

OPTIMASI PRODUKSI HORMON, NITROGEN TOTAL DAN KEPADATAN SEL *AZOTOBACTER* PADA INOKULAN CAIR MELALUI PENAMBAHAN FE DAN MO

Production optimization of hormones, total nitrogen, and density of *Azotobacter* on inoculant liquid trough addition Mo and Fe

NANA DANAPRIATNA^{1,*}), BENNY HUTAGALUNG²), REGINAWANTI HINDERSAH³)

¹ Fakultas pertanian Universitas Islam "45", Jl. Cut Mutiah 83 Bekasi 17113,

² Alumni Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran,

³ Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran,

ABSTRACT

Production of liquid biofertilizer *Azotobacter* requires pure inoculum with N₂ fixation capacity, hormone production, and optimal cell density. This research was conducted to determine the effect of Fe-Mo microelement and *Azotobacter* inoculant concentration on enhancement of hormones and total nitrogen content as well as *Azotobacter* population in liquid culture. The experiment used Randomized Completely Design with six treatments and three replications. The treatments were combination of inoculant concentration (without, 5%, 10% and 15%) and Fe-Mo solution (with and without Fe-Mo). The result showed that addition of Fe and Mo microelements in liquid culture increased Cytokinin production as well as population density of *Azotobacter*. Inoculant concentration of 10% with the addition of micronutrients Fe and Mo was able to optimize the production of hormones, nitrogen fixation, and cell density of *Azotobacter*.

Keywords : Fe, Mo, Total Nitrogen, Hormone, *Azotobacter*

PENDAHULUAN

Pupuk hayati yang banyak dikembangkan di sawah untuk mengurangi dosis pupuk N anorganik adalah pemfiksasi nitrogen (N₂) blue green algae (BGA) dan *Azolla* (Roger, 1992). Penanaman padi tanpa penggenangan (Uphoff *et al.*, 2002) memberi peluang untuk aplikasi bakteri aerob pemfiksasi N₂ di lahan sawah. Ekosistem sawah memiliki fase aerob dan anaerob yang saling berdekatan. Rizosfer memiliki aktivitas mikroba yang didukung oleh ketersediaan oksigen dan komponen karbon yang dilepaskan akar. Selain itu, zone nonrizosfer di sawah memiliki lapisan tanah oksidatif (Roper & Ladha, 1995). Dengan demikian rizobakteri pemfiksasi N₂ aerob dapat beraktivitas di tanah sawah. Salah satu bakteri pemfiksasi N₂ aerobik adalah *Azotobacter* yang mampu memfiksasi

gas nitrogen (N₂) secara non simbiotik. *Azotobacter* juga berperan sebagai rizobakteri pemacu pertumbuhan tanaman (*plant growth promoting rhizobacteria*) yang menghasilkan berbagai hormon tumbuh giberelin dan sitokinin (Hindersah *et al.*, 2003. Hormon sitokinin dan giberelin penting dalam merangsang pertumbuhan akar dan pupus (Berkum & Bohlool, 1980; Marschner, 2002; Taiz & Zeiger, 2002).

Sel bakteri pemfiksasi N₂ mempunyai enzim yang berperan dalam konversi N₂ menjadi NH₃ yaitu dinitrogen reduktase dengan kofaktor besi (Fe). Ion Fe berperan dalam transport ion pada rantai pernafasan organisme aerob sebagai heme yang berperan sebagai gugus prostetik pada sitokrom (Keeton, 1980).

Rantai pernafasan menghasilkan energi dalam bentuk ATP baik untuk fiksasi nitrogen, produksi fitohormon maupun pembelahan sel. Peran ATP dalam fiksasi nitrogen yang berkaitan dengan keberadaan logam adalah pada saat fiksasi N₂ protein Fe harus dapat

^{*)} Alamat Korespondensi:
Email: nadaprina@yahoo.co.id

menghidrolisis MgATP yang disertai dengan transfer elektron ke protein Fe-Mo (Taiz dan Zeiger, 2002; Saika dan Jain, 2007). Jika fiksasi N₂ meningkat maka proliferasi sel dipercepat sehingga bakteri lebih cepat mencapai fase logaritmik akhir saat hormon diproduksi (Taller & Wong, 1989).

Peran logam Fe dan Mo secara langsung dalam produksi fitohormon *Azotobacter* belum banyak dijelaskan. Namun, secara tidak langsung kedua logam tersebut diyakini akan berperan dalam produksi fitohormon mengingat Fe dan Mo adalah logam penting dalam fiksasi N₂ yang meregulasi pertumbuhan sel *Azotobacter* pada kondisi kahat N.

Kemampuan *Azotobacter* dalam menghasilkan sitokinin dan giberelin menyebabkan rizobakteri ini telah dikembangkan sebagai pupuk hayati. Produksi pupuk hayati cair yang mengandung *Azotobacter* memerlukan inokulan murni *Azotobacter* dengan kapasitas fiksasi N₂, produksi hormon dan kepadatan sel optimal. Mengingat pentingnya peran unsur hara mikro Fe dan Mo dalam metabolisme *Azotobacter*, maka optimasi dapat dilakukan dengan menambahkan kedua logam tersebut ke dalam kultur cair saat produksi inokulan.

Tujuan penelitian untuk mengetahui pengaruh penambahan unsur hara mikro Fe-Mo terhadap produksi hormon, nitrogen total dan populasi *Azotobacter* di dalam inokulan cair yang diproduksi pada beberapa konsentrasi inokulan *Azotobacter*.

BAHAN DAN METODE

Tempat Penelitian. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi dan Bioteknologi Tanah, Jurusan Ilmu Tanah dan Manajemen Sumberdaya Lahan, Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran. Bakteri *Azotobacter chroococcum* diisolasi dari rizosfir padi sawah varietas Ciherang yang tumbuh di areal persawahan Kecamatan Rengasdengklok-Karawang; Bakteri dikultur pada media cair Ashby dengan penambahan larutan mikro Fe-Mo. Komposisi larutan mikro terdiri dari 1.45 g FeCl₃ dan 0.253 Na₂MoO₄ dalam 1 liter akuades (Hindersah *et al.* 2000).

Rancangan Penelitian. Percobaan ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap yang terdiri dari enam kombinasi perlakuan konsentrasi inokulan (5, 10 dan 15

%) dan unsur hara mikro (dengan dan tanpa) dengan tiga ulangan.

Respon yang diamati adalah (a) N-Total dengan metode Kjeldahl; (b) Produksi hormon giberelin dan sitokinin yang akan diukur dengan HPLC (High Performance Liquid Chromatography) menurut Chen (1987) yang dimodifikasi oleh Hindersah *et al.* (2003); (c) Populasi bakteri yang ditentukan dengan metode Pengenceran Plat (Schinner *et al.*, 1995).

Pengujian perbedaan pengaruh rata-rata perlakuan dilakukan dengan uji F pada taraf 5 %. Apabila perbedaan rata-rata perlakuan berpengaruh nyata maka pengujian dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan pada taraf 5 % (Gasperz, 1991).

Pelaksanaan Penelitian. Persiapan bakteri dilakukan dengan cara membuat kultur baru dari media agar miring ke media cair. Cara pembuatan kultur cair yaitu dengan menyiapkan 5 mL NaCl fisiologis dan ditambahkan ke dalam satu agar miring biakan murni. Koloni bakteri dilepaskan dari agar, kemudian dituangkan ke dalam tabung reaksi steril dan ditambah dengan NaCl fisiologis 5 ml setelah itu dicampur/dikocok menggunakan pengocok vortex. Kepadatan sel pada *Azotobacter* di dalam kultur dihitung dengan metode langsung menggunakan Bilik Hitung (*Counting Chamber/Haemocytometer*) Kultur cair *Azotobacter* dengan konsentrasi sesuai perlakuan dimasukkan ke dalam 50 ml media Ashby cair di dalam tabung Erlenmeyer 100 ml. Larutan unsur hara (Fe-Mo) ditambahkan ke dalam media sesuai dengan konsentrasi perlakuan. Kultur ditempatkan di atas *shaker* pada 115 rpm dengan suhu kamar 30 °C selama 72 jam. Produksi hormon, kapasitas penambatan nitrogen dan kepadatan sel di dalam kultur akan diamati pada 72 jam setelah inkubasi.

Analisis Kandungan Hormon. Ekstraksi hormon dari sel bakteri dilakukan menurut metode Chen (1987) yang dimodifikasi oleh Hindersah *et al.* (2003). Sebanyak 50 ml kultur ditambah dengan metanol (85:15), kemudian diblender pada kecepatan 2.000 rpm selama beberapa menit. Setelah itu larutan disaring dengan kertas saring Whatman no.40 dan diliofilisasi (*Freeze-drying*) sampai mencapai volume 50 ml. Sebanyak 1 ml ekstrak dikromatografi kolom dengan menggunakan

kolom kontinyu yang terdiri atas PVP (Polyvinil Piroolidon), kolom sekap C_{18} dan kolom penukar kation SCX dengan pengemulsi etanol. Tinggi dan diameter kolom masing-masing 2 cm dan 1 cm. Fraksi (1 ml) dikoleksi setelah 1 jam. Selanjutnya 1 μ l fraksi di atas dianalisis dengan HPLC fasa terbalik dengan menggunakan kolom μ -Bondapak $C_{18}/280$ nm. Pelarut asetonitril (60:40) pada laju alir 1.0 ml/menit yang dioperasikan pada suhu kamar. Adanya hormon dideteksi dengan detektor UV-VIS Spektrofotometer pada panjang gelombang 254 nm berdasarkan luas area yang dibandingkan dengan beberapa sitokinin dan giberelin.

Analisis Nitrogen Total. Penetapan kadar N-Total dilakukan dengan metode Kjeldahl. Kultur bakteri disentrifugasi 13.000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit untuk mengendapkan bakteri dan fraksi padat lainnya. Supernatan dikoleksi untuk penetapan N total.

Analisis Populasi *Azotobacter*. Penentuan kepadatan sel *Azotobacter* di dalam kultur cair ditentukan dengan metode pengenceran plat menurut Schinner *et al.* (1995). Satu ml kultur cair diencerkan dengan NaCl fisiologis steril

sampai 10^{-7} atau 10^{-8} , dan dari setiap pengenceran diambil 0,5 ml untuk ditumbuhkan di lempeng agar Ashby dengan cara tuang. Kultur diinkubasi pada suhu 30 °C selama 3 hari. Koloni yang terbentuk dihitung dan populasi bakteri per ml ditentukan dengan membagi jumlah koloni oleh faktor pengenceran.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kepadatan Sel *Azotobacter chroococcum*. Penghitungan akhir (setelah inkubasi 72 jam) menggunakan metode Pengenceran Plat, yang menghitung bakteri yang tumbuh pada media, yaitu bakteri yang hidup. Kepadatan sel *Azotobacter* sebelum inkubasi adalah $3,61 \times 10^7$ sel mL^{-1} dan pada tahap akhir menjadi 10^9 CFU mL^{-1} . Peningkatan jumlah bakteri ini karena terpenuhinya nutrisi yang mendukung pertumbuhannya. Tabel 2 menunjukkan bahwa pada setiap konsentrasi inokulan pemberian larutan Fe-Mo (1.45 g FeCl_3 dan 0.253 g Na_2MoO_4 per 1 L aquades) berpengaruh terhadap kepadatan sel *Azotobacter*.

Tabel 2. Pengaruh pemberian larutan Fe-Mo terhadap kepadatan sel *Azotobacter chroococcum*.

Perlakuan	Kepadatan Sel ($\times 10^9$ CFU)
T1 (Inokulan 5%; tanpa larutan Fe-Mo)	1,13a
T2 (Inokulan 5%; dengan larutan Fe-Mo)	1,43ab
T3 (Inokulan 10%; tanpa larutan Fe-Mo)	1,07a
T4 (Inokulan 10%; dengan larutan Fe-Mo)	1,60ab
T5 (Inokulan 15%; tanpa larutan Fe-Mo)	1,00a
T6 (Inokulan 15%; dengan larutan Fe-Mo)	1,90b

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama, tidak berbeda nyata menurut Uji Duncan pada taraf 5%.

Populasi suatu mikroorganisme di suatu tempat sangat dipengaruhi oleh ketersediaan nutrisi. Tabel 2 memperlihatkan bahwa kepadatan sel bakteri lebih tinggi dengan adanya penambahan larutan Fe-Mo daripada yang tidak mendapat penambahan larutan Fe-Mo. Penambahan larutan Fe-Mo pada konsentrasi inokulan 5 % dan 10 % tidak berpengaruh terhadap peningkatan kepadatan sel *Azotobacter* dibandingkan dengan kultur tanpa larutan Fe-Mo, tetapi terdapat potensi bahwa penambahan larutan mikro Fe-Mo

mampu meningkatkan kepadatan sel bakteri. Pada konsentrasi inokulan 15 % penambahan larutan Fe-Mo dengan nyata mampu meningkatkan kepadatan sel *Azotobacter* sebesar 90 %. Dalam pertumbuhannya *Azotobacter* maupun bakteri lainnya menggunakan nutrisi yang tersedia dalam media sebagai proses pendukung metabolismenya (Lay & Hastowo, 1992). Penambahan larutan Fe-Mo berpotensi meningkatkan kepadatan sel di dalam kultur pada setiap konsentrasi inokulan. Peningkatan

populasi *Azotobacter*, seperti halnya bakteri pemfiksasi N lain, terjadi jika proses fiksasi berlangsung optimal di media yang bebas N. Bakteri ini menggunakan nitrogen bebas untuk sintesis sel protein (Becking, 1992). Dengan tercukupinya kebutuhan unsur hara Fe-Mo maka aktivitas nitrogenase menjadi optimal dalam memfiksasi nitrogen bebas dan perkembangan populasi bakteri menjadi optimal pula.

Peningkatan ini juga penting karena akan meningkatkan aktivitas *Azotobacter* dalam memfiksasi N dan memproduksi hormon, serta meningkatkan jumlah sel bakteri mati yang merupakan sumber nitrogen di dalam tanah setelah bakteri tersebut mengalami dekomposisi (Sprent & Sprent, 1990).

Produksi Hormon Sitokinin dan Giberelin oleh *Azotobacter chroococcum*. Kultur cair

Tabel 3. Pengaruh pemberian larutan Fe-Mo terhadap produksi hormon sitokinin dan giberelin *A. chroococcum*

Perlakuan	Hormon Sitokinin (ppm)	Hormon Giberelin (ppm)
T1 (Inokulan 5%; tanpa larutan Fe-Mo)	9,73a	17,01a
T2 (Inokulan 5%; dengan larutan Fe-Mo)	9,66a	17,84a
T3 (Inokulan 10%; tanpa larutan Fe-Mo)	13,41a	17,52a
T4 (Inokulan 10%; dengan larutan Fe-Mo)	19,47bc	23,70a
T5 (Inokulan 15%; tanpa larutan Fe-Mo)	20,04c	24,05a
T6 (Inokulan 15%; dengan larutan Fe-Mo)	13,81ab	17,53a

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama, tidak berbeda nyata menurut Uji Duncan pada taraf 5%.

Pengaruh pemberian larutan Fe-Mo terhadap produksi hormon sitokinin berbeda pada setiap konsentrasi inokulan. Pada konsentrasi inokulan 5 % penambahan larutan Fe-Mo tidak meningkatkan produksi sitokinin. Pada konsentrasi inokulan 10 % penambahan larutan Fe-Mo mampu meningkatkan produksi sitokinin sebesar 31,12 %. Sedangkan pada konsentrasi 15 % penambahan larutan Fe-Mo menurunkan produksi sitokinin sebesar 31,08 %. Penurunan ini diduga karena bakteri dalam media belum mencapai fase logaritmik akhir saat produksi optimal sitokinin (Taller & Wong, 1989).

Menurut Atlas dan Bartha (1998) metabolisme bakteri, tidak hanya dipengaruhi oleh kondisi fisik dan kimia lingkungan, tetapi oleh interaksi di dalam populasi. Peningkatan

A. chroococcum yang telah diinkubasikan selama 72 jam (fase logaritmik akhir) mengandung sitokinin dan giberelin, yang memperlihatkan kemampuan bakteri dalam mensintesis dan mensekresikan kedua hormon tersebut. Pemberian larutan Fe-Mo berpengaruh nyata terhadap produksi hormon sitokinin tetapi tidak berpengaruh nyata terhadap produksi hormon giberelin (Tabel 3). Menurut (Salmeron *et al.* 1990) selain sitokinin *Azotobacter* juga menghasilkan hormon giberelin dan auksin. Sampai saat ini sejumlah penelitian telah membuktikan kemampuan rizhobakteri *Azotobacter chroococcum*, *A. beijerinckii*, *A. paspali* maupun *A. vinelandii* dalam memproduksi hormon terutama sitokinin (Hindersah *et al.* 2003)

kepadatan sel bakteri dalam suatu populasi akan mendorong terbentuknya metabolit yang merugikan ataupun mengubah jenis metabolit yang dihasilkan atau mengubah arah sintesis yang protein sebagai akibat dari interaksi negatif. Hal tersebut diduga sebagai penyebab terjadinya perbedaan produksi hormon sitokinin yang dihasilkan pada tiap konsentrasi inokulan.

Pengaruh Fe dan Mo terhadap konsentrasi giberelin tidak tergantung dari konsentrasi awal inokulan (Tabel 3). Walaupun secara statistik tidak nyata, penambahan larutan mikro Fe-Mo pada inokulan 5 % dan 10 % meningkatkan giberelin masing-masing 4,87 % dan 35,27 % dibandingkan dengan tanpa larutan Fe-Mo. Fakta ini menunjukkan bahwa inokulan *Azotobacter* yang ditambah larutan

Fe-Mo berpotensi dalam mensintesis giberelin.

Sejauh ini belum banyak penelitian yang menjelaskan pengaruh larutan Fe-Mo terhadap sintesis hormon sitokinin dan giberelin. Sejumlah penelitian mampu memperlihatkan kemampuan *Azotobacter* dalam memproduksi hormon sitokinin saja. Hasil penelitian Hindersah (2000), *Azotobacter sp* yang diisolasi dari rizosfir tomat dan dikulturkan di media bebas N mengekskresikan sitokinin sebanyak 10.13 µg/mL dan GA₁ sebanyak 13.57 µg mL⁻¹. Isolat *Azotobacter* yang diisolasi dari rizosfir bibit *lettuce* memperlihatkan adanya 0.04 ppm

sitokinin dan adanya 1.9 ppm GA₃, 0.9 ppm GA₅ dan 1.0 ppm GA₇ (Hindersah *et al*, 2003a).

Nitrogen Total *Azotobacter chroococcum*.

Nitrogen adalah salah satu unsur hara utama yang sangat penting dalam seluruh proses biokimia di tanaman. Pada media kultur yang tidak terdapat N bebas, sistem nitrogenase dapat mereduksi N molekul, sehingga aktivitas tersebut dapat dijadikan dasar untuk menentukan potensi bakteri dalam menambat N bebas dari udara. Pemberian larutan Fe-Mo pada konsentrasi inokulan yang berbeda-beda berpengaruh nyata terhadap jumlah nitrogen total yang dihasilkan oleh *Azotobacter* setelah 72 jam inkubasi (Tabel 4).

Tabel 4. Pengaruh pemberian larutan Fe-Mo terhadap nitrogen total *A. Chroococcum*

Perlakuan	N total (%)
T1 (Inokulan 5%; tanpa larutan Fe-Mo	1,49a
T2 (Inokulan 5%; dengan larutan Fe-Mo	2,17b
T3 (Inokulan 10%; tanpa larutan Fe-Mo	1,95b
T4 (Inokulan 10%; dengan larutan Fe-Mo	2,26b
T5 (Inokulan 15%; tanpa larutan Fe-Mo	1,95b
T6 (Inokulan 15%; dengan larutan Fe-Mo	2,17b

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama, tidak berbeda nyata menurut Uji Duncan pada taraf 5%.

Penambahan larutan Fe-Mo pada konsentrasi inokulan 5 % berpengaruh nyata terhadap nitrogen total setelah 72 jam inkubasi dibandingkan dengan kultur tanpa larutan Fe-Mo. Pada konsentrasi inokulan 10 % dan 15 % penambahan larutan Fe-Mo tidak memberikan pengaruh nyata terhadap nitrogen total. Secara umum dapat dilihat bahwa penambahan larutan Fe-Mo pada berbagai konsentrasi inokulan mampu meningkatkan nitrogen total.

Kedua unsur hara mikro Fe dan Mo sangat berperan dalam fiksasi nitrogen oleh *Azotobacter*. Umumnya, reduksi N₂ dikatalisis oleh nitrogenase yang mengandung molibdenum (MoFe-N₂ase), namun dalam beberapa bakteri diazotroph, molibdenum tidak diperlukan. Dalam *Azotobacter chroococcum* (Robson *et al*, 1986), vanadium tampaknya bertindak sebagai pengganti molibdenum dalam nitrogenase vanadium (VFe-N₂ase). Brock, *et al* (1994), menyatakan bahwa *Azotobacter chroococum* mampu tumbuh dan mereduksi N₂ tanpa kehadiran molibdenum yang berfungsi dalam pembentukan nitrogenase. Jika bakteri ini

ditempatkan pada media yang kekurangan amonia dan molybdenum tetapi mengandung logam vanadium, maka bakteri ini akan menghasilkan vanadium nitrogenase menggantikan posisi molibdenum yang berfungsi menstimulasi pengikatan nitrogen.

SIMPULAN

Penambahan larutan mikro Fe dan Mo pada inokulan cair memberikan pengaruh positif terhadap peningkatan produksi hormon sitokinin, fiksasi nitrogen dan kepadatan sel *Azotobacter*, tapi tidak berpengaruh terhadap produksi giberelin. Komposisi 10% inokulan cair *Azotobacter* dengan penambahan larutan Fe dan Mo merupakan komposisi terbaik untuk produksi inokulan cair. Komposisi tersebut mampu menghasilkan inokulan dengan produksi hormon sitokinin dan giberelin, fiksasi nitrogen total dan kepadatan sel *Azotobacter* terbaik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada staf laboratorium Biologi dan Bioteknologi Faperta UNPAD atas bantuan analisis dan Badan

Penelitian dan Pengembangan Pertanian Deptan atas pendanaan melalui program KKP3T.

DAFTAR PUSTAKA

- Atlas, R.M & R. Bartha. 1998. Microbial Ecology: Fundamentals and Applications. Addison-Wesley Publishing Company. London
- Becking, J.H., 1992. The family Azotobacteraceae. In: Balows, A., Tru  per, G.H., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H. (Eds.), The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. 2nd ed., vol. 4, Springer, Germany, pp. 3144-3170.
- Berkum, Van P. & B.B. Bohlool. 1980. Evaluation of Nitrogen Fixation by Bacteria in Association With Roots of Tropical Grasses. Microbiol. Rev. 44(3): 491 -517.
- Brock, T. D. M.T. Madigan & J. Martinko. 1994. Biology Of Microorganism, New Jersey. Prentice - Hall. seventh edition.
- Chen. C.M. 1987. Characterization of Cytokinins and Related Compounds by HPLC dalam Linskens. HF. And J.F Jackson (ed.) High Performance Liquid Chromatography in Plant Science. Springer-Verlag. Berlin.
- Triplett, E.W. 2000 Prokaryotic Nitrogen Fixation – A Model System for the Analysis of a Biological Process. Norfolk, UK: Horizon Scientific Press, 800pp.
- Gaspersz, V. 1991. Metode Perancangan Percobaan. Armico. Bandung.
- Hindersah, R, D.H. Arief, & Y. Sumarni. 2000. Kontribusi Hormonal *Azotobacter chroococcum* pada Pertumbuhan Kecambah Jagung Sistem Kultur Cair. Prosiding Seminar Nasional Bioteknologi Pertanian.
- Hindersah, R, D.H. Arief, & Y. Sumarni. Totowarsa. 2003. Produksi Hormon Sitokinin oleh *Azotobacter*. Prosiding Kongres dan Seminar Nasional HITI, Padang, Juli 2003. Hal 549-555
- Hindersah, R., Setiawati, M.R. & Fitriatin, B.N. 2003a. Inokulasi *Azotobacter* sp. Melalui Filosifr dan Rizosfir pada Pembibitan Selada lettuce (*Lactuca sativa* L.). Laporan Penelitian. Lembaga Penelitian Universitas Padjadjaran. Bandung.
- Keeton, W. T. (1980), Biological Science. 3rd Ed. W. W. Norton and Company, New York, 844-845.
- Lay, B. W. dan Hastowo. 1982. Mikrobiologi. Rajawali Press Jakarta.
- Marschner, H. 2002. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd ed. Academic Press. London
- Robson, R. L., R. R. Eady, T. H. Richardson, R. W. Miller, M. Hawkins, and J. R. Postgate. 1986. The alternative nitrogenase of *Azotobacter chroococcum* is a vanadium enzyme. Nature (London) 322:388-390.
- Roger, P.A. 1992. An Introduction to Blue-Green Algae and Their Role In Paddy Fields. The International Network On Soil fertility and Fertilizer Evaluation For Rice (INSFFER). IRRI. ORSTOM and Soil Microbiologist. France.
- Roper, M.M. and J.K. Ladha. 1995. Biological N₂ fixation by heterotrophic and phototrophic bacteria in association with straw. Plant and Soil 174 (1-2):211-224
- Saika, S.P. and V. Jain. 2007. Biological nitrogen fixation with non-legumes : An achievable target or dogma? Current Sci. 92 (3) : 317 – 322.
- Salmeron V., M.V. Martinez-Toledo & J. Gonzalezlopez. 1990. Nitrogen Fixation and Production of Auxins, Gibberellins and Cytokinin by an *Azotobacter chroococcum* Strain Isolated from Root of *Zea mays* in Presence of Insoluble Phosphate. Chemosphere, 20:417-422.
- Schinner, F., R., E. Ohlinger. Kandeler, and R. Margesin. 1995. Methods in Soil Biology. Springer-Verlag. Berlin.
- Simarmata, T. 2011. Management of water saving and organic based fertilizers technology for remediation and maintaining the health of paddy soils and tio increase the sustainability of rice productivity in Indonesia. International Conference on Sustainable Agriculture and Food : *Challenges and opportunities*. Bandung 27-28 September 2011.
- Sprent, J.I. & P. Sprent. 1990. Nitrogen Fixing Organisms, Pure and Applied Aspects. Chapman and Hall. London.
- Taiz, L. and E. Zeiger. 2002. Plant physiology. 3rd ed. Sinauer Associates.
- Taller, B.J. & Wong, T.Y. 1989. Cytokinins in *Azotobacter vinelandii* Culture Medium. Appl. Environ. Microbiol. 55: 266-267.
- Uphoff, N., E.C.M. Fernandes, Y. Longping, P. Jiming, S. Rafaralahy and J. Rabenandrasana. 2002. Assesment of System of Rice Intensification. Proceeding of International Conference of SRI. Sanya China. April 1-4. 2002.