

Peranan *Methylobacterium* spp. dalam Meningkatkan dan Mempertahankan Vigor Benih Kedelai

The Role of Methylobacterium spp. for Improving and Maintaining Soybean Seed Vigor

Ratri Tri Hapsari¹, Selly Salma², Eni Widajati³, dan Maryati Sari³

¹Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi
Jl.Raya Kendalpayak Km.8. Kotak Pos 66 Malang 65101, Indonesia
E-mail: ratri.3hapsari@gmail.com

²Balai Penelitian Tanah
³Departemen Agronomi dan Hortikultura, Faperta IPB

Naskah diterima 24 Februari 2016, direvisi 13 Juni 2016, dan disetujui diterbitkan 23 Juni 2016

ABSTRACT

Soybean is considered as a functional food, due to its status as source of protein in Indonesia dietary. The soybean seeds determine the quality of soybean products through a better crop in the farm. Factor limiting the supply of soybean seeds in the tropics is the rapid deterioration of seed germination during storage, thereby reduces the availability of high quality of seed. Seed vigor is divided into two categories, namely the seed growth strength vigor and longevity seed vigor. Seed growth strength vigor indicates the growing strength in a suboptimum condition, while seed longevity vigor is the ability of seed lot to be stored in a suboptimum condition. Seed treatment uses beneficial microbes can protect plants in the nursery stage, and during the plant life cycle. Methylobacterium spp can live in a single-carbon compounds of the plant, such as metanol (CH₃OH) or methylamine (CH₃NH₂) as a carbon source. Methylobacterium spp can produce IAA, GA₃ and transzeatin. Methylobacterium spp can produce PQQ and tocopherol, one of the antioxidants that limit the nonenzymatic lipid oxidation during seed storage, germination and early seedling development. Methylobacterium spp can be used to improve the germination of soybean seed through seed inoculation, while maintaining soybean seed longevity can be obtained by coating the seed with Methylobacterium spp.

Keywords: Soybean, seed, vigor, *Methylobacterium* spp., seed coating.

ABSTRAK

Kedelai dapat berfungsi sebagai pangan fungsional dan sumber protein penting dalam menu makan di Indonesia. Faktor penentu dalam peningkatan hasil kedelai adalah penggunaan benih bermutu tinggi. Faktor pembatas penyediaan benih kedelai di daerah tropis adalah kemunduran mutu benih yang berlangsung cepat selama penyimpanan. Benih bermutu tinggi dicirikan oleh vigor yang tinggi, yang dapat dibagi menjadi dua kategori, yaitu vigor kekuatan tumbuh dan vigor daya simpan. Vigor kekuatan tumbuh mengindikasikan vigor benih pada kondisi alam suboptimum, sedangkan vigor daya simpan adalah kemampuan benih untuk disimpan dalam kondisi suboptimal. Perlakuan benih menggunakan "mikroba bermanfaat" dapat melindungi tanaman pada tahap pembibitan atau persemaian, hingga selama siklus hidup tanaman. *Methylobacterium* spp. dapat hidup pada senyawa berkarbon tunggal (C1) dari tanaman, yaitu metanol (CH₃OH) atau metilamina (CH₃NH₂) sebagai sumber karbon. *Methylobacterium* spp. dapat memproduksi IAA, GA₃ dan transzeatin, serta dapat memproduksi PQQ dan tokoferol. Tokoferol merupakan zat antioksidan yang dapat membatasi oksidasi lipid nonenzimatik benih selama penyimpanan, perkecambahan, dan perkembangan awal bibit. *Methylobacterium* spp. dapat digunakan untuk meningkatkan perkecambahan benih kedelai dengan cara inokulasi benih atau dengan imbibisi benih, sedangkan untuk mempertahankan daya simpan benih kedelai dapat digunakan teknik pelapisan benih yang diintegrasikan dengan *Methylobacterium* spp.

Kata kunci: Kedelai, benih, vigor, *Methylobacterium* spp., pelapisan benih.

PENDAHULUAN

Kedelai merupakan pangan fungsional dan sumber protein penting di Indonesia. Kandungan protein varietas kedelai berkisar antara 30-45% dan lemak 7-25% (Balitkabi 2008). Input utama yang diperlukan dalam peningkatan hasil kedelai adalah penggunaan benih bermutu tinggi. Salah satu faktor pembatas dalam penyediaan benih kedelai di daerah tropis, seperti Indonesia, adalah kemunduran benih yang berlangsung cepat selama penyimpanan sehingga mengurangi ketersediaan benih bermutu tinggi.

Benih bermutu tinggi dapat dicirikan dari vigor yang tinggi (Ilyas 2012). Menurut Sadjad *et al.* (1999), vigor benih adalah kemampuan benih tumbuh normal pada kondisi lapang suboptimal. Secara umum, vigor benih dibagi menjadi dua kategori, yaitu vigor kekuatan tumbuh dan vigor daya simpan. Vigor kekuatan tumbuh mengindikasikan vigor benih pada kondisi suboptimal, sedangkan vigor daya simpan adalah kemampuan benih untuk disimpan dalam kondisi suboptimal.

Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk meningkatkan vigor benih adalah dengan teknik *seed enhancement*. Menurut Taylor *et al.* (1998), terdapat tiga teknik yang dapat digunakan untuk meningkatkan mutu benih, yaitu *pre-sowing hydration treatment (priming)*, teknologi *coating*, dan *seed conditioning*. *Priming* adalah perlakuan benih sebelum tanam dengan cara menyeimbangkan potensial air benih untuk merangsang kegiatan metabolisme dalam benih sehingga benih siap berkecambah. Menurut Kuswanto (2003), *seed coating* merupakan pelapisan benih menggunakan zat tertentu seperti zat pengatur tumbuh, zat hara mikro, mikroba, fungisida atau antioksidan yang dapat meningkatkan vigor benih di lapang.

Pelapisan benih menggunakan zat antioksidan merupakan salah satu cara yang dapat digunakan untuk mempertahankan vigor benih kedelai dengan cara memperlambat proses kemunduran benih. Justice dan Bass (2002) menjelaskan, selama benih disimpan, proses oksidasi yang terjadi dapat memutuskan ikatan rangkap asam lemak tak jenuh, sehingga menghasilkan radikal-radikal bebas yang dapat bereaksi dengan lipida lainnya. Menurut Bewley dan Black (1986), akumulasi radikal bebas menyebabkan kerusakan membran yang mengakibatkan terjadinya kebocoran elektrolit, sehingga berpotensi menurunkan viabilitas benih. Sattler *et al.* (2004) melaporkan tokoferol merupakan salah satu zat antioksidan yang dapat membatasi oksidasi lipid nonenzimatik selama penyimpanan, perkecambahan, dan perkembangan awal bibit. Tokoferol telah diketahui sebagai antioksidan yang mampu mempertahankan

integritas membran. Menurut Ardiansyah (2007), senyawa tersebut bekerja sebagai *scavenger* radikal bebas oksigen, peroksidasi lipid dan oksigen singlet. Mekanisme kerja antioksidan terkait dengan struktur molekul yang dapat memberikan elektron kepada molekul radikal bebas tanpa terganggu, sehingga dapat memutus reaksi berantai dari radikal bebas.

Tokoferol dapat dimanfaatkan sebagai *coating* untuk mempertahankan daya simpan benih kedelai. Tokoferol bisa didapat secara alami dari tanaman dan *Methylobacterium* spp. atau secara sintetik. Hughes dan Tove (1982) berhasil mendeteksi kandungan derivat tokoferol menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) pada *Methanobacteria* dan mikroorganisme lainnya. Hal ini didukung oleh penelitian Widajati *et al.* (2011) dengan perangkat HPLC, yang mendeteksi kemampuan *Methylobacterium* spp dalam memproduksi tokoferol.

Methylobacterium spp. atau *Pink Pigmented Facultative Methylotroph* (PPFM) juga mampu dapat menghasilkan fitohormon. Hasil penelitian Widajati *et al.* (2008) menunjukkan bahwa fitohormon pada kultur *Methylobacterium* spp yang diisolasi dari berbagai jenis tanaman menghasilkan kadar IAA 1,4-15,1 ppm, kadar GA₃ 20,2-129,8 ppm, dan kadar Trans zeatin 22,3-89,2 ppm.

Methylobacterium spp. berperan dalam meningkatkan daya berkecambah benih beberapa tanaman, seperti padi (Madhaiyan *et al.* 2004), kacang tanah (Madhaiyan *et al.* 2006a), tomat (Madhaiyan *et al.* 2007), tembakau (Abanda-Nkpawatt 2006), dan kedelai (Meenakshi and Savalgi 2009). Hasil penelitian Radha *et al.* (2009) menunjukkan kedelai yang diinokulasi isolat bakteri *Methylobacterium* spp. yang dikombinasikan dengan *Bradyrhizobium japonicum* strain SB 120 meningkatkan tinggi tanaman, jumlah daun, bobot kering tajuk dan bobot kering akar, jumlah nodul dan bobot kering nodul.

Manfaat mikroba dalam usaha pertanian belum disadari sepenuhnya, karena pandangan umum terhadap mikroba lebih terfokus pada mikroba patogen yang menyebabkan penyakit pada tanaman (Saraswati dan Sumarno 2008). Berbagai penelitian menunjukkan perlakuan benih menggunakan mikroba dapat melindungi tanaman tidak hanya pada tahap pembibitan atau persemaian, tetapi juga selama siklus hidup tanaman (Copeland and McDonald 2001). Holland *et al.* (1996) melaporkan PPFM dapat digunakan sebagai inokulum pada benih atau *seed coating* yang bertujuan untuk meningkatkan perkecambahan, vigor, dan mempertahankan daya simpan benih.

POTENSI *METHYLOBACTERIUM* SPP. DALAM MENINGKATKAN VIGOR BENIH

Methylobacterium spp. disebut memiliki pigmentasi merah muda yang khas. Menurut Holland et al. (2002), PPFM berwarna merah muda karena memiliki pigmen karotenoid, produk dari metabolisme isoprenoid. Green (1992) melaporkan bakteri PPFM memiliki ciri khas dapat hidup pada senyawa berkarbon tunggal (C_1) dari tanaman, yaitu metanol (CH_3OH) atau metilamina (CH_3NH_2) sebagai sumber karbon. *Methylobacterium* termasuk ke dalam kelompok bakteri fakultatif metilotrof, karena mampu memanfaatkan gugus metil dan tumbuh pada senyawa multikarbon seperti suksinat, piruvat atau glioksilat.

Methylobacterium spp. merupakan mikrobiota normal pada filosfer hampir semua tanaman, lumut, dan paku-pakuan. Menurut Amelia (2002), mikroba ini sebagai mikroflora normal pada filosfer hampir semua tanaman. Hal ini memungkinkan bakteri tersebut berperan mendukung pertumbuhan tanaman inang. Menurut Glick et al. (1999) melaporkan secara langsung maupun tidak langsung, bakteri dapat mempunyai pengaruh yang kuat terhadap pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Secara tidak langsung, bakteri dapat mengurangi atau mencegah kerusakan yang disebabkan oleh organisme fitopatogen melalui satu atau beberapa mekanisme yang berbeda seperti produksi antibiotik, antifungi dan lain-lain. Secara langsung, umumnya bakteri mensintesis senyawa tertentu seperti hormon tumbuh, vitamin, siderofor atau mempermudah pengambilan nutrisi dari lingkungan.

Simbiosis *Methylobacterium* dengan tanaman berawal dari pemanfaatan metanol yang diproduksi oleh tanaman. Metanol merupakan produk samping dari metabolisme pektin pada dinding sel yang sedang berkembang (Kutschera 2007). Salma et al. (2005) melaporkan metanol merupakan produk dari aktivitas enzim *methanol dehydrogenase* yang dikeluarkan melalui stomata. Penelitian Chistoserdova et al. (2003) menunjukkan *Methylobacterium* spp. memiliki sedikitnya 100 gen yang berperan dalam metabolisme metanol.

Metanol yang dihasilkan tanaman merupakan tempat hidup yang baik untuk *Methylobacterium* spp. Sebagai bentuk simbiosisnya dengan tanaman, *Methylobacterium* spp. dapat memproduksi hormon yang berguna untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Menurut Lidstrom dan Chistoserdova (2002), hormon pertumbuhan yang dihasilkan adalah jenis sitokinin *trans-zeatin* dan auksin *Indole Acetic Acid* (IAA). Menurut Widajati et al. (2008), perangkat HPLC dapat mendeteksi fitohormon jenis IAA, GA_3 dan sitokinin pada suspensi kultur *Methylobacterium* spp.

Tabel 1 menunjukkan konsentrasi fitohormon yang terdapat pada 17 suspensi kultur *Methylobacterium* spp. Isolat TD-J10 yang berasal dari tanaman jagung memiliki konsentrasi IAA tertinggi sebesar 15,1 ppm, konsentrasi GA_3 tertinggi terdapat pada isolat TD-TPB3 yang berasal dari tanaman terong bulat, sedangkan konsentrasi transzeatin tertinggi terdapat pada isolat TD-J7 dari tanaman jagung.

Holland (1997) mengemukakan pemodelan produksi sitokinin yang dihasilkan tanaman akibat adanya asosiasi dengan PPFM. Teori tersebut mengasumsikan produksi sitokinin oleh PPFM terjadi pada jaringan yang sedang berkembang. Jaringan tersebut dikolonisasi oleh PPFM. Sitokinin bertindak sebagai molekul sinyal yang dapat menginisiasi pembelahan sel, sehingga mendorong terjadinya demetilasi pektin yang melepaskan metanol. Metanol tersebut dikonsumsi PPFM sebagai sumber nutrisi. Menurut Ivanova et al. (2007), gen yang bertanggung jawab dalam sintesis sitokinin adalah gen *ipt* pada hampir semua genom bakteri *Methylobacterium* yang diuji menggunakan analisis *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Hal ini dapat diketahui dari kemampuan pembentukan akar plantlet tembakau transgenik yang mengekspresikan gen *ipt*.

Selain menghasilkan sitokinin, *Methylobacterium* spp. juga dapat memproduksi IAA. Penelitian Omer et al (2004) dengan kombinasi perangkat HPLC dan *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) berhasil mendeteksi fitohormon jenis IAA pada 16 suspensi kultur PPFM. Menurut Ivanova et al. (2007), pada *Methylobacterium extorquens*, gen RMQ09094 yang bernama *Benzoylformate Dercarboxylase*

Tabel 1. Konsentrasi fitohormon yang terdapat pada 17 suspensi kultur *Methylobacterium* spp.

Isolat	Asal tanaman	IAA (ppm)	GA_3 (ppm)	Trans-zeatin (ppm)
TD-TPB1	Terong bulat	2,31	79,64	25,79
TD-TPB2	Terong bulat	3,39	99,61	22,66
TD-TPB3	Terong bulat	9,56	129,83	33,14
TD-TM1	Tomat	7,2	86,18	52,08
TD-K2	Kedelai	9,63	59,11	43,79
TD-G2	Gambas	1,81	49,99	26,82
TD-G3	Gambas	5,74	20,28	69,36
TD-J2	Jagung	2,08	ttd	89,21
TD-J7	Jagung	9,13	98,75	74,37
TD-J10	Jagung	15,14	51,44	59,75
TD-L2	Labu siam	12,68	98,36	49,74
TD-P4	Padi	9,32	ttd	22,28
TD-P5	Padi	1,46	47,92	28,79
PPU-K2	Kedelai	3,69	92,89	27,9
PPU-K10	Kedelai	9,56	78,32	ttd
TD-T1	Terong ungu	1,42	83,15	39,71
TD-B1	Buncis	6,4	78,15	ttd

Sumber: Widajati et al. (2008)

(*BfdC*) bertanggung jawab sebagai reaksi kunci pada sintesis IAA, misalnya pada dekarboksilasi *indole-3-pyruvate* (*IpyA*). Senyawa *IpyA* adalah senyawa intermediet dalam lintasan utama sintesis IAA.

Hormon asam indol-3-asetat (IAA) merupakan auksin alami yang tidak stabil dan berperan merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada pucuk tanaman, serta dalam pembentukan akar. Hormon asam geberelat (GA_3) merangsang pertumbuhan organ baru dan mempengaruhi pembentukan daun dan akar. Hormon trans-zeatin (TZ) merupakan hormon sitokinin yang berperan dalam pembelahan sel jaringan dan merangsang tunas daun (Wetherell 1982).

Kemampuan *Methylobacterium* spp. dalam memproduksi fitohormon menyebabkan bakteri ini dapat menstimulus perkecambahan benih. Holland dan Pollaco (1994) dalam Selvakumar *et al.* (2008) melaporkan benih yang diberi perlakuan PPFM memperlihatkan perkecambahan dan perkembangan tanaman yang lebih baik dibandingkan dengan yang tidak diberi perlakuan PPFM. Pengurangan populasi PPFM pada kulit benih menyebabkan daya berkecambah benih berkurang.

Berbagai penelitian di dalam dan luar negeri juga membuktikan *Methylobacterium* spp. berperan dalam meningkatkan daya berkecambah benih beberapa tanaman, termasuk padi (Madhaiyan *et al.* 2004, Fitriani 2008), kacang tanah (Madhaiyan *et al.* 2006a), tomat (Madhaiyan *et al.* 2007), cabai rawit (Afifah 2009), kakao (Sadikin 2009), dan cabai besar (Goni 2010). Menurut Riupassa (2003), *Methylobacterium* spp. memiliki pola adaptasi untuk mampu hidup pada lingkungan dengan daya dukung yang beragam, walaupun merupakan satu kelompok metilotrof.

Beberapa cara yang dapat diterapkan untuk meningkatkan vigor benih kedelai antara lain adalah sebagai berikut:

1. Inokulasi dengan *carier*

Carier yang digunakan adalah *lignite powder* yang dicampur dengan $CaCO_3$ kemudian dikemas dalam plastik polipropilen (PP) dan disterilisasi menggunakan autoklaf $121^\circ C$ selama 1 jam. Kultur *Methylobacterium* yang berumur 72 jam dan *Bradyrhizobium* kemudian dicampurkan dengan campuran *lignite powder* dan $CaCO_3$ yang sudah disterilisasi. Benih kedelai kemudian dicampurkan dengan *carier* yang telah dibuat sesaat sebelum ditanam. Hasil penelitian menunjukkan inokulasi pada benih (*Methylobacterium extorquens* + *Bradyrhizobium*) yang dilanjutkan dengan penyemprotan (*Methylobacterium extorquens*) meningkatkan jumlah nodul, total bahan kering, kandungan klorofil, aktivitas

enzim urase, dehidrogenase dan fosfatase dibandingkan dengan benih yang hanya diinokulasi dengan *Bradyrhizobium* (Meenakshi dan Savalgi 2009).

Radha *et al.* (2009), melaporkan bahwa benih kedelai yang diinokulasi isolat bakteri *Methylobacterium* dan dikombinasikan dengan *Bradyrhizobium japonicum* strain SB 120 secara nyata dapat meningkatkan tinggi tanaman, jumlah daun, bobot kering tajuk, bobot kering akar, jumlah nodul, bobot kering nodul, jumlah polong per tanaman dan hasil biji per tanaman dibandingkan dengan kontrol (tanpa perlakuan).

2. Imbibisi benih

Imbibisi benih dilakukan dengan merendam benih kedelai dengan isolat *Methylobacterium* spp selama 12 jam. Isolat yang digunakan dalam bentuk liquid (cair) dan tidak dilakukan pengenceran. Untuk merendam 150 butir benih ukuran biji sedang diperlukan 50 ml isolat *Methylobacterium* spp dan pada ukuran biji besar diperlukan 60 ml. Danial (2011) melaporkan perlakuan *Methylobacterium* spp isolat TD-K2 pada benih kedelai varietas Kaba dapat meningkatkan indeks vigor 17,33% (dari 72% menjadi 89,33%) dan isolat TD-J2 meningkatkan kecepatan tumbuh 9,49%/etmal (dari 31,74%/etmal menjadi 41,23%/etmal).

Aplikasi imbibisi benih yang dilanjutkan dengan penyemprotan daun pada umur 10 HST + 20 HST juga dapat meningkatkan vigor dan hasil. Danial (2011) melaporkan, dengan teknik aplikasi imbibisi benih dan penyemprotan *Methylobacterium* spp. isolat TD-TPB3 pada varietas Kaba meningkatkan tinggi tanaman pada 35 HST, bobot kering tajuk, bobot kering akar, jumlah polong, polong isi, bobot 100 butir, dan hasil biji.

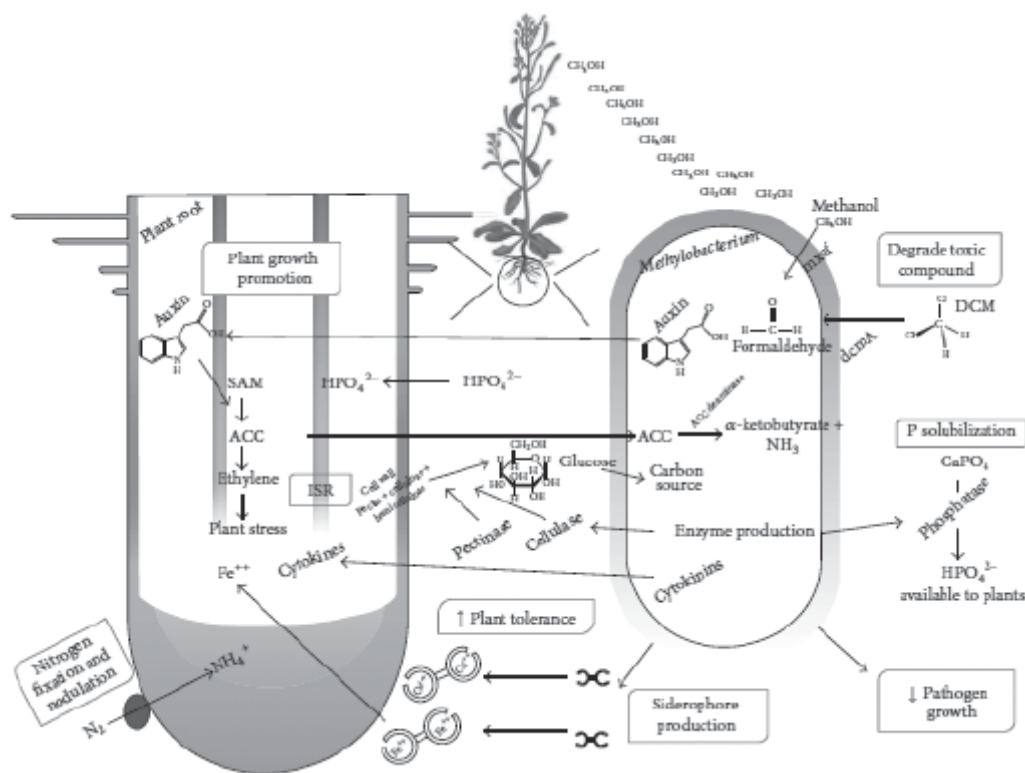
Secara tidak langsung, *Methylobacterium* spp. juga dapat mengurangi atau mencegah pengaruh mikroorganisme patogen melalui ketahanan sistemik terinduksi atau *induced systemic resistance* (ISR) pada padi (Madhaiyan *et al.* 2004) dan kacang tanah (Madhaiyan *et al.* 2006a). Madhaiyan *et al.* (2006a) melaporkan, benih kacang tanah yang telah diimbibisi dengan *Methylobacterium* sp. PPFM Ah dan diinokulasi dengan *Aspergillus niger* dan *Sclerotium rolfsii* meningkatkan daya berkecambah dan indeks vigor. Selain itu, cara ini juga dapat meningkatkan *pathogenesis related- protein* (PR-protein) dan fenolik dibandingkan dengan kontrol. Hal ini didukung oleh peningkatan aktivitas *phenylalanine ammonia lyase* (PAL), α -1,3 glukonase dan enzim peroksidase (PO) pada benih yang diberi perlakuan *Methylobacterium* sp. PPFM-Ah dibandingkan dengan kontrol. Menurut Heil dan Bostock (2002), PR-protein memegang peranan penting dalam meningkatkan resistensi tanaman terhadap invasi patogen. Beberapa fungsinya antara lain melisis dinding

sel patogen, menginaktivasi enzim yang disekresikan patogen, mengganggu struktur dan fungsi membran sel patogen dan pertahanan dinding sel tanaman. Kelompok PR-protein yang umum dikenal antara lain kitinase dan α -1,3 glukanasase.

Madhaiyan *et al.* (2006b) melaporkan bahwa enzim 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACCD) terdapat pada benih kanola yang diberi perlakuan *Methylobacterium fujisawaensis*. Benih kanola yang diberi perlakuan *M. fujisawaensis* menunjukkan jumlah ACC yang lebih rendah dibandingkan dengan kontrol. Jumlah ACC yang berkurang diduga disebabkan oleh aktivitas ACC deaminase yang dihasilkan bakteri *M. fujisawaensis*. Aktivitas ACC deaminase berperan menurunkan etilen dengan cara mendegradasi ACC (prekursor hormon etilen). ACCD yang dihasilkan *M. fujisawaensis* dapat meniadakan efek etilen sehingga memacu pemanjangan akar dan meningkatkan pertumbuhan tanaman. Lemus *et al.* 2009 melaporkan, pada tanaman tomat, ACC deaminase yang dihasilkan *Burkholderia* sp. mempengaruhi etilen dan memiliki peran penting dalam pertumbuhan tanaman. Hasil penelitian Akhwan *et al.* (2012) membuktikan bahwa bakteri penghasil ACC deaminase memberikan pengaruh lebih baik bagi pertumbuhan dan hasil bawang merah, yang tercermin pada bobot kering akar, luas daun, laju

pertumbuhan tanaman (LPT), bobot kering total, tinggi tanaman, bobot kering oven umbi, diameter umbi, indeks panen, bobot segar umbi, susut bobot umbi, dan bobot umbi jamur matahari.

Methylobacterium spp. juga mampu mengurangi fitotoksik logam berat (Idris *et al.* 2006, Madhaiyan *et al.* 2007). Menurut Lacava *et al.* (2008), *Methylobacterium* spp mampu memproduksi *hydroxamate-type siderophores*. Neilands (1995) melaporkan, siderofor dapat digunakan dalam pengendalian penyakit tumbuhan dengan memanfaatkan peranannya menyerap unsur besi dari lingkungan dan menyediakan mineral yang penting bagi sel mikroba. Menurut Budzikiewicz (2001), mekanisme kerja siderofor terjadi melalui perkembangan yang cepat dari bakteri yang mengkolonisasi akar tanaman dan memindahkan unsur besi di permukaan dan terciptanya kondisi yang sesuai bagi pertumbuhan akar. Dey *et al.* (2004) mengemukakan bakteri penghasil siderofor juga dapat menginduksi ketahanan tanaman. Mekanisme ketahanan tanaman terjadi karena perbaikan lingkungan tumbuh dengan adanya interaksi mikroba tanaman. Secara umum, Daurado *et al.* (2015) membuat mekanisme *Methylobacterium* spp. dalam mengkolonisasi dan berperan sebagai pemacu pertumbuhan tanaman (Gambar 1).



Sumber: Daurado *et al.* (2015)

Gambar 1. Mekanisme *Methylobacterium* spp. dalam mengkolonisasi dan berperan sebagai pemacu pertumbuhan tanaman.

POTENSI *METHYLOBACTERIUM* SPP. DALAM MEMPERTAHAKAN DAYA SIMPAN BENIH

Daya simpan benih kedelai dapat dipertahankan dengan menekan laju metabolisme benih. Cara yang dapat dilakukan untuk mempertahankan viabilitas benih selama penyimpanan antara lain menggunakan teknologi *coating*. Pelapisan benih (*coating*) merupakan salah satu metode *seed enhancement*, untuk memperbaiki mutu benih melalui penambahan bahan kimia pada lapisan luar benih yang dapat mengendalikan perkecambahan benih. Penambahan bahan kimia lain yang menguntungkan seperti ZPT atau hormon sintetik, zat hara mikro, mikroba dan fungisida pada pelapis dapat digunakan untuk meningkatkan performansi benih di lapangan (Copeland and McDonald 2001). Manfaat pelapisan benih menurut Kuswanto (2003) antara lain melindungi benih dari gangguan atau pengaruh kondisi lingkungan selama penyimpanan atau dalam rantai pemasaran, mempertahankan kadar air benih.

Copeland dan McDonald (2001) menyatakan bahwa polimer untuk pelapis benih idealnya memiliki karakter sebagai berikut: (1) *water-based polymer*, (2) nilai viskositas yang rendah, (3) memiliki konsentrasi yang tinggi pada saat padat, (4) memiliki pengaturan keseimbangan antara hidrofilik dengan hidrofobik, (5) membentuk lapisan tipis keras selama pengeringan. Selain itu, menurut Kuswanto (2003), bahan *coating* yang digunakan tidak bersifat *toxic* terhadap benih, mudah pecah dan larut apabila terkena air sehingga tidak menghambat proses perkecambahan. Bahan *coating* juga bersifat porus, sehingga benih masih dapat memperoleh oksigen untuk respirasi, bersifat higroskopis, tidak bereaksi dengan pestisida, bersifat perambat dan menyimpan panas yang rendah dan mudah didapat dengan harga yang relatif murah, sehingga dapat menekan harga benih. Desai *et al.* (1997) melaporkan bahwa bahan polimer yang memiliki sifat adhesi yang baik untuk digunakan pada *coating* benih di antaranya adalah *arabic gum*, *dextran*, *methylecellulose*, dan parafin.

Pemberian polimer dapat diintegrasikan dengan mikroorganisme yang dapat menunjang pertumbuhan tanaman. Menurut Holland *et al.* (1996) populasi awal larutan *coating* yang disarankan agar dapat meningkatkan perkecambahan pada benih kedelai adalah 10^7 - 10^8 sel bakteri/ml. Proporsi larutan *coating* pada benih dapat berkisar antara 0,1-25% dari bobot benih, bergantung pada tipe benih. Bahan perekat yang digunakan dapat berupa *vinyl pyrrolidone* atau *vinyl acetate*, sedangkan *carier* yang digunakan antara lain gambut atau vermikulit. Proses pengeringan benih dapat dilakukan dengan *airdryer* menggunakan suhu tidak lebih dari 30°C.

Keistimewaan *Methylobacterium* yang diintegrasikan pada *coating* benih adalah kemampuannya mensintesis PQQ. Senyawa PQQ adalah gugus prostetik (koenzim) dari metanol dehidrogenase. *Pyrroloquinoline Quinon* terletak pada periplasma dalam enzim metanol dehidrogenase (Lidstrom *et al.* 1998). Kasahara dan Kato (2003) melaporkan enzim-enzim yang mengandung PQQ antara lain metanol dehidrogenase. Pada bakteri metilotrof, perombakan metanol dan metilamina menjadi formaldehida (CH_2O) memerlukan enzim metanol dehidrogenase dan metilamina dehidrogenase. Formaldehida selanjutnya teroksidasi atau berasimilasi ke dalam sel karbon (Lidstrom *et al.* 1998). Morris *et al.* (1994) melaporkan, pada *Methylobacterium extorquens* AM-1 dibutuhkan tujuh gen untuk mensintesis PQQ. Gen tersebut berkode *pqqDGCBA* dan *pqqEF*.

Pyrroloquinoline Quinon dapat bekerja sebagai pembersih (*scavenging*) superoksida dan mampu mengikat radikal bebas beracun lainnya. Fungsi PQQ serupa dengan vitamin E, β -karoten, karotenoid, vitamin C, flavonoid, asam linoleat terkonjugasi, dan senyawa fenolik (Klinman 1996). Hal serupa juga dikemukakan He *et al.* (2003) bahwa PQQ dapat berfungsi sebagai vitamin dan bersifat antioksidan.

Zat antioksidan memiliki berbagai manfaat, di antaranya dapat digunakan dalam bidang pertanian. Sattler *et al.* (2004) melaporkan salah satu zat antioksidan tokoferol dapat membatasi oksidasi lipid nonenzimatis selama penyimpanan, perkecambahan, dan perkembangan awal bibit. Menurut Rahayu (2010), tokoferol disebut juga vitamin E. Tokoferol yang terbesar aktivitasnya adalah α -tokoferol. Hasil penelitian Fukuzawa dalam Sattler (2004) mengungkapkan bahwa satu molekul α -tokoferol dapat menetralkan hingga 120 molekul oksigen singlet sebelum terdegradasi. Menurut Ardiansyah (2007), mekanisme kerja antioksidan terkait dengan struktur molekulnya yang dapat memberikan elektron kepada molekul radikal bebas tanpa terganggu, sehingga dapat memutus reaksi berantai radikal bebas.

Tokoferol bisa didapat secara alami dari tanaman dan *Methylobacterium* spp. atau secara sintetik. Hughes dan Tove (1982), berhasil mendeteksi kandungan derivat tokoferol menggunakan HPLC pada *Methanobacteria* dan mikroorganisme lainnya. Hal ini didukung oleh penelitian Widajati *et al.* (2011), dengan perangkat HPLC dapat mendeteksi kemampuan *Methylobacterium* spp dalam memproduksi tokoferol. Konsentrasi tokoferol yang terdapat pada 21 suspensi kultur *Methylobacterium* spp. ditampilkan pada Tabel 2.

Methylobacterium spp. yang mampu memproduksi tokoferol dapat dimanfaatkan untuk mempertahankan daya simpan benih. Penyimpanan benih selama periode tertentu

Tabel 2. Konsentrasi tokoferol yang terdapat pada 21 suspensi kultur *Methylobacterium* spp.

Isolat	Asal tanaman	Tokoferol (ppm)
TD-TPB1	Terong bulat	0
TD-TPB2	Terong bulat	422,85
TD-TPB3	Terong bulat	871,70
TD-TM1	Tomat	1766,91
TD-TM3	Tomat	1611,80
TD-B1	Buncis	486,80
TD-G2	Gambas	312,71
TD-G3	Gambas	247,94
TD-J2	Jagung	216,58
TD-J7	Jagung	190,18
TD-L2	Labu siam	313,94
TD-P4	Padi	771,04
TD-P5	Padi	683,17
PPU-K2	Kedelai	370,05
PPU-K10	Kedelai	316,01
M, TL	Durian	258,25
M, Atas	Durian	128,30
DK-4	Kedelai	59,41
DK-1	Kedelai	144,80
Tantri TP	Durian	121,70
Tantri TL	Durian	265,68

Sumber: Widajati et al. (2011)

berpengaruh terhadap viabilitas dan vigor benih. Benih yang telah disimpan akan mengalami kemunduran mutu yang ditunjukkan menurunnya viabilitas dan vigor benih. Kemunduran benih adalah proses bertahap yang diikuti oleh terakumulasinya metabolit beracun yang semakin lama semakin menekan daya berkecambah dan pertumbuhan kecambah. Kemunduran benih semakin cepat karena denaturasi protein akibat proses oksidasi lemak. Benih berkadar lemak tinggi tidak tahan disimpan lama. Proses yang terjadi selama penyimpanan dapat memutuskan ikatan rangkap asam lemak tak jenuh, sehingga menghasilkan radikal-radikal bebas yang dapat bereaksi dengan lipida lainnya. Hal ini menyebabkan rusaknya struktur membran sel (Justice and Bass 2002).

Sattler et al. (2004) melakukan penelitian pada daun dan biji tanaman *Arabidopsis thaliana* dengan cara mengisolasi dan mengkarakterisasi lokus vitamin E (*vte1* dan *vte2*), kemudian melakukan mutasi pada lokus tersebut. Mutasi menyebabkan defisiensi tokoferol pada semua jaringan. Mutasi pada salah satu lokus tersebut menyebabkan umur benih nyata berkurang dibandingkan dengan tipe liarnya. Pertumbuhan bibit mutan *vte2* selama perkecambahan mengalami kerusakan dengan kadar lemak hidroperoksida dan asam lemak hidroksi meningkat hingga 4-100 kali dibandingkan dengan tipe liarnya. Hal ini menunjukkan pentingnya peran tokoferol dalam mempertahankan viabilitas benih.

Tabel 3. Pengaruh beberapa formula pelapisan benih terhadap daya berkecambah benih kedelai setelah penyimpanan.

Formula pelapisan benih	Periode simpan (bulan)		
	0	3	6
Kontrol (tanpa pelapisan benih)	91,0	85,3	79,3
<i>Arabic gum</i>	95,0	88,0	83,3
Tokoferol 800 ppm + <i>Arabic gum</i>	97,7	90,0	85,7
TD-TM1 + <i>Arabic gum</i>	94,3	87,7	86,7
TD-TM3 + <i>Arabic gum</i>	93,3	88,3	83,0
TD-TPB3 + <i>Arabic gum</i>	94,0	85,3	86,0
TD-TPB3 + TD-TM1 + <i>Arabic gum</i>	91,3	86,7	86,0
TD-TPB3 + TD-TM3 + <i>Arabic gum</i>	93,7	88,0	81,3
<i>Arabic gum</i> + Gambut	94,3	84,3	80,7
TD-TPB3 + TD-TM1 + <i>Arabic gum</i> + Gambut	93,0	84,3	79,7
TD-TPB3 + TD-TM3 + <i>Arabic gum</i> + Gambut	95,0	80,0	78,3

Sumber: Hapsari (2013).

Pemberian tokoferol sebelum disimpan diduga dapat mempertahankan viabilitas benih selama periode simpan. Tokoferol diduga berperan sebagai antioksidan untuk mengurangi efek radikal bebas yang terbentuk selama benih dalam penyimpanan. Penghambatan pembentukan radikal bebas dapat mempertahankan struktur membran sel dari kemunduran.

Sari (2009) melaporkan, pada benih kacang panjang, formulasi *coating arabic gum* + *Methylobacterium* TD-L2 merupakan formulasi terbaik berdasarkan tolok ukur indeks vigor benih, potensi tumbuh maksimum, bobot kering kecambah, dan keserempakan tumbuh bibit. Benih yang *dicoating* dengan formulasi ini setelah disimpan 12 minggu masih memiliki viabilitas yang tinggi, ditunjukkan oleh daya berkecambah 90,33%. Formulasi *coating* terbaik adalah *arabic gum* + tokoferol. Benih yang *dicoating* dengan formula tersebut setelah disimpan 12 minggu masih memiliki viabilitas yang tinggi, ditunjukkan oleh daya berkecambah 92%.

Hapsari (2013) melaporkan formula pelapisan benih *arabic gum*, *arabic gum* + tokoferol 800 ppm, *arabic gum* + *Methylobacterium* TD-TM3 dan *arabic gum* + *Methylobacterium* TD-TPB3 konsisten mempertahankan viabilitas benih sampai periode simpan 6 bulan pada suhu ruang, nyata lebih tinggi dibanding kontrol. Formula pelapisan benih dengan gambut menghasilkan DB yang rendah (78,3%), sedangkan formula pelapisan benih dengan *Methylobacterium* spp menghasilkan DB yang lebih tinggi (81,3-86,7%) dibandingkan tanpa pelapisan benih (79,3%) setelah disimpan sampai 6 bulan (Tabel 3). Benih yang diberi pelapis juga dapat meminimalisasi cendawan yang tumbuh pada saat benih dikecambahkan.

KESIMPULAN

Methylobacterium spp. memproduksi IAA, GA₃, transzeatin, PQQ, tokoferol dapat digunakan untuk meningkatkan perkecambahan benih kedelai dengan inokulasi benih maupun dengan imbibisi benih. Vigor benih kedelai dapat dipertahankan dengan teknik pelapisan benih yang diintegrasikan dengan *Methylobacterium* spp.

DAFTAR PUSTAKA

- Abanda-Nkpwatt. D., M. Müsch, J. Tschiersch, M. Boettner, and W. Schwab. 2006. Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedling: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. *J. Exp. Bot.* 57(15):4025-4032.
- Afifah, N. 2009. Penggunaan *Methylobacterium* spp. untuk invigorasi benih cabai rawit (*Capsicum frutescens* L.) [skripsi]. Bogor: Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Akhwan, I.A.S., E. Sulistyaningsih, dan J. Widada. 2012. Peran JMA dan bakteri penghasil acc deaminase terhadap pertumbuhan dan hasil bawang merah pada cekaman salinitas. *Vegetalika* 1(2):139-152.
- Amelia, R. 2002. Pengaruh inokulasi isolat bakteri pink pigmented facultative methylophilic terhadap pertumbuhan jagung dan kedelai. [skripsi]. Bogor: Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Ardiansyah. 2007. Antioksidan dan peranannya bagi kesehatan, <http://islamicsspace.wordpress.com/2007/01/24/antioksidan-dan-peranannya-bagi-kesehatan/> >.[31 Maret 2011].
- Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian. 2008. Deskripsi varietas unggul kacang-kacangan dan umbi-umbian. Puslitbangtan, Bogor.
- Bewley, J.D. and M. Black. 1986. *Seeds physiology of development and germination*. Second Printing. New York: Plenum Press. 367p.
- Budzikiewicz, H. 2001. Siderophore-antibiotic conjugates used as Trojan horses against *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 1:73-92.
- Chistoserdova, L., S.W. Chen, A. Lapidus, and M.E. Lidstrom. 2003. Methylophilic in *Methylobacterium extorquens* AM1 from a genomic point of view. *Journal Bacteriol.* 185(10):2980-2987.
- Copeland, L.O. and M.B. McDonald. 2001. *Principle of seed science and technology*. New York: Chapman and Hall. 408p.
- Danial D. 2011. Pengaruh aplikasi *Methylobacterium* spp. terhadap peningkatan vigor dan produksi tanaman kedelai. [tesis]. Bogor: Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Dourado, M.N., A.C.C. Neves, D.S. Santos, and W.L. Araújo. 2015. Biotechnological and agronomic potential of endophytic pink-pigmented methylophilic *Methylobacterium* spp. *BioMed Research International* Volume 2015, Article ID 909016. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/909016>.
- Desai, B.B., P.M. Kotecha, and K. Salunkhe. 1997. *Seed handbook*. New York: Marcel Dekker, Inc. 627p.
- Dey, R., K.K. Pal, D.M. Bhatt, and S.M. Chauhan. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological Research* 159: 371-389.
- Fitriani, D. 2008. Penggunaan *Methylobacterium* spp. untuk invigorasi benih padi (*Oryza sativa* L.) [skripsi]. Bogor: Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Glick, B.R., C.L. Patten, G. Holguin, and D.M. Penrose. 1999. *Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria*. London: Imperial college press.
- Green, P.N. 1992. The genus *Methylobacterium*. In: Ballows, A, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K.H. Schleifer (Eds.). *The Prokaryotes*. New York: Springer. <http://books.google.co.id>. [15 Februari 2013].
- Hapsari, R.T. 2013. Pemanfaatan *Methylobacterium* spp. pada invigorasi dan teknik coating untuk meningkatkan vigor benih kedelai. [tesis]. Bogor: Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- He, K., H. Nukada, T. Urakami, and M. Murphy. 2003. Antioxidant and prooxidant of pyroloquinoline-quinone (PQQ): implication for its function in biological system. *Biochem. Pharmacol.* 65:67-74.
- Heil, M. and R.M. Bostock. 2002. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant dependences. *Ann.Bot.* 89: 503-512.
- Holland, M.A., R.L.G. Long, and J.C. Polacco. 2002. *Methylobacterium* spp: Phylloplane bacteria involved in cross talk with the plant host? Di dalam: Lindow SE, Hecht-Poinar, Elliot VJ, editor. *Phyllosphere Microbiology*. Minnesota: APS Press.
- Holland, M.A., M.D. Salisbury, J.C. Polacco, and M.O. Columbia. 1996. Seeds, coated or impregnated with a PPFM. United States Patent Application Publication Pub No. US005512069 A.
- Holland, M.A. 1997. *Methylobacterium* and plants. *Recent Res. Devel. in Plant Physiol.* 1: 207-221.
- Hughes, P.E. and S.B. Tove. 1982. Occurrence of α -tocopherolquinone and α -tocopherolquinol in microorganism. *Journal of Bacteriology* 151(3):1397-1402.
- Idris, R., M. Kuffner, L. Bodrossy, M. Puschenreiter, S. Monchy, W. Wenzel, and A. Sessitsch. 2006. Characterization of Ni-tolerant methylobacteria associated with the hyperaccumulating plant *Thlaspi goesingense* and description of *Methylobacterium goesingense* sp. Nov. *Syst. Appl. Microbiol* 29: 634-644.

- Ilyas, S. 2012. Ilmu dan teknologi benih: Teori dan hasil-hasil penelitian. Bogor: IPB Press. 138 p.
- Ivanova, E.G., D.N. Fedorov, N.V. Doronina, and Y.A. Trotsenko. 2007. Metabolic aspects of methylotrophic bacteria interaction with plants. In: Book of Abstracts Plant Growth Substances: Intracellular Hormonal Signaling and Applying in Agriculture. 2nd International Symposium; 2007 October 8-12. Kyiv, Ukraine.
- Justice, L.O. and L.N. Bass. 2002. Prinsip dan praktek penyimpanan benih. Roesli R, penerjemah. Jakarta: PT Raja Grafindo Persada. 446p. Terjemahan dari Principles and Practice of Seed Storage.
- Kasahara T, Kato T. 2003. Nutritional biochemistry: A new redox-cofactor vitamin for mammals. *Nature* 422(6934):832.
- Klinman, J.P. 1996. New quinocofactors in eukaryotes. *J. Biol. Chem.* 271:27189-27192.
- Kuswanto, H. 2003. Teknologi Pemrosesan, Pengemasan, dan Penyimpanan Benih. Kanisius. Yogyakarta.
- Kutschera, U. 2007. Plant-associated methylotrophic bacteria as co-evolved phytosymbionts. *Plant Signal behave.* 2(2):74-78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2633902> [24 Nopember 2011].
- Lacava, P.T., M.E. Silva-Stenico, W.L. Araújo, A.V.C. Simionato, E. Carrilho, S.M. Tsai, and J.L. Azevedo. 2008. Detection of siderophores in endophytic bacteria *Methylobacterium* spp. associated with *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*. *Pesq. Agropec. Bras.* 43(4):521-528.
- Lemus, J.O., I.H. Lucas, L. Girard, J.C. Mellado. 2009. ACC (1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in *Burkholderia* sp., and its growth promoting effect on tomato plants. *Appl. And Environ. Microbiol.* 75(20):6581-6590.
- Lidstrom, M.E., L. Chistoserdova, S. Stolyar, and A.L. Springer. 1998. Genetics and regulation of C1 metabolism in methylotroph. Dalam: Canters, G.W., Vijgenboom, editor. Biological Electron Transfer Chains: Genetic, Composition, and Mode of Operation. New York: Kluwer Academic Publisher. p.89-97. http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-94-011-5133-7_7#page-1 [12 Februari 2013].
- Madhaiyan, M., S. Poonguzhali, J.H. Ryu, and T. Sa. 2006b. Regulation of ethylene levels in canola (*Brassica campertis*) by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase containing *Methylobacterium fujisawaense*. *Planta* 224:268-278.
- Madhaiyan, M., S. Poonguzhali, and T. Sa. 2007. Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicum esculentum* L.). *Chesosphere* 69(2): 220-228. www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653507004845. [27 Nopember 2012].
- Madhaiyan, M., S. Poonguzhali, M. Senthilkumar, S. Seshadri, H. Chung, J. Yang, S. Sundaram, and T. Sa. 2004. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. *Bot. Bull. Acad. Sin* 45:315-324. <http://ejournal.sinica.edu.tw/bbas/content/2004/4/Bot454-07.html> [7 Januari 2013].
- Madhaiyan, M., B.V.S. Reddy, R. Anandham, M. Senthilkumar, S. Poonguzhali, S.P. Sundaram, and T. Sa. 2006a. Plant growth-promoting *Methylobacterium* induces defense responses in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared with root pathogens. <http://www.aseanbiotechnology.info/Abstract/21023854.pdf> [11 Februari 2013].
- Meenakshi, B.C. and V.P. Savalgi. 2009. Effect of co-inoculation of *Methylobacterium* and *B. japonicum* on plant growth dry matter content and enzyme activities in soybean. *Karnataka J. Agric. Sci.* 22(2):334-348.
- Morris, C.J., F. Bivelle, E. Turlin, E. Lee, K. Ellermann, W.H. Fan, R. Ramamoorthi, A.L. Springer, and M.E. Lindstrom. 1994. Isolation, phenotypic characterization, and complementation analysis of mutants of *Methylobacterium extorquens* AM1 unable to synthesize pyrroloquinoline quinone and sequences of pqqD, pqqG, and pqqC. *Journal of Bacteriology* 176(6):1746-1755.
- Omer, Z.S., R. Tombolini, A. Broberg, and B. Gerhardson. 2004. Indole-3-acetic acid production by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria. *Plant Growth Regul.* 43:93-96.
- Radha, T.K., V.P. Savalgi, and A.R. Alagawadi. 2009. Effect of *Methylotrophs* on growth and yield of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Karnataka J. Agric. Sci.* 22(1):118-121.
- Rahayu, I.D. 2010. Vitamin E. <http://imbang.staff.umm.ac.id/?tag=tokoferol-alpha> [27 Maret 2011].
- Riupassa, P.A. 2003. Kelimpahan dan keragaman genetik bakteri pink pigmented facultative methylotroph dari beberapa daun sayuran lalapan. Tesis. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor. 32 hal.
- Sadikin, I. 2009. Pengaruh *Methylobacterium* spp. terhadap viabilitas benih kakao (*Theobroma cacao*) [skripsi]. Bogor: Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Sadjad, S., E. Murniati, and S. Ilyas. 1999. Parameter pegujian vigor benih dari komparatif ke simulatif. Jakarta: Grasindo. 185p.
- Salma, S., A. Suwanto, A. Tjahjoleksono dan A. Meryandini. 2005. Keanekaragaman bakteri filusfer dari beberapa tanaman asal Kalimantan Timur. *Forum Pascasarjana* 28(1):1-10.
- Saraswati, R. dan Sumarno. 2008. Pemanfaatan mikroba penyubur tanah sebagai komponen teknologi pertanian. *Iptek Tanaman Pangan* 3(1):41-58.

- Sattler, S.E., L.U. Gililand, M.M. Lundback, M. Polard, and D. Dellapenna. 2004. Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *The Plant Cell* 16:1419-1432.
- Selvakumar, G., S. Nazim, and S. Kundu. 2008. Methyloleotrophy in bacteria concept and significance. *Dalam: Saika, R. (Ed.). Microbial Biotechnology*. India: New India Publishing. 422p. <http://books.google.co.id>. [11 Februari 2013].
- Taylor, A.G., P.S. Allen, M.A. Bennet, K.J. Bradford, J.S. Burris, and M.K. Misra. 1998. Seed Enhancements. *Seed Science Research* 8:245-256.
- Wetherell, D.F. 1982. Pengantar propagasi tanaman secara *in vitro*. Koensoemardiyah, S., penerjemah. Semarang: IKIP Semarang. 110 p. Terjemahan dari Introduction to Invitro Propagation.
- Widajati, E., S. Salma, E. Pratiwi, M. Kosmiatin, dan S. Rahayu. 2008. Potensi *Methylobacterium* spp. asal Kalimantan Timur untuk meningkatkan mutu benih dan kultur invitro tanaman serta analisis keragamannya. Bogor. Laporan Penelitian LPPM IPB.
- Widajati, E., S. Salma, M. Sari, dan D. Danial. 2011. Pemanfaatan isolat *Methylobacterium* spp. untuk peningkatan vigor benih dan produksi kedelai dalam mendukung swasembada kedelai di Indonesia. Bogor. Laporan Penelitian LPPM IPB.