

PRODUKSI ZAT PENGATUR TUMBUH IAA (*INDOLE ACETIC ACID*) DAN KEMAMPUAN PELARUTAN POSFAT PADA ISOLAT BAKTERI PENAMBAT NITROGEN ASAL KABUPATEN TAKALAR

Oslan Jumadi, Liawati dan Hartono

Jurusan Biologi, Universitas Negeri Makassar

Email: hartono@unm.ac.id

Abstract: Growth Promoting Substance IAA (Indole Acetic Acid) Production and Phosphate Solubilising Capability of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Takalar Regency. This research is a descriptive study aiming to determine the capability of nitrogen-fixing bacteria isolated from crops rhizosphere to produce growth regulator IAA and to dissolve phosphate. Isolation of nitrogen-fixing bacteria was performed using nitrogen-free selective medium namely Ashby and Burk's. The growing bacterial colonies that showed the distinct characteristic were selected, and were characterized physiologically and morphologically. The ability of bacterial isolates to produce IAA was analyzed using spectrophotometry at a wavelength of 535 nm. The ability of phosphate dissolution was quantitatively analyzed on Pikovskaya medium by comparing the ratio between the diameter of the colony with the diameter of clear zone. We obtained 20 isolates of nitrogen-fixing bacteria from which 6 isolates were detected to produce growth promoting substance IAA of 7.35 to 38.35 ppm. Two isolates were capable of dissolving phosphate, with clear zone ratio of 1.7 cm-2.6 cm. The other isolates do not have the ability to dissolve phosphate.

Abstrak: Produksi Zat Pengatur Tumbuh IAA (*Indole Acetic Acid*) dan Kemampuan Pelarutan Posfat pada Isolat Bakteri Penambat Nitrogen Asal Kabupaten Takalar. Penelitian ini adalah penelitian deskriptif yang bertujuan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri penambat nitrogen yang diisolasi dari rhizosfer tanaman padi dan jagung asal Kabupaten Takalar dalam memproduksi zat pengatur tumbuh IAA dan pelarutan posfat. Isolasi bakteri penambat nitrogen dilakukan menggunakan medium selektif bebas nitrogen yaitu Ashby dan Burk's. Koloni bakteri yang tumbuh dan menunjukkan perbedaan karakteristik dipilih kemudian dikarakterisasi secara fisiologi dan morfologi. Kemampuan menghasilkan IAA dari isolat bakteri dianalisis dengan menggunakan metode *spectrophotometry* pada panjang gelombang 535 nm. Uji kemampuan pelarutan posfat secara kuantitatif dilakukan pada medium Pikovskaya dengan membandingkan rasio antara diameter koloni dengan diameter zona bening yang terbentuk. Dari hasil isolasi bakteri diperoleh 20 isolat bakteri penambat nitrogen dimana 6 isolat diantaranya terdeteksi mampu memproduksi zat pengatur tumbuh IAA dengan konsentrasi antara 7.35-38.35 ppm. Dari 6 isolat yang mampu memproduksi zat pengatur tumbuh IAA, 2 isolat diantaranya terdeteksi mampu melarutkan posfat dengan rasio zona bening 1,7 cm-2,6 cm sedangkan empat isolat diantaranya tidak memiliki kemampuan dalam melarutkan posfat.

Kata kunci: *indole acetic acid*, *pelarutan posfat*, *bakteri penambat nitrogen*

A. PENDAHULUAN

Bakteri penambat nitrogen (N_2) adalah bakteri yang dapat mengkonversi molekul N_2 bebas di atmosfer menjadi amonium melalui reduksi elektron dan protonasi gas N_2 dengan menggunakan enzim nitrogenase (Zahran, 1999). Amonium yang terbentuk selanjutnya digabungkan ke dalam glutamat membentuk glutamin melalui aktivitas enzim *Glutamine synthetase* (GS). Glutamin menjadi sumber nitrogen bagi sekitar 10% metabolit yang

mengandung nitrogen dalam sel seperti *Nicotinamide adenine dinucleotide* (NAD), *Paraminobenzoic acid* (PABA), purin, pirimidin, histidin dan triptofan (Colnaghi *et al.*, 1997).

Setelah sel bakteri mati dan lisis, senyawa nitrogen organik dalam sel seperti protein dan asam nukleat akan dilepaskan ke lingkungan dan selanjutnya dapat dimanfaatkan oleh organisme lain seperti tanaman setelah melalui proses mineralisasi. Fenomena ini telah

banyak dimanfaatkan dengan menggunakan bakteri penambat nitrogen sebagai agensia penyedia nitrogen bagi tanaman yang dikenal sebagai pupuk hayati (*biofertilizer*). Pemanfaatan bakteri penambat nitrogen sebagai pupuk hayati diharapkan dapat mengurangi penggunaan pupuk nitrogen sintesis yang harganya mahal dan menyebabkan dampak negatif bagi lingkungan (Gordon & Jacobson, 1983).

Pupuk hayati merupakan pupuk berbahan dasar mikroorganisme hidup yang diberikan ke dalam tanah sebagai inokulum untuk membantu tanaman dalam menyediakan unsur hara tertentu bagi tanaman khususnya nitrogen. Oleh karena itu, pupuk hayati sering juga disebut sebagai pupuk mikroba (Simanungkalit, 2001). Pengaruh mikroorganisme terhadap pertumbuhan tanaman sangat penting terutama dalam meningkatkan produktivitas tanaman dan mempertahankan kesuburan tanah. Mikroorganisme dapat membawa perubahan pada pertumbuhan tanaman baik yang bersifat memacu pertumbuhan tanaman maupun menghambat pertumbuhan tanaman (Imas *et al.*, 1989).

Selama ini inokulum yang digunakan dalam pembuatan pupuk hayati hanya menggunakan bakteri yang memiliki kemampuan menambat nitrogen dari atmosfer. Kekurangan bakteri penambat nitrogen sebagai inokulum pupuk hayati adalah pengaruhnya yang kurang signifikan bagi pertumbuhan tanaman. Beberapa hasil penelitian melaporkan bahwa bakteri penambat nitrogen juga memiliki kemampuan dalam menghasilkan zat pengatur tumbuh seperti IAA dan memiliki kemampuan dalam melarutkan posfat (Chitraselvi *et al.*, 2015; Gupta *et al.*, 2014; Inui-Kishi, 2012). Penemuan tersebut sangat penting karena pertumbuhan tanaman tidak hanya membutuhkan nitrogen saja tetapi juga membutuhkan faktor pertumbuhan yang lain diantaranya adalah zat pengatur tumbuh (fitohormon) dan ketersediaan mineral seperti posfat.

Zat pengatur tumbuh merupakan senyawa yang dalam jumlah sedikit dapat berpengaruh besar terhadap pertumbuhan dan produksi tanaman. Zat pengatur tumbuh mampu diproduksi oleh mikroorganisme tertentu dan juga dapat dihasilkan oleh tanaman yang dapat mempengaruhi proses fisiologis tumbuhan (Hanafiah *et al.*, 2005). IAA termasuk fitohormon golongan auksin alami dan berperan sebagai zat pemacu pertumbuhan tanaman karena

dapat meningkatkan sintesis DNA dan RNA, serta pemanjangan sel dengan meningkatnya pertukaran proton (Aslamasyah 2002).

Salah satu pendekatan yang dapat dijadikan sebagai solusi untuk mengatasi masalah dalam aplikasi bakteri penambat nitrogen khususnya yang non simbiotik adalah dengan menggunakan bakteri penambat nitrogen yang memiliki kemampuan ganda khususnya dalam menghasilkan zat pengatur tumbuh IAA dan kemampuan dalam melarutkan posfat. Bakteri ini diharapkan mempunyai kemampuan yang lebih tinggi dalam mempengaruhi pertumbuhan tanaman. Sampai saat ini penelitian yang dilakukan untuk mengisolasi bakteri penambat nitrogen yang memiliki kemampuan dalam menghasilkan zat pengatur tumbuh IAA dan melarutkan posfat masih belum banyak dilakukan.

B. METODE

1. Penyediaan Sampel Tanah

Sampel tanah diambil dari Kabupaten Takalar, Provinsi Sulawesi Selatan dari dua lokasi tanaman budidaya yang berbeda yaitu padi (*Oryza sativa*) dan Jagung (*Zea mays* L.). Untuk tiap lokasi tanaman budidaya masing-masing diambil sebanyak 6 titik pada daerah rhizosfer tanaman kemudian sampelnya dikompositkan dan dibawa ke Laboratorium. Sampel tanah dikeringanginkan kemudian disaring dengan ayakan berdiameter 2,00 mm mesh. Satu gram dari setiap sampel tanah dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 250 mL yang berisi 100 mL medium bebas nitrogen yaitu medium Burk's (10 g glukosa, 0,41 g KH_2PO_4 , 0,52 g K_2HPO_4 , 0,05 g Na_2SO_4 , 0,2 g CaCl_2 , 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,005 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0025 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,8 g agar; 1000 mL air destilata, pH 7) dan Medium Asbhy (10 g manitol, 0,2 g KH_2PO_4 , 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g NaCl, 0,1g CaCO_3 , 10 mg Na_2MoO_4 , 15 g agar, 1000 mL air destilata; pH 7) (Atlas, 2009) kemudian diinkubasi selama 14 hari pada suhu 27°C. Bakteri yang tumbuh pada medium cair diambil 1 mL secara aseptis kemudian diencerkan sampai pengenceran 10⁻³ kemudian diinokulasi pada medium Burk's dan Asbhy padat dengan metode cawan sebar selanjutnya diinkubasi selama 7 hari pada suhu 27°C. Koloni yang tumbuh dan menunjukkan bentuk morfologi yang berbeda dimurnikan sebanyak tiga kali dengan metode goresan.

Koloni murni yang tumbuh kemudian dikarakterisasi secara morfologi sesuai dengan prosedur yang dijelaskan oleh John *et al.*, 1994. Isolat yang telah dikarakterisasi kemudian disimpan dalam agar miring untuk kebutuhan analisis lebih lanjut.

2. Uji Kemampuan Bakteri Menghasilkan IAA Secara In-vitro

Pengujian kemampuan bakteri dalam menghasilkan IAA secara In-vitro dilakukan menggunakan metode kolorimetri dengan menggunakan pereaksi Salkowski 50 mL (35% *perchloric acid*; 1-mL 0.5 M FeCl_3) sesuai prosedur yang dijelaskan oleh Gordon and Weber (1951). Isolat bakteri dibuat dalam bentuk suspensi sebanyak 10 mL dengan kerapatan sel 107 CFU/mL. Suspensi biakan bakteri diambil sebanyak 3 mL dan dimasukkan ke dalam 12 mL medium Minimal Salt yang ditambahkan dengan tryptophan (1 mg/mL) kemudian diinkubasi pada suhu 28°C, dengan cara di-*shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 6 hari. Untuk menghitung konsentrasi IAA, setiap 2 hari sekali cairan kultur yang telah di-*shaker* diambil kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5500 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk diambil kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi steril dan ditambahkan reagen Salkowski dengan perbandingan 4:1 (supernatan : reagen Salkowski). Campuran tersebut diinkubasi selama 20 menit dan absorbansinya diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 535 nm. Konsentrasi IAA dihitung dengan persamaan regresi linier dari kurva standar IAA.

3. Uji Kemampuan Pelarutan Posfat

Uji kemampuan pelarutan posfat dilakukan dengan menggunakan media Pikovskaya Agar (0,25 g ekstrak yeast; 5 g dekstroza; 2,5 g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; 0,25 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1 g KCl; 0,05 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,005 g $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,005 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 10 g agar; 1000 mL air destilata) sesuai prosedur yang dijelaskan oleh Deshwal and Kumar (2013). Bakteri penambat nitrogen yang telah diremajakan diinokulasi pada media Pikovskaya, secara aseptis sebanyak 1 ose kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 3 hari dan diamati terbentuknya zona bening. Kemampuan pelarutan dihitung melalui rasio antara diameter zona bening dengan diameter koloni bakteri

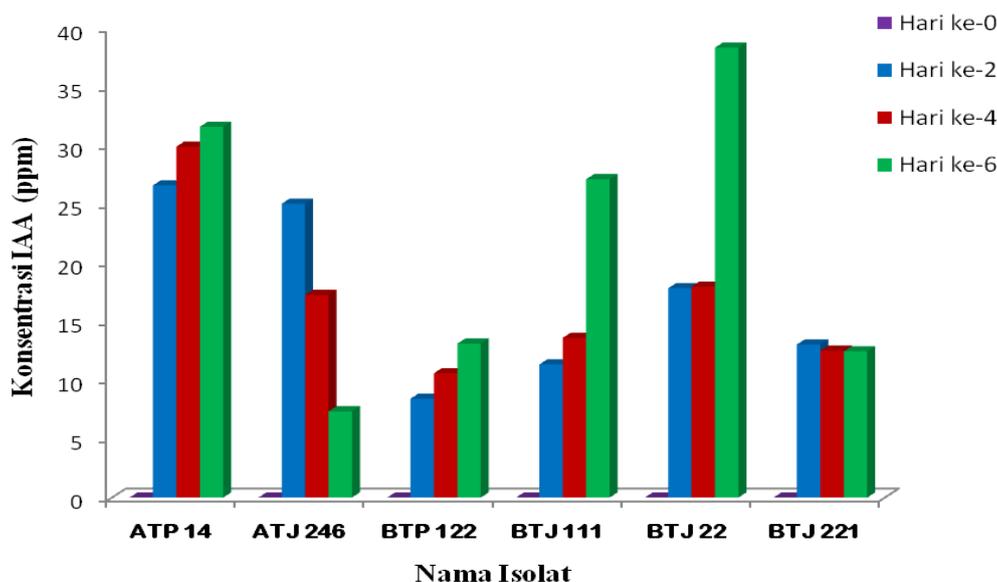
(Berraqueiro *et al.*, 1976). Berdasarkan pada Silva Filho (2002), kemampuan pelarutan posfat dapat diklasifikasikan sebagai berikut: aktivitas pelarutan rendah (*low solubilization*) ($E < 2$), aktivitas pelarutan sedang (*average solubilization*) ($2 < E < 3$) dan aktivitas pelarutan tinggi (*high solubilization*) ($E > 3$).

C. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi bakteri dari sampel tanah rhizosfer tanaman padi dan jagung di kabupaten Takalar, Provinsi Sulawesi Selatan diperoleh 20 isolat bakteri penambat nitrogen dimana 9 isolat diperoleh dari rhizosfer tanaman padi dan 11 isolat diperoleh dari rhizosfer tanaman jagung. Data tersebut menunjukkan bahwa jumlah isolat bakteri penambat nitrogen yang diperoleh dari rhizosfer tanaman jagung dan padi relatif cukup banyak. Hal ini disebabkan karena lahan pertanian padi dan jagung yang digunakan sebagai sebagai tempat mengambil sampel penelitian memiliki riwayat pemupukan yang cukup lama dan intensif. Agustian *et al.*, (2010) menyatakan bahwa perubahan dalam lingkungan rhizosfir tanaman khususnya perbedaan populasi mikroba bisa disebabkan karena aktivitas pengolahan tanah, pemupukan dan pengapuran. Menurut Soepardi (1983) dalam Agustian *et al.*, (2010) bahwa perubahan dalam lingkungan karena pengolahan tanah, pengapuran dan pemupukan tidak hanya mempengaruhi jumlah mikroorganisme didalam tanah tetapi juga macam mikroorganisme dalam tanah.

Uji produksi IAA secara kuantitatif dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui konsentrasi IAA yang diekskresikan ke dalam medium pertumbuhan oleh isolat bakteri penambat nitrogen ketika ditumbuhkan pada medium minimal salt yang ditambahkan dengan tryptophan (1mg/mL) dengan sistem *batch culture*. Berdasarkan hasil uji produksi IAA pada isolat bakteri penambat nitrogen yang berhasil diisolasi, diketahui ada 6 isolat yang memiliki kemampuan mengekskresikan amonium dengan konsentrasi yang tinggi seperti yang disajikan pada gambar 1. Konsentrasi zat pengatur tumbuh IAA yang terdeteksi pada medium pertumbuhan 6 isolat yang diteliti berkisar antara 7.35-38.35 ppm, dimana konsentrasi IAA tertinggi terdeteksi pada medium pertumbuhan isolat BTJ 22 dan konsentrasi terendah terdeteksi pada medium

Produksi Zat Pengatur Tumbuh IAA



Gambar 1.Produksi Zat Pengatur Tumbuh IAA pada Isolat Bakteri Penambat Nitrogen.

isolat ATJ 246. Beberapa penelitian sebelumnya melaporkan berhasil menguji kemampuan menghasilkan zat pengatur tumbuh IAA pada beberapa bakteri penambat nitrogen strain wild type seperti *Enterobacter sp.* (FJ890899), *E. Homaechi subsp. steigerwaltii* (FJ890898), *Labrys portucalensis* (FJ890891), dan *Burkholderia sp.* (FJ890895) dengan konsentrasi berkisar antara 16-140 $\mu\text{g/mL}$ (Inui-Kishi *et al.*, 2012) dan *Pseudomonas nitroreducens* dengan konsentrasi zat pengatur tumbuh IAA antara 13.83-90.17 $\mu\text{g/mL}$ (Chitraselvi *et al.*, 2015).

Hasil penelitian pada gambar 1 menunjukkan bahwa produksi zat pengatur tumbuh IAA pada isolat ATP14, BTP 122, BTJ 111 dan BTJ 22 mulai terjadi pada waktu inkubasi 2 hari (48 jam) dan berlanjut sampai hari ke 6 (144 jam). Data ini menunjukkan bahwa produksi IAA pada bakteri berbanding lurus dengan pertambahan waktu inkubasi. Menurut Retnowati *et al.* (2015), hal tersebut dipengaruhi oleh faktor kecukupan nutrisi selama masa pertumbuhan bakteri dan adanya suplai triptofan murni sebagai prekursor sintesis IAA. Chitraselvi *et al.*, (2015) and Inui-Kishi *et al.*, (2012) menyatakan bahwa zat pengatur tumbuh IAA di produksi pada fase stationer pertumbuhan bakteri karena IAA merupakan metabolit sekunder dari bakteri. Perbedaan pola produksi zat pengatur tumbuh IAA seperti yang terlihat pada isolat ATJ

246 dan isolat BTJ 221 dimana produksi IAA berkurang seiring dengan pertambahan waktu inkubasi bisa disebabkan karena perbedaan pola pertumbuhan dari isolat bakteri tersebut khususnya waktu masuk ke fase pertumbuhan stationer dan lamanya fase tersebut berlangsung. Hal tersebut juga bisa disebabkan karena isolat bakteri memetabolisme IAA yang terdapat di medium sehingga konsentrasinya berkurang.

Mikroorganisme yang berasal dari rhizosfer tanaman berpotensi menghasilkan zat pengatur tumbuh IAA karena akar tanaman dapat mensekresikan eksudat akar yang mengandung tryptopan. Tryptopan digunakan sebagai prekursor dalam biosintesis IAA pada tanaman dan mikroorganisme (Khalid *et al.*, 2004)

Isolat-isolat bakteri penambat nitrogen yang memiliki kemampuan dalam menghasilkan zat pengatur tumbuh kemudian diuji kemampuannya dalam melarutkan posfat pada medium pikovskaya dengan waktu inkubasi selama 3 hari seperti yang disajikan pada tabel 1.

Pada tabel 1 bisa dilihat bahwa dari 6 isolat yang mampu mengekskresikan amonium dan memproduksi zat pengatur tumbuh IAA, 2 isolat diantaranya memiliki kemampuan dalam melarutkan posfat yang ditandai dengan pembentukan zona bening disekitar koloni bakteri ketika ditumbuhkan pada medium pikovskaya (Gambar 2).

Tabel 1. Kemampuan Pelarutan Posfat pada Isolat Bakteri Penambat Nitrogen.

Kode isolat	Rasio zona bening (cm)
ATP 14	2,6
ATJ 246	ND
BTP 122	1,7
BTJ 111	ND
BTJ 22	ND
BTJ 221	ND

ND—not detectable.

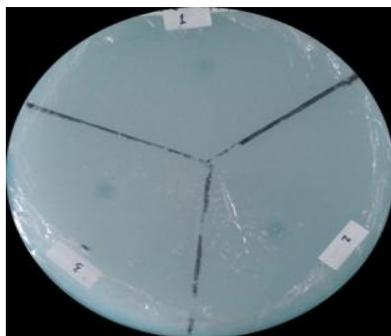
Dari 2 isolat yang memiliki kemampuan dalam pelarutan posfat, isolat BTP 122 memiliki aktivitas pelarutan yang rendah ($E < 2$), dan isolat ATP 14 memiliki aktivitas pelarutan sedang ($2 < E < 3$). Kemampuan pelarutan posfat dari isolat bakteri yang diteliti lebih tinggi jika dibandingkan dengan beberapa penelitian sebelumnya. Chitraselvi *et al.*, (2015) melaporkan berhasil mengisolasi bakteri pelarut posfat dengan rasio zona bening tertinggi 0,9 cm pada isolat A10 dan 61,7 pada isolat D3 (Gupta *et al.*, 2014). Diantara strain bakteri penambat nitrogen yang bisa melarutkan posfat adalah *Pseudomonas putida*, *P. cepacia* and *P. fluorescens* (Deshwal *et al.*, 2013), *Bacillus altitudinis*, *Pseudomonas monteilii*, dan *Pseudomonas mandelii* yang berasosiasi dengan akar tanaman padi dan memiliki kemampuan menambat nitrogen (Habibi *et al.*, 2014).

Kemampuan isolat bakteri penambat nitrogen dapat berbeda-beda dalam melarutkan fosfat. Hal ini disebabkan karena setiap mikroba pelarut fosfat menghasilkan jenis dan jumlah

asam organik yang berbeda. Ada kemungkinan dimana satu jenis mikroba pelarut fosfat menghasilkan lebih dari satu jenis asam organik (Adu-Tae, 2004). Ginting (2006) dalam Prastyowati (2008) menambahkan bahwa asam-asam organik yang dihasilkan mikroorganisme berbeda-beda kualitas dan kuantitasnya dalam membebaskan fosfat. Nagarajah *et al.*, (1970) menyatakan bahwa asam sitrat dan asam oksalat sangat efektif dalam melarutkan fosfat dari kaolinit dan gipsit, sedangkan asam malonat, tartarat dan malat, keefektifannya sedang, serta asam asetat dan suksinat digolongkan kurang efektif.

Menurut Ginting 2006 dalam Prastyowati 2008 pelarutan fosfat berlangsung secara kimia dan biologi. Pada mekanisme pelarutan fosfat secara kimia, mikroba menghasilkan sejumlah asam organik dengan berat molekul rendah seperti oksalat, suksinat, tartat, laktat, sitrat, asetat, propionate dan formintat. Meningkatnya asam-asam organik akan diikuti dengan penurunan pH, perubahan pH berperan penting dalam peningkatan kelarutan fosfat.

Pada mekanisme secara biologi, mikroba meng-hasilkan enzim fosfatase yang berperan di dalam melarutkan posfat. Pelarutan fosfat dapat pula dilakukan oleh mikroba yang tidak menghasilkan asam organik atau enzim melalui mekanisme (i) pelepasan proton (ion H^+) pada proses respirasi; (ii) asimilasi amonium (NH_4^+); dan (iii) adanya kompetisi antara anion organik dengan ortofosfat pada permukaan koloid (Illmer dan Schinner, 1995 dalam Kasmita, 2010).



AMP 141



AMP 143

Gambar 2. Pelarutan Posfat pada Isolat Bakteri Penambat Nitrogen pada Medium Pikovskaya.

D. KESIMPULAN

Isolasi bakteri penambat nitrogen pada rhizosfer tanaman budidaya asal Kabupaten Takalar berhasil diperoleh 20 isolat bakteri dimana 6 isolat diantaranya terdeteksi mampu memproduksi zat pengatur tumbuh IAA dengan konsentrasi antara 7.35-38.35 ppm. Dari 6 isolat

yang mampu memproduksi zat pengatur tumbuh IAA, 2 isolat diantaranya terdeteksi mampu melarutkan posfat dengan rasio zona bening 1,7 cm-2,6 cm sedangkan empat isolat diantaranya tidak memiliki kemampuan dalam melarutkan posfat.

E. DAFTAR PUSTAKA

- Adu-Tae, A.S.J. 2004. *Efisiensi Pemupukan Fosfat dan Hasil Kacang Tanah (Arachis hypogaea L.) Varietas Lokal Kupang Barat Akibat Pemberian Pupuk Fosfat, Kotoran Sapi, dan Bakteri Pelarut Fosfat*. Desertasi untuk Memperoleh Gelar Doktor. Program Pascasarjana Universitas Padjadjaran Bandung.
- Atlas RM. *Handbook of Microbiological Media 4th Edition*. 2009. Taylor and Francis : CRC press web site.
- Agustian., Nuriyani., L. Maira., O. Emalinda. 2010. Rhizobakteria Penghasil Fitohormon IAA pada Rhizosfir Tumbuhan Semak Karamunting, Titonia, dan Tanaman Pangan. *J. Solum*. 7(1).
- Aslamyah, S. 2002. Peranan Hormon Tumbuh dalam Memacu Pertumbuhan Algae. .
- Berraqueiro F. R, Baya A. M, Cormenzana A. R. 1976. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. *ARS Pharmaceutica*. 17: 399-406.
- Chitraselvi, P. E., Kalidass, S., and R. Kant. 2015. Efficiency of Rhizosphere Bacteria in Production of Indole Acetic Acid, Siderophore and Phosphate Solubilization. *International Journal of ChemTech Research*. 7(6).
- Colnaghi, R., A. Green, H. Luhong, P. Rudnick, and C. Kennedy. 1997. Strategies for increased amonium production in free-living or plant associated nitrogen fixing bacteria. *Plant Soil*. 194:145-154.
- Deshwal, V., K. P. 2013. Kumar. Production of Plant growth promoting substance by Pseudomonads. *Journal of Academia and Industrial Research (JAIR)*. 2: 221-225.
- Gupta, S., M. K. Meena., and S. Datta. 2014. Isolation, characterization of plant growth promoting bacteria from the plant Chlorophytum borivilianum and in-vitro screening for activity of nitrogen fixation, phosphate solubilization and IAA production. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. 3: 1082-1090.
- Gordon, J. K., and M. R. Jacobson. 1983. Isolation and characterization of Azotobacter vinelandii mutant strains with potential as bacterial fertilizer. *Can. J. Microbiol*. 29: 973-978.
- Gordon S.A. and Weber R.P. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*. 26: 192-195.
- Habibi, S., Djedidi, S., Prongjunthuek, K., Mortuza, M.F., Ohkama-Ohtsu, N., Sekimoto, H., Yokoyama, T. 2014. Physiological and genetic characterization of rice nitrogen fixer PGPR isolated from rhizosphere soils of different crops. *Plant and Soil*. 379: 5166.
- Hanafiah, Anas, Napoleon dan Ghoffar. 2005. *Biologi Tanah: Ekologi dan Mikrobiologi Tanah*. Jakarta: PT. Raja Grafindo Persada.
- Imas, T., R. S. Hadioetomo., A. W. Gunawan., Y. Setiadi. 1989. *Bahan Pengajaran Mikrobiologi Tanah II*. Depdikbud. Dirjen Dikti. PAU Bioteknologi. IPB Press.
- Inui-Kishi R.N., Takeshi Kishi L., Picchi S.C., Barbosa J.C, Lemos M.T.O., Marcondes J. and Lemos E.G.M. 2012. Phosphorus Solubilizing and IAA production activities in Plant Growth Promoting Rhizobacteria from Brazilian soils under Sugarcane cultivation. *ARN Journal of Engineering and Applied Sciences*. 7: 1446 – 1454.
- John, G.H., R. K. Noel., H. A. S Peter., T. S. James., and T. W. Stanley (1994). *Aerobic/Microaerophilic, motile, helical/vibroid Gram negative bacteria*. In: *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Kasmita, Reni 2010 *Isolasi, Karakterisasi, dan Identifikasi Molekuler Bakteri Pelarut Fosfat (BPF) dari Beberapa Sampel Tanah di Bogor, Nusa Tenggara Barat (NTB), dan Nusa Tenggara Timur (NTT)*. Bandung : Bogor Agricultural University.
- Khalid A, Arshad M, Zahir ZA. 2004. creening plant growth promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J. Appl. Microbiol*. 96: 473-480.
- Nagajarah S., Posner, A.M., and J.P. Quirk. 1970. Competitive adsorption of Phosphate with Polygalacturonate and Other Organic Anions on Kaolinite and Oxide Surfaces. *Nature*. 228: 83-84.
- Prasetyowati, Novi. 2008. *Pengujian Kompabilitas Antara Mikroba Pelarut Fosfat Asal Tanah Paku Haji Tangerang Dengan Tanaman Kedelai (Glycine Max (L.) Merr)*. Jakarta: Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah.
- Retnowati, Y., W. D. Uno., S. H. E. Putri. 2015. *Potensi Penghasilan Hormon IAA Oleh Mikroba Endofit Akar Tanaman Jagung (Zea mays)*. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan IPA Universitas Negeri Gorontalo. Gorontalo.
- Silva Filho G.N., Narloch C. and Scharf R. 2002. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de Pinus e Eucalyptus de Santa Catarina. *Pesq Agropec Bras*. 37: 847-854.
- Simanungkalit, R., D. M. 2001. Aplikasi Pupuk Hayati dan Pupuk Kimia: Suatu Pendekatan Terpadu. *Buletin AgroBio*. 4(2).
- Zahrán, H. H. 1999. Rhizobium legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. *Microbiol and Mol. Biol. Rev*. 63: 968-989.

