KAJIAN ASOSIASI Rhizobium sp, Rhizobakteri Osmotoleran DAN MIKORIZA PADA KEDELAI LOKAL TAHAN CEKAMAN KEKERINGAN DI TANAH MEDITERAN, SIMO, BOYOLALI

Jumiati¹, Agung Astuti², Mulyono²

¹Mahasiswa Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, ²Dosen Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

Email: Joe_miaty@yahoo.com

Tujuan penelitian adalah mengisolasi dan mengkarakterisasi serta mempelajari asosiasi *Rhizobium* sp, *Rhizobakteri* dan Mikoriza dengan kedelai varietas lokal yang tahan kering di tanah Mediteran, Simo, Boyolali.

Penelitian dilakukan dengan 2 metode yaitu metode observasi dan metode eksplorasi eksperimen. Observasi dilaksanakan di tanah Mediteran, Desa Simo, Kecamatan Simo, Kabupaten Boyolali dan penelitian eksplorasi eksperimen dilaksanakan di Laboratorium Agrobioteknologi dan Laboratorium Tanah Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian dilaksanakan pada bulan September – Desember 2015. Metode survei dilakukan pada budidaya kedelai tahan kering di tanah Mediteran, daerah Simo, Boyolali dan metode eksplorasi eksperimental untuk mengkaji karakteristik tanah dan asosiasi *Rhizobium* sp, *Rhizobakteri* dan Mikoriza dengan tanaman kedelai lahan kering

Dari hasil isolasi ditemukan 8 isolat *Rhizobium* sp, yaitu R5, R6, R7, R8, R9, R10, R13, R15 dengan bentuk sel basil dan bersifat gram negatif, dan 8 isolat *Rhizobakteri* yaitu, Rb1, Rb3, Rb4, Rb5, Rb6, Rb8, Rb9, Rb10, Rb11 dengan bentuk sel kokus dan bersifat negatif, dan infeksi Mikoriza dengan spora Mikoriza sebanyak 20,46x10⁶ spora/ml. Hal ini menunjukkan adanya asosiasi anatara *Rhizobium* sp, *Rhizobakteri* dan Mikoriza terhadap kedelai Petek yang hidup di tanah Mediteran di Simo, Boyolali dengan pH 7,6, kadar lengas lapangan 18,92%, dengan kondisi air tersedia lapangan 1,97% dari 17,92% dan hasil kedelai 0,60 t/ha.

Kata Kunci: Asosiasi, *Rhizobium* sp, *Rhizobakteri*, Mikoriza, Tanah Mediteran, Kedelai Petek.

THE ASSOCIATION INSPECT OF Rhizobium Sp, Rhizobacteri Osmotolerant AND Mycorrhizae ON LOCAL VARIETIES SOYBEAN IN SOIL DROUGHT RESISTANT MEDITERRANEAN, SIMO, BOYOLALI.

Jumiati¹, Agung Astuti², Mulyono²

¹Mahasiswa Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, ²Dosen Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

Email: Joe_miaty@yahoo.com

ABSTRACT

The aim of this research for isolation and characterize and to learn the association of Rhizobium sp, Rhizobacteri and Mycorrhizae with local varieties soybean in soil drought resistant Mediterranean, Simo, Bovolali.

The research was conducted degan two methods: obsevation methods and experimental exploration methods. Observasion carried out in the land of the Mediterranean, the village of Simo, District Simo, Boyolali and exploratory research experiment conducted in the Laboratory Agrobioteknology and Soil Laboratory, Faculty of Agriculture, University of Muhammadiyah Yogyakarta. The research was conducted in September-December 2015. The survey method is performed on drought resistant soybean cultivation in the Mediterranean lands, Simo, Boyolali and exploration of experimental methods to study the characteristics of the soil and the association Rhizobium sp, Rhizobacteri and Mycorrhizae with soybean plants dryland

From the results of isolation found eight isolates of Rhizobium sp, that R5, R6, R7, R8, R9, R10, R13, R15 with cell shape and are gram-negative bacilli and eight isolates of Rhizobacteri that Rb1, RB3, RB4, RB5, RB6, RB8, Rb9, Rb10, Rb11 with cell shape and negative cocci, as well as Mycorrhizae's spores and as much 20,46x106 spores/ml. This indicates between association Rhizobium sp, Rhizobakteri and Mycorrhiza to soy Petek who live in the land of the Mediterranean in Simo, Boyolali with pH 7,6, KL-Kl 18,92%, and water condition in area is 1,97% from 17,92% and Soybean yield is 0,60 t/ha.

Keywords: Association, Rhizobium sp, Rhizobakteri, Mycorrhizae, Mediterranean's soil, Petek's Soybean.

PENDAHULUAN

Tingkat kebutuhan konsumsi kedelai yang mencapai lebih dari 2,24 juta ton setiap tahunnya. Padahal pada kenyataannya produktifitas hasil kedelai ditingkat petani baru mencapai 1,0 – 1,5 ton/ha. Pasalnya produksi dalam negeri yang hanya memasok 800.000 ton dari kebutuhan hingga 3 juta ton per tahun (Marsela, 2012).

Kekeringan merupakan faktor pembatas yang menyebabkan penurunan produktivitas dan kualitas bahan pangan termasuk kedelai di banyak negara. Bahkan sejalan dengan peningkatan populasi manusia dan perubahan iklim global, pengaruh kekeringan terhadap pangan dunia semakin serius. Saat ini gagal panen terjadi diberbagai tempat seperti sal ah satunya daerah banjar, sekitar 50 hektar lahan mengalami kekeringan (Metrotvnews, 2014).

Pada Agustus 2015 ditemukan ada varietas lokal yang tahan kemarau panjang di tanah Mediteran daerah Simo Boyolali penanaman dengan cara tanpa adanya pengolahan (no tilage) dan selama 8 minggu tanpa ada pengairan. Kondisi tanah sangat kering, sampai terlihat retakan-retakan tanah, namun kedelai tetap hidup dan berbuah dengan baik (Komunikasi pribadi, Ir. Mulyono MP).

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan berupa tanah dan tanaman kedelai yang dipanen dari lahan Mediteran, Simo, Boyolali dengan kondisi cekaman kekeringan, medium YMA, medium LB+NaCl.

Sublimat, alkohol, cat Eritrosin, cat alkohol asam, NaOH, HCl, cat acid Fuhsin, air steril.

Alat yang digunakan adalah timbangan, meteran, tabung reaksi, petridist, erlenmeyer, auotoklaf, pisau tajam, mikrosop, pipet steril, mikroskop, *haemacytometer*, saringan spora mikoriza, cat gam, oven, otoklaf, lampu busen, *shaker*, penggaris, dan jarum ose.

Jenis Penelitian

Penelitian dilakukan menggunakan **Metode Observasi dan Eksplorasi Eksperimen.** Metode

Observasi dilakukan pada budidaya kedelai tahan kering di tanah Mediteran, daerah Simo, Boyolali dan metode eksplorasi eksperimental untuk mengkaji karakteristik tanah dan asosiasi *Rhizobium* sp, *Rhizobakteri* dan Mikoriza dengan tanaman kedelai lahan kering. Observasi dilakukan untuk mendapatkan informasi tentang kondisi eksisting wilayah yang menggambarkan keadaan awal kawasan tersebut. Diobservasi kondisi lahan, meliputi :batas lahan, vegetasi sekeliling, irigasi, kondisi tanah dan tanaman.

Metode Penetapan Lokasi dan Tanaman Korban

Penelitian dilakukan di lahan Mediteran daerah Simo, Boyolali yang terdapat tanaman kedelai tahan terhadap cekaman kekeringan selama 8 minggu tanpa adanya penyiraman ataupun pengairan. Penetapan Sampel dalam 1 petak lahan ditentukan 3 blok, dengan luasan 20 x 25 meter. Pada setiap bloknya diambil 10 tanaman sampel dengan metode undian. Setiap tanaman sampel diamati

pertumbuhan dan hasilnya serta dilakukan: a) Isolasi *Rhizobakteri* yang tahan cekaman kekeringan, b) Karakteristik nodulasi dan efektivitas *Rhizobium* sp. c) Karakteristik Mikoriza dan efektivitasnya.

HASIL ANALISIS DAN PEMBAHASAN

Kondisi Tanah Mediteran di daerah Simo,
Boyolali: Dari hasil observasi pada tanggal 2,
September 2015, dapat dinyatakan lokasi penelitian,
pada lahan kedelai yang tahan kering di daerah
Simo Boyolali, dengan jenis tanah Mediteran.
Kondisi Tanah di lahan Meditera tersebut, sangat
kering bahkan sampai terlihat retakan tanah.



Gambar 1. Retakan tanah 6-10 cm

Pada lahan tidak ada aliran irigasi, petani setempat juga tidak melakukan penyiraman karena pengairan pada lahan tersebut menggunakan air hujan yang turun saja. Tanaman kedelai hanya terkena hujan pada awal tanam sampai 2 MST saja, setelah itu tidak memperoleh air sama sekali baik dari irigasi ataupun hujan karena kemarau panjang.

Lahan tersebut berukuran 500 m² dengan bagian penelitian yang terdiri dari 3 blok penelitian yaitu blok A, Blok B dan blok C. luasan setiap bloknya yaitu: Blok A dengan luasan 2,95 m², blok B dengan luasan 3,85 x 2,45 m², blok C dengan luasan 4,30 x 2,45 m²

Pola tanam yang dilakukan petani dari musim sebelumnya yaitu padi-padi-kedelai. Varietas kedelai yang ditanam yaitu varietas Petek. Jumlah populasi setiap bloknya yaitu, pada blok A berjumlah 309 tanaman kedelai, blok B berjumlah 313 tanaman, dan pada blok C 350 tanaman.

Sifat Tanah Mediteran Simo, Boyolali: Beberapa sifat kimia tanah berupa drajat keasaman (pH), C organik, N-Total, dan C/N ratio. Berikut data dari sampel tanah Mediteran Simo, Boyolali:

Tabel 1. Hasil pengamatan laboratorium Kl-kl, Bo, N, C/N, dan pH di Tanah Mediteran Simo, Boyolali

Blok	Во	N	C/N	pН
A	0,80 %	0,33 %	1,36 %	7,6
В	1,51 %	0,79 %	1,11 %	7,7
С	1,96 %	2,78 %	0,40 %	7,6
Rerata	1,42 %	1,30 %	0,96 %	7,6

Kandungan bahan organik tanah: Hasil perhitungan kandungan bahan organik pada tanah Mediteran di Simo, Boyolali dapat di lihat pada tabel 1 yaitu, tanah Mediteran di Simo Boyolali memiliki kandungan bahan organik dengan rerata 1,42 %, jika jika dilihat pada pendapat Bohn (1979) yakni kandungan bahan organik tanah sangat beragam, berkisaran antara 0,5%-5% pada tanahtanah mineral. Bahan organik berperan sebagai granulator yaitu memperbaiki struktur tanah.

<u>Kandungan Nitrogen (N)</u>: Nitrogen tanah berasal dari bahan organik tanah, pengikatan N di udara oleh *Rhizobium* sp yang bersimbiosis dengan tanaman, *Azotobacter*, atau penambahan pupuk N. Kriteria N dalam tanah berdasarkan standar Internasional yaitu <0,1 termasuk kriteria sangat

rendah, 0,1-0,21 berkriteria rendah, 0,22-0,51 berkriteria sedang, 0,52-0,75 berkriteria tinggi sedangkan >0,75 termasuk kedalam kriteria sangat tinggi (Hardjowigeno, 2003). Pada hasil analisis tanah Mediteran di Simo, Boyolali memiliki kandungan Nitrogen sangat tinggi yaitu dengan rerata 1,3 % (tabel 1).

Kandungan C/N Ratio: Kandungan C/N Ratio adalah salah satu parameter yang digunakan untuk mengukur kualitas bahan organik. Pada tabel 1 dapat dilihat kadar C/N pada tanah Mediteran di Simo, Boyolali yaitu dengan rerata 0,96 %. Menurut Hardjowigeno (2003) kondisi C/N dengan kadar kecil dari 5 maka masuk kepada kriteria sangat rendah. Jika dibandingkan hasil analisis Hardjowigeno (2003), dengan hasil analisis tanah Mediteran di Simo, Boyolali maka tanah tersebut masuk pada kriteria N/C rendah. Hal ini selaras karena kandungan N total yang sangat tinggi yaitu 1,3 %

pH Tanah: Menurut Suharno (2014) budidaya Kedelai dilakukan pada kondisi tanah dengan pH netral 5,5-6,5, selain dari kondisi tanaman hal ini juga berkaitan dengan kondisi tanaman yang bersimbiosis dengan bakteri *Rhizobium* sp. Menurut Danu dan Hanafiah (2015) *Rhizobium* sp tidak dapat hidup pada pH lebih kecil dari 4,3 karena bakteri ini peka terhadap keasaman. Menurut Danu (2015) Tanaman kedelai sebaiknya dibudidayakan pada pH <5,0 agar mendapatkan hasil yang maksimal dalam pertumbuhan dan produksi

tanaman pada setiap jenis varietas kedelai. Jika dibadingakan dari referensi tanah Mediteran memiliki pH yang cukup tinggi dibandingkan dengan kondisi pH standar untuk hidup tanaman kedelai sehingga dapat tumbuh dan berproduksi dengan baik

Hasil Kadar lengas tanah: Pengukuran Kadar lengas kapasitas lapang guna untuk mengetahui ketersediaan air pada tanah, yang untuk mengetahui keadaan air normal. Kadar lengas tanah pada kondisi dilapangan dapat dilihat pada tabel 2

Tabel 2. Kadar Lengas Tanah Mediteran Simo, Boyolali

Blok	Lapisan 1 (0-10 cm)	Lapisan 2 (10-20 cm)	Lapisan 3 (20-30 cm)	Rearata
A	15,01 %	18,39 %	26,93 %	20,11 %
В	7,12 %	14, 61 %	25,39 %	16,25 %
С	8,94 %	19,97 %	29,33 %	19,41 %
Rerata	10,35 %	19,18 %	27,21 %	18,92 %

Dari tabel 2 dapat dilihat rerata kadar lengas pada setiap blok per lapisannya, kondisi kadar lengas pada lapisan 0-10 cm memiliki kadar lengas 10,35%, lapisan 10-20 cm yaitu 17,65 %, dan 20-30 cm yaitu 27,21 %. Kadar lengas terbesar dimiliki oleh lapisan 20-30 cm. Hal ini kemungkinan dipengaruhi dari kondisi tanah yang kering dan kemarau sehingga pada lapisan atas terjadi penguapan yang besar sehingga pada lapisan atas kadar lengas yang dimiliki kecil yaitu 10,35%. Untuk mengetahui seberapa air yang harus tersedia di tanah dan kondisi air yang tersedia di lapangan maka perlu mengetahui kadar lengas kapasitas lapang, kadar lengas kondisi lapangan, dan kadar lengas kering angin, data dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Kandungan Kadar Lengas Tanah Mediteran

Blo k	Kl- KL	KL dilapan gan	Kl- Ka	Air tersedia(teori) Kl-kl – Kl- ka	Air tersedia (kondisi lapangan) KL lapangan – K-Ka
A	34,4 8%	20,11	20,0 5%	14,43%	0,06%
В	38,8 0%	16,26 %	13,8 0%	25,00%	2,46%
С	31,3 3%	19,41 %	17,0 0%	14,33%	2,41%
Rer ata	34,8 7%	18,92 %	16,9 5%	17,92%	1,97%

Jika dilihat dengan kondisi kadar lengas kondisi di lapangan 18,92% maka pada ketersediaan airnya yaitu 1,97% pada tanah mediteran Simo, Boyolali ini memiliki kondisi ketersedian air yang sngat kecil karena dari kemampuan mengikat air dan kondisi air pada kapasitas lapang yaitu memiliki kemampuan demikan tersedia yaitu 17,92% dengan perbandingan yang sangat tinggi, maka dapat disimpulkan kondisi tanah mengalami cekaman yang tingg. Kondisi tanaman berada pada kondisi kritis karena rerata panjang perakaran hanya mampu mencapai 0-11 cm sedangkan kondisi kadar lengas terbesar pada kedalaman 20-30 cm. Hal ini memberikan efek pada kondisi pertumbuhan dan tanaman kedelai tersebut kurang optimal hasil karena penyerapan hara tergantung pada kondisi perkaran. Kedelai masih bertahan hidup dan berbuah dan baik, diduga adanya peranan dari rhizobakteri dan mikoriza sehingga tanaman kedelai dapat bertahan hidup.

Karakterisasi *Rhizobium* sp, *Rhizobakteri* dan Mikoriza

<u>Rhizobium</u> sp.: Karakterisasi Nodul akar kedelai Petek Simo, Boyolali, Aktivitas Nodulasi dapat diamati berdasarkan: Sebaran nodul, jumlah Nodul, diameter nodul, berat nodul, dan nodul. Berikut sebaran nodul jumlah nodul, diameter nodul, berat nodul dan bentuk nodul tersaji pada tabel 4.

Tabel 4. Nodul Akar Tanaman Kedelai Petek di Simo, Boyolali

NodulB1 ok	Sebaran	Jumlah Nodul	Diamete r nodul (cm)	Berat Nodul (g)	Bentuk Nodul
Blok A	Akar pokok	4, 7	0,06 - 0,15	0,07	Irregular
Blok B	Akar pokok	3,8	0,03 - 0,36	0,28	Irregular
Blok C	Akar pokok	6,67	0,09 – 0,44	0,08	Irregular
Rerata	Akar pokok	5,06	0,09 - 0,15	0,14	Irregular

Sebaran Nodul: Dari tabel 4, dapat dilihat sebaran nodul akar kedelai varietas petek di tanah Mediteran Simo Boyolali, terdapat di Akar pokok. Sebaran nodul akar menunjukan letak terbentuknya nodul akar yang ada dalam sistem perakran kedelai. akar Sebaran nodul menunjukkan letak terbentuknya nodul akar yang ada dalam sistem perkaran kedelai. Gambar sebararan nodul akar kedelai dapat dilihat pada gambar lampiran yang menunjukkan menunjukan nodul akar terdapat di akar primer dan sekunder, nodul akar terlihat paling banyak berada pada akar primer yaitu pada pangkal akar.

<u>Jumlah Nodul</u>: hasil penelitian Noveta (2007) dan Solihin (2006) jumlah nodul kedelai tanpa inkulasi yaitu16,89 buah nodul. Menurut Danu Dkk (2015) peningkatan pH akan

meningkatan jumlah pembintilan dan pH dengan hasil pembintilan yang lebih besar pada tanaman. Selain itu kondisi pola tanaman pada lahan tersebut diduga mempengaruhi perkembangan juga perbintilan karena menurut Panday (1994) dalam Suharno (2014) Kondisi tanah yang sebelumnya telah ditanami kedelai akan memiliki populasi Rhizobium sp yang lebih tinggi yaitu 5-30 bintil/tanamn. Sedangkan tanah yang sebelumnya tidak ditanami kedelai akan memiliki pembintilan 1-10 bintil/tanaman. Kondisi pola tanamn di tanah Meditera Simo, Boyolali yaitu Padi-Padi-Kedelai sehingga tanah tersebut tidak mempunyai riwayat ditanami kedelai sebelumnya.

Diameter Nodul: Rerata diameter nodul pada tabel 4. menunjukan antara 0,09-0,15 cm. Diameter nodul berkaitan dengan aktivitas *Rhizobium* sp., jika nodul semakin aktif maka akan semakin besar nodul yang terbentuk. Hasil penelitian Noveta (2007) diameter nodul dengan perlakuan menggunakan serbuk gergaji dan macam pengemas yaitu 0,18 cm dan 0,21 cm. jika dibandingkan terdapat perbedaan antara penelitian Noveta dan kedelai di Simo, Boyolali. Hal ini diduga karena pengaruh dari perlakuan selain itu kondisi tanah mediteran yang berada pada cekaman kekeringan dan pH tanah yang tinggi. Hasil penelitian Danu Dkk (2015) menyatakan peningkatan pH akan mempegaruhi diameter nodul yaitu pada pH 6,8 memiliki diameter nodul 0.71. Sedangkan pada perkembangan nodul di tanah Mediteran di Simo, Boyolali yang memiliki pH yang tinggi yaitu 7,6

namun diameter nodul yang dimiliki yaitu 0,009-0,15. Perbedaan ini diduga dipengaruhi kondisi tanah yang sangat asam dan memiliki kadar lengas yang tinggi dan berada pada cekaman kekekringan, sehigga nodul terhambat pada perkembangannya.

Berat Nodul: Berat nodul dipengaruhi oleh jumlah dan diameter nodul, berat nodul pada kedelai di tanah Mediteran Simo, Boyolali dengan rerata ±0,14 gram, dengan bentuk irregular (tidak beraturan). Nodul pada kedelai Petek di Simo, memiliki kondisi nodul yang banyak namun kecilkecil. Menurut Panday (1994) Nodul akan berkembang baik dan aktif jika kondisi air terpenuhi, tanah tidak terlalu asam atau basa pH antara 5,5 dan 6,5, tanah serta mengandung unsur hara yang cukup. Kondisi tanah di Simo, sangat kering air tersedia hanya pada saat tanam sampai umur 2 minggu setelah tanam serta memiliki konsentrasi pH yang agak basa yaitu 7,6. Hal ini diduga yang mempengaruhi kondisi nodul. karena perkembangan nodul dapat berkembang dengan baik apabila dalam kondisi kebutuhan terpenuhiserta konsentrasi pH 5,5-6,5 sehingga nodul *Rhizobium* sp pada kedelai Petek di Simo memiliki jumlah nodul yang banyak namun berat nodul hanya $\pm 0,14$.

<u>Karakterisasi Koloni Rhizobium sp</u>: Untuk dapat mengidentifikasi dan mengklasifikasi suatu mikroorganisme maka harus mempelajari karakteristiknya. Karakteristik berdasarkan berdasarkan bentuk koloni, diameter koloni, serta warna koloni, dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. *Rhizobium* sp Hasil Pengamatan Berdasarkan Betuk koloni, Diamter, dan Warna

Nama Bakteri	Bentuk koloni	Diameter koloni (cm)	Warna koloni
R1	Circular	0,1-0,3	Pink Coklat tengah
R2	Circular	<0,1	Pink titik
R3	Irregular	0,1-0,3	Pink Bunga semu
R4	Myceloyd	0,3	pink pucat
R5	Circular	0,3-0,5	pink transparent
R6	Circular	0,3	Pink jelas
R7	Culed	0,5	Pink jelas
R8	Circular	0,3	Pink coklat
R9	Circular	0,3	Pink salm
			Pink mengkilat
R10	Circular	0,3-0,5	transparan
R11	Circular	0,3	pink pucat
R12	Irregular	0,3	Pink
R13	Irregular	0,1-0,2	Pink putih
R14	Rhizoid	0,1-0,2	pink
R15	Irregular	0,1-0,8	Pink zona
R16	Irregular	0,3	pink bunga
R17	Irregular	0,2-0,3	Pink bunga zona
R18	Circular	0,3	Pink titik tengah

Isolasi dilakukan dengan mengambil nodul dari akar kedelai di tanah Meditera Simo, Boyolali. Pengamatan dilakukan berdasarkan bentuk, diameter dan warna maka ditemukan 18 isolat. Hasil pengamatan bentuk koloni dari nodul akar kedelai di Simo, Boyolali yaitu berbentuk *Circular*, *Culed* dan *Irregular*, dengan warna dan diameter berbeda-beda. Untuk memastikan apakah isolat pada tabel 5 benar-benar isolat *Rhizobium* sp maka dilanjutkan dengan uji sel yaitu berdasarkan bentuk dan sifat gram sehingga hasil cat grap tersaji pada tabel 6.

Tabel 6. Sifat gram dan bentuk sel isolate *Rhizobium* sp pada kedelai Petek di tanah Mediteran Simo Boyolali

DIIIIO D	Dillo Doyolali					
Nama	Ulangan 1		Ulangan 2			
Sampel	Sifat Gra		Sifat Gram			
-	Bentuk s	el	Bentuk se	el		
R1	Negatif	Kokus	Negatif	Kokus		
R4	Negatif	Kokus	Negatif	kokus		
R5	Negatif	Basil	Negatif	Basil		
R6	Negatif	Basil	Negatif	Basil		
R7	Negatif	Basil	Negatif	Basil		
R8	Negatif	Basil	Negatif	Basil		
R9	Negatif	Basil	Negatif	Basil		
R10	Negatif	Basil	Negatif	Basil		
R12	Positif	Kokus	Positif	Kokus		
R13	Negatif	Basil	Negatif	Basil		
R14	Negatif	Basil	Negatif	Basil		
R15	Negatif	Kokus	Negatif	Kokus		
R17	Negatif	Kokus	Negatif	Kokus		
R18	Negatif	Kokus	Negatif	Kokus		

Hasil cat gram pada tabel 6 menunjukkan hasil yang berbeda pada setiap isolatnya, negatif kokus, negatif basil dan positif kokus. Berdasarkan Bergey's manual of Determinative Bacteriology oleh Jhon G. Holt et. al (1994) Sifat sel Rhizobium sp yaitu negtif dan berbentuk batang, hal yang sama dikemukakan oleh Pelczar dan Chan (1988) secara umum sel-sel bakteri Rhizobium sp berbentuk batang, aerobik dan bersifat gram negatif.

Selanjutnya pengamatan secara mikroskopis yang mengamati berdasarkan Elevansi koloni, bentuk tepi dan struktur dalam. Hasil pengamatan dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7. Deskripsi Isolat *Rhizobium* sp, di Tanah Mediteran Simo, Boyolali

Nama	Elevansi	Bentuk	Struktur dalam
Bakteri		Tepi	
R5	Effuse	Entire	Transparent
R6	Effuse	Entire	Coarsely granular
R7	Umbonate	Crenate	Arborescent
R8	Effuse	Entire	Translucent
R9	Effuse	Lobate	Coarsely granular
R10	Effuse	Entire	Transparent
R13	Conuex	Ramose	Filamentous
	Rugose		
R14	Conuex	Undulate	Finely granular
	Papillate		

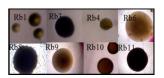
Hasil penelitian Dwi (2005) Struktur dalam isolat *Rhizobium* sp. yang terdapat di kedelai Edamame memiliki (*Arborescent*) dan (*Finely granular*). Hal ini menunjukan terdapat beberapa isolat *Rhizobium* sp kedelai petek yang terdapat di Simo Boyolali, dengan hasil penelitian Elkan dan Dwi, namun ada beberapa isolat yang berbeda yaitu (*Coarsely granula*) dan (*Filamentous*). Perbedaan ini kemungkinan disebabkan strain isolat *Rhizobium* sp pada kedelai Petek yang hidup di Simo, Boyolali berbeda dengan strain *Rhizobium* sp yang telah dieliti oleh Elkan dan Dwi serta menunjukan karakteristik khusus dari kedelai varietas Petek ditanah Mediteran dengan cekaman kekeringan.

Rhizobakteri: Isolasi dilakukan dengan menggunakan cekaman NaCl, diawali dari uji screening dengan cekaman NaCl 0,17 M, 1 M, 1,5 M, 1,75 dan 2 M. Hasil solasi dan karakterisasi pada awal berdasarkan bentuk koloni, warna dan diameter ditemukan 11 bakteri yang berbeda. berikut 11 isolat yang berbeda pada tahapan pengamatan berdasarkan bentuk koloni, diameter, dan warna

Tabel 8. Delapan Isolat *Rhizobakteri* pada cekaman 2 M

Nama Bakteri	Bentuk	Diameter	Warna	Lendir
Rb.1	Circular	< 0,1 cm Putih cream pekat		+
Rb.2	Circular	0,1 cm	Putih cream pekat	+
Rb.3	Circular	0,2 cm	putih	+
Rb.4	Circular	0,1 cm	putih cream	+
Rb.5	Circular	0,3 cm	putih cream	+
Rb.6	Irregular	0,3 cm	putih cream	+
Rb.7	Circular	0,1 cm	Putih susu	+
Rb.8	Circular	0,1 cm	Putih susu	+
Rb.9	Circular	0,1 cm	Putih susu	+
Rb.10	Circular	0,1 cm	Putih Cream	+
Rb.11	Circular	0,1 cm	Putih	+

Bentuk koloni pada isolat *Rhizobakteri* di tanah Mediteran Simo, Boyolali yaitu berbentuk Circular dan Irregular, sedangkan diameternya memiliki ukuran yang berbeda-beda. Untuk warna koloni yaitu Putih kream pekat, Putih kream, Putih dan Putih susu hal ini sesuai dengan pendapat Holt, et. al. (1994) bahwa Rhizobakteri memiliki warna yaitu kuning, pada hasil pengamatan Putih atau Rhizobakteri memiliki warnan Putih kream pekat, Putih kream, Putih dan Putih susu. Hal ini menunjukan ada beberapa strain Rhizobakteri. Selanjutnya pengamatan secara morfologis mikroskopis yaitu berdasarkan elevansi, bentuk tepi, dan struktur dalam maka dari 13 isolat didapatkan hanya 8 isolat yang berbeda. Untuk visualisasi dapat dilihat pada gambar 4 sedangkan deskripsi 8 isolat *Rhizobakteri* disajikan pada tabel 6.



Gambar 2. Delapan isolat *Rhizobakteri* tanah Mediteran di Simo, Boyolali

Tabel 9. Deskripsi 8 isolat *Rhizobakteri* secara morfologis Mikroskopis

Nama	Elevansi	Bentuk	Struktur dalam
Bakteri		Tepi	
	T 00		^
Rb1	Effuse	Entire	Opaque
Rb3	Effuse	Entire	Opaque
Rb4	Raised with	Csiliate	Wavy
	Concave		enteriaced
	Bevelfed edge		
Rb6	Effuse	Entire	Trnslucent
Rb8	Umbonate	Undulate	Opaque
Rb9	Effuse	Entire	Coaarsely
			granular
Rb10	Effuse	Entire	Translucent
Rb11	Effuse	Entire	Ораqие

Selanjutnya adalah pengamatan berdasarkan bentuk dan sifat gram sel. Karakterisasi sel dilakukan dengan cara pengecatan garm, yang mana organisme yang dapat menahan kompleks pewarna primer ungu kristal iodium sampai pada akhir prosedur (sel-sel tampak biru gelap atau ungu) di sebut gram positif sedangkan organisme yang kehilangan kompleks warna ungu kristal pada pembilasan, dan terwarnai dengan safranin sehingga sel nampak merah disebut gram negatif (Hadioetomo dan Ratnasari, 1985). Dari delapan isolat hasil pengamatan dilakukan karakterisasi sel meliputi bentuk sel dan sifat sel, yang tersaji dalam tabel 10.

Tabel 10. Deskripsi Karakterisasi Sel Isolat *Rhizobakteri* pada Kedelai Petek di Tanah Mediteran Simo Bovolali

Wiedrichan Simo Boyotan				
Nama Sampel	Sifat gram	Bentuk		
RB.1	Negatif	Kokus		
RB.3	Negatif	Kokus		
RB.4	Negatif	Kokus		
RB.6	Negatif	Kokus		
RB.8	Negatif	Kokus		
RB.9	Negatif	Kokus		
RB.10	Negatif	Kokus		
RB.11	Negatif	Kokus		

Tabel 10, menunjukkan bahwa kedelapan isolate memiliki bentuk sel kokus dan bersifat gram negatif dengan ditunjukan warna merah. Menurut Jhon G. Holt et. al.(1994) beberapa genus dari Rhizobakteri memiliki bentuk batang atau basil, lurus, batang sedikit bengkok, kokus, dan *pulmp Vibrioid*. Genus Rhizobakteri yang memiliki sifat gram negatif dan berbentuk kokus yaitu, dari genus Azotobacter dan Acetobakter. Dari kedua genus tersebut yang dapat bertahan dengan pH yang tinggi yaitu dari genus Azotobacter dapat tumbuh dengan pH antara 4,8-8,5 sedangkan Acetobakter pH optimumnya yaitu antara 5,4-6,3. Jika dibandingkan antara hasil pengamatan isolat di tanah Meditera Simo, Boyolali dan pendapat Jhon, G. Holt et. al. merupakan ciriciri dari Rhizobakteri dengan genus Azotobacter karena memiliki kesamaan gram dan bentuk sel dan tumbuh dengan pH optimum yaitu antara 4,8-8,5 yang mana kondisi tanah Mediteran di Simo, Boyolali memiliki pH 7,6. Dari hasil pengamatan delapan isolat Rhizobakteri memiliki sel yang berbentuk kokus dan memiliki sifat gram negatif namun memiliki diameter, warna, struktur dalam, bentuk tepi dan elevasi yang berbeda-beda.

Hasil Penelitian Agung-Astuti (2012) yaitu isolat *Rhizobacteri indigenous* lahan pasir vulkanik Merapi memiliki sifat gram negatif, dengan bentuk *Baccil dan Coccus*, selain itu juga pada hasil penelitian Erma (2013) sifat gram *Rhizobateri* bersifat negatif dan memiliki bentuk yang kokus dan basil. Hal ini sesuai dengan pengamatan pada *Rhizobakteri* yang bersumber dari tanah Mediteran Simo, Boyolali memiliki betuk sel kokus dan bersifat negatif.

Terdapat kemiripan antara hasil penelitian *Rhizobacteri indigenous* lahan pasir vulkanik Merapi yang tahan terhadap cekaman hingga < 2,25 M bersifat osmotoleran dengan tanaman kedelai di tanah Mediteran Simo, Boyolali dengan cekaman 2 M Kondisi tanah mediteran Simo, Boyolali selain berada pada cekaman kekeringan, pH dengan konsentrasi agak basa yaitu 7,6, serta kondisi ketersediaan air rendah yaitu 1,97 dari 17,92%, kedelai tetap tumbuh baik, ini di duga karena adanya peranan *Rhizobakteri* hal ini dibuktikan dengan ditemukannya 8 isolat Rhizobakteri yang tahan pada cekaman 2 M.

Mikoriza: Untuk membuktikan asosiasi mikoriza pada akar tanaman maka dilakukan pengamatan persentase infeksi mikoriza pada akar dan menghitung jumlah spora yang terdapat di sekitar perkaran tanama. Pengambilan sampel akar untuk mengamati infeksi mikoriza akar yang digunakan akar sekunder.

Tabel 11. Rerata Infeksi dan Jumlah Spora Mikoriza

Blok	Rata-rata Infeksi	Rata-rata Spora Mikoriza x10 ⁶
A	21,0 %	20,23 Spora/ml
В	15,0 %	22,26 Spora/ml
C	10,0 %	18,90 Spora/ml
Rerata	15,3 %	20,46 Spora/ml

Infeksi Mikoriza: Kedelai Petek di Simo Boyolali, menurut tabel 10 ternyata memiliki interakaksi dengan mikoriza yang di tandai dengan adanya spora yang terdapat pada tanah yang memiliki rata-rata 15,3 %. Hal tersebut diduga berasal dari tanaman yang inang yang terinfeksi. Menurut Kabirun (1990), Mikoriza mempunyai peran yang sangat penting dalam peningkatan produktifitas tanaman, yaitu meningkatkan penyerapan air dan beberapa hara tanaman, menghasilakn hormon pemacu pertumbuhan tanaman, dapat mengurangi cekaman tanaman oleh dan dapat memperbaiki struktur tanah, air, meningkatkan nodulasai serta penyematan Nitrogen oleh *Rhizobium sp* pada kedelai.

Jumlah Spora Mikoriza: Selain dari persentase infeksi Mikoriza jumlah spora sangat efektif digunakan untuk mengetahui perkecambahan spora yang telah dihasilkan oleh cendawan mikoriza arbuskula. Produksi spora akan meningkat jika metabolisme tanaman cukup baik. Di tanah Mediteran di Simo Boyolali, memiliki asosiasi dengan Mikoriza hal ini dibuktikan dengan adanya spora Mikoriza dengan rerata Jumlah Spora Mikoriza dapat dilihat pada tabel 10 yaitu 20,46 Spora/ml.

Pertumbuhan dan Hasil Tanaman Kedelai:
Pertumbuhan tanaman tanaman yang dianalisi terdiri dari 10 sampel tanaman untuk setiap bloknya, yang terdiri A, B C sehinga jumlah tanaman 30 sampel tanaman. Pertumbuhan yang diamati yaitu tinggi tanaman, berat segar tanaman, berat kering tanaman, panjang akar, berat segar akar, dan berat kering akar.

Tabel 12. Pertumbuhan Tanaman Kedelai Petek, Simo, Boyolali

В	Tinggi	Berat	Berat	Panja	Berat	Berat
1	Tanam	Segar	Kering	ng	Segar	Kering
О	an	Tanama	Tanama	Akar	Akar	Akar
k	(cm)	n (g)	n (g)	(cm)	(g)	(g)
Α	73,75	7,92	6,32	13,66	0,39	0,29
В	71,50	6,26	4,80	12,00	0,41	0,27
С	73,18	5,06	3,87	10,00	0,53	0,34
R						
er	72,81	6,41	5,00	11,89	0,44	0,30
at	12,01	0,41	3,00	11,09	0,44	0,50
a						

Pada akar pada kedelai petek yang tumbuh di tanah Mditeran tersebut. Pola percabangan pada kedelai Petek Simo. Boyolali ini dapat dikategorikan kurang baik karena dalam skors tidak mencapai 2+ sedangkan hasil terbaik adalah 5+, dengan kondisi pengembangan akar yang kurang baik namun tanaman dapat tumbuh dengan baik. Hal ini di sebabkan kondisi tanah yang sangat keras dan minimnya ketersediaan air, menurut Hasanah dkk (2008) pada saat kondisi kering akar tanaman akan mempertahankan hidup dengan cara memperkuat akar yang ada dari pada pembentukan akar baru, sehingga ploriferasinya tidak terlalu luas.



Gambar 3. Ploriferasi Akar

Dari Gambar 7 dapat diliat pengembangan akar tidak terlalu baik bahkan pada gambar ke A dan C terlihat adanya pembekakan di bagian pertengahan akar, penebalan tersebut jika diiris melintang dan diamati dibawah mikroskop maka aka muncul kenampakan seperti berikut



Gambar 4. Irisan melintang penebalan Akar

Diduga dengan kondisi tanah mediteran di Simo, Boyolali yang kering dan tidak ada pengairan selama kemarau panjang membuat kondisi akar untuk mempertahankan hidupnya dengan cara mempertebal jaringan epidermis sehingga nampak pada Gambar 8 teradapat penebalan di bagian pigir akar. Fungsi jaringan epdermis atau jaringan pelindung berfungsi membatasi penguapan, dan sebagai daran penyimpanan dan penyerapan.

Selain itu menurut Fatmah (2003) Akar yang terinfeksi juga dapat meningkatkan serapan unsur hara dan mengurangi cekaman pada kadar lengas tertentu, akar kedelai petek Simo Boyolali terbukti terinfeksi dapat dilihat pada gambar 5 dan tabel 10 sehingga diduga kondisi tanaman kedelai petek di tanah Mediteran Simo Boyolali karena adanya asosiasi antara *Rhizobakteri* dan Mikoriza.

Hasil Kedelai: Pengamatan Hasil, dilakukan pada saat pemanenan, Hasil kedelai Petek yang hidup di daerah Simo, Boyolali yang diambil dari 3 blok yang hasil masih-masing blok dikeringkan dengan menggunakan sinar Matahari, lalu di timbang dan

dihitung menggunakan perbandingkan hasil pada kadar air 11%. Hasil tanaman secara keseluruhan tersaji pada tabel 15.

Tabel 13. Rerata Jumlah Polong, berat polong, jumlah biji dan berat biji Tanaman Kedalaj

jumlah biji, dan berat biji Tanaman Kedelai

Blo k	Jumlah Polong /tanaman (buah)	Berat Polong /tanama n (gram)	Jumla h Biji /tanam an (biji)	Berat Biji /tana man (gram	Berat 100 Biji	Hasil t/ha
A	47,00	12,22	86,10	6,15	7,81	0,34
В	46,00	11, 62	101,20	6,63	6,58	0,73
С	38,40	9,85	71,40	5,90	6,75	0,73
Rer ata	43,80	11,23	86,23	6,03	6,83	0.6

Dari tabel 15 dapat dilihat rerata jumlah polong adalah 43,80 polong, dengan rerata berat 6,03 gram, sedangkan rerata jumlah biji 83,23 biji pertanamannya, dengan rerata berat biji 7,80 gram. Berat 100 bijinya yaitu 6,83 dan dengan hasil 0,60 t/ha. Menurut Suyatmo dan Musalamah (2010) Jumlah polong kedelai Petek setip tanamannya yaitu 25 polong, dengan berat biji pertanamnnya 9,60 gram. Jika dilihat dari hasil pengamatan pemanenan kedelai Petek didaerah Simo Boyolali dan Hasil Penelitian Suyatmo dan Mursalamah dari jumlah polong terlihat lebih banyak pada kedelai Petek di Simo Boyolali yaitu selisih 23.80 Polong/tanaman namun dari berat biji lebih rendah. Untuk berat 100 biji kedelai Petek di Simo lebih kecil yaitu 7,04 gram dan Petek pada kondisi normal mempunyai berat 100 biji 8,7 meskipun selisinya tidak besar namun berat kedelai petek di Simo lebih rendah. Sedangkan untuk hasil dari kedelai Petek di Simo dapat dilihat di tabel 15 hasil biji pada kadar air 11% yaitu 0,60 t/ha.

Hasil tanaman kedelai Petek di Simo kurang optimal diduga merupakan pengaruh dari kondisi tanaman selama pertumbuhannya. Menurut Sri Suryanti dkk (2015) kondisi kedelai yang berada dalam cekaman kekeringan pada setiap fase pertumbuhan berpengaruh terhadap penurunan hasil dan berpengaruh besar pada periode kritis tanaman. Namun demikian kondisi kedelai di Simo dapat bertahan hidup dengan baik ini diduga adanya Asosiasi Rhizobium, Rhizobakteri dan Mikoriza melihat dari kondisi kedelai yang tidak ada pengairan sejak berusia 2 minggu setelah tanam sampai pemanenan namun kedelai masih dapat bertahan hidup ditanah Mediteran dengan cekaman kekerigan tidak ada pemupukan dan penyiangan dapat tumbuh dan berbuah dengan baik meskipun tidak seoptimal hasil kedelai Petek pada umumnya. Hal ini dibuktikan dengan ditemukannya infeksi Mikoriza pada akar kedelai serta terdapat 8 isolat Rhizobakteri yang dapat bertahan pada cekaman 2 M.

SIMPULAN

Kesimpulan: (1) Hasil isolasi dan karakterisasi Rhizobium sp pada nodul akar kedelai Petek di Simo, Boyolali, ditemukan 8 jenis isolat yaitu R5, R6, R7, R8, R9, R10, R13, R15 dengan dengan sifat gram negatif dan berbentuk basil. (2) Hasil isolasi dan karakterisai Rhizobakteri ditemukan 8 isolat yaitu Rb1, Rb3, Rb4, Rb6, Rb8, Rb9, dan Rb11 dapat tumbuh pada cekaman NaCl 2 M memunyi sifat gram negatif dan berbentuk kokus. (3) Akar kedelai Petek, di tanah Mediteran Simo, Boyolali

terinfesi Mikoriza sebesar 13,5 % berupa hifa eksternal, Hifa internal, vesicel, dan arbuskul, dengan spora 20,46 x 106 Spora/ml. (4) Terdapat Asosiasi antara 8 isolat Rhizobium sp dengan tanaman kedelai Petek di tanah Mediteran Simo, Boyolali denga 8 isolat Rhizobakteri osmotoleran dan spora Mikoriza sehingga kedelai Petek dapat tumbuh dan produktifitas 0,60 t/ha meski dalam kondisi tercekam dengan pH 7,6.

DAFTAR PUSTAKA

- Agung-Astuti. 2012. Isolasi *Rhizobacteri* indigenous Lahan Pasir Vulkanik Merapi yang Tahan Terhadap Cekaman Kekeringan. Disampaikan pada seminar ilmiah di Fakultas Pertanian UMY, 24 Nopember 2012.
- Artha,N.1993. Respon Tanaman Kedelai terhadap Inokulasi *Rhizobium sp* japonicum dan Pupuk Anorganik di Lahan Kering pada Musim Hujan. Prosiding Lokakarya Palawija. Bogor. 4:329-339.
- Danu S. L, A S. Hanafiah, Mariani S. 2015.

 Pengaruh pH terhadap Pemebntukan Bintil
 Akar, Serapan N, P, dan Produksi Tanaman
 pada Beberapa Varietas Kedelai pada
 tanah Inseptisol di Rumah Kasa. Fakultass
 Pertanuan Usu. Medan. 3(3): 1111
 1115.
- Dwi Yuni Astuti. 2005. Isolasi Pemurnian dan Inokulasi Isolat *Rhizobium sp*sp. Dari Nodul Akar Kedelai Varietas Edamame. Fakultas Pertaian. UMY. Yogyakarta.

- Bohn. H.L.. B. L. Mc. Neal. and G.A O'Connor. 1979. Soil Chemistry. John Willey & Sons. New York.
- Elkan, G.H. 1987. Symbiotic nitrogen fixattion tecnology. Marcel Dekker, INC. New York dan Basel. 1-27 p.
- Fatmah. 2003.Peranan *Mikoriza Vesikular Arbuskular* Terhadap Pertumbuhan dan Hasil Jagung Hibrida di Tanah Pasir Pantai pada berbagai Volume Air Siram.

 Fakultas Pertanian UMY. Yogyakarta.
- Hadioetomo, R. S. 1993. Mikrobiologi Dasar dalam Praktek: Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Hardjowigeno, S. 2003. Ilmu Tanah. Akademi Persindo. Jakarta.
- Hasanah,N.A.U, Agung-Astuti, dan A.A.
 Syarifudin. 2008. KajianRhizobakteri
 Fiksasi N Tahan cekaman kekeringandengan
 berbagai kondisi air dan macam
 iokulum pada padi merah putih. Fakultas
 Pertanian UMY. Yogyakarta.
- I Nyoman Adijaya, Putu Suratmini dan Ketut Mahaputra. 2014. Aplikasi Pemberian Legin (*Rhizobium sp*) Pada Uji Beberapa Varietas Kedelai Di Lahan Kering. Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Bali. Bali.
- Jhon G. Holt, Noel R. K., Petter H. A. S., James S.T., S. T. Williams. 1994. *Bergey's Mamual of Determinative Bacteriology*

- ninth edition. Williams & Wilkins. USA. 787 p.
- Kabirun. 1990 *Dalam* Tim Agroteknologi. 2012. Panduan Praktikum Teknik isolasi dan Perbanyakan Agensia Hayati. UMY. Yogyakarta.
- Kemas, Ali Hanafiah. 2005. Dasar dasar Ilmu Tanah. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Marsela A., 2012. Kedelai, Potret Ketakberdayaan Negara Senin, 30 Juli 2012 |13:17.

 www.suarapembaruan.com. Diakses 2
 Agustus 2015.
- Metrotvnews. 2014. 50 hektar kedelai gagal panen. http://news.metrotvnews.

 com/read/2014/10/17/306282/50-hektarelahan-kedelai-gagal-panen-akibat-kekeringan. Akses 30 Agustus 2015.
- Noveta C. I P. 2007. Pengaruh Jenis Media
 Pembawa dan Pengemas terhadap
 Efektivitas Inokulum R. Japonicum
 Indigenous Etisol Vulkanik pada kedelai
 Edamame. UMY. Yogyakarta.
- Novita N. 2011. Varietas dan Teknologi Produksi Kedelai.Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian (BALITKABI). Malang.
- Pelczar, M.J. dan E. C. S. Chan. 1988. Dasar-dasar Mikrobiologi. Universitas Indonesia. Jakarta. Hal 953-981. Setiadi, Y., 2003. Arbuscular mycorrhizal inokulum production. Program dan

- abstrak Seminar dan Pameran:Teknologi Produksi dan Pemanfaatan Inokulan Endo-Ektomikoriza untuk Pertanian, Perkebunan, dan Kehutanan. 16 September 2003. Bandung. pp 10.
- Sri Suryanti, Didik I., Putu S., Jaka W. 2015.

 Kebutuhan Air, Efisiensi Penggunaan

 Air Dan Ketahanan Kekeringan Kultivar

 Kedelai. Agritech. Yogyakarta. 35(1).
- Suharno. 2014. Peranan *Rhizobium Japonicum* pada Produktivitas Kedelai. STTP Yogyakarta. Yogyakarta.
- Suyatmo dan Musalamah. 2010. Kemampuan Berbunga, Tingkat Keguguran Bunga, dan Potensi Hasil Beberapa Varietas Kedelai. Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian. Malang.
- Yuwono, T., Desi Handayani, and Joedoro Soedarsono (1999) *Dalam* Tim Agroteknologi. Panduan Praktikum Teknik isolasi dan Perbanyakan Agensia Hayati. UMY.Yogyakarta.