

POTENSI BAKTERI ENDOFIT ASAL TANAMAN LADA SEBAGAI PELARUT FOSFAT DAN PENGIKAT NITROGEN SERTA PENGHASIL IAA

Potency of Endophytic Bacteria from Black Pepper as Phosphate Solubilization, Nitrogen Fixation and IAA Production

GUSMAINI DAN ANDRIANA KARTIKAWATI

Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
Jl. Tentara Pelajar No.3 Bogor, 16111

e-mail: gusmaini672@gmail.com

Diterima : 31-07-2018

Direvisi : 28-02-2019

Disetujui : 10-05-2019

ABSTRAK

Potensi bakteri endofit untuk meningkatkan pertumbuhan tanaman sudah banyak diketahui. Namun bakteri endofit indigenus tanaman lada, baik lada yang sudah dibudidayakan maupun lada liar belum banyak dilakukan penelitian. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Rumah Kaca Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat Bogor, Jawa Barat pada bulan Juni 2015–April 2016. Penelitian bertujuan untuk mengisolasi dan mengkaraktisasi potensi bakteri endofit yang berasal dari tanaman lada budidaya dan liar sebagai pelarut P, pengikat N, dan penghasil hormon IAA in vitro. Bakteri endofit diisolasi dari akar dan daun tanaman lada budidaya dan lada liar. Permukaan sampel bagian tanaman disteril dengan menggunakan alkohol 70% dan sodium hypochlorite 2%. Bagian tanaman (akar dan daun) yang sehat dipilih sebagai contoh. Setiap bagian tanaman sebanyak 1 g ditimbang kemudian digerus sampai halus kemudian ekstraknya disaring dan ditumbuhkan pada medium *Trypticase Soy Agar* dengan 3 ulangan untuk tiap pengenceran. Semua isolat bakteri yang diperoleh diukur kemampuannya sebagai pelarut fosfat (P), pengikat N, dan penghasil IAA in vitro. Hasil isolasi dan karakterisasi menunjukkan kemampuan setiap bakteri endofit yang berasal dari lada budidaya dan liar yang berfungsi sebagai pemicu pertumbuhan tanaman berbeda-beda. Dari hasil isolasi diperoleh sebanyak 23 isolat dari *Piper nigrum* dan 11 isolat dari *P. colubrinum*. Bakteri endofit tersebut dapat dikelompokkan menjadi penghasil IAA (4 isolat), 21 isolat berfungsi ganda (10 isolat sebagai pengikat N₂ dan penghasil IAA serta 11 isolat sebagai pelarut P dan penghasil IAA), dan 9 isolat berfungsi ketiganya (pelarut P, pengikat N₂ dan sekaligus penghasil IAA). Hasil penelitian mengindikasikan bahwa isolat bakteri endofit tersebut dapat dimanfaatkan untuk memacu pertumbuhan tanaman. Peran bakteri endofit tersebut perlu diuji lebih lanjut aktivitas dan kestabilannya dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman.

Kata kunci : *Piper nigrum*, *Piper colubrinum*, bakteri endofit, pelarut P, pengikat N, fitohormon.

ABSTRACT

The potential of endophytic bacteria to promote plant growth has been already well known. However, research on indigenous endophytic bacteria from wild or cultivated pepper plants are still limited. The research was conducted in Microbiology Laboratory and Glass House of Research Institute for Spice and Medicinal Crops, Bogor, West Java from June 2015 to April 2016. The objective of this study was to isolate and characterize the potential of endophytic bacteria from cultivated and wild pepper plants as phosphate (P) solubilizing, N₂ fixation, and IAA hormone producers. Endophytic bacteria were

isolated from the roots and leaves of both cultivated and wild pepper plants. The surfaces part of plant samples were sterilized using alcohol 70% and sodium hypochlorite 2%. Healthy parts of plants (roots and leaves) are selected as samples. Then, 1 g of plant part was crushed into small particles, extracted, filtered and cultured on Trypticase Soy Agar medium, with 3 replications for each dilution. All bacterial isolates were assessed their capability as P solubilizing, N₂ fixation, and IAA hormone producer. The result showed the different capability of each endophytic bacteria derived from cultivated and wild pepper plants in promoting plant growth. The results of isolation of endophytic bacteria were obtained by 23 isolates from *P. nigrum* and 11 isolates from *P. colubrinum*. The endophytic bacteria could be grouped as followed: four isolates were IAA producers; 21 isolates possessed two functions (10 isolates as N₂ fixation and IAA producers, while 11 isolates as P solubilizing, and IAA producers); and nine isolates have three functions as P solubilizing, N₂ fixation, and IAA producer viz. Ca³(1)2, La⁰(2)1, La²(2)2, La⁴(1)3, La⁴(3)1, La⁴(3)2, La⁴(3)3, La⁴(3)4, and Ld⁰(2)2. All 34 endophytic bacterial isolates obtained from this study can potentially be used to improve nutrient use efficiency and accelerate plant growth. Furthermore, it is necessary to further examine the role of endophytic bacteria, which have single or multiple functions, in improving plant growth and fertilizer use efficiency for pepper plants.

Keywords : *Piper nigrum*, *Piper colubrinum*, endophytic bacteria, P solubilizing, N₂ fixation, phytohormone.

PENDAHULUAN

Lada merupakan salah satu komoditas rempah yang banyak digunakan dan Indonesia merupakan salah satu negara produsen lada terbesar di dunia. Pengembangan kawasan lada di Indonesia cukup luas, antara lain di Sumatera (Bangka Belitung dan Lampung), Kalimantan (Barat dan Timur), serta Sulawesi (Tenggara dan Selatan). Lada adalah salah satu tanaman yang cukup banyak membutuhkan hara. Rekomendasi kebutuhan hara untuk tanaman lada sudah berproduksi di Bangka diperlukan pupuk NPKMg sebanyak 2,4 kg/tan/th dan daerah Lampung sebanyak 1,6 kg/tan/th NPKMg (Wahid dan Suparman 1986). Jika dalam 1 ha terdapat 1500-1600 tanaman maka keperluan pupuk untuk daerah Bangka Belitung sebanyak 3.600-

3.840 kg/ha/th dan Lampung sebanyak 2.400-2.560 kg/ha/th.

Tingginya harga dan kebutuhan hara untuk tanaman lada menyebabkan biaya produksi menjadi sangat tinggi sehingga petani tidak maksimal menerapkan rekomendasi pemupukan pada lada. Hal tersebut merupakan salah satu penyebab rendahnya produksi lada di Indonesia. Selain itu, tingkat efisiensi pupuk yang dapat diserap tanaman rendah, sehingga bila diberikan dalam jumlah besar, tidak semua dapat diserap oleh tanaman. Tanaman hanya mampu menyerap pupuk N 55-60% (Patrick Jr. and Reddy 1976), P sebanyak 20% (Hagin and Tucker 1982), dan K sebanyak 50-70% (Tisdale et al. 1975). Untuk mengurangi tingginya kebutuhan hara tersebut diperlukan upaya untuk mengurangi kehilangan dan meningkatkan efisiensi dalam pemberian pupuk (Baligar and Bennett 1986).

Potensi bakteri endofit sebagai pemicu pertumbuhan tanaman sudah banyak diketahui. Bakteri endofit dapat menghasilkan fitohormon, seperti IAA, GA₃, dan Sitokinin (Ergün et al. 2002; Ngamau et al. 2012; Mbai et al. 2013; Zhao et al. 2015; Etesami et al. 2015). Hormon-hormon pertumbuhan tersebut berperan di dalam metabolisme tanaman sehingga dapat memacu pertumbuhan tanaman. Bakteri endofit juga dapat menambat N dari udara (Asis et al. 2004; Ramos et al. 2011; Carvalho et al. 2014), melarutkan fosfat yang ada di dalam tanah (Rodríguez and Fraga 1999; Dinić et al. 2014; Sharma et al. 2013; Manoharan et al. 2016), dan mengkelat logam Fe dari tanah (Ngamau et al. 2012; Loaces et al. 2011). Oleh karena itu, bakteri endofit mempunyai peranan yang cukup penting di dalam memacu pertumbuhan tanaman, seperti pada tanaman padi (Ji et al. 2014), benih karet (Hidayati et al. 2014), tanaman obat (*Lonicera japonica*) (Zhao et al. 2015), *Olea ferruginea* dan *Withania coagulans* (Ullah et al. 2017).

Bakteri endofit yang berasal dari tanaman lada yang berkaitan dengan kemampuannya dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman belum banyak dilakukan. Beberapa hasil penelitian menyebutkan bahwa bakteri endofit yang diisolasi dari tanaman lada umumnya berhubungan dengan serangan organisme pengganggu tanaman (OPT) seperti penyakit utama lada antara lain penyakit kuning (Munif and Kristiana 2012) dan busuk pangkal batang (Aravind et al. 2009) serta fusarium (Edward et al. 2013).

Bakteri endofit yang dihasilkan tanaman lada mempunyai potensi dalam memacu pertumbuhan sebagaimana yang dihasilkan tanaman lain. Tiap jenis tanaman dapat menghasilkan bakteri endofit yang mempunyai fungsi spesifik. Lada yang selama ini sudah

dibudidayakan dan menjadi varietas menghasilkan lada yang unggul dalam produksi. Sebaliknya dengan tanaman lada liar, meski tidak unggul dalam produksi, namun toleran terhadap serangan OPT. Adanya spesifikasi secara genetik tersebut diharapkan akan memperoleh bakteri endofit yang sesuai dengan sifat tanaman inangnya.

Adanya potensi bakteri endofit yang mampu melarutkan P diharapkan dapat meningkatkan ketersediaan P di dalam tanah. Pengikatan N dan penghasil IAA juga diharapkan dapat membantu tanaman lada dalam meningkatkan pertumbuhannya.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji potensi bakteri endofit dari tanaman lada budidaya dan liar sebagai pelarut P, pengikat N, dan penghasil hormon IAA secara *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Rumah Kaca Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat Bogor, Jawa Barat pada bulan Juni 2015 – April 2016. Kegiatan penelitian terdiri atas beberapa tahapan, yaitu isolasi dan karakterisasi morfologi bakteri endofit, serta pengukuran aktifitas bakteri endofit dalam melarutkan fosfat, mengikat nitrogen, dan menghasilkan *Indole Acetic Acid*.

Isolasi dan Karakteristik Morfologi Bakteri Endofit

Tanaman lada varietas Natar 1 dikoleksi dari salah satu wilayah penghasil lada yaitu Lampung Timur, Provinsi Lampung dan lada liar dikoleksi dari Bogor Provinsi Jawa Barat. Penggunaan sampel lada budidaya atau varietas yang digunakan mempunyai sifat yang unggul pada produksi, tanaman mampu tumbuh dengan baik dalam hal menyerap hara dan dalam proses metabolit primer (fotosintesis), sehingga diharapkan nantinya diperoleh isolat yang sesuai dengan inangnya. Sedangkan lada liar merupakan lada yang tidak unggul dalam produksi tetapi unggul dalam ketahanannya terhadap gangguan OPT, sehingga diharapkan diperoleh isolat yang mempunyai sifat-sifat ketahanan seperti inangnya. Tanaman lada yang digunakan sebagai sampel dipilih yang memiliki kriteria sehat dan bebas penyakit. Bakteri endofit diisolasi dari tanaman lada budidaya (*Piper nigrum*), dan lada liar (*Piper collubrinum*) masing-masing 10 dengan 2 ulangan. Bagian tanaman yang diisolasi yaitu daun dan akar. Isolasi bakteri endofit dilakukan dengan cara sebagai berikut: a) Bagian tanaman (akar dan daun) dibersihkan dari kotoran dengan menggunakan air yang mengalir, dikeringkan dengan kertas filter yang steril. Permukaan daun

dibersihkan lalu dipotong seberat 1 g, disteril menggunakan alkohol 70% selama 30 detik, kemudian dilanjutkan perendaman menggunakan 2% *sodium hypochlorite* selama 2 menit. b) Masing-masing potongan bagian tanaman lada (akar dan daun) yang telah steril dibilas atau dicuci 3-4 kali dengan air steril, kemudian dikeringkan menggunakan tisu steril. Setelah bersih bagian tanaman tersebut masing-masing digerus dengan menggunakan mortar steril, lalu diberi air destilasi sebanyak 10 ml, disaring dan diambil ekstrak airnya (Hallman et al. 1997).

Ekstrak tersebut dikocok rata lalu diambil 1 ml kemudian diencerkan hingga 10^0-10^5 . Diambil 0,1 ml ekstrak, dituangkan di atas medium *Trypticase Soy Agar* (TSA) Himedia dalam cawan petri pada konsentrasi 10% lalu disebar, menggunakan metode *pour plate*. Ekstrak dalam media TSA tersebut, lalu diinkubasi pada suhu 30°C selama 24-48 jam. Koloni yang tumbuh dipisahkan dengan cara menggosokkan pada media TSA dalam cawan petri menggunakan jarum ose beberapa kali sampai benar-benar mendapatkan koloni murni (Hallman et al. 1997). Selanjutnya diamati pertumbuhan koloni bakteri endofit, berupa karakteristik morfologi meliputi bentuk koloni, bentuk elevasi, tepi, struktur dalam koloni dan warna (Holt et al. 1994). Karakterisasi morfologi koloni bakteri dilakukan setelah mendapatkan koloni murni. Pengamatan koloni dilakukan untuk membantu awal identifikasi bakteri. Isolat bakteri yang sudah murni selanjutnya disimpan dalam beberapa buah tabung reaksi berisi media TSA miring sebagai stok kerja dan stok kultur.

Pengukuran Aktivitas Pelarut Fosfat

Isolat bakteri endofit yang diperoleh dari hasil isolasi ditumbuhkan pada media agar Pikovskaya dalam cawan petri, dengan sumber fosfat $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama lima hari (Aung et al. 2011). Pada hari kelima dilakukan pengukuran diameter koloni dan diameter zona bening di sekitar isolat bakteri menggunakan penggaris. Zona bening yang terbentuk di sekitar isolat bakteri menunjukkan bahwa terdapat aktivitas pelarutan fosfat (Atekan et al. 2014). Berdasarkan ukuran diameter zona bening yang terbentuk, kemudian dihitung indeks pelarutan atau *solubilizing index* (SI). Pengamatan dilakukan setiap hari, dimulai setelah terbentuk zona bening sampai tidak terbentuk lagi zona bening. Hal tersebut dilakukan untuk melihat kemampuan dalam melarutkan P dengan mengukur diameter zona bening yang terbentuk dan mengukur diameter koloni sehingga diperoleh nilai indeks pelarutan P (IPP) dari masing-masing isolat. Cara menghitung IPP yaitu nisbah antara diameter total

(diameter koloni+diameter zona bening) terhadap diameter koloni (Yasmin and Bano 2011; (Mardad et al. 2013).

Pengujian Aktivitas Pengikat Nitrogen

Pengujian penambatan N menggunakan media malat bebas N, yang mengandung *bromothymol blue* (BTB) sebagai indikator untuk seleksi awal dan diinkubasi pada suhu 30° hingga 24 jam. Isolat bakteri ditumbuhkan pada media tersebut kemudian diamati adanya zona berwarna biru yang dihasilkan isolat ditandai sebagai pemfiksasi nitrogen dalam kondisi media kultur padat (Gothwal et al. 2008).

Pengukuran Aktivitas Bakteri Endofit sebagai Penghasil *Indole Acetic Acid* (IAA)

Analisis IAA dari bakteri endofit secara kualitatif menggunakan metode kolorimetri memakai reagen *Salkowski* (Gordon and Weber 1951). Pembuatan reagen *Salkowski* yaitu dengan mengambil 1 ml 0,5 M FeCl_3 di tambah 50 ml HClO_4 50% [v/v], selanjutnya disimpan dalam botol yang tidak tembus cahaya atau ditutup dengan aluminium foil. Isolat yang positif uji kualitatif ditandai dengan terbentuknya warna merah muda pada media kemudian dilanjutkan dengan analisis secara kuantitatif menggunakan metode spektrofotometri.

Analisis kandungan IAA secara kuantitatif dilakukan dengan metode spektrofotometri. Analisis menggunakan metode spektrofotometri menurut Gravel et al. (2007) menggunakan 100 ml media *Tryptic Soy Broth* (TSB Himedia) 50%. Precursor L-Tryptophan (200 ppm) ditambahkan ke dalam 100 ml media TSB steril, kemudian diinokulasi isolat dan diinkubasi dalam mesin rotary shaker. Setelah diinkubasi pada mesin rotary shaker diambil satu mL dan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Setelah itu supernatant yang dipisahkan dari pelet selanjutnya ditambahkan 2 ml larutan reagen *Salkowski* dan diinkubasikan selama 30 menit. Selanjutnya absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 530 nm. Konsentrasi IAA dari sampel dihitung berdasarkan kurva standard dengan standard IAA murni Merck (Gravel et al. 2007).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi Morfologi Isolat Bakteri Endofit Asal Tanaman Lada Budidaya dan Lada Liar

Bakteri endofit pada tanaman lada varietas Natar 1 (*P. nigrum*) dan lada liar (*P. colubrinum*) yang dapat diidentifikasi sebanyak 34 isolat terdiri dari 23 isolat asal *P. nigrum* dan 11 isolat asal *P. colubrinum* yang dapat

diidentifikasi di laboratorium. Karakteristik morfologi dari isolat tersebut bervariasi dilihat dari bentuk, elevasi, tepi, struktur dalam dan warna koloninya (Tabel 1).

Secara umum dilihat dari karakterisasi morfologi koloni dari hasil isolasi tersebut banyak variasinya (bentuk, elevasi, tepi, struktur dalam dan warna koloninya). Hal tersebut mengindikasikan bahwa keragaman isolat bakteri endofit cukup banyak yang diperoleh, dan yang paling banyak diperoleh dari akar tanaman. Bakteri endofit yang berasal dari jaringan akar diperoleh sebanyak 31 isolat dan yang berasal dari

jaringan daun sebanyak 3 isolat. Perakaran tanaman merupakan bagian tanaman yang langsung bersentuhan dengan media tumbuh. Kondisi ini menyebabkan peluang yang cukup besar bakteri yang ada di dalam tanah untuk berinteraksi dengan akar tanaman dan masuk ke dalam perakaran tanaman dan hidup di dalam jaringan akar tanaman lada. Beberapa hasil penelitian juga menunjukkan di dalam jaringan akar lebih banyak ragam dan jumlahnya dibandingkan dengan di dalam jaringan daun (Mendes et al. 2007; Gusmaini et al. 2013).

Tabel 1. Karakterisasi morfologi koloni isolat bakteri endofit dari tanaman lada budidaya dan liar
 Table 1. Morphological characterization of colonies endophytic bacteria from cultivated and wild pepper plants

| No | Kode Isolat/ Isolate codes | Koloni/ Colony | Elevasi/ Elevation | Tepi/ Edge | Struktur Dalam Structure | Warna/ Colour |
|---|-------------------------------|-------------------|-----------------------|---------------|-----------------------------|------------------|
| <i>Lada Liar / wild pepper (Piper collubrinum)</i> | | | | | | |
| 1 | Ca ¹ (1)2 | Melingkar | Sedikit cembung | Rata | Berbutir halus | putih keruh |
| 2 | Ca ¹ (2)1 | Melingkar | Sedikit cembung | Bergelombang | Berbutir halus | Kream |
| 3 | Ca ¹ (1)4 | Melingkar | Sedikit cembung | Rata | Berbutir halus | krem keruh |
| 4 | Ca ² (1)5 | Melingkar | Sedikit cembung | Rata | Berbutir halus | Krem |
| 5 | Ca ² (3)3 | Melingkar | Sedikit cembung | Rata | Berbutir halus | Kuning |
| 6 | Ca ³ (1)2 | Melingkar | Sedikit cembung | Bergelombang | Berbutir halus | putih bening |
| 7 | Ca ³ (1)4 | Tidak beraturan | Sedikit cembung | Berlekuk | Berbutir kasar | Kuning |
| 8 | Ca ³ (2)1 | Melingkar | Sedikit cembung | Bergelombang | Berbutir halus | putih keruh |
| 9 | Ca ³ (1)1 | Melingkar | Sedikit cembung | Bergelombang | Berbutir halus | Putih |
| 10 | Cd ¹ (2)3 | Melingkar | Sedikit cembung | Rata | Berbutir halus | putih bening |
| 11 | Cd ¹ (3)1 | Tidak beraturan | Datar tipis merata | Bergelombang | Berbutir halus | putih keruh |
| <i>Lada Budidaya / cultivated pepper (Piper nigrum)</i> | | | | | | |
| 12 | La ⁰ (2)1 | Tidak beraturan | Sedikit cembung | Bergelombang | Berombak | Pink |
| 13 | La ⁰ (2)2 | Tidak beraturan | Sedikit cembung | Bergelombang | Berbutir halus | coklat muda |
| 14 | La ¹ (2)1 | Tidak beraturan | Sedikit cembung | Bergelombang | Berbutir halus | putih bening |
| 15 | La ² (2)2 | Melingkar | Sedikit cembung | Rata | Berbutir halus | putih bening |
| 16 | La ³ (2)1 | Tidak beraturan | Sedikit cembung | Bergelombang | Berbutir halus | putih keruh |
| 17 | La ³ (3)1 | Melingkar | Sedikit cembung | Bergelombang | Berbutir halus | putih keruh |
| 18 | La ³ (3)2 | Seperti amuba | Sedikit cembung | Bersilia | Berbutir kasar | coklat muda |
| 19 | La ³ (3)3 | Melingkar | Sedikit cembung | Bergelombang | Berbutir halus | Kuning |
| 20 | La ³ (3)4 | Tidak beraturan | Sedikit cembung | Bergerigi | Halus/ licin | krem bening |
| 21 | La ⁴ (1)1 | Tidak beraturan | Sedikit cembung | Bergelombang | Berbutir halus | Putih |
| 22 | La ⁴ (1)2 | Melingkar | Sedikit cembung | Bergelombang | Berbutir halus | krem keruh |
| 23 | La ⁴ (1)3 | Melingkar | Sedikit cembung | Bergelombang | Berbutir halus | Putih |
| 24 | La ⁴ (1)4 | Melingkar | Sedikit cembung | Bergelombang | Berbutir halus | Putih |
| 25 | La ⁴ (2)1 | Melingkar | Sedikit cembung | Bergelombang | Berbutir halus | putih susu |
| 26 | La ⁴ (3)1 | Melingkar | Sedikit cembung | Bergelombang | Berbutir halus | Putih |
| 27 | La ⁴ (3)2 | Melingkar | Sedikit cembung | Bergelombang | Berbutir halus | krem keruh |
| 28 | La ⁴ (3)3 | Tidak beraturan | Sedikit cembung | Bergelombang | Berbutir halus | putih bening |
| 29 | La ⁴ (3)4 | Tidak beraturan | Sedikit cembung | Bergelombang | Berbutir halus | putih susu |
| 30 | La ⁴ (3)5 | Berkerut | Sedikit cembung | Crenate | Berbutir halus | Krem |
| 31 | La ⁵ (1)1 | Melingkar | Sedikit cembung | Bergelombang | Berbutir halus | krem keruh |
| 32 | La ⁵ (2)1 | Melingkar | Sedikit cembung | Bergelombang | Berbutir halus | kuning keruh |
| 33 | La ⁵ (2)2 | Melingkar | Sedikit cembung | Bergelombang | Berbutir halus | putih keruh |
| 34 | Ld ⁰ (2)2 | Melingkar | Sedikit cembung | Bergelombang | Berbutir halus | Merah muda |

Aktivitas Bakteri Endofit sebagai Pelarut P

Aktivitas bakteri endofit yang berpotensi sebagai pelarut diperoleh sebanyak 22 isolat yang positif sebagai pelarut P dari 34 isolat yang diukur (Tabel 2). Pengujian tersebut dilakukan secara *in vitro* dengan ditandainya pembentukan zona bening di sekeliling koloni yang ditumbuhkan pada media Pikovskaya (Gambar 1). Hal tersebut menunjukkan bahwa isolat bakteri tersebut

mempunyai kemampuan sebagai pelarut P. Secara kualitatif, kemampuan bakteri sebagai pelarut P berbeda-beda, ditunjukkan dengan indeks pelarut P yang dihasilkan. Indeks pelarut P (IPP) adalah perbandingan antara diameter zona bening yang dihasilkan oleh mikroba tersebut dengan diameter koloninya. Semakin tinggi nilai IPP maka semakin besar kemampuan isolat untuk melarutkan P.

Tabel 2. Indeks pelarutan P dari isolat bakteri endofit asal tanaman lada budidaya dan liar

Table 2. Phosphate solubilization index of endophytic bacterial isolates from cultivated and wild pepper plants

| No | Isolat Bakteri Endofit <i>Endophytic bacterial isolates</i> | Indeks pelarutan P / <i>P solubilizing index</i> | | | | | | | | | | |
|---|--|--|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---|
| | | Hari pengamatan / <i>observation days</i> | | | | | | | | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | Ket | |
| Lada Liar /wild pepper (<i>Piper collubrinum</i>) | | | | | | | | | | | | |
| 1 | Ca ¹ (1)2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 2 | Ca ¹ (2)1 | 1,17 | 1,29 | 1,29 | 1,29 | 1,43 | 1,43 | 1,57 | 1,57 | 1,57 | 1,57 | + |
| 3 | Ca ¹ (1)4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 4 | Ca ² (1)5 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 5 | Ca ² (3)3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 6 | Ca ³ (1)2 | 1,45 | 1,5 | 1,65 | 1,65 | 1,65 | 1,65 | 1,65 | 1,65 | 1,65 | 1,65 | + |
| 7 | Ca ³ (1)4 | 1,33 | 1,33 | 1,33 | 1,4 | 1,6 | 1,6 | 1,6 | 1,64 | 1,64 | 1,73 | + |
| 8 | Ca ³ (2)1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 9 | Ca ⁵ (1)1 | 1,21 | 1,21 | 1,27 | 1,33 | 1,4 | 1,53 | 1,6 | 1,88 | 1,88 | 1,88 | + |
| 10 | Cd ¹ (2)3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 11 | Cd ¹ (3)1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Lada Budidaya /cultivated pepper (<i>Piper nigrum</i>) | | | | | | | | | | | | |
| 12 | La ⁰ (2)1 | 2,08 | 2,33 | 2,42 | 2,54 | 2,57 | 2,67 | 2,69 | 2,83 | 2,83 | 2,83 | + |
| 13 | La ⁰ (2)2 | 1,47 | 1,53 | 1,6 | 1,73 | 1,73 | 1,73 | 1,73 | 1,73 | 1,73 | 1,73 | + |
| 14 | La ¹ (2)1 | 2,38 | 2,5 | 2,5 | 2,33 | 2,33 | 2,44 | 2,44 | 2,75 | 3 | 3 | + |
| 15 | La ² (2)2 | 1,2 | 1,45 | 1,67 | 2 | 2,33 | 2,53 | 2,67 | 2,87 | 2,87 | 2,87 | + |
| 16 | La ³ (2)1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 17 | La ³ (3)1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 18 | La ³ (3)2 | 1,86 | 1,86 | 2 | 2,14 | 2,14 | 2,5 | 2,63 | 3,11 | 3,11 | 3,11 | + |
| 19 | La ³ (3)3 | 3,29 | 3,43 | 3,71 | 3,5 | 3,63 | 3,44 | 3,44 | 3,56 | 3,67 | 3,67 | + |
| 20 | La ³ (3)4 | 1,2 | 1,2 | 1,8 | 1,9 | 1,9 | 1,91 | 2,27 | 2,27 | 2,27 | 2,36 | + |
| 21 | La ⁴ (1)1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1,83 | 2,5 | 2,43 | 2,43 | 2,43 | 2,57 | + |
| 22 | La ⁴ (1)2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 23 | La ⁴ (1)3 | 1,22 | 1,8 | 1,62 | 1,8 | 2,07 | 2,13 | 2,33 | 2,47 | 2,47 | 2,67 | + |
| 24 | La ⁴ (1)4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 25 | La ⁴ (2)1 | 2 | 2,17 | 2,17 | 2,5 | 2,67 | 3 | 3,33 | 4 | 4 | 4,14 | + |
| 26 | La ⁴ (3)1 | 1,14 | 1,43 | 1,86 | 2,14 | 2,29 | 2,43 | 2,71 | 2,86 | 2,86 | 2,86 | + |
| 27 | La ⁴ (3)2 | 1,1 | 1,19 | 1,26 | 1,4 | 1,43 | 1,43 | 1,43 | 1,45 | 1,45 | 1,45 | + |
| 28 | La ⁴ (3)3 | 1,58 | 1,58 | 1,67 | 1,67 | 1,75 | 1,77 | 1,85 | 1,86 | 1,86 | 1,86 | + |
| 29 | La ⁴ (3)4 | 1,33 | 1,44 | 1,6 | 1,67 | 1,86 | 2 | 2,06 | 2,06 | 2,06 | 2,18 | + |
| 30 | La ⁴ (3)5 | 1,33 | 1,47 | 1,47 | 1,5 | 1,56 | 1,58 | 1,24 | 1,24 | 1,24 | 1,24 | + |
| 31 | La ⁵ (1)1 | 1,19 | 1,19 | 1,21 | 1,26 | 1,32 | 1,32 | 1,32 | 1,32 | 1,32 | 1,32 | + |
| 32 | La ⁵ (2)1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 33 | La ⁵ (2)2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 34 | Ld ⁰ (2)2 | 2,67 | 2,78 | 3,11 | 3,11 | 3,11 | 3,33 | 3,33 | 3,33 | 3,33 | 3,33 | + |

Keterangan: (+) potensi sebagai pelarut P; (-) tidak berpotensi sebagai pelarut P

Notes : (+) potential as P solubilizer; (-) no potential as P solubilizer

Perkembangan pembentukan zona bening diamati hingga hari ke-9 menunjukkan pada hari pertama, terdapat 22 isolat yang membentuk zona bening dengan besaran yang berbeda, sehingga dihasilkan IPP yang beragam. Selain itu terdapat 12 isolat yang tidak membentuk zona bening. Hal tersebut mengindikasikan bahwa ke-12 isolat tersebut tidak berpotensi sebagai pelarut P. Pada hari pertama isolat La³(3)3 menghasilkan IPP tertinggi (3,29), perkembangannya agak lambat hingga pada hari kesembilan menghasilkan IPP sebesar 3,67. Berbeda dengan isolat La⁴(2)1 hari pertama menghasilkan nilai IPP sebesar 2, dan pada hari ke-9 menghasilkan IPP tertinggi (4,14). Ada 2 isolat yang hanya tumbuh hingga hari ke-7 (Tabel 2).

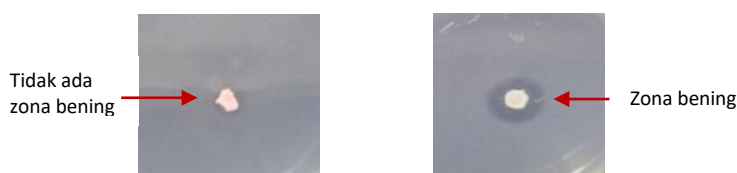
Hasil penelitian ini juga memberikan informasi bahwa asal tanaman lada bisa menghasilkan bakteri endofit pelarut P, baik dari *P. nigrum* maupun *P. colubrinum*, tetapi tidak semua isolat yang diuji bisa berfungsi sebagai pelarut P. Secara umum bakteri endofit yang berasal dari tanaman lada budidaya mempunyai IPP lebih tinggi dibandingkan dengan lada liar. IPP lebih tinggi mengindikasikan bahwa bakteri endofit yang berasal dari *P. nigrum* mempunyai kemampuan lebih baik dalam melarutkan fosfat dibandingkan dengan bakteri endofit asal *P. colubrinum*. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian (Matos et al. 2017) memperoleh isolat EB18, yang diperoleh dari mengisolasi bakteri endofit asal tanaman pisang

mempunyai zona pelarut yang terbesar, dan tanaman padi (de Abreu et al. 2017; Li et al. 2017).

Pengikatan P oleh logam di dalam mineral tanah seperti Al, Fe dan Ca, menyebabkan ketersediaan P di dalam tanah rendah. Bakteri pelarut P adalah salah satu mikroba yang dapat melepaskan P yang terikat oleh logam di dalam mineral tanah. Bakteri pelarut P mampu menghasilkan senyawa-senyawa organik yang bersifat asam, dapat melepaskan ikatan logam-logam pada mineral tanah tersebut sehingga P menjadi tidak terikat, tersedia dalam larutan tanah dan dapat diserap tanaman. Hal tersebut telah dibuktikan oleh Matos et al. (2017) yang dapat mengukur senyawa organik yang dihasilkan oleh bakteri endofit sebagai pelarut P secara in vitro yang dapat menurunkan pH media lebih besar.

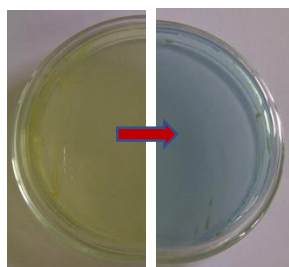
Seleksi Aktivitas Bakteri Endofit sebagai Pengikat N

Hasil seleksi 34 isolat bakteri endofit yang dihasilkan dari tanaman lada budidaya dan liar diperoleh 18 yang positif berpotensi mampu mengikat N (Tabel 3). Hal tersebut menunjukkan bahwa bakteri endofit yang berasal dari tanaman lada cukup banyak yang mampu untuk mengikat N yaitu sebesar 18,89% dari yang dapat diisolasi. Bakteri endofit yang berasal dari lada liar menghasilkan 5 isolat dan lada budidaya terdapat 13 isolat. Isolat bakteri endofit yang berpotensi sebagai pengikat N ditandai dengan perubahan warna pada media agar menjadi biru (Gambar 2).



Gambar 1. Pelarutan P secara kualitatif oleh bakteri endofit ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri

Figure 1. Qualitative phosphate solubilization of endophytic bacteria shown as a halo zone around the colony of bacteria



Gambar 2. Perubahan warna media menjadi biru merupakan indikasi adanya pengikatan N oleh bakteri endofit

Figure 2. The blue color change of agar media indicating of N fixation by the endophytic bacteria.

Tabel 3. Isolat bakteri endofit asal tanaman lada yang dapat memfiksasi N
 Table 3. Isolate of endophytic bacteria from pepper plants that can fixate N

| No. | Bakteri Endofit <i>endophytic bacteria</i> | Keterangan <i>information</i> | No. | Bakteri Endofit <i>endophytic bacteria</i> | Keterangan <i>information</i> |
|---|---|----------------------------------|-----|---|----------------------------------|
| <i>Lada Liar / wild pepper (Piper collubrinum)</i> | | | | | |
| 1 | Ca ¹ (1)2 | + | 7 | Ca ³ (1)4 | - |
| 2 | Ca ¹ (2)1 | - | 8 | Ca ³ (2)1 | + |
| 3 | Ca ¹ (1)4 | - | 9 | Ca ⁵ (1)1 | - |
| 4 | Ca ² (1)5 | - | 10 | Cd ¹ (2)3 | + |
| 5 | Ca ² (3)3 | + | 11 | Cd ¹ (3)1 | - |
| 6 | Ca ³ (1)2 | + | | | |
| <i>Lada Budidaya / cultivated pepper (Piper nigrum)</i> | | | | | |
| 12 | La ⁰ (2)1 | + | 24 | La ⁴ (1)4 | + |
| 13 | La ⁰ (2)2 | - | 25 | La ⁴ (2)1 | - |
| 14 | La ¹ (2)1 | - | 26 | La ⁴ (3)1 | + |
| 15 | La ² (2)2 | + | 27 | La ⁴ (3)2 | + |
| 16 | La ³ (2)1 | + | 28 | La ⁴ (3)3 | + |
| 17 | La ³ (3)1 | + | 29 | La ⁴ (3)4 | + |
| 18 | La ³ (3)2 | - | 30 | La ⁴ (3)5 | - |
| 19 | La ³ (3)3 | - | 31 | La ⁵ (1)1 | - |
| 20 | La ³ (3)4 | - | 32 | La ⁵ (2)1 | - |
| 21 | La ⁴ (1)1 | - | 33 | La ⁵ (2)2 | + |
| 22 | La ⁴ (1)2 | + | 34 | Ld ⁰ (2)2 | + |
| 23 | La ⁴ (1)3 | + | | | |

Keterangan : (+) potensi sebagai pengikat N; (-) tidak berpotensi sebagai pengikat N.

Notes : (+) potential as N₂fixation; (-) no potential as N₂fixation.

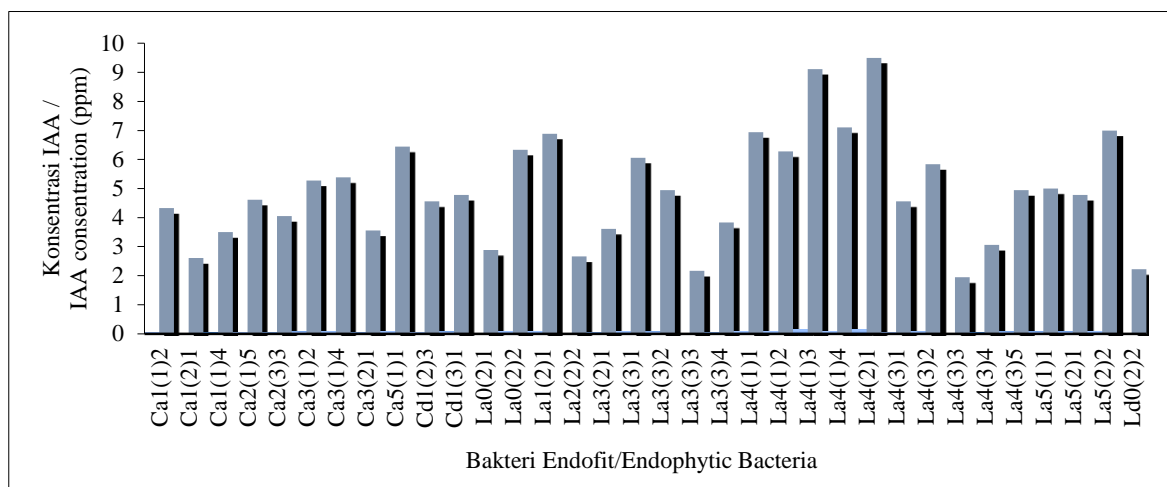
Potensi isolat bakteri endofit sebagai pengikat N bagi tanaman juga telah banyak dihasilkan dari tanaman lain seperti pada tanaman tebu (Muangthong et al. 2015), gandum (Silveira et al. 2016) dan padi (Banik et al. 2016). Isolasi bakteri endofit berasal dari tanaman lada yang berpotensi sebagai pengikat N belum banyak dilakukan.

Unsur N merupakan unsur esensial dan diperlukan dalam jumlah yang cukup besar pada fase pertumbuhan tanaman. Nitrogen di dalam tanah bersifat *mobile* yaitu mudah hilang baik menguap ke udara maupun tercuci oleh adanya hujan sehingga efisiensinya sangat rendah. Tanaman-tanaman tertentu seperti tanaman yang menghasilkan daun merupakan tanaman yang cukup besar dalam membutuhkan N. Adanya bakteri endofit yang berpotensi sebagai pengikat N tersebut memberikan harapan penggunaan bakteri endofit membantu dalam ketersediaan N bagi pertumbuhan tanaman. Dengan demikian pemanfaatannya bagi praktek pertanian sangat diperlukan, untuk mengurangi ketergantungan terhadap pupuk buatan.

Bakteri Endofit sebagai Penghasil Fitohormon (IAA)

Hasil analisis terhadap fitohormon pada 34 isolat bakteri endofit yang diuji menunjukkan bahwa semua isolat tersebut menghasilkan hormon IAA (Gambar 3). Kadar hormon IAA yang dihasilkan berbeda-beda. Isolat La⁴(2)1 menghasilkan IAA tertinggi diikuti oleh isolat La⁴(1)3 yang berasal dari tanaman lada budidaya.

IAA yang dihasilkan oleh bakteri endofit dari beberapa hasil penelitian menunjukkan kemampuannya dalam memacu pertumbuhan tanaman dengan cara membantu penyerapan hara. Adanya IAA dapat meningkatkan ukuran dan distribusi akar sehingga memperluas bidang serapan oleh akar. Hal tersebut menghasilkan penyerapan hara dari tanah yang lebih besar (Li et al. 2008). Kemampuan IAA yang berasal dari bakteri endofit dalam memacu pertumbuhan tanaman telah diaplikasikan pada padi (Mbai et al. 2013), legum (Umamaheswari et al. 2013), tebu (Da Silva et al. 2015), dan nanas (Ngamau et al. 2012). Adanya IAA yang dihasilkan oleh bakteri endofit yang berasal dari tanaman lada ini, diharapkan dapat membantu memacu pertumbuhan tanaman.



Gambar 3. Konsentrasi IAA yang dihasilkan oleh bakteri endofit yang berbeda berasal dari tanaman lada
 Figure 3. IAA productions by different eEndophytic bacteria originated from black pepper plant

KESIMPULAN DAN SARAN

Diperoleh sebanyak 34 isolat bakteri endofit yang berhasil diisolasi dari tanaman lada budidaya varietas Natar 1 (*P. nigrum*) dan lada liar (*P. colubrinum*). Isolat bakteri endofit yang diperoleh mempunyai kemampuan beragam dalam melarutkan P, mengikat N atau penghasil hormon IAA dan beberapa isolat bakteri endofit yang berfungsi tunggal maupun ganda. Hasil penelitian mengindikasikan potensi dari isolat bakteri endofit asal tanaman lada budidaya dan lada liar untuk memacu pertumbuhan tanaman lada. Lebih lanjut perlu dilakukan penelitian untuk melihat potensi dari isolat bakteri endofit pada tanaman lada

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat yang telah mendanai penelitian ini melalui DIPA APBN 2016.

DAFTAR PUSTAKA

Asis, C.A., K. Adachi, & S. Akao. (2004) N2 fixation in sugarcane and population of N2-fixing endophytes in stem apoplast solution. *Philippine Journal of Crop Science*. 29 (2), 45–58.

de Abreu, C. S., Figueiredo, J.E.F., Oliveira, C.A., dos Santos, V.L., Gomes, E.A., Ribeiro, V.P., Barros, B.A., Lana, U.G.P., & Marriel, I.E. (2017) Maize endophytic bacteria as mineral

phosphate solubilizers. *Genetics and Molecular Research*. [Online] 16 (1). Available from : doi:10.4238/gmr16019294.

Aravind, R., Kumar, A., Eapen, S.J. & Ramana, K. V. (2009) Endophytic bacterial flora in root and stem tissues of black pepper (*Piper nigrum* L.) genotype: isolation, identification and evaluation against *Phytophthora capsici*. *Letters in Applied Microbiology*. [Online] 48 (1), 58–64. Available from: doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02486.x.

Atekan, Y. Nuraini, E. Handayanto, & Syekhfani. (2014) The Potential of phosphate solubilizing bacteria isolated from sugarcane wastes for solubilizing phosphate. *Journal of Degraded and Mining Lands Management*. 1 (4), 175–182. doi:10.15243/jdmlm.2014.014.175.

Aung, T.N., S. Nourmohammadi, & M. Myint. (2011) Isolation Of Endophytic Bacteria From Green Gram And Study on Their Plant Growth Promoting Activities Department of Biotechnology, Mandalay Technological University, Mandalay, Myanmar Centre for Plant Molecular Biology, Osmania University, Hyderabad. *IJABPT, International journal of applied Biology and Pharmaceutical Technology*. 2 (3), 525–537.

Baligar, V. & Bennett, O. (1986) NPK-fertilizer efficiency -a situation analysis for the tropics. *Fertilizer Research*. 10, 147–164.

Banik, A., S.K. Mukhopadhyaya, & T.K. Dangar. (2016) Characterization of N2-fixing plant growth

- promoting endophytic and epiphytic bacterial community of Indian cultivated and wild rice (*Oryza* spp.) genotypes. *Planta*. 243 (3), 799–812. doi:10.1007/s00425-015-2444-8.
- Carvalho, T. L.G., E. Balsemão-Pires, R.M. Saraiva, P.C.G. Ferreira, & A.S. Hemerly. (2014) Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. *Journal of Experimental Botany*. 65 (19), 5631–5642. doi:10.1093/jxb/eru319.
- Da Silva, J.M., Dos Santos, T.M.C., De Albuquerque, L.S., Montaldo, Y.C., De Oliveira, J.U.L., Da Silva, S.G.M., Nascimento, M.S., & Teixeira, R.R.O. (2015) Potential of the endophytic bacteria (*Herbaspirillum* spp. and *Bacillus* spp.) to promote sugarcane growth. *Australian Journal of Crop Science*. 9 (8), 754–760.
- Dinić, Z., M. Ugrinović, P. Bosnić, M. Predrag, J. Mirazdravković, M. Miladinović, D. Jošić. (2014) Solubilization of inorganic phosphate by endophytic *Pseudomonas* sp. from French bean nodules. *Ratarstvo i povrtarstvo*. 51 (2), 100–105. doi:10.5937/ratpov51-6222.
- Edward, E.J., King, W.S., Leong, S., Teck, C., Jiwan, M., Fitri, Z., Aziz, A., Kundat, F.R., Ahmed, O.H., Muhammad, N. & Majid, A. (2013) Antagonistic Activities of Endophytic Bacteria against Fusarium Wilt of. *International Journal of Agriculture & Biology*. 15, 291–296.
- Ergün, N., Topcuoglu, S., & Yildiz, A. (2002) Auxin (indole-3-acetic acid), gibberellic acid (GA₃), abscisic acid (ABA) and cytokinin (Zeatin) production by some species of mosses and lichens. *Turkish journal of botany*. 26, 13–18.
- Etesami, H., Alikhani, H.A., & Hosseini, H.M. (2015) Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents. *MethodsX*. 2 : 72–78. doi:10.1016/j.mex.2015.02.008.
- Gordon, S.A. & Weber, R.P. (1951) Colorimetric estimation of indolacetic acid. *American Society of Plant Biologists*. 192–195.
- Gothwal, R.K., Nigam, V.K., Mohan, M.K., Sasmal, D. & Ghosh, P. (2008) Screening of nitrogen fixers from rhizospheric bacterial isolates associated with important desert plants. *Applied Ecology and Environmental Research*. [Online] 6 (2), 101–109. Available from: doi:10.15666/aer/0602_101109.
- Gravel, V., Antoun, H., & Tweddell, R.J. (2007) Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry*. 39 (8), Elsevier, 1968–1977.
- Gusmaini, Aziz, S.A., Munif, A., Sopandie, D., & Bermawie, N. (2013) Isolation and selection of endophytic bacteria consortia from medicinal plant (*Andrographis paniculata*) As Plant Growth Promoting Agents. *Journal of Agronomy*. 12 (3), 113–121. doi:10.3923/ja.2013.113.121.
- Hagin, J. & Tucker, B. (1982) *Fertilization of dry land and irrigated soil*. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. p 70-95.
- Hallman, J., Quadt Hallman, A., Mahaffee, W.F., & Klopfer, J.W. (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43, 895–914.
- Hidayati, U.C., Iswandi, A., & Munif, A.. (2014) The Potency of mixed culture of endophytic bacteria as plant growth promoting for rubber rootstock growth. *Indonesian J. Nat. Rubb. Res.* 32 (2), 129–138.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A. Al, Staley, J.T. & Williams, S.T. (1994) *Bergey's Manual of determinate bacteriology*. Baltimore, MD (USA) Williams & Wilkins.
- Ji, S.H., Gururani, M.A., & Chun, S.C. (2014) Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic Diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiological Research*. 169 (1), 83–98. doi:10.1016/j.micres.2013.06.003.
- Li, J.H., Wang, E.T., Chen, W.F., & Chen, W.X. (2008) Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biology and Biochemistry*. 40 (1), 238–246. doi:10.1016/j.soilbio.2007.08.014.
- Li, Y.S., Gao, Y., Tian, Q.Y., Shi, F.L., Li, L.H., & Zhang, W.H. (2017) Colonization and maize growth promotion induced by phosphate solubilizing bacterial isolates. *International Journal of Molecular Sciences*. 18 (7). doi:10.3390/ijms18071253.
- Loaces, I., Ferrando, L., & Scavino, A.F. (2011) Dynamics, diversity and function of endophytic

- siderophore-producing bacteria in rice. *Microbial Ecology*. [Online] 61 (3), 606–618. doi:10.1007/s00248-010-9780-9.
- Manoharan, M.J., Salini, B. Abitha, & S. Tongmin. (2016) Isolation of phosphat solubilizing endophytic bacteria from *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn.: evaluation of plant growth promotion and antioxydant activity under salt stress. *Journal of Applied Research of Medicinal and Aromatic Plants*. 65, 7 p.
- Mardad, I., Serrano, A. & Soukri, A. (2013) Solubilization of inorganic phosphate and production of organic acids by bacteria isolated from a Moroccan mineral phosphate deposit. *African Journal of Microbiology Research*. [Online] 7 (8), 626–635. Available from: doi:10.5897/AJMR12.1431.
- Matos, A.D.M., Gomes, I.C.P., Nietsche, S., Xavier, A.A., Gomes, W.S., Dos Santo Neto, J.A., & Pereira, C.T.M. (2017) Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. 89 (4), 2945–2954. doi:10.1590/0001-3765201720160111.
- Mbai, F., Magiri, E., & Matiru, V. (2013). Isolation and characterisation of bacterial root endophytes with potential to enhance plant growth from Kenyan Basmati rice. *American International Journal of Contemporary Research*. 3 (4), 25–40.
- Mendes, R., Pizzirani-Kleiner, A.A., Araujo, W.L., & Raaijmakers, J.M. (2007) Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of Burkholderia cepacia complex isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 73 (22), 7259–7267. doi:10.1128/AEM.01222-07.
- Muangthong, A., Youpensuk, S., & Rerkasem, B. (2015) Isolation and characterisation of endophytic nitrogen fixing bacteria in sugarcane. *Tropical Life Sciences Research*. 26 (1), 41–51.
- Munif, A. & Kristiana (2012) Hubungan bakteri endofit dan nematoda parasit Bangka Belitung. *Buletin RISTRI*. 3 (1), 71–78.
- Ngamau, C.N., Matiru, V.N., Tani, A., & Wangiri, C. (2012) Isolation and identification of endophytic bacteria of bananas (*Musa* spp.) in Kenya and their potential as biofertilizers for sustainable banana production. *African Journal of Microbiology Research*. 6 (34), 6414–6422. doi:10.5897/AJMR12.1170.
- Patrick Jr. W.H. & Reddy, K.R. (1976) Fate of Fertilizer Nitrogen in a Flooded Rice Soil. *Soil Science Society of America Journal*. 40 (5), 678–681.
- Ramos, P.L., Van Trappen, S., Thompson, F.L., Rocha, R.C.S., Barbosa, H.R., De Vos, P., & Moreira-Filho, C.A. (2011) Screening for endophytic nitrogen-fixing bacteria in Brazilian sugar cane varieties used in organic farming and description of *Stenotrophomonas Pavanii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61 (4), 926–931. doi:10.1099/ijs.0.019372-0.
- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*. 17 (4–5), 319–339. doi:10.1016/S0734-9750(99)00014-2.
- Sharma, S.B., Sayyed, R., Trivedi, M.H., & Gobi, T.A. (2013) Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*. 2 (1), 1–14. doi:10.1186/2193-1801-2-587.
- Silveira, A.P.D.D., Sala, V.M.R., Cardoso, E.B.N., Labanca, E.G. & Cipriano, M.A.P. (2016) Nitrogen metabolism and growth of wheat plant under diazotrophic endophytic bacteria inoculation. *Applied Soil Ecology*. 107, Elsevier B.V., 313–319. doi:10.1016/j.apsoil.2016.07.005.
- Tisdale, S.L., Nelson, W.L. & Beaton, J.D. (1975) Liming. *Soil Fertility and Fertilisers*. Macmillan Publishing Co., Inc. New York. 412–424.
- Ullah, A., Mushtaq, H., Fahad, Sh., Hakim, Shah, A., & Chaudhary, H.J. (2017) Plant growth promoting potential of bacterial endophytes in novel association with *Olea ferruginea* and *Withania coagulans*. *Microbiology*. 86 (1), 119–127. doi:10.1134/S0026261717010155.
- Umamaheswari, T., Anbukkarasi, K., Hemalatha, T. & Chendrayan, K. (2013) Original research article atudies on phytohormone producing ability of indigenous endophytic bacteria isolated from tropical legume crops. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*. [Online] 2 (6), 127–136. Available from: doi:doi:10.2514/6.1974-846.
- Wahid, P., & Suparman, U. (1986) Teknik Budidaya untuk Meningkatkan Produktivitas Tanaman Lada. *Edisi Khusus. Penelitian Tanaman Rempah dan Obat*. 2 (1): 1-11.

Yasmin, H. & Bano, A. (2011) Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from rhizosphere soil of weeds of khewra salt range and attock. *Pak. J. Bot.* 43 (3), 1663–1668.

Zhao, L., Xu, Y., Lai, X.H., Shan, C., Deng, Z. & Ji, Y. (2015) Screening and characterization of endophytic *Bacillus* and *Paenibacillus* strains from medicinal plant *Lonicera japonica* for use as potential plant growth promoters. *Brazilian Journal of Microbiology*. [Online] 46 (4), 977–989. Available from: doi:10.1590/S1517-838246420140024.