

**STUDI KEMELIMPAHAN BAKTERI RHIZOSFER TERHADAP
PERTUMBUHAN, PRODUKSI, SERTA MUTU BENIH PADA EMPAT
VARIETAS KEDELAI (*Glycine max* (L.)Merill) DI LAHAN MARGINAL
BERBASIS *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)**

(Skripsi)

Oleh

**Dian Anjar Sari
NPM 1814161032**



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023**

**STUDI KEMELIMPAHAN BAKTERI RHIZOSFER TERHADAP
PERTUMBUHAN, PRODUKSI, SERTA MUTU BENIH PADA EMPAT
VARIETAS KEDELAI (*Glycine max* (L.) Merrill) DI LAHAN MARGINAL
BERBASIS *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)**

Oleh

DIAN ANJAR SARI

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA PERTANIAN

Pada

Jurusan Agronomi dan Hortikultura
Fakultas Pertanian Universitas Lampung



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023**

ABSTRAK

STUDI KEMELIMPAHAN BAKTERI RHIZOSFER TERHADAP PERTUMBUHAN, PRODUKSI, SERTA MUTU BENIH PADA EMPAT VARIETAS KEDELAI (*Glycine max* (L.)Merill) DI LAHAN MARGINAL BERBASIS *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)

Oleh

DIAN ANJAR SARI

Tanaman kedelai (*Glycine max* (L.) Merill) merupakan salah satu sumber pangan terpenting bagi masyarakat Indonesia. Permintaan kedelai yang tinggi, tidak selaras dengan produksi kedelai domestik yang rendah per tahunnya. Produksi kedelai dipengaruhi oleh berbagai faktor, seperti pemilihan varietas dan kesesuaian penggunaan teknologi budidaya dengan ketersediaan lahan. Komposisi dan diversitas komunitas mikroorganisme tanah seperti bakteri juga menjadi bagian esensial yang memengaruhi pertumbuhan dan produksi tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemelimpahan bakteri rhizosfer serta dampaknya pada pertumbuhan, produksi, serta mutu benih pada empat varietas tanaman berbasis *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Sampel merupakan tanah dari perakaran tanaman kedelai dengan 4 varietas berbeda, yaitu Anjasmoro, Argomulyo, Dena-1, dan Devon-1 dengan 4 ulangan tiap varietas, yang diambil secara acak sebanyak 3 sampel dari masing-masing ulangan. Penelitian ini menggunakan rancangan non faktorial yang disusun dengan Rancangan Acak Lengkap, dianalisis ragam, dilakukan uji lanjut Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan program statistika Rstudio, serta dilakukan analisis menggunakan *software online GerminaQuant* pada variabel mutu benih, dan dianalisis korelasi koefisien seluruh variabel pengamatan dengan kemelimpahan bakteri rhizosfer kedelai. Sampel diekstraksi dengan metode kit Promega. Sekuen 16s rRNA diamplifikasi dengan primer 63F dan 1387R. Hasil amplifikasi divisualisasi dengan metode *capillary electrophoresis digital*, yang hasilnya mengindikasikan perbedaan kemelimpahan bakteri rhizosfer.

Varietas dengan pertumbuhan, produksi, dan mutu benih terbaik adalah varietas Devon-1, Anjasmoro, Argomulyo, dan Dena-1. Bakteri gram negatif varietas Argomulyo dan bakteri gram positif varietas Devon-1 menunjukkan kelimpahan tertinggi. Variabel pengamatan jumlah polong isi berkorelasi positif dengan kelimpahan bakteri gram positif, dan berkorelasi negatif dengan kelimpahan bakteri gram negatif, sedangkan produksi per hektar berkorelasi positif dengan kelimpahan bakteri gram positif maupun negatif.

Kata Kunci : Kedelai, Produksi, Rhizosfer, Bakteri, Korelas

Judul Skripsi

: **STUDI KEMELIMPAHAN BAKTERI RHIZOSFER TERHADAP PERTUMBUHAN, PRODUKSI, SERTA MUTU BENIH PADA EMPAT VARIETAS KEDELAI (*Glycine max* (L.) Merrill) DI LAHAN MARGINAL BERBASIS POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)**

Nama Mahasiswa

: **Dian Anjar Sari**

Nomor Pokok Mahasiswa

: **1814161032**

Jurusan

: **Agronomi dan Hortikultura**

Fakultas

: **Pertanian**



1. **Komisi Pembimbing**


Dr. Ir. Paul Benyamin Timotiwu, M.S.
NIP 196209281987031001


Wawan A. Setiawan, S.Si. M.Si.
NIP 197912302008121001

2. **Ketua Jurusan Agronomi dan Hortikultura**


Prof. Dr. Ir. Setyo Dwi Utomo, M.Sc.
NIP 196110211985031002

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : **Dr. Ir. Pauf Benyamin Timotiwu, M.S.**

Sekretaris : **Wawan A. Setiawan, S.Si. M.Si.**

Anggota : **Prof. Dr. Ir. Setyo Dwi Utomo, M.Sc.**

2. Dekan Fakultas Pertanian

Prof. Dr. Ir. Arwan Sukri Banuwa, M.Si.

NIP. 196110201986031002



Tanggal Lulus Ujian Skripsi: **13 November 2023**

SURAT PERNYATAAN

Saya Dian Anjar Sari mahasiswi Jurusan Agronomi dan Hortikultura angkatan 2018 yang bertanda tangan dibawah ini sebagai penulis, menyatakan bahwa skripsi yang berjudul "Studi Kemelimpahan Bakteri Rhizosfer terhadap Pertumbuhan, Produksi, serta Mutu Benih pada Empat Varietas Kedelai (*Glycine Max (L.) Merill*) di Lahan Marginal berbasis *Polymerase Chain Reaction (PCR)*" adalah hasil tulisan saya sendiri yang menjadi suatu karya yang menjadi syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Pertanian, Universitas Lampung. Tulisan yang tertuang dalam skripsi ini telah mengikuti kaidah penulisan karya ilmiah Universitas Lampung. Apabila terbukti bahwa skripsi ini merupakan hasil salinan atau dibuat oleh orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan ketentuan akademik yang berlaku di Universitas Lampung.

Bandar Lampung, 13 Desember 2023
Penulis



Dian Anjar Sari
NPM 1814161032

RIWAYAT HIDUP

Dian Anjar Sari, dilahirkan di Bandar Lampung, pada 08 Juli 2000. Penulis merupakan anak pertama dari bapak Suratno dan Ibu Rohaidah, dan memiliki adik yang bernama Bella Rizki Amalia. Penulis menyelesaikan pendidikan Sekolah Dasar di SDN 01 Negara Jaya, pada tahun 2012, Sekolah Menengah Pertama di MTS Darul Ulum Tulang Bawang Barat pada tahun 2015, dan Sekolah Menengah Atas di MAS Plus Walisongo Kotabumi pada tahun 2018.

Penulis terdaftar sebagai mahasiswi di Program Studi Agronomi dan Hortikultura pada tahun 2018 melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN). Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif dalam kegiatan akademik dan organisasi. Penulis pernah mengikuti Himpunan Mahasiswa Agronomi dan Hortikultura (HIMAGRHO). Tahun 2020 penulis menjadi anggota dalam bidang Hubungan Masyarakat. Tahun 2021 penulis menjadi Bendahara Bidang Kaderisasi dan Organisasi HIMAGRHO, anggota divisi *Public Relation*, Komunitas Ruang Pangan Tahun 2021, Anggota *Lampung Narrative Community* Tahun 2021, *Part of Rumah Inggris Lampung* Tahun 2023, serta mengikuti *Lampung Youth Ecopreneurship Summit* oleh Gajahlah Kebersihan tahun 2022. Penulis melakukan Kuliah Kerja Nyata (KKN) pada Februari-Maret 2021 di Desa Tanjung Mas, Kecamatan Negeri Besar, Kabupaten Way Kanan. Penulis melaksanakan Praktikum Umum (PU) pada Agustus 2021 di UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi

Teknologi (UPT LTSIT), Universitas Lampung. Penulis menjadi asisten pada tahun 2021 dalam beberapa mata kuliah seperti Pembiakan Vegetatif, dan Biologi Molekuler pada Tahun 2022. Penulis juga menjadi presenter oral pada Webinar Nasional Masyarakat Biodeversitas Indonesia, Tahun 2022.

Hai orang-orang yang beriman, jadikanlah sabar dan sholat sebagai penolongmu,
sesungguhnya Allah beserta orang-orang yang sabar

- QS. Al-Baqarah : 153

Sesungguhnya Allah tidak melihat (menilai) bentuk tubuhmu dan tidak
pula menilai kebagusan wajahmu, tetapi keikhlasan hatimu

- HR. Muslim

“Sapere aude”

-Unknown soul from Latina-

If there is a second chance, I will eat and leave no crumbs

Dian Anjar Sari

PERSEMBAHAN

Tiada kata yang lebih indah selain ucapan syukur kepada Allah Azawajalla atas segala rahmat dan hidayah-Nya.

Kupersembahkan karya ini kepada :

Kedua orang tuaku tercinta yang selalu mencurahkan kasih sayang dan dukungan penuh ketulusan serta mendoakan kebaikan dan kebahagiaan untuk putri sulungnya, serta adik-adik tersayang yang selalu mendoakan Mbak Dian, juga keluarga Bude yang cintanya sangat luas kepada Dian.

Dosen – dosen pembimbing yang terhormat, sahabat-sahabat tersayang, dan teman seperjuangan yang telah memberikan dukungan serta semangat

Dosen dan civitas akademika Jurusan Agronomi dan Hortikultura

Serta almamater yang kubanggakan,

Universitas Lampung.

SANWACANA

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah subhanahu wa ta'ala yang memberikan rahmat dan karunia-Nya sehingga terlaksana seluruh rangkaian kegiatan dan penyelesaian studi dari merencanakan penelitian sampai penyusunan konsep skripsi yang berjudul “Studi Kemelimpahan Bakteri Rhizosfer terhadap Pertumbuhan, Produksi, serta Mutu Benih pada Empat Varietas Kedelai (*Glycine Max* (L.) Merrill) di Lahan Marginal Berbasis *Polymerase Chain Reaction* (PCR)”. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si., selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
2. Bapak Prof. Dr. Ir. Setyo Dwi Utomo, M.Sc., selaku Ketua Jurusan Agronomi dan Hortikultura, juga sebagai selaku penguji dalam penelitian ini atas saran dan kritik membangun terhadap penulisan skripsi ini sejak awal penelitian hingga skripsi ini selesai
3. Ibu Dr. Ir. Tumiar Katarina B. Manik, M.Sc., selaku dosen pembimbing akademik yang senantiasa memberi motivasi, bimbingan, dan saran sejak penulis masuk menjadi mahasiswa baru sampai dengan penulis menyelesaikan tugasnya sebagai mahasiswa.
4. Bapak Dr. Ir. Paul Benyamin Timotiwu, M.S., selaku dosen pembimbing pertama yang senantiasa memberi motivasi, mencurahkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk memberikan gagasan penelitian, bimbingan, kritikan saran, dan terus memacu untuk terbuka pada wawasan baru kepada penulis sejak perencanaan penelitian sampai terwujudnya skripsi ini.

5. Bapak Wawan A. Setiawan, M.Si., yang juga senantiasa memberi motivasi, mencurahkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk memberikan gagasan penelitian, bimbingan, kritikan dan saran kepada penulis sejak magang, perencanaan penelitian sampai terwujudnya skripsi ini, tiada lelah mengajarkan penulis dalam bidang biomolekuler, maupun bidang-bidang lain dan senantiasa memberikan nasihat-nasihat diluar penelitian untuk terus memperbaiki diri.
6. Bapak dan Ibu dosen pengampu mata kuliah pada Program Studi Agronomi dan Hortikultura, Universitas Lampung yang telah membekali ilmu yang sangat bermanfaat dalam memperluas wawasan sebagai calon lulusan pertanian yang juga menunjang penulisan skripsi ini.
7. Teristimewa untuk Ayahanda Suratno, Ibunda Rohaidah, dan Ibu yang senantiasa selalu memberikan kasih sayang, motivasi, dukungan moral dan material, kesabaran, dan pengorbanan serta iringan doa yang tiada henti.
8. Bude tercinta, Pujiati dan keluarga yang tiada henti memberikan dukungan dan kebaikannya kepada penulis.
9. Adik kandung, adik-adik, dan sepersepupuan penulis, Bella Rizki Amalia, Algi, Mba Nisa, Mba Ayu, Mas Agung, Mas Adit, Teh Dian, Kak Rani, dan Mas Agus yang selalu memberikan motivasi, doa, dukungan, dan hiburan.
10. Sahabat dan teman seperjuangan terbaik bagi penulis, Adinda Nurulita Putri, terima kasih telah hadir di semua momen lima tahun terbaik penulis.
11. Sahabat-sahabat tersayang penulis, Putri, Regi, Dhavid, Nia, Guswan, Ari, Rahma, Santi, Ririn, juga sahabat-sahabat baru yang ditemui dalam kerasnya dunia menuju kedewasaan, Caca, Nia, Noly, Des Nidi, Barkah, Bunga, Ifan, Maqrus, Rafi, Alipha, Wahyudi, Darwin, Rasyad, dan Bagio, yang selalu membantu, mendukung, menghibur, memotivasi, dan mewarnai hari-hari penulis.
12. Rekan sekaligus sahabat di rumah inggris yang mewarnai masa akhir perkuliahan penulis, M. Zaydan Musyaffa, Paul, Rere, Fina, Rara, Elva, Dewi, Dicka, dan Anjas yang layaknya keluarga baru.

13. Rekan - rekan penelitian biomolekuler, Ketut, Kak Mikha, Riski, Mba Dona, dan Mba Desi yang telah banyak membantu, memotivasi, menyemangati, menemani pelaksanaan dan kelancaran penelitian.
14. Seluruh teman-teman angkatan 2018 yang telah berjuang meraih mimpi dan cita-cita yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Semoga tulisan ini bermanfaat bagi pembaca

Bandar Lampung, 29 Oktober 2023

Dian Anjar Sari

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR ISI	i
DAFTAR GAMBAR	iv
DAFTAR TABEL	v
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	2
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.4. Manfaat Penelitian.....	3
1.5. Landasan Teori dan Kerangka Pemikiran	3
1.6. Hipotesis	7
II. TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1. Biologi Tanaman Kedelai (<i>Glycine max</i> [L.] Merrill)	8
2.2. Bakteri Rhizosfer.....	12
2.3. Analisis Kemelimpahan Bakteri	13
2.4. Teknik Pengambilan Sampel.....	14
2.4. Ekstraksi DNA	15
2.5. <i>Polymerase Chain Reaction</i>	16
2.6. Elektroforesis.....	17
III. BAHAN DAN METODE	18
3.1. Budidaya Tanaman Kedelai (<i>Glycine max</i> [L.] Merrill)	18
3.1.1. Waktu dan Tempat Penelitian	18
3.1.2. Alat dan Bahan Penelitian	18

3.1.3. Deskripsi Lahan Penelitian.....	19
3.1.4. Rancangan Percobaan	19
3.1.5. Pelaksanaan Penelitian	20
3.1.5.1. Pengolahan Lahan.....	20
3.1.5.2. Penanaman Tanaman Kedelai.....	21
3.1.5.3. Pemupukan.....	21
3.1.5.4. Pemeliharaan.....	21
3.1.5.5. Pemanenan	22
3.2. Analisis Kemelimpahan Bakteri Rhizosfer 4 Varietas Tanaman Kedelai (<i>Glycine max</i> (L.) Merrill)	22
3.2.1. Waktu dan Tempat Penelitian	22
3.2.2. Alat dan Bahan Penelitian	23
3.2.3. Pengambilan Sampel Tanah Rhizosfer pada Masing-masing Varietas Tanaman.....	23
3.2.4. Preparasi Sampel	24
3.2.5. Ekstraksi DNA Sampel	24
3.2.6. Analisis Kemurnian dan Konsentrasi DNA	25
3.2.7. Amplifikasi dengan Metode <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)...	26
3.2.8. Visualisasi Hasil <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) dengan Elektroforesis.....	27
3.3. Pengukuran Variabel Pengamatan.....	28
3.3.1. Pengamatan Komponen Pertumbuhan Tanaman	28
3.3.2. Pengamatan Komponen Produksi Tanaman	30
3.3.3. Pengamatan Komponen Mutu Benih	31
3.3.4. Pengamatan Kemelimpahan Bakteri	32
3.3.5. Korelasi Kemelimpahan Bakteri dengan Masing-masing Variabel Pengamatan	32
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	34
4.1. Hasil Penelitian.....	34
4.1.1. Hasil Analisis Kandungan Hara Tanah	34
4.1.2. Pertumbuhan.....	34
4.1.3. Hasil Analisis Kemelimpahan Bakteri Rhizosfer Kedelai	37

4.1.3.1. Hasil Ekstraksi DNABakteri Rhizosfer	37
4.1.3.2. PCR Gen dan Visualisasi Hasil PCR.....	39
4.1.4. Produksi dan Hasil Uji Mutu Fisiologis Benih	42
4.1.4.1. Produksi.....	42
4.1.4.2. Hasil Uji Mutu Fisiologis Benih	44
4.1.5. Nilai Korelasi Parameter Pertumbuhan, Produksi, dan Hasil Uji Mutu Benih terhadap Visualisasi Hasil PCR.....	45
4.2. Pembahasan	48
V. KESIMPULAN DAN SARAN	60
5.1. Kesimpulan	60
5.2. Saran	61
DAFTAR PUSTAKA	62
LAMPIRAN.....	76

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Diagram alir kerangka berpikir	6
Gambar 2. Denah tata letak percobaan	19
Gambar 3. Grafik pengamatan tinggi tanaman pada minggu ke-2 hingga ke-5 MST	36
Gambar 4. Grafik pengamatan jumlah daun tanaman pada minggu ke-2 hingga ke-5 MST	37
Gambar 5. Grafik Kemelimpahan bakteri rhizosfer Gram positif dan negatif	39
Gambar 6. Visualisasi hasil PCR DNA bakteri Gram positif dan Gram negatif rhizosfer kedelai	40
Gambar 7. Visualisasi hasil PCR DNA bakteri Gram positif dan Gram negatif rhizosfer kontrol	42
Gambar 8. Grafik perkecambahan benih hasil produksi 4 varietas kedelai dalam 8 hari	45

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Kandungan hara tanah pada lahan marginal di lahan percobaan di Desa Negeri Jaya, Kecamatan Negeri Besar, Kabupaten Way Kanan, Lampung	34
Tabel 2. Rekapitulasi hasil analisis ragam terhadap pengamatan pertumbuhan tanaman kedelai (<i>Glycine max</i> (L.) Merrill).....	35
Tabel 3. Analisis Konsentrasi dan Kemurnian Hasil Ekstraksi DNA.....	38
Tabel 4. Rekapitulasi hasil analisis ragam terhadap pengamatan produksi tanaman kedelai (<i>Glycine max</i> (L.) Merrill).....	43
Tabel 5. Rekapitulasi hasil analisis ragam terhadap pengamatan data uji mutu benih tanaman kedelai (<i>Glycine max</i> (L.) Merrill)	44
Tabel 6. Hubungan antarvariabel berdasarkan nilai koefisien korelasi (r)	45
Tabel 7. Korelasi variabel pertumbuhan tanaman dengan kelimpahan bakteri rhizosfer Gram positif dan Gram negatif	46
Tabel 8. Korelasi variabel produksi tanaman dengan kelimpahan bakteri rhizosfer Gram positif dan Gram negatif	47
Tabel 9. Korelasi variabel uji mutu benih dengan kelimpahan bakteri rhizosfer Gram positif dan Gram negatif	48

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) merupakan kelompok tanaman pangan utama di Indonesia. Kedelai dinilai sebagai komoditas strategis serta berperan penting pada perkembangan penduduk Indonesia, khususnya pada sektor pertanian (Supadi, 2009). Dikutip dari *American Soybean Association* (2017), kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) dinyatakan sebagai salah satu kacang-kacangan terpenting di dunia. Hal tersebut, selain daripada tanaman kedelai merupakan bahan pokok makanan dengan permintaan tinggi di berbagai negara, tanaman kedelai juga memiliki peran penting pada sektor industri, perdagangan serta pakan ternak (Onwueme and Sinha, 1991; Abdullah, 2012).

Indonesia memiliki kebutuhan kedelai nasional mencapai 2.825.219 ton per 2021, berdasarkan data proyeksi Kementerian Pertanian RI (2021). Sedangkan ketersediaan kedelai nasional per-April 2021 hanya sebesar 2.732.489 ton, dengan pembagian produksi dalam negeri sebesar 211.265 ton dan impor sebesar 2.521.224 ton atau sekitar 89% pemenuhannya masih bergantung pada negara pengimpor dengan defisit sebesar 92.735 ton. Berdasarkan data survei oleh Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi (Balitkabi, 2021), diketahui bahwa total keseluruhan luas lahan pertanian di Indonesia yang mencapai 36.817.086 ha, 14.006.450 ha diantaranya merupakan lahan marginal dengan luas panen tanaman kedelai hanya mencapai 134.692 ha atau berkisar antara 0,36% dari total keseluruhan lahan pertanian di Indonesia.

Mengacu pada hasil survei Badan Pusat Statistika ((BPS), 2020), upaya intensifikasi lahan marginal tersedia melalui restrukturisasi dan penerapan

teknologi budidaya yang tepat merupakan upaya yang relevan untuk diadaptasi bagi peningkatan produksi kedelai saat ini. Restrukturisasi lahan marginal salah satunya dapat dilakukan melalui pengaplikasian berbagai jenis mikroorganisme yang telah terverifikasi berpotensi memperbaiki pertumbuhan dan produksi tanaman (Perez-Jaramillo *et al.*, (2016); Tian *et al.*, (2017)). Lebih lanjut lagi (Alexander, 1977), menyatakan bahwa *rhizobacteria* merupakan salah satu mikroorganisme yang sukar berubah baik keragaman maupun populasinya dipengaruhi oleh keragaman faktor tumbuh dan ekosistem yang meliputinya. Untuk itu, penelitian ini dilakukan guna mengamati kemelimpahan *rhizobacteria* pada rhizosfer beberapa varietas lokal unggul, sehingga diketahui varietas dengan pertumbuhan, produksi, serta mutu benih terbaik pada pertanaman dilahan marginal yang sama. Demikian, diharapkan penelitian ini dapat berperan bagi pengembangan perbaikan produksi kedelai nasional saat ini.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini ialah sebagai berikut :

1. Apakah terdapat perbedaan pertumbuhan, produksi, dan mutu benih pada empat varietas tanaman kedelai yang dibudidayakan pada lahan marginal yang sama?
2. Apakah terdapat perbedaan kemelimpahan bakteri rhizosfer empat varietas tanaman kedelai yang dibudidayakan pada lahan marginal yang sama?
3. Apakah perbedaan kemelimpahan bakteri rhizosfer 4 varietas tanaman kedelai berkorelasi dengan pertumbuhan, produksi, dan mutu benih empat varietas tanaman kedelai yang dibudidayakan pada lahan marginal yang sama?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mengetahui perbedaan pertumbuhan, produksi, dan mutu benih empat varietas tanaman kedelai yang dibudidayakan pada lahan marginal yang sama.
2. Mengetahui perbedaan kemelimpahan bakteri pada rhizosfer empat varietas tanaman kedelai yang dibudidayakan pada lahan marginal yang sama.
3. Mengetahui korelasi kemelimpahan bakteri terhadap pertumbuhan, produksi, dan mutu benih pada empat varietas tanaman kedelai yang dibudidayakan di lahan marginal yang sama.

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Memberi informasi mengenai kemelimpahan bakteri rhizosfer relatif pada empat varietas tanaman kedelai yang dibudidayakan di lahan marginal.
2. Memberi informasi mengenai pengaruh kemelimpahan bakteri rhizosfer terhadap pertumbuhan, produksi, dan mutu benih empat varietas tanaman kedelai yang dibudidayakan di lahan marginal.
3. Informasi mengenai kemelimpahan bakteri pada rhizosfer empat varietas tanaman kedelai yang selanjutnya dapat dirunut keberagaman genetik serta metabolismenya, sehingga dapat diadaptasi sebagai *rhizobacteria* spesifik bagi pertumbuhan dan produksi tanaman kedelai.

1.5. Landasan Teori

Keterbatasan faktor tumbuh tersedia, serta cekaman logam berat yang meliputi lahan marginal menyebabkan penghambatan aktivitas enzim sitoplasma, kerusakan struktur sel, serta DNA, akibat stres oksidatif yang berpengaruh pada pertumbuhan dan metabolisme tanaman (Ojuederie dan Babalola, 2017).

Sementara itu, terdapat *rhizobacteria* yang secara langsung berkaitan dengan *uptake* nutrisi, pertukaran O₂ dan CO₂, *gradient* kelembaban tanah, serta pH tanah, yang berpotensi menjadi alternatif pengembalian fungsi tanah serta induksi unsur hara alami bagi tanaman (Mohanram and Kumar, 2019; Leal de Castilho, et al, 2020). *Rhizobacteria* memiliki keselarasan interaksi dan ketergantungan yang kompleks dengan pertumbuhan dan produksi tanaman yang menaunginya (Curl, 1986). Interaksi antara tanaman dengan *rhizobacteria* terbentuk berdasarkan fungsi dari eksudat akar oleh tanaman (Miransari, 2011) yang secara kimiawi menarik *rhizobacteria* menggunakan flavonoid (Reddy, et al., 2007). Eksudat akar dalam bentuk flavonoid tersebut, kemudian direspon oleh *rhizobacteria* untuk memulai transkripsi gen nod (D’Hae ze and Holsters, 2005) yang menginduksi beberapa jalur pensinyalan melalui infeksi rambut akar dan pembentukan nodul (Cooper, 2007), kemudian memengaruhi kelimpahan bakteri yang bernaung padanya. Dengan demikian, kelimpahan bakteri akan berbeda bergantung pada sekresi eksudat pada masing-masing varietas yang berbeda.

Rhizobacteria dengan spesifitas tertentu dapat membentuk simbiosis dengan tanaman, berperan pada peningkatan pertumbuhan dan produksi tanaman, sebagai pelarut fosfor (P), produksi siderofor, produksi fitohormon, dan fiksasi N (Mohanram and Kumar, 2019; de Castilho, et al., 2020). Beberapa spesies mikroba dalam kingdom bakteri tertentu, juga dapat memengaruhi kestabilan pertumbuhan dan produksi tanaman, serta ketahanan terhadap tekanan lingkungan (Liu et al., 2014; Martin-Robles, 2018; Huang et al., 2019). *Rhizobacteria* mampu memengaruhi pertumbuhan dan morfologi tanaman dengan berbagai mekanisme (Bano et al., 2013), misalnya dengan meningkatkan luas permukaan akar (Adesemoye, et al., 2009).

Menurut Jorquera, et al (2015), keragaman bakteri PGPR pada berbagai tipe lahan berpotensi untuk memecahkan kendala di bidang pertanian dengan fokus pada peningkatan pertumbuhan dan produksi tanaman pada lahan berpotensi rendah dengan mengamati eksistensi *rhizobacteria* yang mampu bertahan pada rhizosfer tanaman yang hidup pada kondisi ekstrem dan beradaptasi pada kondisi

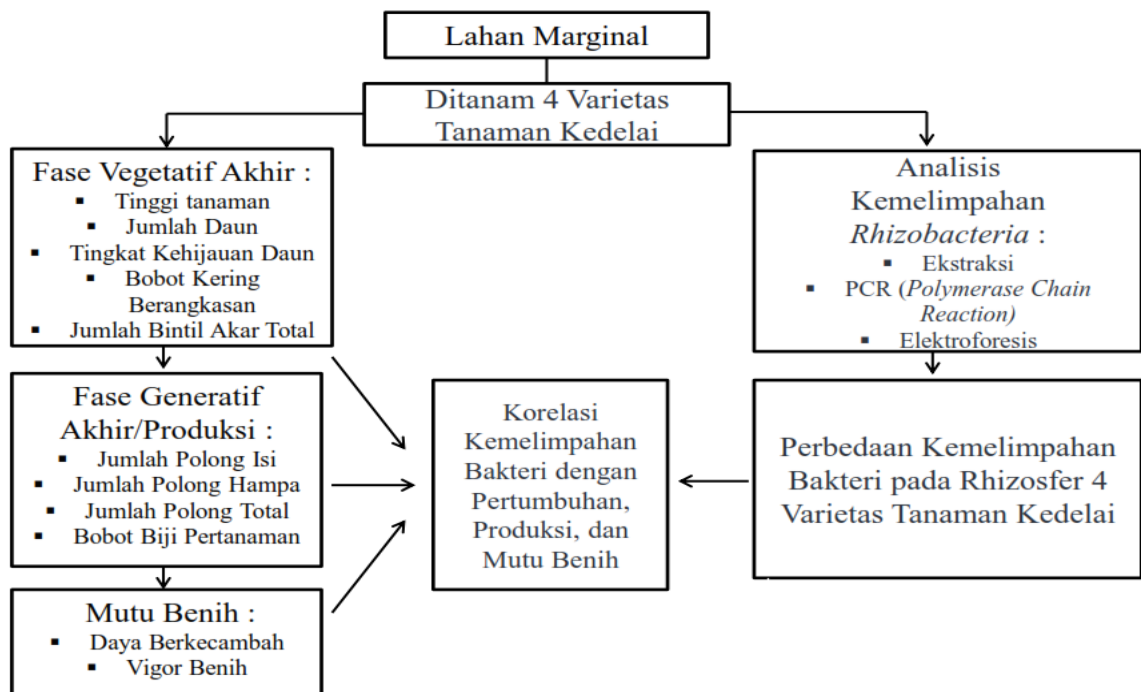
keterbatasan nutrisi (Bull *and* Asenjo, 2013). Beberapa jenis *rhizobacteria* juga telah terkonfirmasi dapat meningkatkan produktivitas tanah dan pertumbuhan tanaman melalui mekanisme produksi fitohormon, *siderophores*, antioksidan, exopolysaccharides (EPS), *osmoprotectants*, enzim seperti 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase, peningkatan serapan nutrisi, dan *Induced Systemic Resistance* (ISR) di bawah tekanan garam (Numan, *et al.*, 2018).

Analisis keragaman bakteri pada rhizosfer secara umum dapat dilakukan melalui dua tahap, yaitu identifikasi secara morfologi yang melewati proses pengkulturan dan analisis reaksi biokimiawi bakteri berbasis molekuler (Patantis dan Fawzya, 2009). Kekurangan identifikasi secara morfologi ialah beberapa takson bakteri tidak dapat dikulturkan karena ketidaksesuaian media pengkulturan dengan keragaman bakteri pada sampel. Sedangkan analisis berbasis molekuler yang saat ini lebih sering disebut dengan istilah metagenomik memungkinkan evaluasi keseluruhan bakteri secara langsung dari sampel lingkungan maupun spesimen (Forbes *et al.*, 2018). Total keseluruhan bakteri yang terdeteksi pada analisis berbasis metagenom digambarkan kemelimpahannya pada visualisasi menggunakan elektroforesis setelah melalui tahap ekstraksi DNA, kemudian dilakukan pengamplifikasian daerah *barcoding* bakteri menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Pada proses PCR (*Polymerase Chain Reaction*), sekuens DNA bakteri dapat diamplifikasi dengan primer 16S rRNA, *Forward* (5-3) 63 F dan *Reverse* (5-3) 1387 R (Marchesi, *et al.*, 1998). Primer 16S rRNA yang diamplifikasikan pada DNA target, dapat menggambarkan keragaman filotipe yang dimiliki pada suatu habitat. Metode ini merupakan mekanisme yang sangat baik untuk mengevaluasi secara cepat kemelimpahan bakteri dan mikroba lainnya yang terkait secara temporal dan spasial (Madigan, *et al.*, 2019). Ketebalan pita DNA yang muncul pada proses visualisasi elektroforesis menggambarkan kemelimpahan bakteri rhizosfer. Intensitas ketebalan pita DNA yang semakin tinggi, menggambarkan kemelimpahan bakteri yang semakin tinggi pula. Kemelimpahan bakteri yang berbeda menunjukkan banyaknya jumlah bakteri yang dapat bersimbiosis dengan perakaran tanaman (Muyzer *et al.*, 1996; Marzorati, *et al.*, 2008).

Hingga saat ini, informasi mengenai kemelimpahan bakteri rhizosfer pada empat varietas tanaman kedelai Anjasmoro, Agromulyo, Dena 1, dan Devon 1 masih belum tersedia. Mengingat bahwa empat varietas tanaman kedelai tersebut termasuk ke dalam varietas unggulan di Indonesia, maka sudah semestinya dilakukan penelitian untuk mengevaluasi sistem budidaya serta lingkungan tumbuh yang kompatibel bagi keempat varietas tanaman kedelai tersebut, sebagai upaya terhadap peningkatan produksi kedelai. Oleh sebab itu, dilakukan penelitian ini sebagai upaya kontribusi pada pemecahan masalah mengenai pertumbuhan serta produktivitas tanaman kedelai yang berdasarkan pada kemelimpahan *rhizobacteria* serta korelasinya terhadap masing-masing varietas kedelai uji.

Berdasarkan pada landasan teori yang telah dikemukakan, dibentuk diagram alir kerangka pemikiran (Gambar 1), sebagai berikut :



Gambar 1. Diagram Alir Kerangka Pemikiran

1. 6. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori dan kerangka pemikiran yang telah dikemukakan, hipotesis yang diajukan adalah :

1. Empat varietas tanaman kedelai yang dibudidayakan pada lahan marginal yang sama akan menunjukkan daya adaptasi terbaik hingga terburuk berdasarkan perbedaan pertumbuhan, produksi, dan mutu benih pada masing-masing varietas.
2. Empat varietas tanaman kedelai yang dibudidayakan pada lahan marginal yang sama akan menunjukkan kemelimpahan bakteri rhizosfer yang berbeda berdasarkan jumlah relatif fragmen DNA yang teramplifikasi pada proses PCR (*Polymerase Chain Reaction*) menggunakan primer 16S rRNA.
3. Kemelimpahan bakteri rhizosfer keempat varietas tanaman kedelai berkorelasi dengan pertumbuhan, produksi, dan mutu benih masing-masing varietas.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Biologi Tanaman Kedelai (*Glycine max* [L.] Merrill)

Kedelai (*Glycine max* [L.] Merrill) merupakan salah satu spesies tanaman yang banyak dikembangkan di Indonesia setelah diperkenalkan oleh Rumphius dalam *Herbarium Amboinense* pada tahun 1673 dan dibudidayakan di seluruh tanah Jawa tahun 1835. Sebelumnya, tanaman kedelai telah menyebar di berbagai Negara seperti Korea, Jepang, Thailand dan Indonesia hingga Amerika Serikat yang penyebarannya didukung oleh peranan tanaman kedelai sebagai sumber pangan penting di Dunia, serta memiliki siklus budidaya yang relatif cepat karena merupakan tanaman semusim. Tanaman kedelai begitu cepat tersebar di seluruh Dunia, menyebabkan tanaman kedelai sulit diklasifikasikan, hingga akhirnya tiga ilmuwan pemerhati klasifikasi kedelai terdahulu yaitu Hermann (1962), Verdcourt (1966), dan Hymowitz (1970) berhasil mengklasifikasikan kedelai sebagaimana yang dianut saat ini :

Kingdom : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Kelas : Dicotyledonae
Ordo : Polypetales
Famili : Leguminosae
Genus : *Glycine*
Spesies : *Glycine max* (L.) Merrill.

Kedelai (*Glycine max* [L.] Merrill) merupakan golongan kacang-kacangan yang pada umumnya memiliki bentuk biji atau buah bulat sempurna sampai bulat lonjong yang bervariasi tergantung varietas. Variasi ukuran biji kedelai yang

begitu beragam, menyebabkan biji kedelai digolongkan menjadi tiga kelompok, yaitu berbiji kecil (<10 g/100 biji), berbiji sedang ($10 - 14$ g/100 biji), dan berbiji besar (>14 g/100 biji) (Adie dan Krisnawati, 2013). Banyaknya variasi ukuran biji kedelai dipengaruhi perubahan ukuran pada struktur biji kedelai yang identik pada tiap varietas. Struktur biji kedelai tersebut tersusun atas kotiledon pada embrio dan dilapisi oleh kulit biji (*testa*), antara kulit biji dan kotiledon terdapat lapisan endosperm. Selanjutnya, embrio biji kedelai tersusun oleh plamula, epikotil, kotiledon, hipokotil dan radikula.

Kulit biji kedelai terdiri dari tiga lapisan yaitu epidermis, hipodermis, dan parenkim. Lapisan parenkim yang terletak pada kulit biji kedelai memiliki struktur hilum yang diduga memiliki peran dalam mengatur metabolisme dan kelembaban dalam embrio. Pada struktur hilum tersebut pula terdapat lapisan palisade yang diduga mengandung sebagian besar pigmen warna kulit biji kedelai. Kombinasi pigmen pada kulit biji yang lebih spesifik pada hilum dan kotiledon kemudian membentuk warna biji yang bermacam-macam pada kedelai, dari warna kuning, coklat, hijau hingga hitam (Adie dan Krisnawati, 2013).

Bunga tanaman kedelai tergolong bunga sempurna (hermaprodit) (Adisarwanto, 2013), yang memasuki fase reproduktif saat tunas aksiler berkembang menjadi kelompok bunga dengan 2 hingga 35 kuntum bunga setiap kelompok. Saat telah memasuki fase reproduktif bunga mengalami penyerbukan pada saat kelopak bunga tertutup. Ada dua tipe pertumbuhan batang dan permulaan pembungaan pada kedelai. Tipe pertama adalah indetermit, yaitu tunas terminal melanjutkan fase vegetatif selama pertumbuhan. Tipe kedua adalah determinit dimana pertumbuhan vegetatif tunas terminal terhenti ketika terjadi pembungaan (Adie dan Krisnawati, 2013).

Daun kedelai merupakan daun majemuk terbagi menjadi empat tipe, yakni daun primer, daun biji, daun trifoliat, dan profila. Daun primer berbentuk oval dengan tangkai daun sepanjang 1–2 cm terletak pada batang utama. Stomata terletak pada keempat tipe daun tersebut, yang ada pada lapisan atas dan bawah lapisan epidermis daun, lebih spesifik pada bagian bawah daun, sedangkan batang

tanaman kedelai berbentuk perdu, tegak dan bercabang. Batang tanaman kedelai berasal dari poros embrio pada biji tanaman kedelai (Adie dan Krisnawati, 2013).

Struktur akar tanaman kedelai terdiri atas akar lembaga (radikula), akar tunggang (radiks primaria), dan akar cabang (radiks lateralis) berupa akar rambut. Akar kedelai memiliki kemampuan membentuk bitil akar (nodul). Bintil-bintil akar bentuknya bulat atau tidak beraturan yang merupakan koloni dari beberapa mikroorganisme spesifik. Salah satunya yang telah diketahui dapat memperbaiki pertumbuhan tanaman kedelai, yaitu bakteri *Rhizobium japonicum* yang bersimbiosis dengan nitrogen bebas dari udara. Jumlah nitrogen yang dapat ditambat bakteri ini berkisar 40 – 70% dari seluruh nitrogen yang dibutuhkan tanaman (Adie dan Krisnawati, 2013).

Secara universal, tanaman mengalami fase pertumbuhan yang terbagi menjadi dua fase (stadia), yakni fase vegetatif dan fase generatif (reproduktif). Fase vegetatif dimulai ketika pertama kali bakal tanaman muncul dari tanah dan kotiledon belum membuka, hingga akhirnya dinyatakan berakhir setelah terbentuknya bunga pertama, sebagai simbol organ reproduktif (Fehr *and* Caviness 1977). Pada pertumbuhannya, tanaman kedelai (*Glycine max* [L.] Merrill) sebagai tanaman yang peka terhadap photo-periodisitas menghendaki penyinaran \pm 12 jam/hari. Intensitas penyinaran yang tepat menginduksi *florigen* pada pembungaan tanaman. *Florigen* disintesa pada daun, dan ditranslokasikan ke organ bakal bunga melalui ploem yang hanya terjadi pada periode gelap. Tanaman kedelai yang tidak mengalami periode gelap, tumbuh vegetatif terus-menerus, sehingga tidak mampu membentuk bunga (Sumarno dan Manshuri, 2013).

Kondisi air lapang tersedia yang ideal bagi tanaman kedelai yang dibudidayakan di Indonesia dengan umur panen 80-90 hari berkisar antara 360 – 405 mm, setara dengan curah hujan 120-135 mm per bulan. Sedangkan sifat tanah ideal bagi tanaman kedelai sebagai tanaman aerobik ialah tanah bertekstur liat, berdrainase baik, atau tanah lempung berpasir (*sandy loam*) dengan kadar kelembaban 70 – 80% kapasitas lapang, pada pH berkisar antara 5,5 sampai 7,0 dan pH optimal 6,0-6,5 (Doorenbos *and* Pruitt 1977 dalam Van Doren *and* Recosky 1987).

Fase reproduktif dikelompokkan ke dalam tiga fase yakni fase pembungaan, pembentukan polong, dan pematangan biji diakhiri jika 90-95% polong telah matang, sehingga tanaman siap panen (Fehr *and* Caviness 1977). Pada jenis kacang-kacangan dua fase terpenting lainnya ialah fase pembentukan polong dan pembentukan nodul. Setelah memasuki fase generatif, dan terjadi pembuahan, ovarium mulai berkembang menjadi buah, namun tangkai putik dan benang sari mengering. Kelopak bunga tetap ada selama perkembangan polong, hingga akhirnya terjadi pemasakan polong yang diawali dengan adanya satu polong yang telah berwarna kuning (matang). Pada fase tanaman kedelai sering juga disebut sebagai fase masak fisiologis (Adie dan Krisnawati, 2013).

Selain pembentukan polong, karakteristik yang identik dengan tanaman kacang-kacangan ialah pembentukan nodul pada perakaran. Pembentukan nodul pada perakaran tanaman kacang-kacangan merupakan ekspresi dari gen tertentu yang ditangkap oleh rhizobia dalam rhizosfer setelah dilepaskannya *flavonoid* oleh tanaman. Rhizobia dalam rhizosfer kemudian terbentuk jika terdapat kesesuaian (*compatibility*) antara tanaman inang dengan (*Brady*) *Rhizobium* (Lerouge *et al.* 1990, Schultz *et al.* 1992, Sanjuan *et al.* 1992). Rhizobia yang melekat pada bulu akar, berkembang dan berdiferensiasi hingga membentuk bakteroid (Fisher *and* Long., 1992, Denarie *and* Cullimore 1993, Vijn *et al.* 1993, Fellay *et al.* 1994, Relic *et al.* 1994, Long 1996).

Simbiosis antara rhizobia dalam rhizosfer dengan perakaran tanaman kacang-kacangan ini disebut sebagai *Rhizobium*. *Rhizobium* inilah yang nantinya mampu memfiksasi nitrogen bebas di udara dan membentuk senyawa amonium. Senyawa mengandung protein tersebut sebagian besar direduksi menjadi asam amino oleh bintil akar dan diserap oleh tanaman inang. Sebagai gantinya, tanaman inang memasok fotosintat pada rhizobia sebagai sumber energi (Fisher *and* Long 1992., Denarie *and* Cullimore 1993, Vijn *et al.*, 1993, Fellay *et al.*, 1994, Relic *et al.*, 1994, Long 1996).

2.2. Bakteri Rhizosfer

Daerah rhizosfer merupakan daerah terdekat dengan sistem akar tumbuhan dan relatif kaya nutrisi yang berasal dan dipengaruhi oleh endapan getah dan eksudat akar. Bakteri endorhizosfer adalah bagian cabang dari komunitas rhizobakteria, yang mana memiliki kemampuan untuk masuk ke dalam rambut akar. Komunitas bakteri dari daerah ini memacu pertumbuhan inang dengan menekan pertumbuhan patogen dan memproduksi hormon pertumbuhan bagi tanaman inang. Selain itu, bakteri rhizosfer berkontribusi terhadap siklus biogeokimia yang memproduksi beberapa elemen kimia yang dibutuhkan bagi pertumbuhan tumbuhan (Singh *and* Kothari, 2016).

Komunitas rhizobakteria, yang telah terkonfirmasi keberadannya pada beragam rhizosfer ialah dari genus *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Bukholderia*, *Arthrobacter*, *Paenibacillu*, *Proteobacteria*, dan *Cyanobacteria* (Yang *et al.*, 2017). *Proteobacteria* terdiri dari lima kelas, yakni *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* dan *Epsilonproteobacteria*. *Proteobacteria* dikenal sebagai filum bakteri pemfiksasi nitrogen dengan simbiosis pada tanaman *leguminosa*. Sedangkan filum *Cyanobacteria* diketahui mampu memfiksasi nitrogen dan karbon dengan bersimbiosis pada tanaman paku, tanaman *dycotile* dan *monocotyle* (Madigan *et al.*, 2019).

Keragaman *rhizobacteria* yang begitu melimpah di alam, dan telah diketahui metabolismenya sebagian diantaranya telah dikelompokkan kedalam PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*). *Streptomyces griseoviridis* digolongkan menjadi PGPR, karena mampu memproduksi auksin dan IAA secara *in vitro* yang berperan menstimulasi pertumbuhan tanaman. *Pseudomonas fluorescens* mampu menghasilkan IAA yang juga dapat merangsang pertumbuhan akar jagung pada kondisi hidroponik (Aryantha *et al.*, 2004; Glick *and* Penrose, 2004; Ana *et al.*, 2011). *Rhizobacteria* lainnya yang mampu menghasilkan protease antara lain *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Clostridium*, *Bacillus* dan *Pseudomonas* (Kumar *et al.*, 2005).

Gholami *et al.* (2009) menyatakan genus *Pseudomonas*, *Azospirillum* dan *Azotobacter* yang diaplikasikan pada benih jagung mampu meningkatkan pertumbuhan dan produktivitas melalui sintesis fitohormon, meningkatkan serapan hara sekitar akar, mendukung penyerapan hara melalui penurunan tingkat keracunan logam berat dan melawan patogen. Kemudian, bakteri *Rhodopseudomonas palustris*, terdeteksi berperan penting pada fiksasi karbon dan nitrogen tanaman *blueberry* liar. *Rhodococcus eritropolis* dan *Pseudomonas stutzeri* juga terdeteksi di rhizosfer tanaman *blueberry* liar masing-masing berperan pada degradasi herbisida dan pencegahan terhadap serangan insektisida (Yurgel *et al.*, 2019).

2.3. Analisis Kemelimpahan Bakteri

Analisis kemelimpahan bakteri dapat dilakukan dengan beberapa metode analisis, diantaranya :

(a). *Plate Counting*

Merupakan metode konvensional menggunakan *spreading method*, dengan mengkulturkan mikroorganisme di media spesifik, kemudian menghitung seluruh koloni yang terbentuk pada media tumbuh pasca inkubasi. Koloni yang tumbuh di lempeng dihitung, kemudian dibedakan berdasarkan warna atau sifat morfologi koloninya. Penggunaan metode *plate counting* memungkinkan mikroorganisme dapat diisolasi, dikarakterisasi, dan diidentifikasi dengan cepat, namun memungkinkan beberapa jenis mikroorganisme tidak dapat tumbuh pada media kultur yang spesifik, sehingga tidak memungkinkan dilakukan eksplorasi keseluruhan jumlah dan keragaman mikroorganisme pada suatu sampel (Madigan, *et al.*, 2017).

(b). Metode Mikroskopis

Penghitungan terhadap kemelimpahan bakteri dilakukan dengan mengamati suatu sampel secara langsung menggunakan mikroskop. Menggunakan mikroskop fluoresensi, sampel diamati berdasarkan perbedaan morfologinya setelah proses

pewarnaan sel. Metode ini memungkinkan keseluruhan sel mikroorganisme hidup dan mati dapat dihitung secara komprehensif, namun membutuhkan waktu yang cukup lama (Pelczar, *et al.*, 2003).

(c). *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Merupakan metode kuantifikasi terhadap keseluruhan kandungan genetik suatu sampel secara spesifik. Rangkaian DNA spesifik, memberikan informasi tentang banyaknya bakteri target. *Polymerase chain reaction (PCR)* melibatkan primer spesifik, sebagai penanda gen mikroorganisme pada seluruh biodiversitas, sehingga memungkinkan perhitungan secara komprehensif terhadap komposisi dan kelimpahan komunitas bakteri (Willey, *et al.*, 2019).

2.4. Pengambilan Sampel

Proses infeksi bakteri pada perakaran tanaman kedelai dimulai saat terlepasnya rhizobia ke dalam calon bintil akar. Selanjutnya, perubahan bentuk akar, pembengkokan ujung bintil akar, terbentuknya benang infeksi, bintil akar primer dan sekunder, dan terlepasnya rhizobia ke dalam sel korteks berlangsung karena tanaman inang mengeluarkan senyawa spesifik (flavonoid) yang kompatibel dengan bakteri rhizobium (Fisher *and* Long 1992, Higashi 1993). Flavonoid efektif mendorong bakteri rhizobium untuk bersimbiosis dengan tanaman inang. Interaksi spesifik antara tanaman legum dengan bakteri rhizobium ditandai dengan terbentuknya *leghemoglobin*. Interaksi ini terus berlangsung, hingga mencapai fase maksimal, kemudian membusuk. Fase simbiosis secara maksimal terjadi saat sebelum nodul akar membusuk pada 6 MST. Sebelumnya, pada pada 5 MST, atau pada masa vegetatif akhir, terbentuk simbiosis yang kompleks, ditandai dengan pembesaran nodul akar secara maksimal dan membentuk warna kemerahan. Pada fase inilah, sampel tanah pada perakaran tanaman kedelai diambil untuk dianalisis kelimpahan bakteri yang menaunginya.

2.4. Ekstraksi DNA

Isolasi DNA merupakan tahap awal dari serangkaian proses analisis molekuler, proses ini penting dilakukan karena proses ini bertujuan untuk mendapatkan DNA target yang dibutuhkan dalam proses selanjutnya khususnya pada proses PCR. Isolasi DNA bertujuan untuk memisahkan DNA dari materi lain seperti protein, lemak, dan karbohidrat (Ruchi *et al.*, 2018).

Ada beberapa metode yang digunakan dalam ekstraksi DNA yang tiap metode memiliki kelebihan maupun kekurangan sehingga pemilihan metode yang tepat dapat menentukan keberhasilan dalam proses analisis molekuler (Rawat *et al.*, 2016). Ada beberapa metode yang digunakan untuk ekstraksi DNA seperti metode *boiling* yang menggunakan suhu tinggi untuk merusak dinding sel dan inaktivasi enzim khususnya enzim DNase yang dapat merusak DNA (Sharbatkhori *et al.*, 2009). Metode lain yang umum dilakukan adalah dengan menggunakan kit komersial yang diproduksi untuk memudahkan dan mempercepat proses isolasi DNA. Selain kedua metode tersebut, ada metode *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) yang banyak digunakan dalam proses isolasi DNA tanaman (Donata, 2007), CTAB adalah detergen yang berfungsi untuk melisiskan dinding sel, denaturasi protein maupun memisahkan DNA dengan karbohidrat (Suprpto, 2003). Prinsip yang digunakan dalam metode ini menurut Habibah (2017) yaitu :

- a. Lisis sel yang merupakan tahapan untuk menghancurkan dinding sel yang menyebabkan seluruh isi sel keluar.
- b. Ekstraksi yaitu tahapan pemisahan DNA dari materi genetik maupun materi lain yang tidak dibutuhkan dalam proses analisis molekuler.
- c. Presipitasi yaitu tahapan pengendapan DNA.
- d. Purifikasi yang merupakan tahapan pembersihan DNA dari kontaminan lain.

2.5. *Polymerase Chain Reaction*

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah salah satu metode yang dapat digunakan untuk memperbanyak DNA dari suatu organisme (Pertiwi *et al.*, 2015). Menurut Fatchiyah (2005), ada beberapa tahapan dalam PCR diantaranya adalah denaturasi, aneling, dan ekstensi yang dilakukan secara berulang. Selain itu ada beberapa komponen dalam PCR yaitu DNA cetakan, primer, taq DNA polymerase, PCR buffer dan konsentrasi Mg^{2+} , Nukleotida (dNTPs). Pada tahapan denaturasi, temperatur yang digunakan berkisar 90-95°C, temperatur pada aneling berkisar 53 – 60°C dan pada tahap ekstensi atau pemanjangan untai DNA terjadi pada temperatur 72°C.

Menurut Handoyo dan Rudiretna (2000), suhu dan waktu amplifikasi merupakan faktor penting dalam menentukan berhasil atau tidaknya amplifikasi DNA dengan PCR. Metode PCR menggunakan suhu yang berbeda pada tiap prosesnya seperti denaturasi, aneling dan elongasi. Denaturasi merupakan tahap pemotongan untai DNA dari *double helix* menjadi *single* menggunakan suhu yang tinggi yaitu berkisar 93-95°C selama 30-90 detik, kondisi tersebut merupakan kondisi yang optimum untuk dilakukannya denaturasi karena apabila suhu yang terlalu tinggi dan dalam waktu yang lama maka DNA sukar rusak, sedangkan pada suhu rendah proses denaturasi DNA template tidak sempurna. Aneling merupakan tahap penempelan primer dengan DNA cetakan pada kondisi suhu berkisar 37-60 °C selama 30-60 detik. Suhu aneling yang digunakan tergantung dari T_m (*Melting Temperature*) primer yang digunakan. T_m (*Melting Temperature*) primer merupakan suhu dimana 50% untai ganda DNA akan terpisah, hal ini berhubungan dengan komposisi dan panjang primer yang digunakan. T_m dapat diketahui melalui rumus $[2(A+T)+4(C+G)]$, kondisi aneling yang banyak digunakan yaitu pada suhu 50 – 60°C selama 30 – 45 detik (Zuhriana, 2010). Elongasi merupakan proses pemanjangan primer yang dibantu oleh enzim DNA polimerase yang terjadi pada kondisi suhu 72°C selama 30-60 detik, suhu ini merupakan suhu yang optimum untuk proses pemanjangan DNA. Waktu elongasi dipengaruhi oleh panjang DNA yang di amplifikasi (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

2.6. Elektroforesis

Elektroforesis merupakan suatu tahap deteksi amplifikasi fragmen DNA setelah proses PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Elektroforesis DNA mengelompokkan hasil amplifikasi DNA berdasarkan ukuran berat molekul dan struktur fisik molekulnya, melalui perpindahan partikel bermuatan listrik negatif ke arah elektroda berlawanan. Fragmen DNA yang teramplifikasi, diukur berdasarkan perpindahan ion pada gel agarosa atau gel poliakrilamid (Reiner, 2016). Pada tahap tersebut, seluruh sampel akan berada pada larutan *aqueous solution*. Perbedaan massa molekul dan partikel, menyebabkan perbedaan kecepatan pergerakan fragmen DNA. Perbedaan kecepatan pergerakan fragmen DNA tersebut, yang dinyatakan sebagai ukuran sebuah fragmen DNA (Reiner, 2016).

Elektroforesis merupakan metode yang digunakan untuk karakterisasi kualitatif suatu zat atau campuran zat, untuk kontrol kemurnian, penentuan kuantitatif, dan tujuan suatu penelitian. Berdasarkan *Qiagxcell DNA handbook* (2014) yang diadaptasi dari prinsip elektroforesi, pemisahan fragmen DNA dilakukan pada kapiler dari gel *catridge* pracetak. Molekul berpindah melalui kapiler melewati detektor yang mendeteksi dan mengukur sinyal fluoresens. Detektor *photomultiplier* mengubah sinyal emisi menjadi data elektronik. Setelah rangkaian proses selesai, data ditampilkan sebagai elektroferogram atau *gel image*. *Software* proses elektroforesis menghitung ukuran fragmen DNA berdasarkan pada waktu migrasi fragmen yang dibandingkan dengan referensi *size marker* yang berukuran 50 bp –1,5 kb.

III. METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan melalui dua tahap, tahap pertama yaitu pembudidayaan 4 varietas tanaman kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) pada lahan marginal di Desa Negara Jaya, Kecamatan Negeri Besar, Way Kanan, Lampung. Pada proses budidaya tersebut, diamati pertumbuhan dan produksi 4 varietas tanaman kedelai, kemudian pada tahap kedua akan dilakukan analisis kemelimpahan bakteri rhizosfer masing-masing varietas dianalisis menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

3.1. Budidaya Tanaman Kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill)

3.1.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di lahan percobaan, Desa Negara Jaya, Kecamatan Negeri Besar, Way Kanan, Lampung. Tahap penelitian dilaksanakan mulai dari bulan Mei 2022 sampai dengan bulan Juli 2022.

3.1.2. Alat dan Bahan Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam pelaksanaan penelitian ini adalah alat tulis, meteran, mistar, tugal, karung, koret, ember, selang air, timbangan, patokan, tali rafia, cangkul, dan *sprayer*.

Bahan-bahan yang digunakan dalam pelaksanaan penelitian ini adalah benih kedelai varietas Anjasmoro, Agromulyo, Devon 1, dan Dena 1, air, dolomit, pupuk anorganik Urea, SP36, dan KCl.

3.1.3. Deskripsi Lahan Penelitian

Lahan percobaan terletak di Desa Negeri Jaya, Kecamatan Negeri Besar, Kabupaten Way Kanan, Lampung, pada lahan seluas 165 M² dengan pH tanah 4,15. Dilakukan uji kandungan unsur hara yang dilaksanakan di Laboratorium Pengujian UPT LTSIT Universitas Lampung, yang memiliki sertifikat SNI ISO/IEC 17025:2008. Informasi mengenai kondisi lahan percobaan digunakan sebagai acuan penggunaan teknologi budidaya yang di adaptasi berdasarkan buku monograf “Teknologi Produksi Kedelai” oleh Balitkabi (2018) dengan modifikasi.

3.1.4. Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan rancangan non faktorial atau faktor tunggal, yang disusun dengan Rancangan Acak Lengkap dengan 4 ulangan, untuk mengetahui hasil pengamatan parameter pertumbuhan dan produktivitas masing-masing varietas tanaman kedelai.

Faktor perlakuan pada penelitian ini yaitu empat varietas kedelai, yaitu :

V1 : Varietas Anjasmoro

V2 : Varietas Agromulyo

V3 : Varietas Dena-1

V4 : Varietas Devon-1

Tata letak percobaan dapat digambarkan sebagai berikut :

I	II	III	III
V3	V2	V4	V2
V1	V3	V1	V4
V2	V4	V3	V1
V3	V1	V2	V4

Gambar 2. Denah tata letak percobaan

Berdasarkan 4 varietas yang ditanam dengan ulangan sebanyak 4 kali, maka didapatkan 16 satuan percobaan. Pada setiap satuan percobaan dibutuhkan 200 butir benih. Data yang diperoleh diuji homogenitas dan perbedaan nilai tengahnya menggunakan Uji Barlett, kemudian dianalisis keragamannya menggunakan uji lanjut Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan $\alpha = 5\%$. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan program statistika RStudio.

Analisis kemelimpahan bakteri masing-masing varietas dilakukan dengan membandingkan ketebalan pita DNA hasil amplifikasi primer 16s rRNA pada proses PCR, yang divisualisasi menggunakan elektroforesis.

3.1.5. Pelaksanaan Penelitian

3.1.5.1. Pengolahan Lahan

Sebelum dilakukan pengolahan lahan, dilakukan pembersihan lahan terlebih dahulu dari gulma dan pengkotor lahan lainnya. Pembersihan lahan dilakukan secara manual menggunakan parang dan arit. Selanjutnya, tanah diolah secara manual menggunakan cangkul, dengan cara membolak-balikkan tanah dengan kedalaman 15–20 cm hingga gembur. Tanah yang telah gembur kemudian ditaburi dolomit dengan dosis 3 ton/Ha. Selanjutnya tanah yang telah ditaburi dengan dolomit, dibolak-balik secara manual menggunakan cangkul. Tanah yang telah tercampur dolomit kemudian didiamkan selama ± 2 minggu.

Tanah yang telah diolah, kemudian dibuat berpetak dengan ukuran 2 x 3 M² dengan jarak antar petak 1 M². Petak perlakuan dibuat sebanyak 16 petak, dengan pembagian masing-masing 4 petak per-varietas. Parit dengan lebar 1 M dibuat di sekeliling lahan percobaan dan juga memajang di tiap pinggir petak. Parit tersebut digunakan sebagai aliran drainase dan jalan untuk memudahkan proses pemeliharaan tanaman.

3.1.5.2. Penanaman Tanaman Kedelai

Benih tanaman kedelai ditanam pada kedalaman 2-3 cm, dengan cara ditugal. Sebelum benih ditanam, benih direndam di dalam air untuk memilah antarbenih berkualitas baik dan benih yang sudah tidak produktif. Benih ditanam pada jarak 15 x 40 cm, sesuai dengan rekomendasi Balitkabi (2018). Tiap satu lubang tanam diisi dengan 2 benih kedelai untuk mengantisipasi benih kemungkinan adanya benih bernas yang ikut tertanam. Pada hari ke-7 setelah tanam dapat dilakukan penjarangan jika diperlukan.

3.1.5.3. Pemupukan

Pupuk dasar yang direkomendasi untuk tanaman kedelai, ialah 75 kg/ha Urea, 100 kg/ha SP 36, dan 100 kg/ha KCl diberikan bersamaan dengan penanaman benih kedelai atau paling lambat 14 HST. Ketiga pupuk diaplikasikan tepat disamping benih dengan jarak 5–7 cm, dengan metode tugal, lalu membenamkannya pada tanah untuk menghindari penguapan. Pada lahan marginal perlu dilakukan pemupukan susulan menggunakan pupuk urea dengan dosis 50 kg/ha pada 20 HST.

3.1.5.4. Pemeliharaan

Tanaman kedelai merupakan komoditas tanaman yang cukup peka terhadap cekaman kekeringan ataupun genangan air, terutama pada fase kritis yakni pada fase perkecambahan dan fase awal generatif (berbunga) hingga pembentukan dan pengisian polong. Maka, perlu dilakukan upaya untuk menjaga drainase pada rhizosfer tanaman tetap stabil pada kondisi lapang. Oleh karena itu, penyiraman tanaman dilakukan pada pagi dan sore hari atau digantikan dengan tadah hujan pada kondisi iklim tertentu.

Penyiangan tanaman dilakukan dua kali selama satu periode tanam, yakni pada 15 dan 45 HST. Penyiangan dilakukan secara manual menggunakan arid atau dicabut

menggunakan tangan untuk mengurangi potensi kerusakan akar. Pada penyiangan pertama, sekaligus dilakukan pembumbunan tanaman. Pembubunan ini perlu dilakukan untuk memperbaiki kondisi fisik tanah di perakaran tanaman yang terkikis pada proses penyiraman tanaman, sekaligus untuk menginduksi pembentukan nodul pada perakaran tanaman.

3.1.5.5. Pemanenan

Secara umum tanaman kedelai dapat dipanen apabila 90-95% polong telah matang, dan sebagian besar daun telah menguning, mengering ataupun gugur (Fehr *and* Caviness 1977). Varietas Anjasmoro akan memasuki usia panen pada usia 83-93 hari setelah tanam (HST), 80-82 HST pada varietas Argomulyo, 78 HST pada varietas Dena-1, dan 83 HST pada varietas Devon-1. Pemanenan tanaman menggunakan sistem potong pangkal, untuk meminimalisir goncangan yang ditimbulkan apabila pemanenan dilakukan dengan cara mencabut seluruh tanaman secara langsung. Pemanenan dengan sistem ini lebih efisien, untuk menekan jumlah polong yang rontok akibat goncangan, dan akar yang putus pada proses pencabutan tanaman.

3.2. Analisis Kemelimpahan Bakteri Rhizosfer 4 Varietas Tanaman Kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill)

3.2.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biomolekuler UPT LTSIT Universitas Lampung, Bandar Lampung. Tahap penelitian ini dilaksanakan mulai dari bulan Juni 2022 sampai dengan bulan September 2022.

3.2.2. Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam pelaksanaan penelitian ini antara lain ialah, *cool box*, es batu, plastik klip, alat tulis, kertas *tissue*, enlenmeyer, tabung reaksi, aluminium foil, *hot plate*, autoklaf, oven, *micropipette*, *microtube* steril 0,2 mL, 1.5 mL, dan 2 mL, tip steril ukuran 10 μ L, 200 μ L, dan 1000 μ L, alat *Centrifuge*, *Tissue Lyser*, Vortex, Alat Inkubasi, Alat Spin, *Nanophotometer* (IMPLEN, Jerman), kuvet, Laminar UV 4 PCR, *well buffer*, *thermocycler* (*Sensoquest*, Jerman), *tray buffer*, alat elektroforesis kapiler digital *QIAxcel Advanced* (Qiagen, Jerman), dan *freezer*.

Bahan-bahan yang digunakan pada pelaksanaan penelitian ini, antara lain ialah alkohol, kit ekstraksi DNA, kit pereaksi PCR, kit pereaksi elektroforesis, dan primer 16S rRNA, *Forward* (5–3) 63 F dan *Reverse* (5–3) 1387 R.

3.2.3. Pengambilan Sampel Tanah Rhizosfer pada Masing-masing Varietas Tanaman

Sampel tanah pada rhizosfer tanaman varietas Anjasmoro, Argomulyo, Devon 1, dan Dena-1 diambil dari lahan percobaan Desa Negara Jaya, Kecamatan Negeri Besar, Way Kanan, Lampung, secara komposit pada fase vegetatif akhir (30 HST). Sampel tanah diambil pada fase generatif akhir, yakni saat terbentuk simbiosis yang kompleks, ditandai dengan pembesaran nodul akar secara maksimal dan membentuk warna kemerahan. Sampel tanah rhizosfer diambil sebanyak 100 g pada kedalaman 10-15 cm, yang mengacu pada pendapat Singh (1983), bahwa meskipun perakaran kedelai tumbuh hingga 60-150 cm, namun absorpsi air dan unsur hara berlangsung secara maksimal hanya hingga kedalaman 15 cm dari permukaan tanah, sehingga pada lokasi perakaran tersebut interaksi antara tanaman dan *rhizobacteria* berlangsung secara maksimal.

Pengambilan sampel tanah dilakukan dalam kondisi steril menggunakan spatula dan kantong plastik yang disterilisasi berulang untuk setiap pengambilan sampel

(Gupta *et al.*, 2017). Pada tiap-tiap perlakuan, sampel tanah diambil secara acak pada 3 lokasi berbeda pada petak yang sama, kemudian dihomogenkan. Sampel tanah kemudian dimasukkan ke dalam plastik klip steril dan segera disimpan pada *freezer* pada suhu $< 0^{\circ}\text{C}$, untuk mempertahankan komposisi bakteri pada sampel sampai waktu dilakukan proses identifikasi (Gaete, *et al.*, 2020).

3.2.4. Preparasi Sampel

Sampel bakteri diperkaya pada medium universal dengan pengenceran 10^{-1} , yaitu dengan mencampurkan 1 gram tanah dari masing-masing varietas ke dalam 9 ml masing-masing media. Bakteri diperkaya pada medium *Nutrient Broth* (NB) dan diinkubasi selama 24 jam. Medium NB dibuat dengan melarutkan 2,8 gram NB pada 100 ml akuades menggunakan hot plate. Medium NB dituang ke dalam tabung reaksi sebanyak 9 ml, kemudian disterilisasi dengan *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm.

3.2.5. Ekstraksi DNA Sampel

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, AS). Ekstraksi DNA diawali dengan menempatkan 1 ml sampel hasil perkayaan yang sudah dihomogenkan pada tube tumpul berukuran 2 ml dan ditambahkan 1 ml TAE 10x, lalu dihomogenkan kembali dengan vorteks. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C , supernatan dikeluarkan perlahan. *Phosphate Buffer Saline* (PBS) 1x ditambahkan sebanyak 1 ml pada masing-masing sampel dan 10 μl lisozim pada sampel bakteri Gram positif, sampel dihomogenkan dengan vorteks. Kemudian, sampel bakteri Gram positif diinkubasi pada suhu 37°C di inkubator selama 60 menit dan sampel bakteri Gram negatif langsung disentrifugasi dengan kecepatan 13.500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C , supernatan dikeluarkan perlahan. Sampel bakteri Gram positif yang telah selesai diinkubasi langsung disentrifugasi dengan kecepatan 13.500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C dan

supernatan dikeluarkan perlahan. Selanjutnya, 500 μ l *Nucleic Lysis Solution* ditambahkan pada sampel bakteri Gram positif dan Gram negatif, dihomogenkan dengan vorteks. Kedua sampel diinkubasi pada suhu 80°C selama 5 menit dan didinginkan sampai suhu ruang. Kedua sampel ditambahkan 200 μ l *Protein Precipitation Solution*, kemudian dihomogenkan dengan dibolak-balik secara perlahan dan diinkubasi dengan es selama 5 menit. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 x g selama 5 menit pada suhu 4°C.

Hasil sentrifugasi yang terbentuk diambil bagian paling atas, karena DNA yang bersifat hidrofilik berada pada bagian atas, sedangkan bagian bawah yang terdiri dari lapisan hidrofobik seperti fenol berada pada bagian bawah (Tan & Yiap, 2009). Cairan yang diambil dimasukkan pada tube lancip 1,5 ml berisi 600 μ l isopropanol bersuhu ruang, lalu dihomogenkan dengan menginversi perlahan sampai terbentuk benang-benang halus. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 13.500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C, supernatan dikeluarkan perlahan dengan menuangkan pada tissue bersih. Kemudian, ditambahkan 600 μ l etanol 75% bersuhu ruang pada kesua sampel. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 13.500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C, etanol dikeluarkan perlahan dengan menuangkan pada tissue bersih. Etanol yang masih tersisa dikeringkan dengan menempatkan tube pada tissue bersih di dalam laminar secara terbalik dengan kondisi lampu dimatikan. Setelah etanol sudah tidak bersisa, ditambahkan 20 μ l DNA Rehydration Solution ke dalam masing-masing sampel dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu 65 °C, setiap 5 menit dilakukan tapping secara perlahan. Setelah inkubasi selesai, sampel ditap perlahan dan dispin down dengan mini *centrifuge*. DNA siap untuk dianalisis kemurnian dan konsentrasinya. Sampel DNA disimpan pada suhu -18°C.

3.2.6. Analisis Kemurnian dan Konsentrasi DNA

Konsentrasi DNA hasil ekstraksi diperiksa dengan menggunakan alat *Nanophotometer* (IMPLEN, Jerman). Sampel diteteskan pada lid sebanyak 1,5 μ l kemudian diletakkan pada *cell holder*. *Nanophotometer* menunjukkan konsentrasi

DNA dalam satuan ng/ μ l, Absorbansi A260/A280 sebagai ratio absorbansi asam nukleat dengan protein, dan A260/A230 sebagai indikasi keberadaan komponen lain seperti fenol. Sebelum dilakukan pemeriksaan sampel, dilakukan pemeriksaan blanko dengan *DNA rehydration solution* yang diteteskan pada lid sebanyak 1 μ L terlebih dahulu. Setiap pergantian sampel lid dibersihkan dengan *tissue* bersih. Sampel DNA yang murni ditunjukkan dengan absorbansi A260/A280 berkisar 1,8 – 2,0. DNA dengan kemurnian 1,8 – 2,0 dan konsentrasi >50 ng/ μ l dapat dilanjutkan ke proses amplifikasi dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

3.2.7. Amplifikasi dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

DNA bakteri diamplifikasi dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan alat *thermocycler* (*Sensoquest*, Jerman). Gen DNA bakteri diamplifikasi menggunakan primer 16S rRNA (ribosomalRNA) dengan Forward (5'-3') 63F (CAGGCCTAACACATGCAAGTC) dan Reverse (5'-3') 1387 R (GGGCGGWGTGTACAAGGC) (Marchesi et.al., 1998). Setiap pereaksi PCR terdiri dari 10,5 μ L mastermix MyTaqTM HS Red Mix , 0,25 μ L primer Forward (F), 0,25 μ L primer Reverse (R), 8 μ L ddH₂O, dan 2 μ L sampel DNA yang dimasukkan pada microtube berukuran 0,2 mL. Program thermocycling yang digunakan memiliki 6 tahapan, yaitu tahap denaturasi awal (94°C selama 5 menit), tahap denaturasi (94°C selama 1 menit), tahap penempelan primer atau annealing (50°C selama 1 menit), pemanjangan atau elongation (72°C selama 1 menit), elongasi akhir (72°C selama 5 menit), dan cooling (20°C selama 10 menit). Tahap denaturasi, penempelan primer (annealing), dan pemanjangan (elongation) diulang sebanyak 30 siklus. Proses pencampuran pereaksi PCR dilakukan di Laminar UV 4 PCR. Sampel hasil PCR diletakkan di lemari pendingin bersuhu 4°C.

3.2.8. Visualisasi Hasil *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan Elektroforesis

Visualisasi dilakukan dengan metode *capillary electrophoresis* menggunakan alat elektroforesis digital *QiaxCel Advanced* (Qiagen, Jerman) menggunakan DNA *HIGH RESOLUTION KIT*. Prosedur yang digunakan mengikuti panduan manual *QiaxCel Advanced* dari Qiagen, Jerman.

Tahap Preparasi :

Sebelum dioperasikan *cartridge* diletakkan di suhu ruang terlebih dahulu selama \pm 20 menit. Kemudian, separation buffer dan wash buffer dituang ke dalam buffer tray, ditempatkan pada buffer tray holder. Alignment marker yang berukuran 15 pb – 3.000 pb (Qiagen, Jerman) untuk menyerupakan waktu migrasi DNA dihomogenkan dan diletakkan pada well di buffer tray dalam posisi tube terbuka.

Tahap visualisasi dan penentuan ukuran fragmen DNA :

Visualisasi dan penentuan ukuran fragmen DNA dilakukan dengan *software QIAxcel ScreenGel* yang ditampilkan dalam bahasa Instrumen *QIAxcel* dan komputer dinyalakan, masuk ke *QIAxcel ScreenGel software* pada “DNA mode” sebagai “routine user”. Buffer tray berisi *alignment marker*, *separation buffer*, dan *wash buffer* dimasukkan ke bagian dalam *QIAxcel Advanced* dengan memilih “park position” pada bagian status information. Cartridge dan smart key dimasukkan ke dalam *QIAxcel Advanced instruments* di bagian atas, kemudian nitrogen diaktifkan. Size marker yang berukuran 100 pb – 2.500 pb (Qiagen, Jerman) sebagai pembanding ukuran fragmen DNA dan sampel DNA dari proses PCR dihomogenkan dan diletakkan pada “well” di sample “row” dengan posisi tube terbuka. Kemudian, diklik “process profile” pada bagian “instrument status”, *cartridge type* yang dipakai yaitu *DNA Screening*, dipilih “process profile” yang digunakan. Pemilihan sampel dilakukan dengan memilih “sample selection”, *size marker* yang digunakan 100 pb – 2,5 kb (20 ng/ μ l), *alignment marker* menggunakan QX 15pb -3 kb, pada bagian “sample row selection” dipilih baris A apabila hanya \leq 11 sampel yang dielektroforesis, diklik kanan pada salah satu kolom antara 1-12 untuk memilih lokasi size marker, kemudian diklik kotak

“*show lot information*”. Selanjutnya, dipilih “*sample information*” untuk memberi nama masing-masing sampel dan size marker untuk menyesuaikan posisi sampel di *sample row*. Setelah seluruh informasi *cartridge*, sampel dan penanda (marker) terisi, kemudian dipilih “*run check*”. Diklik pada kotak untuk mengkonfirmasi *sample rows* telah terisi sampel juga alignment marker dan *size marker* telah dimasukkan. Nitrogen diaktifkan dan *cartridge* dikunci dengan memilih “*latch*” pada bagian status *information*. Setelah “*errors and warnings*” tidak menunjukkan peringatan, maka proses elektroforesis dapat dijalankan dengan memilih “*run*”. Setelah laju migrasi DNA selesai (± 11 menit), *software* menampilkan posisi dan ukuran fragmen DNA, untuk dapat mengetahui ukuran fragmen DNA dapat dipilih “*analysis*” pada bagian menu bar.

3.3. Pengukuran Variabel Pengamatan

Pengamatan dilakukan untuk menguji kesahihan kerangka pemikiran dan hipotesis, beberapa komponen pengamatan terhadap pertumbuhan dan hasil tanaman kedelai, dijelaskan sebagai berikut :

3.3.1. Pengamatan Komponen Pertumbuhan Tanaman

(a) Tinggi tanaman

Tinggi tanaman diukur dari pangkal tanaman pada permukaan tanaman sampai titik tumbuh batang utama, dilakukan saat tanaman berusia 7 MST, yakni pada saat tanaman mencapai masa vegetatif akhir. Pengukuran dilakukan pada 10 sampel tanaman pada tiap petak percobaan. Pengukuran dinyatakan dalam satuan sentimeter (cm) dengan alat bantu berupa meteran.

(b) Jumlah daun

Jumlah daun diamati pada hari ke-35 HST, dengan cara menghitung daun sempurna yang terbentuk per satu tanaman sampel. Kriteria daun sempurna ialah memiliki 1-3 helai daun sempurna, pada tiap helai daun. Pengukuran dilakukan pada 10 tanaman sampel, pada tiap petak percobaan. Hasil pengukuran jumlah daun yang dilakukan secara manual dinyatakan dalam jumlah tangkai daun, sesuai kriteria daun sempurna.

(c) Tingkat kehijauan daun

Dilakukan dengan menggunakan alat Minolta SPAD, dinyatakan dalam satuan (unit). Pengukuran klorofil daun dilakukan satu kali, pada saat tanaman memasuki fase vegetatif maksimum (umur 6 MST) menggunakan alat klorofil meter. Setiap tanaman sampel diambil 3 helai daun yaitu pangkal daun, tengah daun, dan ujung daun. Cara pengukuran yaitu pada 3 titik dari satu helai pangkal, tengah dan ujung daun kemudian nilai yang diperoleh dirata-ratakan. Pada tiap petak percobaan, diukur 10 tanaman sampel untuk mewakili populasi tanaman pada petak percobaan.

(d) Bobot kering berangkasan

Seluruh bagian tanaman sampel yang terbentuk hingga fase vegetatif akhir, dari bagian pucuk hingga ujung pangkal tanaman dipangkas dan dikeringkan dengan cara menjemur berangkasan pada sinar matahari selama 24 jam, setelah itu dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 70° C, selama ± 3 hari hingga bobot konstan. Pada tiap petak, diambil 10 sampel untuk mewakili populasi tanaman pada petak percobaan. Setelah kering, berangkasan ditimbang dengan menggunakan timbangan, dan dinyatakan pada satuan gram (g), kemudian dirata-ratakan jumlahnya.

(e) Bintil akar total

Pengamatan bintil akar total dilakukan pada akhir fase vegetatif yaitu pada 35 HST dengan membelah bintil akar dan menghitung total bintil akar yang berwarna merah maupun berwarna putih pada sepuluh tanaman sampel, kemudian dirata-ratakan jumlahnya.

3.3.2. Pengamatan Komponen Produksi Tanaman**(a) Jumlah polong total**

Pengamatan dilakukan saat panen dengan menghitung jumlah total polong yang terbentuk. Jumlah polong total yang terbentuk tersebut termasuk polong hampa dan polong isi. Perhitungan dilakukan pada sepuluh tanaman sampel, pada tiap petak percobaan, kemudian dirata-ratakan jumlahnya.

(b) Jumlah polong isi

Pengamatan dilakukan pada saat setelah panen dengan menghitung polong yang bernas pada sepuluh sampel, di tiap petak percobaan, kemudian dirata-ratakan jumlahnya.

(c) Jumlah polong hampa

Jumlah polong hampa diperoleh dari hasil pengurangan jumlah polong total dengan jumlah polong isi pada sepuluh tanaman sampel, pada tiap petak percobaan, kemudian dirata-ratakan jumlahnya.

(e) Bobot biji per tanaman

Pengamatan dilakukan dengan cara memipil keseluruhan biji kedelai per tanaman, pada sepuluh sampel tanaman per petak percobaan. Biji yang telah bersih dikeringkan hingga mencapai kadar air 15-17%, kemudian ditimbang dan dinyatakan pada satuan gram (g).

(f). Produksi per hektar

Produksi kedelai per hektar, dianalisis berdasarkan perhitungan antara bobot biji per tanaman dengan total keseluruhan populasi tanaman per hektar, per ulangan (varietas), kemudian dirata-ratakan jumlahnya.

3.3.3. Pengamatan Komponen Uji Mutu Benih

(a) Daya berkecambah(%)

Pengamatan terhadap daya berkecambah, dihitung secara otomatis oleh *software online GerminaQuant*, atau dapat dilakukan secara manual dengan cara menghitung jumlah benih berkecambah normal pada hari ke-5 dan ke-8 setelah tanam. Daya berkecambah, dihitung menggunakan rumus :

$$DB (\%) = \frac{\sum KN \text{ Pengamatan I} + \sum KN \text{ Pengamatan II}}{\sum \text{Benih yang ditanam}} \times 100\%$$

Keterangan :

KN : Kecambah Normal

(b) Vigor benih

Pengamatan untuk perhitungan indeks vigor dilakukan pada pengamatan ke-1 (*first counting*) dimana kecambah normal dihitung pada hari ke-5 (HST) dengan rumus :

$$IV (\%) = \frac{\sum \text{KN Pengamatan I}}{\sum \text{Benih yang ditanam}} \times 100\%$$

3.3.4. Pengamatan Kemelimpahan Bakteri

Fragmen DNA yang teramplifikasi pada proses PCR (*Polymerase chain reaction*) divisualisasikan menggunakan *gel image* pada proses elektroforesis. *Gel Image* kemudian menggambarkan kemelimpahan bakteri pada rhizosfer 4 varietas tanaman kedelai yang diuji. Variabel yang diamati adalah ketebalan pita DNA. Tebal pita yang tervisualisasi dalam bentuk *gel image* pada proses elektroforesis mengindikasikan kemelimpahan sekuen DNA bakteri rhizosfer yang terseparasi. Semakin tebal pita DNA yang terbentuk sampel diasumsikan dengan semakin melimpahnya bakteri rhizosfer pada sumber sampel, karena semakin banyak pula DNA yang terdapat di dalamnya. Intensitas pita DNA yang muncul pada proses elektroforesis menggambarkan kemelimpahan bakteri relatif suatu populasi (Li, *et al.*, 2016). Pernyataan tersebut juga didukung oleh Boon, *et al.*, (2002), yang menyatakan bahwa intensitas pita dalam hal ini berupa ketebalan pita yang muncul pada *gel track* saat proses elektroforesis merefleksikan jumlah dan kemelimpahan relatif dari sekuen gen.

3.3.5. Korelasi Kemelimpahan Bakteri dengan Masing-masing Variabel Pengamatan

Koefisien korelasi merupakan nilai tunggal atau angka yang menghubungkan dua variabel atau lebih. Namun, koefisien korelasi bukanlah hubungan sebab akibat, dalam arti dua variabel dapat saling berhubungan tetapi tidak mempengaruhi satu

sama lain (Borden, 2009). Studi tentang koefisien korelasi mengamati sifat antar karakter dalam sebuah penelitian (Vidyalaya, 2013). Pada penelitian ini, dilakukan pengamatan terhadap koefisien korelasi seluruh variabel pengamatan lapang dengan kemelimpahan bakteri masing-masing varietas, yang mengacu pada teori Karl Pearson, bahwa koefisien korelasi merupakan koefisien korelasi linier antara dua variabel yang dilambangkan dengan “r”, yang berjalan kearah positif maupun negatif, dimana kenaikan salah satu komponen hasil akan mengakibatkan penurunan dengan komponen hasil lainnya (Dendukuri *and* Reinhold, 2004)

Koefisien korelasi pada penelitian ini dihitung secara otomatis menggunakan *Microsoft Excell*, atau yang secara manual dapat dihitung menggunakan rumus koefisien korelasi :

$$r_{xy} = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{\sqrt{(n \sum x^2 - (\sum x)^2) (n \sum y^2 - (\sum y)^2)}}$$

Keterangan:

r_{xy} = Koefisien korelasi antara x dan y

n = Banyaknya sampel

$\sum x$ = Variabel x

$\sum y$ = Variabel y

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Kesimpulan pada penelitian ini, ialah sebagai berikut :

1. Pertumbuhan, produksi, dan mutu benih keempat varietas tanaman kedelai yang dibudidayakan pada lahan marginal yang sama berturut-turut dari yang terbaik ialah varietas Devon-1, Anjasmoro, Argomulyo, dan Dena-1.
2. Kemelimpahan *Rhizobacteria* Gram negatif dan Gram positif pada perakaran empat varietas tanaman kedelai berturut-turut dari yang tertinggi ialah bakteri Gram negatif varietas Argomulyo, bakteri Gram positif dan negatif varietas Devon-1, bakteri Gram positif varietas Anjasmoro, bakteri Gram positif varietas Dena-1, bakteri Gram negatif varietas Anjasmoro, bakteri Gram negatif varietas Dena-1, bakteri Gram positif varietas Argomulyo.
3. Kemelimpahan bakteri Gram positif pada rhizosfer keempat varietas uji berkorelasi positif dengan variabel tinggi tanaman, jumlah daun, tingkat kehijauan daun, jumlah bintil akar total, jumlah polong isi, jumlah polong hampa, jumlah polong total, produksi per hektar, daya berkecambah dan indeks vigor, namun berkorelasi negatif dengan bobot kering berangkasan. Sedangkan kemelimpahan bakteri Gram negatif berkorelasi positif dengan variabel tingkat kehijauan daun, jumlah bintil akar total, bobot biji pertanaman, dan produksi per hektar, namun berkorelasi negatif dengan tinggi tanaman, jumlah daun, bobot kering berangkasan, jumlah polong isi, jumlah polong hampa, jumlah polong total, daya berkecambah dan indeks vigor.

5.2. Saran

Berdasarkan kesimpulan pada penelitian ini maka penulis menyarankan bahwa perlu dilakukan :

1. Penelitian lebih lanjut terkait eksudat akar yang disekresikan oleh masing-masing varietas kedelai, untuk dapat dilakukan pendekatan yang lebih akurat terkait korelasi sekresi eksudat tanaman inang dengan perbedaan kelimpahan bakteri Gram negatif dan Gram positif yang bernaung tanaman inang.
2. Melakukan analisis pada bintil akar tanaman kedelai untuk mengetahui keragaman bakteri Gram negatif dan Gram positif yang telah bersimbiosis dengan tanaman inang.
3. Metaanalisis dengan metagenomik untuk mengetahui jenis dan peranan masing-masing bakteri Gram negatif dan Gram positif tersebut secara spesifik berdasarkan literatur yang telah tersedia.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, Y.E.Y., 2012. Effect of plant traps and sowing dates on population density of major soybean pests. *J. Basic Appl. Zool.* 65, 37-46.
- Acosta-Martínez, V., Cotton, J., Gardner, T., Moore-Kucera, J., Zak, J., Wester, D., et al. (2014). Predominant bacterial and fungal assemblages in agricultural soils during a record drought/heat wave and linkages to enzyme activities of biogeochemical cycling. *Appl. Soil Ecol.* 84, 69–82.doi: 10.1016/j.apsoil.2014. 06.005.
- Adesemoye, A. O., Torbert, H. A., and Kloepper, J. W. 2009. Plant growthpromoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbial Ecology*, 58(4), 921-929.
- Adie, Muchlish, M. dan Krisnawati, A. 2013. *Biologi Tanaman Kedelai*.
- Adisarwanto. 2013. *Kedelai Tropika Produktivitas 3 ton/ha*. Penebar Swadaya. Malang.
- Ahmed, E., dan Holmstrom, S. J. M. 2014. Siderophore In Environmental Research : Roles And Application. *Microbial biotechnology*.Vol 7(3):196-208.
- Ahmed, S. 2009. Effect of salinity on the yield and yield component of mungbean. *Pak. J. Bot.* 41(1): 263-268.
- Alexander, M. (1977) *Introduction to Soil Microbiology*. 2nd Edition, John Wiley Eastern Limited, New Delhi, 467.
- Almatsier, S. 2009. *Prinsip Dasar Ilmu Gizi*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- American Soybean Association, 2017. *Soy Stats: A Reference Guide to Important Soybean Facts & Figures*. American Soybean Association, USA.
- Alves, L., Henrique, C., Edvan Teciano Frezarin, Luziane Ramos Sales, & Everlon Cid Rigobelo. 2023. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria for Sustainable Agricultural Production. *Microorganisms*, 11(4), 1088–1088. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11041088>.

- Ana P.G.C.M., C. Pires, H. Moreira, A.O.S.S. Range, dan P.M.L. Castro. 2011. Assessment of the Plant Growth Promotion Abilities of Six Bacterial Isolates using *Zea mays* as Indicator Plant. *Soil Biology and Biochemistry*. 4(2),1229-1235.
- Ao X, Guo X H, Zhu Q, Zhang H J, Wang H Y, Ma Z H, Zhao M H, Xie F T. 2013. Effect of phosphorus fertilization to P uptake and dry matter accumulation in soybean with different P efficiency. *Journal of Integrative Agriculture*. doi: 10.1016/S2095-3119(13)60390-1.
- Aryantha, I.N.P., D.P. Lestari dan N.P.D. Pangesti. 2004. “Potensi Isolat Bakteri Penghasil IAA dalam Peningkatan Pertumbuhan Kecambah Kacang Hijau pada Kondisi Hidroponik”. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*. 9(2), 43-46
- Badri, D. V., & Vivanco, J. M. 2009. Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell & Environment*, 32(6) : 666–681. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01926.x>
- Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi (BALITKABI). 2016. *Deskripsi Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian*. Malang.
- Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi (BALITKABI). 2021. Berita: Deskripsi Varietas Unggul Aneka Kacang Tanah dan Umbi. <https://balitkabi.litbang.pertanian.go.id/produk/deskripsi-varietas/>.
- Bano Q, Ilyas N, Bano A, Zafar N, Akram A, Hassan F. 2013. Effect of *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays* L.) under drought stress. *Pak J Bot*. 45: 13–20.
- Basal O., Szabó A. (2018). The effects of drought and nitrogen on soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) physiology and yield. *Int. J. Agric. Biosyst. Engin*. 12 260–265. 10.5281/zenodo.1474431
- Bertin, C., Yang, X., Weston, L., 2003. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and Soil* 256, 67–83.
- Benkova, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertova, D., Jurgens, G., Friml, J. 2003. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*. 115. pp 591-602.
- Bhatia, S., & Dahiya, R. 2015. Concepts and Techniques of Plant Tissue Culture Science. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*, 121–156. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802221-4.00004-2> *Biotechnology*. 4(2): 72.
- Board, J. E., dan Kahlon C.S. 2012. Contribution of Remobilized Total Dry Matter to Soybean Yield. *Journal of Crop Improvement*. 26, 5, 641-654.
- Boon, N. 2002. Evaluation of nested PCR–DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of

bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 39(2) : 101–112. [https://doi.org/10.1016/s0168-6496\(01\)00198-2](https://doi.org/10.1016/s0168-6496(01)00198-2).

Borden, L. M. 2009. Understanding correlation. *The Arizona center for Research and Outreach (AZ REACH)*. Arizona: Tucson.

Bouskill, N. J., Lim, H. C., Borglin, S., Salve, R., Wood, T. E., Silver, W. L., (2013). Pre-exposure to drought increases the resistance of tropical forest soil bacterial communities to extended drought. *ISME J.* 7, 384–394. doi: 10.1038/ismej.2012.113.

BPS (Badan Pusat Statistik). 2020. *Analisis Produktivitas Tanaman Jagung dan Kedelai di Indonesia*. BPS. Jakarta.

Brons J. K., van Elsas J. D. Analysis of bacterial communities in soil by use of denaturing gradient gel electrophoresis and clone libraries, as influenced by different reverse primers. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008;74(9) : 2717–2727.

Budiastuti, M.S. (2000). Penggunaan Triakontanol dan Jarak Tanam pada Tanaman Kacang Hijau (*Phaseolus radiatus* L.). *Jurnal Agrosains* 2(2) : 59-63

Bull AT, Asenjo JA. 2013. *Microbiology of hyper-arid environments* : 1173-1179.

Cahyadi, W. 2007. *Kedelai kasiat dan teknologi*. Penerbit Bumi Aksara. Jakarta.

Carvalhais, L. C., Dennis, P. G., Fedoseyenko, D., Hajirezaei, M. R., Borriss, R., and von Wirén, N. (2011). Root exudation of sugars, amino acids, and organic acids by maize as affected by nitrogen, phosphorus, potassium, and iron deficiency. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 174, 3–11. [10.1002/jpln.201000085](https://doi.org/10.1002/jpln.201000085).

Chaparro, J. M., Badri, D. V., Bakker, M. G., Sugiyama, A., Manter, D. K., Vivanco, J. M. (2013). Root exudation of phytochemicals in arabidopsis follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. *PLoS One* 8, e55731. doi: 10.1371/annotation/51142aed-2d94-4195-8a8a-9cb24b3c733b

Chibeba AM, Guimaraes MDF, Brilo OR, Nagueira MA, Araujo RS, Hungria M. 2015. Coinoculation of soybean with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* promotes early nodulation. *J. Plant Soil* 61:1641-1649. <https://doi.org/10.4236/ajps.2015-610164>

Chodak, M., Gołębiewski, M., Morawska-Ploskonka, J., Kuduk, K., and Niklinska, M. (2015). Soil chemical properties affect the reaction of forest soil bacteria to drought and rewetting stress. *Ann. Microbiol.* 65, 1627–1637. doi: 10.1007/s13213-014-1002-0.

- Ciha, A.J. dan W. A. Burn. 1975. Stomatal Size and Frequency in Soybeans. *Crop sci.* 15 (3) : 309 — 312.
- Cohen, L. 1992. Power Primer. *Psychological Bulletin*, 112(1) : 155-159.
- Cooper. 2007. JE: Early interactions between legumes and rhizobia:disclosing complexity in a molecular dialogue. *J Appl Microbiol.* 103:1355-1365.
- Curl, C.L., R.K. Price, & G.R. Fenwick. 1986. Isolation and structural elucidation of a triterpenoid saponin from guar *Cyamopsis tetragonoloba*. *Phytochem.* 25: 2675-2676.
- Damardjati, D. S., D. K. S. Swastika, D. M.Arsyad & Y. Hilman.2005. *Prospek dan Arah Pengembangan Agribisnis Kedelai*. Badan Litbang Pertanian. Departemen Pertanian, Jakarta.
- Dakora F.D, Phillips D.A. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant Soil*, 245:35–47. <https://doi.org/10.1023/A:1020809400075>
- De Bruin JL, Pedersen P. 2008. Effect of Row Spacing and Seeding Rate On Soybean Yield. *Agronomy Journal*. 100: 704–710. <https://doi.org/10.2134/agronj2007.0106>.
- D’Haeze W, Holsters. 2005. M: Surface polysaccharides enable bacteria to evade plant immunity. *Trend Microbiol.* 12:555-561.
- Denarie, J. and J. Cullimore. 1993. Lipo-oligosaccharide nodulation factors : *A New Class of Signaling Molecules Mediating Recognition and Morphogenesis*. *Cell* 74:951-954.
- Dendukuri, Nandini dan C.Reinhold. 2004. *Correlation and Regression*. AJR: 185.
- Donata. 2007. *Ciri-Ciri DNA Murni dan Penyebab Keberhasilan serta Kegagalan dalam PCR dan Elektroforesis*. Erlangga. Jakarta.
- Dickstein, M.K. Udvardi, Celebrating 20 years of genetic discoveries in legume nodulation and symbiotic nitrogen fixation, *Plant Cell* 32 (2020) 15–41.
- Doorenbos J, WO Pruitt. 1977. *Guidelinis for Predicting Crop Water Requirement*. Book 24. FAO. Rome. 144.
- Dymock, D., & Wade, W. G. 1998. Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), 2333.
- Egli, D. B. and W. P. Bruening. 2006. Fruit development and reproductive survival in soybean: Position and age effects. *Field Crops Res.*, 98:195–202.

- Ernawati. 2006. *Perbaikan Kinerja Reproduksi Akibat Pemberian Isofl Avon dari Tanaman Kedelai*. FMIPA, Universitas Indonesia. Jakarta.
- Fatchiyah. 2005. PCR:Dasar Teknik Amplifikasi DNA dan Aplikasinya <http://fatchiyah.lecture.ub.ac.id/teaching-responsibility/general/> di dalam Yuenleni. 2019. Langkah-Langkah Optimasi PCR. *Indonesian Journal of Laboratory*. 1(3): 51-56.
- Fehr, W.R. and C.L. Caviness. 1977. *Stages of soybean development*. Special Report No 80. Cooperative Extension Services Agric. and Home Econ. Exp. St. Iowa State Univ. of Sci. and Technol, Ames, Iowa.
- Fellay, R, X. Perret, V Viprey, W Broughton, and S. Berner. 1994. Organization of host-inducible transcripts on the symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp. NGR234. *Mol. Microbiol.* 16:657-667.
- Fernando D, Nakkeeran, Zhang Yilan. 2005. biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant diseases. dalam: Z.A. Siddiqui (ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization* 67-109.
- Fisher, R. F. and S. R. Long. 1992. *Rhizobium-plant signal exchange*. *Nature* 357:655-660.
- Forbes, J. D., Knox, N. C., Peterson, C. L., dan Reimer, A. R. 2018. Highlighting Clinical Metagenomics for Enhanced Diagnostic Decision-making: A Step Towards Wider Implementation. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 16: 108—120.
- Fuchslueger, L., Bahn, M., Fritz, K., Hasibeder, R., and Richter, A. (2014). Experimental drought reduces the transfer of recently fixed plant carbon to soil microbes and alters the bacterial community composition in a mountain meadow. *New Phytol.* 201, 916–927. doi: 10.1111/nph.12569.
- Fuchslueger, L., Bahn, M., Hasibeder, R., Kienzl, S., Fritz, K., Schmitt, M., et al. (2016). Drought history affects grassland plant and microbial carbon turnover during and after a subsequent drought event. *J. Ecol.* 104, 1453–1465. doi: 10.1111/1365-2745.12593.
- Gunnigle, E., Frossard, A., Ramond, J.-B., Guerrero, L., Seely, M., and Cowan, D. A. (2017). Diel-scale temporal dynamics recorded for bacterial groups in Namib Desert soil. *Sci. Rep.* 7:40189. doi: 10.1038/srep40189.
- Gaete, Alexis, Mandakovic, Dinka, Gonzalez, Mauricio. 2020. Isolation and Identification of Soil Bacteria from Extreme Environments of Chile and Their Plant Beneficial Characteristics. *Microorganisms*. MDPI.
- García J E, Maroniche G, Creus C, Suárez-Rodríguez R, Ramirez-Trujillo J *Generation Sequencing & Applications*. 3(1): 3—4.
- Ghassemi-Golezani, K., M. Taifeh-Noori, S. Oustan, M. Moghaddam and S. S. Rahmani. 2011. Physiological performance of soybean cultivars under salinity stress. *J. of Plant Physiol. and Breeding* 1(1):1–7.

- Gholami, A., S. Shahsavani dan S. Nezrat. 2009. *The Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on Germination, Seedling Growth and Yield of Maize*. Proceedings of World Academy of Science, Engineering and Technology. Vol.3(7). P : 2070-3740.
- Giyanto. 2003. Apa Yang Dapat Microsoft Excel Lakukan untuk Menganalisis Data Kelautan?. *Oseana*, 28 (4) : 7-16
- Glick, B.R. dan D.M. Penrose. 2004. The Use of ACC Deaminase-Containing Plant Growth-Promoting Bacteria to Protect Plants Against the Deleterious Effects of Ethylene. *Plant Surface Microbiology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Haas, D., dan Devago, G. 2005. Biological Control of Soil Borne Pathogens by *Pseudomonas fluorescens*. *Nature Reviews Microbiology*. Vol (3). hal 307- 319.
- Habibah, A.L. 2017. *Isolasi DNA Chlorella sp. dengan Metode CTAB dan Identifikasi Sikuen 18s rRNA*. Skripsi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Malang.
- Haichar, Z.F., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J.I., Prosser, J.I., et al., 2008. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME Journal* 2, 1221–1230.
- Hamim, Khairul Ashri, Miftahudin, dan Triadiati. 2008. Analisis status air, rolin dan aktivitas enzim antioksidan beberapa kedelai toleran dan peka kekeringan serta kedelai liar. *Agrivita* 30(3):201–210.
- Handoyo, D., dan Rudiretna, A. 2001. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polimerase Chain Reaction (PCR). *Unitas*. 9(1): 17-29.
- Hasan, M.I. 2002. *Pokok-pokok Materi Statistik I (Deskriptif)*. Bumi Aksara. Jakarta.
- Hatten, J., & Liles, G. (2019). A “healthy” balance – The role of physical and chemical properties in maintaining forest soil function in a changing world. *Global Change and Forest Soils*, 373–396. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63998-1.00015-x>.
- Hartmann, M., Brunner, I., Hagedorn, F., Bardgett, R. D., Stierli, B., Herzog, C., et al. (2017). A decade of irrigation transforms the soil microbiome of asemi-arid pine forest. *Mol. Ecol.* 26, 1190–1206.doi: 10.1111/mec.13995
- Hayden, H. L., Mele, P. M., Bougoure, D. S., Allan, C. Y., Norng, S., Piceno, Y. M., et al. (2012). Changes in the microbial community structure of bacteria, archaea and fungi in response to elevated CO and warming in an Australian native grassland soil. *Environ. Microbiol.* 14, 3081–3096.doi: 10.1111/j.14622920.2012.02855.x.

- Helmiyati, A.F. dan Nurrahman. 2010. Pengaruh Konsentrasi Tawas terhadap Pertumbuhan Bakteri Gram Positif dan Negatif. *Jurnal Pangan dan Gizi*, 1(01): 1-6
- Barnard, R. L., Osborne, C. A., and Firestone, M. K. (2013).
- Hermann, F.J. 1962. *A revision of the genus Glycine and its immediate allies*. USDA Tech. Bull. 1268: 1-79.
- Hider, R.C.; Kong, X. 2013. Chapter 8. Iron: Effect of Overload and Deficiency. In Astrid Sigel, Helmut Sigel and Roland K. O. Sigel (ed.). *Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases. Metal Ions in Life Sciences*. 13. *Springer*. pp. 229–294.
- Higashi, S. 1993. Minireview: (Brady)Rhizobium-plant communications involved in infection and nodulation. *J. Plant Res.* 106:201-211.
- Huang, X., Zhang, K., Yu, Z., Li, G., 2015. Microbial control of phytopathogenic nematodes. In: Lugtenberg, B. (Ed.), *Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture*. Springer, pp. 155–164.
- Hymowitz, T. 1970. *On the Domestication of the Soybean*. *Econ. Bot.* 23: 408-421.
- Inceoglu, O., Al-Soud, W.A., Salles, J.F., Semenov, A.V., van Elsas, J.D., 2011. Comparative analysis of bacterial communities in a potato field as determined by pyrosequencing. *PLoS One* 6 (8), e23321. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023321>.
- Jorquera, M.; Graether, S.P.; Maruyama, F. Editorial: Bioprospecting and Biotechnology of Extremophiles. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2019, 7, 204.
- Kementrian Perdagangan. 2021. *Analisis Perkembangan Harga Bahan Pangan Pokok di Pasar Domestik dan Internasional*. KEMENDAG. Jakarta.
- Kumar, V., AlMomin, S., Al-Aqeel, H., Al-Salameen, F., Nair, S., dan Shajan, A. 2018. Metagenomic Analysis of Rhizosphere Microflora of Oil Contaminated Soil Planted with Barley and Alfalfa. *PLoS ONE*. 13(8): 1—16.
- Lauber, C. L., Hamady, M., Knight, R., and Fierer, N. (2009). Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5111–5120. doi: 10.1128/AEM. 00335-09.
- Leal de Castilho, C., Longoni, L., Sampaio, J., Lisboa, B. B., Vargas, L. K., & Beneduzi, A. 2020. The rhizosphere microbiome and growth-promoting rhizobacteria of the Brazilian açucaí palm. *Rhizosphere*, 15, 100233. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100233>
- Lerouge, P., P Roche, C. Faucher, F. Millet, G. Truchet, G.C. Prome, and J. Denarie. 1990. *Symbiotic host-specificity of Rhizobium meliloti is determined by a sulfated and acylated glucosamine oligosaccharide signal*. *Nature* 344:781-784.

- Li, R., Liu, J., Zhang, H., Piao, Y., Hu, X., Zhu, B., Cong, L., Zhao, C., & Dong, L. 2016. Assessment of the microbial diversity during an industrial-scale malting process by a polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(2) : 237–242. <https://doi.org/10.1002/jib.315>
- Liu, Z., Ma, L., He, X., Tian, C., 2014b. Water strategy of mycorrhizal rice at low temperature through the regulation of PIP aquaporins with the involvement of trehalose. *Appl. Soil Ecol.* 84, 185–191.
- Long, S. R 1996. Rhizobium symbiosis : Nod factors in perspective. *The Plant Cell* 8:1885-1898.
- López-Guerrero, M. G., Ormeño-Orrillo, E., Acosta, J. L., Mendoza-Vargas, A., Rogel, M. A., Ramírez, M. A., et al. (2012). Rhizobial extrachromosomal replicon variability, stability and expression in natural niches. *Plasmid* 68, 149–158. doi: 10.1016/j.plasmid.2012.07.002.
- Madigan, M.T., Bender, K.S., Buckley, D.H., Sattley, W.M, dan Stahl, D.A. 2019. *Brock Biology of Microorganisms Fifteenth Edition*. Pearson. London.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. 2017. *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson. London.
- Marasco, R., Rolli, E., Ettoumi, B., Vigani, G., Mapelli, F., Borin, S., et al. (2012). A drought resistance-promoting microbiome is selected by root system under desert farming. *PLOS ONE* 7:e48479. doi: 10.1371/journal.pone.0048479.
- Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Wade WG. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ. Microbiol* 64:795-9.
- Martín-Robles, N., Lehmann, A., Seco, E., Aroca, R., Rillig, M.C., Milla, R., 2018. *Impacts of domestication on the arbuscular mycorrhizal symbiosis of 27 crop species*. *New Phytol.* 218, 322–334.
- Marzorati M., Wittebolle L., Boon N., Daffonchio D., Verstraete W. 2008. How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environmental Microbiology*, 10(6):1571–1581.
- Matus-Acuña, V., Caballero-Flores, G., and Martínez-Romero, E. (2021). The influence of maize genotype on the rhizosphere eukaryotic community. *FEMS Microbiol. Ecol.* 97:fiab066. doi: 10.1093/femsec/fiab066.
- Miransari, M. 2011. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89:917-930.

- Mohanram, S., dan Kumar, P. (2019). Mikrobioma rhizosfer: meninjau kembali sinergi interaksi mikroba tumbuhan. *Ann. Mikrobiol.* 69, 307–320. doi: 10.1007/s13213-019-01448-9.
- Mugnisjah, W. Q dan A. Setiawan. 1990. *Pengantar Produksi Benih*. Edisi 1. Rajawali Persada. Jakarta. 129 hal.
- Mutadi, D. 2010. *Kedelai Komponen Bioaktif untuk Kesehatan*. Anggota Ikatan Penerbit Indonesia. Bogor.
- Muyzer G., Hottentrager S., Teske A., Wawer C. 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA—a new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. In: Kowalchuk G. A., Bruijn F. J., Head I. M., Akkermans A. D., van Elsas J. D., editors. *Molecular Microbial Ecology Manual*. Nowell, Mass, USA: Kluwer Academic; pp. 1–23.
- Mus, F., & Wu, H.-H. (2022). Symbiotic nitrogen fixation. *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-822974-3.00056-2>.
- Naylor, D., & Coleman-Derr, D. (2018). Drought Stress and Root-Associated Bacterial Communities. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02223>.
- Numan, M., Bashir, S., Khan, Y., Mumtaz, R., Shinwari, Z.K., Khan, A.L., Khan, A., Al-Harrasi, A., 2018. Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: a review. *Microbiol. Res.* 209, 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.02.003>.
- Nurwati, L., dan Nawfa, R. 2015. Identifikasi Spesies Isolat Bakteri Galur D Dengan Metode Analisa Sekuen Fragmen Gen 16S rDNA. *Jurnal sains dan seni ITS*. 4:2.
- O'Brien, J. A. & Benkova, E. 2013. Cytokinin cross-talking during biotic and abiotic stress responses. *Frontiers in plant science* 4, 451.
- Ojuederie OB, Babalola OO., 2017. Microbial and Plant-assisted Bioremediation of Heavy Metal Polluted Environments: A review. *Intl. J. Environ. Res. Public Health* 14, 1504.
- Onwueme, I.C., Sinha, T.D., 1991. *Field crop producton in Tropical Africa*. Technical Centre Agricultural and Rural Cooperation (CTA) 337—343.
- Patantis, G., dan Fawzya, Y. N. 2009. Teknik Identifikasi Mikroorganisme Secara Molekuler. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*. 4(2): 72.
- Pelczar, M. J., Chan, E. C. S., & Krieg, N. R. 2003. *Microbiology : Concepts and Applications*. McGraw-Hill.

- Perez-Jaramillo, J.E., Mendes, R., Raaijmakers, J.M., 2016. Impact of Plant Domestication on Rhizosphere Microbiome Assembly and Functions. *Plant Mol. Biol.* 90, 635—644.
- Pertiwi, D.P.N., Mahardika, dan Watiniasih. 2015. Optimasi Amplifikasi DNA Menggunakan Metode PCR (Polymerase Chain Reaction) pada Ikan Karang Aggota Famili Pseudochromidae (DOTTYBACK) untuk Identifikasi Spesies secara Molekular. *Jurnal Biologi.* 19(2): 1-5.
- Petit, Philippe, E.M.F. Lucas, L.M. Abreu, L.H. Pfenning, dan J.A. Takahashi. 2009. Novel Antimicrobial Secondary Metabolites From A *Penicillium* sp. Isolated From Brazilian Cerrado soil. *Electronic Journal of Biotechnology.* 12 (4): 2–9. <https://doi.org/10.2225/vol12-issue4-fulltext-9>.
- Qiagcell DNA Handbook. 2014. *Qiagen Sample Assay and Technologies.* QIAGEN. Hilden.
- Ramlah, S. Y. A., & Guritno, B. (2019). Pengaruh Konsentrasi PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) terhadap Pertumbuhan dan Hasil Tiga Tanaman Kedelai (*Glycine max* L.). *Jurnal Produksi Tanaman*, 7(9). <http://protan.studentjournal.ub.ac.id/index.php/protan/article/view/1232>
- Rawat, S.G., Joshi, Annapurna, D., Arunkumar, A.N., and Karaba, K.N. 2016. Standardization of DNA Extraction Method from Mature Dried Leaves and ISSR-PCR Conditions for *Melia dubia* Cav. A Fast Growing Multipurpose Tree Species. *American Journal of Plant Sciences.* (7) 437-445.
- Reddy PM, Rendon-Anaya M, de los Dolores Soto del Rio. 2007. M: Flavonoids as signaling molecules and regulators of root nodule development. *Dynamic Soil Dyn Plant.* 1:83-94.
- Reeve, W., J. Ardley, R. Tian, L. Eshragi, JW. Yoon, P. Ngamwisetkun, R. Seshadri, NN. Ivanova, & NC. Kyrpides. 2015. A Genomic Encyclopedia of the Root Nodule Bacteria: assessing genetic diversity through a systematic biogeographic survey. *Standards Genomic Sciences.* 9: 10:14.
- Reiner Westermeier. 2016. *This Electrophoresis in Practice : A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations.*
- Relic, B. X. Perret, M. T Estrada-Garcia, J. Kopcinska, W Golinowski, H.B. Krichnan, S. G. Pueppke and W J. Broughton. 1994. Nod Factors of *Rhizobium* are a key to the legume door. *Mol. Microbiol.* 13:171-178.
- Rinanda, T. 2011. Analisis Sekuensing 16S rRNA di Bidang Mikrobiologi. *Jurnal Kedokteran Syah Kuala* 11(3): 172-177.
- Ruchi, W., Putri, H.D., Anhar, A., and Farma, A.S. 2018. Comparison of Three Different DNA Isolation Methods To Degradate The *Trichoderma* Fungi Cell Wall. *Bioscience.* 2(1): 50-59.

- Salisbury FB, Ross CW. 1995. *Fisiologi Tumbuhan Jilid 2* (terjemahan: Diah RL, Sumaryono). Bandung: ITB Press.
- Saraswati, R dan Sumarsono. 2008. Pemanfaatan Mikroba Penyubur Tanah Sebagai Komponen Teknologi Pertanian. *Jurnal Iptek Tanaman Pangan* Bogor. 3 (3): 43.
- S. Roy, W. Liu, R.S. Nandety, A. Crook, K.S. Mysore, C.I. Pislariu, J. Frugoli, R. Sanjuan, J. P Grob, M. Gottfert, H. Hennecke and G. Stacey. 1992. NodW is essential for full expression of the common nodulation genes of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant-Microbe interact.* 7:364-369.
- Schultz, M., B. Quietlet-Sire, E. Kondorisi, H. Virelizier, J. N. Glushka, G. Endre, S. D. Gero and A. Kondorisi. 1992. *Rhizobium meliloti* produces a family of sulfated lipo-oligosaccharids exhibiting different degrees of plant host specificity. *Proc. NF-tl. Acad. Sci. USA* 89:192-196.
- Schimel, J., Balsler, T. C., and Wallenstein, M. (2007). Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology* 88, 1386–1394. doi: 10.1890/06-0219.
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47–56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- Sessions, S. K. (2013). Genome Size. Brenner's Encyclopedia of Genetics, 301–305. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374984-0.00639-2>.
- Sharbatkhori, M., Kia EB, Harandi MF, Jalalizan N, & Mirhendi H. 2009. *Comparison of Five Simple Methods for DNA Extraction from Echinococcus granulosus Protoscoleces for PCR-Amplification of Ribosomal DNA*. 4(2):54-60.
- Singh, C. M., Kumar, M., Pratap, A., Tripathi, A., Singh, S., Mishra, A., Kumar, H., Nair, R. M., & Singh, N. P. (2022). Genome-wide analysis of late embryogenesis abundant protein gene family in vigna species and expression of VrLEA encoding genes in vigna glabrescens reveal its role in heat tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 13.
- Singh. L. 1983. *Modern Techniques of Raising Field Crops*. New Dehli: Oxford and IBH Pulishing.
- Singh, P., Kumar, V., Agrawal, S., 2014. Evaluation of phytase producing bacteria for their plant growth promoting activities. *International Journal of Microbiology* 2014.
- Sitompul, S.M. 2003. Potensi produksi dan pengembangan teknologi kedelai dan jagung dalam sistem agroforestri. *Laporan Penelitian Hibah Bersaing*. Univ Brawijaya.

- Srivastava, S. 2017. *Primer*. In: Vonk, J., Shackelford, T. (eds) *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior*. Springer, Cham.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-47829-6_184-1
- Suhre JJ, Weidenbenner NH, Rowntree SC, Wilson EW, Naeve SL, Conley SP. 2014. Soybean Yield Partitioning Changes Revealed by Genetic Gain and Seeding Rate Interactions. *Agronomy Journal*. 106: 1631–1642.
<https://doi.org/10.2134/agronj14.0.003>
- Sumarno dan Manshuri, Ahmad Gozi. 2013. *Persyaratan Tumbuh dan Wilayah Produksi Kedelai di Indonesia*. Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian (BALITKABI). Malang.
- Supadi. 2009. *Dampak Impor Kedelai Berkelanjutan Terhadap Ketahanan Pangan*. Pusat Analisis Sosial Ekonomi dan Kebijakan Pertanian 7: 87-102.
- Suprpto. 2003. *Genetics: The Continuity of life 4th ed*. Wadsworth Publishing Company (Vol. xix+ 820 hlm). London.
- Swastika, D. K. S, M.O.A. Manikmas, B. Sayaka & K. Kariyasa. 2005. *The Status and Prospect of Feed Crops in Indonesia*. CAPSA WorkinPaper No. 81. UN-ESCAP. Bogor.
- Tan, S. C., & Yiap, B. C. 2009. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009(574398) : 1–10. <https://doi.org/10.1155/2009/574398>
- T. Wang, J. Guo, Y. Peng, X. Lyu, B. Liu, S. Sun, X. Wang, Light-induced mobile factors from shoots regulate rhizobium-triggered soybean root nodulation, *Science* 374 (6563) (2021) 65–71.
- Tian, L., Zhou, X., Ma, L., Xu, S., Nasir, F., Tian, C., 2017. Root-associated Bacterial Diversities of *Oryza rufipogon* and *Oryza sativa* and Their Influencing Environmental Factors. *Arch. Microbiol.* 199, 563—571.
- Tilman D, Hill J, Lehman C., 2006. *Carbon-negative biofuels from low-input high-diversity grassland biomass*. *Science* 314, 1598-1600.
- Tocheva, E. I., Ortega, D. R., & Jensen, G. J. (2016). Sporulation, bacterial cell envelopes and the origin of life. *Nature Reviews Microbiology*, 14, 535–542.
- Tolijander JF, Lindahl BD, Paul LR, Elfstrand M, Finlay RD: Influence of arbuscular mycorrhizal mycelial exudates on soil bacterial growth and community structure. *FEMS Microbiol Ecol* 2007, 61:295-304.
- Treseder K. K., Balser T. C., Bradford M. A., Brodie E. L., Dubinsky E. A., Eviner V. T., et al. 2011. Integrating microbial ecology into ecosystem models: challenges and priorities. *Biogeochemistry* 109 7–18.
 10.1007/s10533-011-9636-5.

- Van Doren, D.M. and D.C. Reicosky. 1987. Tillage and irrigation. p. 391-428. *In*: J.R. Wilcox (Ed.) Soybeans: improvement, production and uses. Second edition, ASA Pub. Agronomy Series, No. 16. Madison, Wisconsin, USA.
- Verdcourt, B. 1966. *A proposal concerning Glycine L.* Taxon 15 : 34-36.
- Vijn, L., L. das Neves, fL Van Kemmen, H. Fransen, and T. Bisseling. 1993. Nod factors and nodulation in plants. *Sci.* 260:1764-1765.
- Vives-Peris, V., de Ollas, C., Gómez-Cadenas, A., & Pérez-Clemente, R. M. 2019. Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond. *Plant Cell Reports*, 39(1) : 3–17. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02447-5>
- Vidyalaya, J. N. K. V. 2013. Studies On Genetic Parameters, Correlation And Path Coefficient Analysis Of Yield And Its Components In Garden Pea (*Pisum sativum*. L). *Thesis*. Universitas Of Jabalpur. India.
- Widawati. 2014. The Effect of Salinity to Activity and Effectivity Phosphate Solubilizing Bacteria on Growth and Production of Paddy. *Proceeding International Conference on Biological Science*, Faculty of Biology, Universitas Gajah Mada. Yogyakarta. Journal KnE Life Sciences. 2: 609-612.
- Wijayati, R.Y, S. Purwanti, & M.M Adie. 2014. Hubungan Hasil dan Komponen Hasil Kedelai (*Glycine max* (L.) Mer.) Populasi F5. *Vegetalika*. 3(4) : 88-97.
- Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. 2019. *Prescott's Microbiology*. McGraw-Hill Education.
- Wu L, Zhang W, Ding Y, Zhang J, Cambula ED, Weng F, Liu Z, Ding C, Tang S, Chen L, Wang S, Li G. 2017. Shading Contributes to The Reduction of Stem Mechanical Strength by Decreasing Cell Wall Synthesis in Japonica Rice (*Oryza sativa* L.). *Frontiers in Plant Science*. 8:881. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00881>.
- Xie F T, Zhang H J, Wang H Y, Ao X, St. Martin S K. 2010. Effect of preplant fertilizer on agronomic and physiological traits of soybean cultivars from different breeding programs. *Agricultural Sciences in China*, **9**, 1602-1611.
- Yang, Y., Wang, N., Guo, X., Zhang, Y., dan Ye, B. 2017. Comparative Analysis of Bacterial Community Structure in The Rhizosphere of Maize By Highthroughput Pyrosequencing. *PLoS ONE*. 12(5), 1—11.
- Yuste, J. C., Fernandez-Gonzalez, A. J., Fernandez-Lopez, M., Ogaya, R., Penuelas, J., Sardans, J., et al. (2014). Strong functional stability of soil microbial communities under semiarid Mediterranean conditions and subjected to long-term shifts in baseline precipitation. *Soil Biol. Biochem.* 69, 223–233. doi: 10.1016/j.soilbio.2013.10.045.

- Yuan, Y., Brunel, C., van Kleunen, M., Li, J., Jin, Z., 2019. Salinity-induced changes in the rhizosphere microbiome improve salt tolerance of *Hibiscus hamabo*. *Plant Soil* 443, 525–537. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04258-9>.
- Yurgel, S. N., Nearing, J. T., Douglas, G. M., dan Langille, M. G. I. 2019. Metagenomic Functional Shifts to Plant Induced Environmental Changes. *Frontiers in Microbiology*. 10: 1—12.
- Zhuang, X., J. Gao, M. Ma, S. Fu, dan G. Zhuang. 2013. Review Bioactive Molecules in Soil Ecosystems: Masters of the Underground. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 8841–8868; www.mdpi.com/journal/ijms.doi:10.3390/ijms14058841
- Zuhriana, K, Y. 2010. Polymerase Chain Reaction (PCR). *Saintek*. 5(6).