

**INTERAKSI PSEUDOMONAD PNDARFLUOR INDIGENUS DENGAN
Glomus aggregatum TERHADAP SERANGAN PENYAKIT BATANG BERLUBANG
DAN PERTUMBUHAN TANAMAN TEMBAKAU**

Gita Pawana¹, Syekhfani², Tini Surtiningsih³, Wiwiek Sri Wahyuni⁴

¹Jurusan Agroekoteknologi Universitas Trunojoyo Madura

²Jurusan Agroteknologi Universitas Brawijaya

³Jurusan Sains dan Tekonologi Universitas Airlangga

⁴Jurusan Agroteknologi Universitas Jember

Korespondensi : gitapawana@yahoo.co.id

ABSTRACT

Properties are favorable for the growth of plants from mycorrhizal arbuscular fungi and pseudomonads fluorescencet still need the wider examine, the positive interaction that may be obtained from their association. The purpose of this study was to examine the interaction of *Pseudomonas fluorescens* Pfm20 with *Glomus aggregatum* in the rhizosphere of tobacco and evaluate whether the interaction can increase of growth and suppress hollow stalk disease. The method of research is evaluation of antagonistic *P. fluorescens* Pfm20 towards *Pectobacterium carotovorum*, followed by green house experiment. The results obtained, the association of *P. fluorescens* Pfm20 with *G. aggregatum* positive interaction, on the presence or the absence of association between of *P. fluorescens* Pfm20 with *G. aggregatum* there are not level of disease severity and progression of hollow stalk disease, positive interaction between *P. fluorescens* Pfm20 with *G. aggregatum* can increase the uptake of phosphate, but can not give a higher biomass.

Key Word: *Pseudomonas fluorescens*, *Glomus aggregatum*, *Pectobacterium carotovorum*, interaction, tobacco.

PENDAHULUAN

Tembakau Madura merupakan jenis tembakau rajang dengan kandungan nikotin rendah, beraroma spesifik, digunakan untuk rokok kretek. Kandungan tembakau Madura dalam rokok tersebut 25-30% dengan kadar nikotin 2-3,5% (Anonim, 2007). Kebutuhan tembakau Madura semakin meningkat seiring dengan kecenderungan konsumen rokok Indonesia untuk mengkonsumsi rokok kretek ringan (rendah nikotin).

Tembakau Madura umumnya ditanaman pada lahan kering dengan topografi perbukitan, pada jenis tanah litosol dan tekstur tanah liat berkapur yang mengandung pasir dan berbatu dengan pH lebih dari 7. Bulan basah tidak lebih dari 3-4 bulan, dengan curah hujan rata-rata tiap bulan 200 mm, suhu pada musim hujan rata-rata 28⁰C dan pada musim kemarau rata-rata 35⁰C. Berdasarkan pada pembagian jenis iklim menurut Scmidth dan Ferguson, wilayah areal pertanaman tembakau Madura bertipe iklim D dan sebagian E (Suwarso *et al.*, 1999). Kondisi lahan yang demikian itu mengakibatkan kandungan fosfat yang tersedia bagi tanaman rendah bahkan dapat sangat rendah, 1 mg.kg⁻¹ tanah atau kurang. Hal ini karena fosfat dikelat oleh ion kalsium (Ca²⁺), sehingga efisiensi dari pemupukan fosfat hanya 10-25% (Gyaneshwar *et al.*, 2002).

Selain rendahnya ketersediaan fosfat, serangan penyakit batang berlubang (*hollow stalk*) yang disebabkan oleh bakteri *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (sinonim *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) juga merupakan

permasalahan yang sering dikeluhkan oleh petani tembakau Madura, walaupun serangannya bersifat sporadis dan jarang sampai menimbulkan kerugian yang berarti namun cenderung meningkat dan sulit diatasi.

Kesuburan lahan dan vigoritas tanaman tidak dapat dilepaskan dari peranan mikroba penghuni rhizosfer, kelompok *plant growth-promoting rhizobacteria* (PGPR) yang tergolong dalam pseudomonad fluorescent (PF) dan cendawan mycorrhiza arbuscular (CMA) merupakan mikroba yang dapat membentuk hubungan simbiosis mutualisme dengan tanaman. Mikroba-mikroba tanah tersebut diketahui dapat menstimulasi pertumbuhan tanaman melalui interaksi langsung atau tidak langsung (Jeffries *et al.*, 2003). PF yang termasuk golongan PGPR mempunyai kapasitas sebagai pelarut fosfat (Jeon *et al.*, 2003; Vega, 2007), mampu menghasilkan fitohormon (Jeon *et al.*, 2003; Sarode *et al.*, 2007) dan bersifat antagonis terhadap patogen tular tanah karena menghasilkan zat antibiotik dan siderophore yang dapat menekan kehidupan mikroba lain yang ada disekitarnya (Sarode *et al.*, 2007), serta menginduksi ketahanan sistemik tanaman (Compant *et al.*, 2005). Kelompok bakteri ini mempunyai keragaman ekologi yang luas sehingga dapat ditemukan pada berbagai rhizosfer tanaman (Barriuso *et al.*, 2008).

Adapun CMA bersimbiosis mutualisme dengan akar tanaman, meningkatkan luas permukaan akar melalui miselium eksternal sehingga tanaman bisa mendapatkan akses yang lebih baik untuk penyerapan nutrisi dan air, sedangkan CMA mendapatkan gula atau karbon organik dari tanaman (Smith dan Read, 2008). Di dalam rhizosfer CMA berasosiasi dan berinteraksi dengan mikroba rhizosfer, interaksi tersebut dapat berpengaruh positif atau negatif pada tanaman bergantung pada kultivar tanaman, masing-masing spesies ataupun strain CMA dan mikroba rhizosfer (Finley, 2007). Kemantapan CMA mengkoloni akar diketahui dapat mengubah aspek fisiologi tanaman, yang meliputi komposisi nutrisi dalam jaringan, keseimbangan hormonal, pola alokasi karbon organik serta komposisi kimia eksudat akar.

Sementara miselia eksternal berkembang, miselia tersebut dapat berperan sebagai sumber karbon organik bagi komunitas mikroba rhizosfer (Bianciotto dan Bonfante, 2002). Perubahan aspek fisiologi pada tanaman yang diinduksi CMA selanjutnya mempengaruhi populasi mikroba melalui perubahan komposisi kimia senyawa yang dieksudasikan akar (Barea *et al.*, 2005).

Selain memberikan akses yang lebih baik untuk penyerapan nutrisi dan air, simbiosis CMA khususnya *Glomus* spp secara langsung ataupun tidak langsung akan memberikan pengaruh yang buruk bagi perkembangan patogen tular tanah. Pengaruh ini diberikan melalui mekanisme eksudasi senyawa dari akar tanaman yang dikoloninya, kompetisi ruang dan nutrisi, peningkatan status nutrisi dan percabangan perakaran tanaman inang, memantapkan kondusivitas lingkungan rhizosfer bagi mikroba antagonis serta menginduksi ketahanan sistemik (Avis *et al.*, 2008). Mekanisme tersebut saling bersinergi satu dengan lainnya, suatu mekanisme akan menjadi lebih besar pengaruhnya bergantung pada kondisi lingkungan, kultivar varietas tanaman, strain CMA ataupun patogennya (Lioussanne, 2010).

Sifat yang menguntungkan bagi proses pertumbuhan tanaman dari PF dan CMA masih perlu di kaji lebih luas, yaitu interaksi positif yang mungkin bisa diperoleh dari asosiasinya. Selain itu potensi PF dan CMA belum pernah dimanfaatkan untuk meningkatkan efisiensi dalam budidaya tembakau Madura. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengkaji interaksi PF indigenus Madura dengan CMA *Glomus aggregatum* di rhizosfer tembakau dan mengevaluasi apakah interaksi tersebut dapat menekan serangan penyakit batang berlubang.

BAHAN DAN METODE

Bahan yang digunakan pada penelitian ini sebagai berikut :

1. Media tanam.

Digunakan tanah dari area pertanaman tembakau Kec. Jrengik Sampang. Tanah (loam) diambil pada lapisan olah (kurang dari 30 cm di bawah permukaan tanah) pada bulan Maret 2011, dengan pH (H₂O) 7,7, fosfat

tersedia dan fosfat total masing-masing 1,7 dan 26 mg fosfat-P Kg⁻¹ tanah kering, N 0,08%, K 0,26 me 100⁻¹g, populasi *P. fluorescens* 4,9 x10⁷ cfu 10⁻¹g tanah, jumlah spora CMA 0,212 spora 10⁻¹ g tanah. Media tanam dipersiapkan dari campuran tanah kering angin, pasir dan kompos dengan perbandingan volume 2:1:1. Media tanam disaring melalui saringan 4 mm. Media tanam diisikan ke polibag sebanyak 3 kg, 2 tiap polibag kemudian ditutup plastik sampai digunakan percobaan 1 minggu kemudian.

2. Cendawan mycorrhiza arbuscular.

Inokulan CMA *Glomus aggregatum* diperoleh dari Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). Inokulan *G. aggregatum* diperbanyak dengan menggunakan kultur pot terbuka (Brundrett *et al.*, 1996), dengan menggunakan jagung sebagai tanaman simbiosis pada media kultur campuran tanah steril dan arang sekam dengan perbandingan volume 1:2. Pada akhir perbanyakannya dihitung kepadatan spora CMA tiap 10 g inokulan dengan metode penyaringan basah. Untuk percobaan kepadatan spora ditentukan 10 spora g⁻¹ inokulan yang dicapai dengan menambahkan tanah steril.

3. Pseudomonad fluorescent Indigenus Madura.

Pseudomonad fluorescent (PF) indigenus Madura yang digunakan adalah *Pseudomonas fluorescens* Pfim20. Bakteri tersebut diisolasi dari dari rhizosfer tanaman tembakau Madura pada lahan tembakau di Kecamatan Propo Kabupaten Pamekasan Madura. Isolasi dilakukan dengan menggunakan media King's B, positif melarutkan fosfat pada media Pikovskaya, positif antagonis terhadap *Pectobacterium carotovorum* dan negatif pada uji hipersensitivitas pada tanaman tembakau. Bakteri tersebut diidentifikasi sebagai *P. fluorescens* Pfim20 berdasarkan uji Gram (Benson, 1990), uji fisiologi dan biokimia (Barrow dan Feltham, 1993) yang meliputi uji reaksi oksidase, uji hidrolisis pati, uji hidrolisis gelatin, uji reduksi nitrat, uji levan sukrosa, uji produksi pigmen non fluorescen, dan uji produksi asam organik dari trehalose.

4. Isolat *Pectobacterium carotovorum*.

Isolat *P. carotovorum* diisolasi dari batang tanaman tembakau. Batang tanaman tembakau yang menunjukkan gejala batang berlubang dibersihkan dengan alkohol 70%. Dipotong pada batas bagian yang sakit dan sehat, dikulturkan pada media nutrisi agar dan dinkubasikan selama 36 jam. Koloni bakteri yang muncul dikulturkan kembali pada media nutrisi agar untuk mendapatkan kultur murni *P. carotovorum*. Isolat yang diperoleh diinokulasikan pada pangkal batang tanaman tembakau. Kemudian diinkubasikan sampai muncul gejala penyakit batang berlubang, selanjutnya diisolasi kembali dan isolat yang diperoleh merupakan isolat *P. carotovorum* sebagai patogen penyakit batang berlubang.

Tahap dan metode penelitian ini meliputi :

1. Percobaan Laboratorium

Tujuan untuk mengetahui antagonisme *P. fluorescens* Pfim20 terhadap isolat *Pectobacterium carotovorum* secara *in vitro*. Uji ini dilakukan dengan mengkompetisikan *P. fluorescens* Pfim20 dengan isolat *Pectobacterium carotovorum* terhadap sumber karbon yang terbatas pada satu erlemeyer. Uji ini dilakukan pada media sintetik (*chemically defined medium*) bakteri khemoheterotrof, sehingga dapat ditentukan jumlah sumber karbon yang bisa menjadikan terjadinya kompetisi. Tahapan ini adalah:

- (a) Membuat kurva pertumbuhan *Pectobacterium carotovorum* oleh *P. fluorescens* Pfim20. Pembuatan kurva pertumbuhan dimaksudkan untuk mengetahui saat dan rentang waktu pada fase pertumbuhan stasioner.
- (b) Menentukan kebutuhan sumber karbon bagi masing-masing isolat sampai fase pertumbuhan stasioner. Konsentrasi sumber karbon (glukosa) ditentukan menurut Sudarmadji *et al.*, (1997).

$$Kk = km - Rk$$

Kk: kebutuhan sumber karbon untuk mencapai akhir fase pertumbuhan stasioner

km: konsentrasi glukosa pada media sebelum inokulasi

Rk: residu glukosa pada saat dicapai akhir fase pertumbuhan stasioner

(c) Perlakuan

Perlakuan dalam uji ini adalah:

P₁: *P. fluorescens* Pfim20 dikulturkan dalam satu erlemeyer dengan isolat *Pectobacterium carotovorum*.

P₂: *P. fluorescens* Pfim20 dan isolat *Pectobacterium carotovorum* masing-masing dikulturkan pada erlemeyer yang berbeda.

(d) Pelaksanaan kegiatan.

Satu mL kultur *P. fluorescens* Pfim20 dan isolat *Pectobacterium carotovorum* yang berumur 24 jam dengan kerapatan sel 10⁹ cfu/mL dikulturkan pada 100 mL medium sintetik bakteri khemoheterotrof yang mengandung sumber karbon cukup untuk mencapai fase pertumbuhan stasioner. Kemudian di suatu titik pada fase pertumbuhan stasioner pada masing-masing perlakuan diamati kerapatan selnya. Pada perlakuan P₁ dengan media King's B, pada perlakuan P₂ dengan media NA, masing-masing perlakuan diulang 10 kali. Untuk mengetahui adanya pengaruh perlakuan P₁, dan P₂ terhadap kerapatan sel *P. fluorescens* Pfim20 dan isolat *Pectobacterium carotovorum* dilakukan uji T dua sampel bebas dengan $\alpha = 5\%$.

2. Percobaan green house.

Tujuannya untuk mengkaji interaksi yang terjadi antara *P. fluorescens* Pfim20 dan *G. aggregatum*, dan pengaruhnya terhadap serangan penyakit batang berlubang pada tanaman tembakau. Digunakan rancangan acak lengkap faktorial yang terdiri atas: Faktor ke 1 media tanam (S) yang terdiri atas 2 level: S₀ = media tanam steril. S₁ = media tanam tidak steril. Faktor ke 2 adalah inokulasi isolat *P. carotovorum* yang terdiri atas 2 level: E₀ = tidak diinokulasi. E₁ = diinokulasi. Faktor ke 3 adalah amendasi mikroba (A) yang terdiri atas 5 level: A₀ = tanpa amendasi *P. fluorescens* Pfim20 dan *G. aggregatum* diberikan pemupukan N dan K tanpa P (-Pfim20-GA+N+K-P) sebagai kontrol negatif. A₁ = tanpa amendasi *P. fluorescens* Pfim20 dan *G.*

aggregatum diberikan pemupukan lengkap N, P dan K (-Pfim20-GA+N+P+K) sebagai kontrol positif. A₂ = amendasi *P. fluorescens* Pfim20 tanpa *G. aggregatum* diberikan pemupukan N dan K tanpa P (+Pfim20-GA+N+K-P) A₃ = amendasi *G. aggregatum* tanpa *P. fluorescens* Pfim20 diberikan pemupukan N dan K tanpa P (-Pfim20+GA+N+K-P) A₄ = amendasi *P. fluorescens* Pfim20 dan *G. aggregatum* diberikan pemupukan N dan K tanpa P (+Pfim20+GA+N+K-P).

Pelaksanaan percobaan

Pembibitan dilakukan dengan menggunakan media tanam steril. Benih tembakau Madura varietas Prancak disemaikan merata di atas media tanam, kemudian dilakukan penyiraman dengan air steril secara merata di atas permukaan media tanam. Bibit siap dipindahkan ke polibag pada saat bibit mempunyai ukuran panjang daun 5-7 cm atau bibit telah berumur 40 hari setelah semai. *P. fluorescens* Pfim20 dan *G. aggregatum* diamendasikan pada saat tanam. Suspensi sel *P. fluorescens* Pfim20 sebanyak 10 mL tiap tanaman dengan kerapatan sel 10⁸ cfu/mL, diberikan di sekitar pangkal akar. Inokulan *G. aggregatum* sebanyak 30 g tiap tanaman dengan kepadatan spora 10 spora/g inokulan, diberikan di bawah perakaran. Inokulasi isolat *Pectobacterium carotovorum* sebanyak 10 mL suspensi sel tiap tanaman dengan kerapatan sel 10⁸ cfu/mL suspensi, diberikan di sekitar pangkal batang dilakukan pada saat 7 hari setelah tanam. Pupuk N, P dan K yang diberikan masing-masing sebanyak 2,1, 1,4 dan 1,4 g tiap tanaman. Pupuk P, K dan ½ dosis pupuk N diberikan pada saat penanaman, ½ dosis pupuk N berikutnya diberikan 3 minggu setelah tanam. Penyiraman dilakukan dengan air steril sampai kapasitas lapang.

Variable pengamatan yang dilakukan meliputi :

1. Populasi PF di Rhizosfer

Pada saat panen 10 g sampel rhizosfer dari masing-masing perlakuan disuspensikan dalam larutan NaCl 0,85% sampai 100 mL, diencerkan 10⁻¹ sampai 10⁻⁸ kali. Satu mL suspensi rhizosfer dengan pengenceran 10⁻⁸ dikulturkan pada media King's B,

diinkubasikan pada suhu kamar selama 24 jam. Setelah masa inkubasi diamati jumlah koloni PF yang tumbuh, yaitu koloni dengan pigmen kuning kehijauan. Populasi PF dihitung dengan:

$$\text{Populasi PF}10^{-1}g \text{ rhizosfer} = \text{jumLah koloni} \times \text{tingkat pengenceran} \times 100$$

2. Tingkat koloni *Glomus aggregatum*

Pengukuran tingkat koloni *G. aggregatum* pada akar tembakau diukur setelah panen. Dua gram sampel akar dengan ukuran 1 cm dari masing-masing tanaman perlakuan dicuci sampai bersih (pencucian diulang 3 kali), selanjutnya direndam dalam KOH 10% selama 12 jam. Kemudian akar dicuci dengan air mengalir dan di ulang sampai 5 kali. Jika akar masih berwarna kelam direndam dengan 10% sodium hipoklorit selama 3 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir diulang sampai 5 kali. kemudian akar direndam dalam larutan tinta asam asetat 5% selama 12 – 24 jam, lalu direndam dalam larutan destaining (asam asetat 1%) untuk menghilangkan kelebihan larutan pewarna, kemudian ditiriskan. Secara acak potongan akar diletakkan berjajar pada objek glass. Setiap lima potong akar ditutup dengan cover glass lalu dilihat di bawah mikroskop. Setiap sampel diamati minimal 150 bidang pandang. Tingkat koloni adalah jumlah bidang pandang akar bermikoriza (ada struktur mikoriza) dibagi total bidang pandang yang diamati dikalikan 100%.

3. Kandungan fosfat pada daun.

Analisis kandungan fosfat daun pada masing-masing perlakuan dilakukan setelah panen pada daun kering oven 60°C. Kandungan fosfat pada daun dianalisis menurut Prasetyo *et al* (2005). Setengah gram sampel daun yang telah dihaluskan ditambahkan 5 mL HNO₃ p.a. dan 0,5 mL HClO₄ p.a. ke dalam tabung digestion selanjutnya dibiarkan 1 malam. Selanjutnya dipanaskan dalam digestion blok dengan suhu

100 °C selama satu jam, kemudian suhu ditingkatkan menjadi 150°C. Setelah uap kuning habis suhu digestion blok ditingkatkan menjadi 200 °C. Destruksi selesai setelah keluar asap putih dan sisa ekstrak kurang lebih 0,5 mL. Tabung diangkat dan dibiarkan dingin. Ekstrak diencerkan dengan air bebas ion hingga volumenya tepat 50 mL dan dikocok hingga homogen. Masing-masing 1 mL ekstrak dipipet ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 9 mL air bebas ion (pengenceran 10 x). Dua mL masing-masing ekstrak ditambah 10 mL pereaksi pewarna fosfat dikocok hingga homogen dan dibiarkan selama 30 menit. Absorbansi larutan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 693 nm.

3. Biomassa tanaman.

Biomassa tanaman ditentukan sebagai bobot kering seluruh bagian tanaman yang meliputi akar, batang dan daun. Akar, batang dan daun dari masing-masing perlakuan dikeringkan dengan oven pada 60°C sampai diperoleh berat yang konstan.

4. Tingkat dan perkembangan keparahan penyakit batang berlubang

Perkembangan keparahan penyakit diamati secara berkala 7 hari sekali dimulai dari 7 hari setelah inokulasi sampai saat panen.

Tingkat keparahan ditentukan dengan formula:

$$Kp = \frac{\sum(n \times v)}{N \times Z} \times 100\%$$

Kp: keparahan penyakit

n : jumlah tanaman pada nilai skala katagori kerusakan

v : nilai skala katagori kerusakan

N : jumlah tanaman yang diamati

Z : nilai skala katagori kerusakan tertinggi

Nilai skala katagori kerusakan oleh patogen batang berlubang disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai skala katagori kerusakan patogen batang berlubang

Nilai skala	Nilai skala Katagori kerusakan oleh patogen batang berlubang
0	Tidak terdapat gejala serangan
1	Pada pangkal batang terdapat bercak coklat nekrotik di bekas letak daun atau pada ketiak daun.
2	Pada batang terdapat beberapa bercak coklat nekrotik di bekas letak daun atau pada ketiak daun, diikuti kelayuan daun.
3	Pada batang terdapat beberapa bercak coklat nekrotik di bekas letak daun atau pada ketiak daun, diikuti kelayuan daun, bercak berkembang dan menyatu.
4	Empulur membusuk dan atau batang berlubang atau tanaman mati

Analisis Statistik.

Untuk mengetahui adanya pengaruh perlakuan terhadap masing-masing parameter pengamatan yaitu populasi PF, tingkat koloni *G. aggregatum*, kandungan fosfat pada daun, biomassa tanaman dan tingkat keparahan penyakit dilakukan analisis varian (ANOVA) dengan $\alpha = 5\%$, kemudian untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan dilanjutkan dengan uji Duncan pada $\alpha = 5\%$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Penekanan pertumbuhan *Pectobacterium carotovorum* oleh *P. fluorescens* Pfim20 secara *in vitro*

Kerapatan sel *P. fluorescens* Pfim20 saat fase pertumbuhan stasioner tidak berbeda antara yang dikulturkan dalam satu erlemeyer bersama *P. carotovorum* dengan yang dikulturkan dalam erlemeyer terpisah, sedangkan kerapatan sel *P. carotovorum* berbeda antara yang dikulturkan dalam satu erlemeyer bersama *P. fluorescens* Pfim20 dengan yang dikulturkan dalam erlemeyer terpisah (Tabel 2). Kondisi tersebut menunjukkan keberadaan *P. fluorescens* Pfim20 telah menekan pertumbuhan *Pectobacterium carotovorum*.

Tabel 2. Kerapatan sel *P. fluorescens* Pfim20 dan *P. carotovorum*

Dikulturkan dalam	Kerapatan sel (cfu/ml)	
	<i>P. fluorescens</i> Pfim20	<i>P. carotovorum</i>
Satu erlemeyer	$1,8 \times 10^8 \pm 1,41$ a	$7,6 \times 10^6 \pm 1,33$ a
Erlemeyer terpisah	$2,1 \times 10^8 \pm 1,36$ a	$1,9 \times 10^8 \pm 1,53$ b

Angka yang diikuti dengan huruf yang sama pada satu kolom tidak berbeda pada uji T ($P \geq 0,05$).

2. Populasi PF pada rhizosfer.

Populasi *P. fluorescens* pada rhizosfer tembakau tidak dipengaruhi inokulasi *P. carotovorum*, namun dipengaruhi oleh media tanam serta amendasi *P. fluorescens* Pfim20

dan *G. aggregatum*. Antara perlakuan media tanam dengan amendasi *P. fluorescens* Pfim20 dan *G. aggregatum* terdapat interaksi (Tabel 3).

Tabel 3. Populasi PF pada rhizosfer.

Amendasi	Populasi PF (cfu.10 ⁻¹ g rhizosfer) pada			
	Media tanam steril		Media tanam tidak steril	
-Pfim20-GA+N+K-P	2,6 x 10 ⁸	± 1,71 a	1,9 x 10 ⁹	± 1,26 c
-Pfim20-GA+N+K+P	4,4 x 10 ⁸	± 2,23 ab	6,3 x 10 ⁹	± 1,38 d
+Pfim20-GA+N+K-P	1,4 x 10 ¹²	± 2,12 e	1,2 x 10 ¹²	± 6,0 e
-Pfim20+GA +N+K-P	7,9 x 10 ⁸	± 1,22 bc	1,9 x 10 ⁹	± 1,54 c
+ Pfim 20 +GA+N+K-P	4,2 x 10 ¹²	± 2,23 f	3,0 x 10 ¹²	± 2,85 ef

Angka yang diikuti dengan huruf yang sama tidak berbeda pada uji Duncan ($P \geq 0,05$).

Amendasi *P. fluorescens* Pfim20 dan *G. aggregatum* tampak meningkatkan populasi PF di dalam rhizosfer. Populasi PF pada perlakuan amendasi *P. fluorescens* Pfim20 bersama *G. aggregatum* ataupun amendasi *P. fluorescens* Pfim20 dan *G. aggregatum* masing-masing secara tunggal tidak dipengaruhi media tanam. Pengaruh amendasi *P. fluorescens* Pfim20 bersama *G. aggregatum* terhadap populasi *P. fluorescens* pada media tanam tidak steril tidak berbeda dengan pengaruh amendasi tunggal *P. fluorescens*.

3. Tingkat koloni *Glomus aggregatum*.

Tingkat koloni *G. aggregatum* tidak dipengaruhi inokulasi *P. carotovorum*, namun dipengaruhi oleh media tanam serta amendasi *P. fluorescens* Pfim20 dan *G. aggregatum*. Antara perlakuan media tanam dan amendasi *P. fluorescens* Pfim20 dan *G. aggregatum* tidak terdapat interaksi. Persentase akar terinfeksi *G. aggregatum* pada media tanam steril lebih rendah dari pada media tanam tidak steril ($P < 0,05$), masing-masing 29% ± 4,32 dan 36,05% ± 4,66. Pengaruh amendasi *P. fluorescens* Pfim20 dan *G. aggregatum* terhadap persentase akar terinfeksi *G. aggregatum* disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Tingkat koloni *G. aggregatum*

Jenis Amendasi	Tingkat koloni <i>G. aggregatum</i>
-Pfim20-GA+N+K-P	9,78 ± 3,21 a
-Pfim20-GA+N+K+P	9,84 ± 2,91 a
+Pfim20-GA+N+K-P	9,89 ± 3,51 a
-Pfim20+GA+N+K-P	60,87 ± 4,31 b
+Pfim20+GA+N+K-P	72,26 ± 7,86 c

Angka yang diikuti dengan huruf yang sama tidak berbeda pada uji Duncan ($P \geq 0,05$).

Amendasi *G. aggregatum* tampak meningkatkan persentase akar terinfeksi *G. aggregatum*, namun pengaruh amendasi *P. fluorescens* Pfim20 bersama *G. aggregatum* lebih tinggi dari pada pengaruh amendasi tunggal *G. aggregatum*.

4. Kandungan Fosfat pada Daun.

Kandungan fosfat pada daun dipengaruhi interaksi inokulasi *P. carotovorum*, media tanam serta amendasi *P. fluorescens* Pfim20 dan *G. aggregatum*. Pengaruh interaksi antara ketiga faktor perlakuan tersebut terhadap kandungan fosfat pada daun disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Kandungan fosfat pada daun

Inokulasi	Amendasi	Kandungan fosfat pada daun (mg/kg)	
		Media tanam	
		Steril	Tidak steril
Tanpa diinokulasi <i>P. carotovorum</i>	-Pfim20-GA+N+K-P	6,45 ± 0,38 b	7,53 ± 0,03 d
	-Pfim20-GA+N+K+P	6,74 ± 0,10 c	8,85 ± 0,02 e
	+Pfim20-GA+N+K-P	7,56 ± 0,06 d	10,55 ± 0,03 i
	-Pfim20+GA+N+K-P	10,12 ± 0,07 h	10,10 ± 0,02 h
	+Pfim20+GA+N+K-P	11,25 ± 0,03 j	13,35 ± 0,02 n

Diinokulasi <i>P. carotovorum</i>	-Pfim20-GA+N+K-P	6,13 ± 0,03	a	9,43 ± 0,01	f
	-Pfim20-GA+N+K+P	9,00 ± 0,02	e	11,92 ± 0,04	k
	+Pfim20-GA+N+K-P	9,91 ± 0,07	g	12,84 ± 0,03	m
	-Pfim20+GA+N+K-P	12,14 ± 0,02	l	13,38 ± 0,02	n
	+Pfim20+GA+N+K-P	11,21 ± 0,08	j	13,42 ± 0,02	n

Angka yang diikuti dengan huruf yang sama tidak berbeda pada uji Duncan ($P \geq 0,05$).

Amendasi *P. fluorescens* Pfim20 dan *G. aggregatum* tampak meningkatkan kandungan fosfat daun. Kandungan fosfat daun pada perlakuan amendasi *P. fluorescens* Pfim20 bersama *G. aggregatum* dipengaruhi media tanam namun tidak dipengaruhi inokulasi *P. carotovorum*. Kandungan fosfat daun pada perlakuan amendasi tunggal *P. fluorescens* Pfim20 dipengaruhi media tanam dan inokulasi *P. carotovorum*, sedangkan pada perlakuan amendasi tunggal *G. aggregatum* jika tanpa diinokulasi *P. carotovorum* tidak dipengaruhi media tanam, sebaliknya jika diinokulasi *P. carotovorum* dipengaruhi media tanam. Pengaruh amendasi *P. fluorescens* Pfim20 bersama *G. aggregatum* terhadap kandungan fosfat daun pada media tanam tidak steril dengan adanya inokulasi *P. carotovorum*

tidak berbeda dengan pengaruh amendasi tunggal *G. aggregatum*.

5. Biomassa Tanaman

Biomassa tanaman tidak dipengaruhi media tanam, namun dipengaruhi oleh inokulasi *P. carotovorum* serta amendasi *P. fluorescens* Pfim20 dan *G. aggregatum*. Antara perlakuan inokulasi *P. carotovorum* dan amendasi *P. fluorescens* Pfim20 dan *G. aggregatum* tidak terdapat interaksi. Biomassa tanaman pada perlakuan tidak diinokulasi *P. carotovorum* lebih tinggi dari pada diinokulasi *P. carotovorum* ($P < 0,05$), masing-masing 24,19 g ± 3,22 dan 22,05 g ± 2,95. Pengaruh amendasi *P. fluorescens* Pfim20 dan *G. aggregatum* terhadap biomassa tanaman disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Biomassa tanaman

Amendasi	Berat biomassa (g/tanaman)	
-Pfim20-GA+N+K-P	19,73 ± 2,98	a
-Pfim20-GA+N+K+P	23,06 ± 2,04	b
+Pfim20+GA+N+K-P	23,42 ± 2,17	b
-Pfim20+GA+N+K-P	24,06 ± 1,88	b
+Pfim20-GA+N+K-P	25,33 ± 4,04	b

Angka yang diikuti dengan huruf yang sama tidak berbeda pada uji Duncan ($P \geq 0,05$).

Amendasi *P. fluorescens* Pfim 20 bersama *G. aggregatum* serta masing-masing amendasi tunggal *P. fluorescens* Pfim20 atau *G. aggregatum* tampak meningkatkan biomassa tanaman, namun pengaruh amendasi *P. fluorescens* Pfim 20 bersama *G. aggregatum* relatif lebih rendah dari pada masing-masing amendasi tunggal *P. fluorescens* Pfim20 atau *G. aggregatum*, bahkan tidak berbeda dengan kontrol kontrol positif akan tetapi lebih tinggi dari pada kontrol negatif.

7. Keparahan dan Perkembangan Infeksi Penyakit.

Tingkat keparahan penyakit hollow stalk tidak dipengaruhi media tanam, namun dipengaruhi oleh interaksi inokulasi *P. carotovorum* dengan amendasi *P. fluorescens* Pfim20 dan *G. aggregatum*. Pengaruh interaksi kedua faktor perlakuan tersebut terhadap tingkat keparahan penyakit disajikan pada Tabel 7.

Tabel 7. Tingkat keparahan penyakit batang berlubang

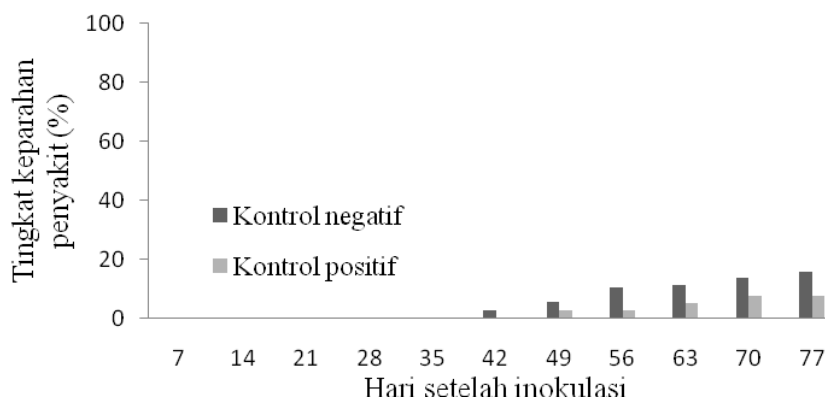
Amendasi	Tingkat keparahan penyakit (%)			
	Tidak diinokulasi		Diiinokulasi	
	<i>P. carotovorum</i>		<i>P. carotovorum</i>	
-Pfim20-GA+N+K-P	0,00	a	15,87 ± 7,14	b
-Pfim20-GA+N+K+P	0,00	a	9,79 ± 5,21	a
+Pfim20-GA+N+K-P	0,00	a	0,00	a
-Pfim20+GA+N+K-P	0,00	a	0,00	a
+Pfim20+GA+N+K-P	0,00	a	0,00	a

Angka yang diikuti dengan huruf yang sama tidak berbeda pada uji Duncan ($P \geq 0,05$).

Tingkat keparahan penyakit batang berlubang pada perlakuan amendasi *P. fluorescens* Pfim20 dan *G. aggregatum* tidak dipengaruhi inokulasi *P. carotovorum* kecuali pada kontrol negatif. Pada perlakuan tidak diinokulasi *P. carotovorum* pengaruh amendasi *P. fluorescens* Pfim20 dan *G. aggregatum* terhadap tingkat keparahan penyakit batang berlubang tidak berbeda, demikian juga pada

perlakuan diinokulasi *P. carotovorum* kecuali pada kontrol negatif.

Perkembangan tingkat keparahan penyakit hollow stalk pada kontrol negatif dimulai 7 hari lebih awal dari pada kontrol positif, dan tingkat keparahan penyakit pada kontrol negatif lebih tinggi dari pada kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa tanaman pada kontrol positif lebih toleran dari pada kontrol negatif (Gambar 1).



Gambar 1. Perkembangan tingkat keparahan penyakit batang berlubang

Pseudomonas fluorescens Pfim20 pada kondisi keterbatasan sumber karbon secara *in vitro* terbukti dapat menekan pertumbuhan *Pectobacterium carotovorum*, hal ini dikarenakan, namun mekanisme penekanan terhadap pertumbuhan *P. carotovorum* tidak dapat dipastikan melalui penghambatan pertumbuhan, mematikan atau keduanya. Hal ini sesuai dengan sifat pseudomonad pendarfluor pada umumnya bahwa kelompok bakteri ini mempunyai kapasitas menghasilkan metabolit sekunder, yang dapat berupa

antibiotik, asam sianida (HCN) dan siderofor (Sarode *et al.*, 2007).

Populasi PF pada amendasi *P. fluorescens* Pfim20 bersama *G. aggregatum* ataupun amendasi tunggal masing-masing *P. fluorescens* Pfim20 tidak dipengaruhi oleh adanya inokulasi *P. carotovorum* maupun media tanam. Hal ini menunjukkan bahwa *P. fluorescens* Pfim20 yang diamendasikan mampu mempertahankan hidup dan berkembang biak pada rhizosfer sepanjang periode pertumbuhan tanaman (akar) dalam kehadiran mikroflora indigenus yang terlebih

dahulu sudah ada ataupun *P. carotovorum*. Perlakuan amendasi *P. fluorescens* Pfim20 bersama *G. aggregatum* memberikan kepadatan populasi PF relatif lebih tinggi dari pada amendasi tunggal *P. fluorescens* Pfim20 (Tabel 3), demikian juga terhadap tingkat koloni *G. aggregatum* juga tidak dipengaruhi oleh adanya inokulasi *P. carotovorum*, dan tingkat koloni *G. aggregatum* tertinggi juga terdapat pada perlakuan amendasi *P. fluorescens* Pfim20 bersama *G. aggregatum* (Tabel 4). Kehadiran *G. aggregatum* dalam asosiasi dengan *P. fluorescens* Pfim20 menstimulasi peningkatan pertumbuhan populasi *P. fluorescens* dan kehadiran *P. fluorescens* Pfim20 meningkatkan tingkat koloni *G. aggregatum*, dengan demikian asosiasi *P. fluorescens* Pfim20 dan *G. aggregatum* pada rhizosfer tembakau Madura nyata berinteraksi positif, keduanya bersinergi untuk meningkatkan perkembangannya.

Interaksi positif tersebut secara tidak langsung mempengaruhi perkembangan mikroba-mikroba rhizosfer lainnya yang berdampak pada perubahan struktur komunitasnya. Dengan demikian tidak berpengaruh inokulasi *P. carotovorum* terhadap populasi pseudomonad pendarfluor ataupun tingkat koloni *G. aggregatum* bisa akibat dari kemantapan interaksi yang terjadi antara *Pseudomonas fluorescens* Pfim20 dengan *G. aggregatum*.

Kandungan fosfat pada daun, pada perlakuan amendasi *P. fluorescens* Pfim20 bersama *G. aggregatum* relatif tertinggi dari pada amendasi *P. fluorescens* Pfim20 dan *G. aggregatum* secara tunggal, tidak dipengaruhi adanya inokulasi *Pectobacterium carotovorum* ataupun sterilitas media tanam (Tabel 5), hal ini dikarenakan kandungan fosfat ditentukan oleh dinamika fosfat tersedia yang dipengaruhi oleh aktifitas mikroba pelarut fosfat yang terdapat pada rhizosfer (Bagyaraj *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2009). Namun demikian inokulasi *P. carotovorum* memberikan kandungan fosfat pada daun yang lebih tinggi baik pada kontrol ataupun amendasi *P. fluorescens* Pfim20 atau *G. aggregatum* masing-masing secara tunggal (tidak pada amendasi *P. fluorescens* Pfim20 dan *G. aggregatum* secara bersama). Hal ini

menunjukkan untuk mengatasi adanya infeksi *P. carotovorum* tanaman pada perlakuan tersebut melakukan pembentukan molekul kaya energi (seperti ATP), yang membutuhkan nutrisi fosfat lebih tinggi, sedangkan pada perlakuan yang tidak diinokulasi *P. carotovorum* kandungan (serapan) fosfat pada daun lebih rendah karena infeksi yang rendah, sehingga tanaman tidak melakukan serapan fosfat yang lebih tinggi.

Biomassa tanaman pada perlakuan media tanam yang tidak diinokulasi *P. carotovorum* lebih tinggi dari pada media tanam yang diinokulasi *P. carotovorum*. Hal ini dikarenakan adanya infeksi patogen akan menimbulkan perubahan metabolisme baik sekunder (proses induksi pertahanan tanaman) maupun primer. Patogen akan memanipulasi metabolisme karbohidrat tanaman untuk memenuhi kebutuhannya. Pengambilan nutrisi oleh patogen ini akan meningkatkan kebutuhan asimilat, di sisi lain terjadi penurunan aliran asimilat dari jaringan akibat pemecahan sukrosa oleh enzim ekstraseluler menjadi glukosa dan fruktosa di dalam apoplast (Berger *et al.*, 2007). Dikemukakan oleh Hammerschmidt dan Nicholson (2000) penurunan biomassa yang mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan tanaman adalah ikutan atau kompensasi dari adanya produksi metabolit sekunder yang disintesis dari produk antara yang dihasilkan metabolisme primer. Namun demikian inokulasi *P. carotovorum* tersebut tidak mempengaruhi biomassa tanaman pada perlakuan amendasi *P. fluorescens* Pfim20 dan *G. aggregatum* secara bersama atau masing-masing secara tunggal maupun kontrol. Kondisi ini menunjukkan bahwa inokulasi tersebut hanya memberikan tingkat infeksi yang rendah.

Smith dan Read (2008) menjelaskan dalam interaksi antara bakteri pelarut fosfat dengan CMA, bakteri pelarut fosfat melepaskan fosfat anorganik dengan mengekskresi asam organik ataupun fosfatase, melalui miselum eksternal CMA menyerap fosfat tersedia dan memindahkan ke tanaman pada arbuskula, sehingga akan memacu pertumbuhan tanaman inang melalui

peningkatan serapan fosfat. Namun demikian ineraksi positif antara *P. fluorescens* Pfim20 bersama *G. aggregatum* tidak tampak tercermin pada biomassa tanaman.

Perlakuan amendasi *P. fluorescens* Pfim20 bersama *G. aggregatum* tidak dapat memberikan peningkatan biomassa tanaman, bahkan diperoleh biomassa tanaman yang lebih rendah dari pada amendasi tunggal *P. fluorescens* Pfim20 atau *G. aggregatum* walaupun secara statistik tidak nyata ($P \geq 5$) (Tabel 6). Hal yang mirip sebelumnya ditemukan oleh Artursson (2005) bahwa *Glomus mosseae* atau *G. intraradices* yang diinokulasikan bersama *Paenibacillus brasilensis* pada rhizosfer *Triticum aestivum* (winter wheat) menurunkan berat daun dan akar dibandingkan jika diinokulasi tanpa *P. brasilensis*. Faktanya kehadiran *P. brasilensis* menstimulasi perluasan dan peningkatan kolonisasi *Glomus* pada akar *Triticum aestivum*. Demikian juga hasil yang di temukan oleh Artursson *et al.* (2011) bahwa *G. mosseae* yang diinokulasikan bersama *P. polymyxa* dengan tingkat konsentrasi suspensi tinggi (10^8 cfu/mL) pada rhizosfer winter wheat memberikan berat kering daun yang lebih rendah dari pada tingkat konsentrasi suspensi rendah (10^6 cfu/mL). Berdasarkan hal tersebut dijelaskan perluasan dan peningkatan kolonisasi akibat stimulasi interaksi bakteri pelarut fosfat dan CMA menjadi merugikan dari pada menguntungkan. Keadaan ini menunjukkan walaupun interaksi positif *P. fluorescens* Pfim20 dan *G. aggregatum* dapat meningkatkan serapan fosfat, namun interaksi tersebut memanfaatkan sumber energi (karbon organik/fotosintat) secara efektif untuk mendukung kemantapan interaksi tersebut.

Hasil analisis tingkat koloni *G. aggregatum* pada perlakuan amendasi *P. fluorescens* Pfim20 bersama *G. aggregatum* adalah 72,26%, lebih tinggi dari pada amendasi tunggal *G. aggregatum*. Dijelaskan oleh O'Connor *et al.* (2001) bahwa tingkat koloni CMA setinggi 30% telah cukup memberikan pertumbuhan optimal bagi tanaman simbiotnya. Oleh karenanya tingkat koloni yang melebihi dari kondisi optimal ini

mengakibatkan tanaman mendistribusikan karbon-karbon organik (fotosintat) yang lebih banyak untuk menunjang kemantapan tingkat koloni *G. aggregatum*.

Inokulasi *P. carotovorum* mempengaruhi tingkat keparahan penyakit batang berlubang. Pengaruh inokulasi *P. carotovorum* pada kontrol negatif (tanpa amendasi *P. fluorescens* Pfim20 dan *G. aggregatum* dipupuk N+K-P) lebih besar dari kontrol positif (tanpa amendasi *P. fluorescens* Pfim20 dan *G. aggregatum* dipupuk N+K+P), sebaliknya pada amendasi *P. fluorescens* Pfim20 bersama *G. aggregatum* ataupun amendasi *P. fluorescens* Pfim20 atau *G. aggregatum* masing-masing tunggal tidak terdapat keparahan penyakit.

Berdasarkan kepadatan populasi *P. fluorescens* dapat dipastikan di rhizosfer *P. fluorescens* Pfim20 mendominasi pertumbuhannya terhadap pertumbuhan mikroba-mikroba yang terlebih dahulu telah ada di dalam rhizosfer dan kemungkinan *P. carotovorum* tidak dapat menunjukkan perkembangan keparahan karena tingkat populasi yang rendah. Mulya *et al.* (1996) menemukan bahwa di dalam rhizosfer tomat *P. fluorescens* strain PfG32R hanya bersifat memperlambat pertumbuhan patogen layu bakteri, populasi patogen tetap tinggi yaitu di atas ambang populasi minimum untuk menginduksi penyakit layu bakteri. Jika penekanan pertumbuhan patogen merupakan faktor penting dalam penekanan keparahan penyakit, kemungkinan penekanan patogen pada tempat infeksi lebih berarti dari pada penekanan pada rhizosfer. Selain itu mungkin patogen dapat melakukan infeksi tetapi tidak dapat terus menunjukkan perkembangan keparahan penyakit karena adanya induksi ketahanan yang dilakukan oleh agen pengendali hayati, baik yang bersifat *systemic acquired resistance* (SAR) atau *induced systemic resistance* (ISR) (Compant *et al.*, 2005; Avis *et al.*, 2008).

Perkembangan keparahan penyakit dimulai sejak 42 hst (Gambar 1), gejala penyakit yang muncul pada periode tersebut berkembang membentuk beberapa bercak coklat nekrotik di bekas letak daun atau pada

ketiak daun, diikuti kelayuan daun dan batang menjadi berlubang yang selanjutnya tanaman bisa mengalami kematian. Gejala penyakit yang muncul pada periode 56-63 hst terus berkembang sampai membentuk batang berlubang saja tanpa diikuti kematian tanaman. Gejala penyakit yang muncul pada periode 77 hst tidak menunjukkan perkembangan keparahan.

Perkembangan keparahan penyakit tampak berhubungan dengan umur tanaman, pada tingkat umur yang berbeda tingkat ketahanan tanaman terhadap serangan penyakit dapat berbeda atau berubah. Dengan bertambahnya umur tanaman aktivitas enzim peroksidase (*phenol-oxidizing enzym peroxidase*) juga akan meningkat. Peroksidase merupakan enzim yang terlibat dalam proses respon pertahanan tanaman terhadap adanya infeksi patogen dengan menghasilkan senyawa antimikroba dan memodifikasi dinding sel melalui proses lignifikasi. Lignifikasi berperan sebagai penghalang difusi yang mencegah aliran nutrisi ke patogen atau toksin ke sel tanaman (Hammerschmidt dan Nicholson, 2000).

KESIMPULAN

Serangan busuk batang berlubang tidak terjadi pada tanaman tanaman yang diberikan amendasi *P. fluorescens* Pfim20 atau *G. aggregatum* baik secara bersama ataupun masing-masing secara tunggal. Amendasi *P. fluorescens* Pfim20 bersama *G. aggregatum* dapat memberikan serapan fosfat yang lebih tinggi dari pada amendasi tunggal masing-masing *P. fluorescens* Pfim20 atau *G. aggregatum*, namun tidak dapat memberikan biomassa yang lebih tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

Anonim, 2007. Gabungan Perusahaan Rokok (GAPERO). Akselerasi alih teknologi tembakau Madura rendah nikotin. Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian 29: 10-11.

Artursson, V. 2005. *Bacterial-Fungal Interactions Highlighted Using Microbiomic: Potential Application for Plant Growth Enhancement*. Doctoral Thesis Swedish University of

Agricultural Science. Uppsala. Sweden.

- Artursson, V., K. Hjort, D. Muleta, L. Jaderlund, U. Granhall. 2011. Effects on *Glomus mosseae* root colonization by *Paenibacillus polymyxa* and *Paenibacillus brasilensis* strains as related to soil P-availability in winter wheat. *App. and Environ. Soil Sci.* Vol. 20. 111-121.
- Avis, T. J, V. Gravel, H. Antoun, R. J. Tweddell. 2008. Multifaceted beneficial effects of rhizosfer microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biol. Biochem.* 40, 1733-1740.
- Bianciooto. V, P. Bonfante. 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi: a specialised niche for rhizospheric and endocellular bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 365-371.
- Bagyaraj. D. J, P. U. Krishnaraj, S. P. S. Khanuja. 2000. Mineral phosphate solubilization: Agronomic implications, mechanism and molekular genetics. *Proc. Indian natn. Sci. Acad. (PINSIA)* B66 Nos 2 & 3. 69-82
- Barea, J. M, M. J. Pozo, R. Azcon, C. Azcon-Aguilar. 2005. Microbial co-operation in the rhizosfer. *Journal of Experimental Botany* 56, 1761-1778.
- Barriuso, J., B. R. Salano, J. A. Lucas, A. P. Lobo, A. G Vilaraco dan F. F. G. Manero. 2008. Ecology, genetic diversity and screening strategies of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) di dalam *Plant-bacteria interctions. Strategies and techniques to promote plant growth.* (ed. Ahmad, I., J. Pichtel dan S. Hayat). Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim, hlm.1-17.
- Barrow, G. I. , R. K. Feltham. 1993. *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. 3th Edition.* Cambrige. Cambridge University Press.

- Benson, H. J. 1990. *Microbiological Applications A Laboratory Manual in General Microbiology Fifth Edition*. Dubuque. Wm.C.Brown Publishers, hlm. 52-54.
- Berger, S., A. K. Sinsa dan T. Roitsch. 2007. Plant shysiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany*. 15: 4019-4026.
- Brundrett, M., N. Bougher, B. Dell, T. Grove, N. Malajczuk. 1996. *Working with Mycorrhiza in Forestry and Agriculture*. CSIRO. Wembley.
- Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clement, E. A. Barka. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principle, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. and Environ. Microbiol.* 7: 4951-4959.
- Finley, R.D. 2007. The fungi in soil di dalam Modern Soil Microbiology edisi ke 2 (ed. J.D. van Elsas, J.K. Jansson dan J.T. Trevors). CRC Press, hlm.107-146.
- Gyaneshwar, P., G. N. Kumar, L. J. Parekh dan P. S. Poole. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil* 245:83-93.
- Hammerschmidt, R., R. L. Nicholson. 2000. A survey of plant defense responses to pathogen di dalam *Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores* (ed. A. A. Agrawal, S. Tuzun, E. Bent). Minnesota. APS Press, hlm. 55-72 .
- Jeffries, P., S Gianinazzi, S Perotto, K Turnau dan J M Barea. 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biol. and Fertil. of Soil*. 37: 1 – 16.
- Jeon, J. S, S. S Lee, H. Y. Kim, T. S. Ahn, H. G. Song. 2003. Plant growth promotion in soil by some inoculated microorganism. *J. Microbiol.* 41: 271-276.
- Khan, A. A., G. Jilani, M. S. Akhtar, S. M. S. Naqvi, M. Rasheed. 2009. Phosphorus solubilizing bacteria: Occurrence, mechanisms and their role in crop production. *J. Agric. Biol. Sci.* 1: 48-58.
- Lioussanne, L. 2010. Review. The role of the arbuscular mycorrhiza-associated rhizobacteria in the biocontrol of soilborne phytopathogens. *Spanis Journal of Agricultural Research* 81, 851-861.
- Mulya, K., M. Watanabe, M. Goto, Y. Takikawa, S. Tsuyumu. 1996. Suppression of bacterial wilt disease of tomato by root-dipping with *Pseudomonas fluorescens* Pseudomonad pendarfluorG32. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 62: 134-140.
- O'Connor, P. J., S. E. Smith, F. A. Smith. 2001. Arbuscular mycorrhizal associations in the southern Simpson Desert. *Australian Journal of Botany* 49: 493–499.
- Prasetyo, B. H., D. Santoso, L. R. Widowati. 2005. *Petunjuk Teknis Analisa Kimia Tanah, Tanaman, Air dan Pupuk*. Balai Penelitian Tanah. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Jakarta. Departemen Pertanian.
- Sarode, P. D., M. P. Rane, B. L. Chaudhari, S. B. Chincholkar. 2007. Screening for siderophore production PGPR from black cotton soils of North Maharashtra. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy* 1: 96-105.
- Smith. S.E., D.J. Read. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd Edition. San Diego Academic Press, hlm. 11-145.
- Sudarmadji, S., B. Haryono, Suhardi. 1997. *Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta. Liberty.
- Suwarso, A. Herawati, A. Rachman, Slamet. 1999. Pemuliaan tembakau Madura. *Tembakau Madura Monograf Ballitas N0.4*. Balai Peneltian Tembakau dan Tanaman Serat Malang.

Vega, N. W. O. 2007. A review on beneficial effects of rhizosfer bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake. *Rev. Fac. Nat. Agr. Medellin* 60: 3621-3643.