol, namun secara statistik tidak berbeda nyata.

Tabel 3. Aktivitas spesifik nitrogenase, kadar klorofil, BK tajuk, dan serapan N tanaman kedelai yang diinokulasi bakteri diazotrof endofit

Table 3. Specific nitrogenase activity, chlorophyll content, shoot dry weight, and N-uptake of soybean plant inoculated by diazotroph endophyte bacteria

Kode isolat	Aktivitas spesifik nitrogenase $\mu\text{mol jam}^{-1}$ tanaman ⁻¹	Kadar klorofil mg g ⁻¹ daun	BK tajuk g	Serapan N mg N tanaman ⁻¹
KAMG ₂	$2,54 \pm 1,2$	0,493	0,256	8,042
KACP ₁₃	$1,09 \pm 0,2$	1,097	0,246	8,095
KONTROL	$0,91 \pm 0,3$	1,117	0,368	10,446
KACP ₁₂	$1,02 \pm 0,1$	0,773	0,284	9,589
KACM	$0,92 \pm 0,0$	0,953	0,314	10,531
KACP ₂₁	$1,07 \pm 0,3$	0,333	0,248	8,162
KACP ₃₂	$0,82 \pm 0,1$	0,227	0,356	11,589

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada Uji BNT ($\alpha = 5\%$)

KESIMPULAN

1. Aktivitas spesifik nitrogenase tanaman yang diinokulasi bakteri *diazotrof endofit* KAMG₂, KACP₁₃, KACP₁₂, dan KACP₂₁ meningkat dibandingkan kontrol. Hal ini menunjukkan adanya kontribusi penambahan N₂ oleh bakteri *diazotrof endofit* yang diinokulasikan ke dalam tanaman kedelai.
2. Inokulasi bakteri *diazotrof endofit* KACM dan KACP₃₂ meningkatkan serapan N lebih tinggi daripada kontrol.

DAFTAR PUSTAKA

- Arshad, M. and Frankenberger Jr. Wt. 1993. Microbial Production of Plant Growth Regulator. Pp. 307-374. *In* Meeting Jr. FB (Ed). Soil Microbial Ecology, Application in Agricultural And Environmental Management. New York: Marcel Dekker Inc.
- Baldani, V.L.D., J.L. Baldani, F.L. Olivers, and J. Dobereiner. 1992. Identification of Rice by the N-fixing bacteri *Herbaspirillum* spp. And *Azospirillum brasilense*. p. 705. *In* New Horizons in Nitrogen Fixation. R. Palacions, K. Moor, W.E. and Newton (Eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/Bosten/ London.
- FAO. 1983. To Evaluate the Nitrogenase Activity of Legume Nodules using Acetylene Reducing Activity. Technical Handbook on Symbiotic Nitrogen Fixation Food and Agricultural Organization of The United Nation-Rome.
- Gordon, S.A. and R.P. Weber. 1951. Colorimetric Estimation of Indolacetic Acid. *Plant Physiol.* 26:192-195.
- James, E. and F.L. Olivares. 1997. Infection and Colonization of Sugarcane and Other Gramineous Plant by Endophytic Diazotrophicus. *Critical Reviews In Plant Science.* 17:77-119.
- Kirchof, G.V.M. Reis, J.I. Baldani, B. Eckert, J. Dobereiner, and A. Hartman. 1997. Occurrence, physiological, and moleculer analysis of endophytic diazotropic bacteria in gramineous plants. *Plant and Soil.* 194:45-55.
- Krieg, N.R. and J. Dobereiner. 1984. Genus *Azospirillum*. *In* N.R. Krieg, J.G. Holt (Eds). Bergeys's Manual of systematic Bacteriology. Vol. 1. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- Oliveira, A.L.M, S. Urquiaga, J. Dobereiner, and J.I. Baldani. 2002. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil.* 242(2):205-215.
- Ozawa, T., E. Matsui, and K. Okumura. 2000. Endophytic N₂ Fixing Bacteria In Leguminous Crops. Osaka Pref. Univ., Osaka, Japan.
- Robert, M.D. 1975. *Plant Physiology.* Affiliated East-West Press PVT. LTD. New Delhi.
- Salisbury, F.B. and C.W. Ross. 1995. *Fisiologi Tumbuhan.* Jilid kedua. Institut Teknologi Bandung.