

Peningkatan Populasi, Pertumbuhan dan Serapan Nitrogen Tanaman Kedelai dengan Pemberian *Azotobacter* Penghasil Eksopolisakarida

Growth and Nitrogen Uptake of Soybean using Exopolysaccharides-Producing Azotobacter

Reginawanti Hindersah^{1*}, Neni Rostini¹, Arief Harsono², dan Nuryani¹

¹Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran,
Jl. Raya Bandung-Sumedang Km. 21, Jatinangor 45363, Indonesia

²Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi
Jl. Raya Kendalpayak Kotak Pos 66, Malang 65101, Indonesia

Diterima 11 Maret 2015/Disetujui 15 Februari 2016

ABSTRACT

Nitrogen-fixing *Azotobacter* is widely used as biofertilizer in sustainable agriculture. The bacteria produce exopolysaccharide which might have a significant role in enhancing soybean nitrogen uptake and growth. The objective of this research was to obtain growth media of Exopolysaccharide-producing *Azotobacter*; and increase shoot and root growth as well as nitrogen uptake of soybean var. Anjasmoro at early vegetative phase following inoculation of *Azotobacter chroococcum* liquid inoculant. The research consisted of two stages, 1) determination of organic-based media for production of liquid *A. chroococcum* inoculant, and 2) pot experiment for application of liquid inoculant on soybean. The first experiment was performed in a series of batch fermenter consisted of several organic media for 72 hours. The second experiment was set in completely randomized design consisted of three density of liquid inoculant. The results verified that the best media which induced exopolysaccharide production of *A. chroococcum* was 1% molase enriched with 0.1% NH_4Cl . Liquid inoculant clearly enhanced population of *Azotobacter* in soybean rhizosphere, plant height, roots dry weight and N uptake of 21 day old soybean. This research implied that *A. chroococcum* might be used as biofertilizer at early growth of soybean.

Keywords: *Azotobacter chroococcum*, biofertilizer, liquid inoculant

ABSTRAK

Bakteri pemfiksasi nitrogen *Azotobacter* telah dimanfaatkan sebagai pupuk hayati pada pertanian berkelanjutan. Bakteri ini menghasilkan eksopolisakarida yang dapat berperan untuk meningkatkan serapan nitrogen dan selanjutnya pertumbuhan tanaman kedelai. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh media pertumbuhan untuk *Azotobacter* penghasil eksopolisakarida, serta meningkatkan pertumbuhan tajuk dan akar serta serapan nitrogen kedelai varietas Anjasmoro pada fase vegetatif awal setelah aplikasi inokulan cair *A. chroococcum*. Penelitian ini terdiri atas dua tahap yaitu 1. penentuan media produksi inokulan cair *A. chroococcum*, dan 2. percobaan pot untuk aplikasi beberapa kepadatan inokulan cair pada tanaman kedelai. Percobaan pertama dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada beberapa media organik di dalam fermenter selama 72 jam. Percobaan kedua dirancang dalam rancangan acak lengkap yang menguji tiga kepadatan inokulan cair bakteri. Hasil penelitian menunjukkan bahwa media terbaik untuk produksi eksopolisakarida *A. chroococcum* adalah 1% molase yang diperkaya dengan 0.1% NH_4Cl . Aplikasi inokulan cair *A. chroococcum* nyata meningkatkan populasi *Azotobacter* di rizosfer kedelai, tinggi tanaman, berat kering akar serta serapan N kedelai umur 21 hari. Penelitian ini memberi indikasi bahwa *A. chroococcum* berpotensi digunakan sebagai pupuk hayati pada pertumbuhan awal tanaman kedelai.

Kata kunci: *Azotobacter chroococcum*, inokulan cair, pupuk hayati

PENDAHULUAN

Rizobakteri *Azotobacter* intensif digunakan dalam pertanian karena memfiksasi dinitrogen (N_2) dan

menghasilkan fitohormon (Aly *et al.*, 2012; Gauri *et al.*, 2012; Razie *et al.*, 2013). Kapasitas *Azotobacter* sebagai *plant growth promoting rhizobacteria* melalui mekanisme produksi eksopolisakarida (EPS) belum banyak dimanfaatkan. Keberadaan EPS *Azotobacter* bersifat multifungsi untuk meningkatkan pertumbuhan tanaman (Gauri *et al.*, 2012), serapan logam berat (Hindersah dan Sudirja, 2012) bahkan

* Penulis untuk korespondensi. e-mail: reginawanti@unpad.ac.id

untuk pengolahan air (Auhim dan Odaa, 2013). Secara alami, EPS *Azotobacter* dibentuk untuk melindungi nitrogenase, toleransi terhadap kekeringan, induksi pembentukan sista, dan resistensi terhadap antimikroba (Gauri *et al.*, 2012). Eksopolisakarida *Azotobacter* juga merupakan komponen dari biosurfaktan yang berperan dalam bioremediasi (Helmy *et al.*, 2008).

Naseem dan Bano (2014) menjelaskan pula bahwa EPS PGPR *Proteus penneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Alcaligenes faecalis* berperan memperbaiki pertumbuhan tanaman jagung melalui perbaikan kandungan air tanah. Pemanfaatan EPS *Azotobacter* pada kedelai (*Glycine max* L.) akan memberikan keuntungan terhadap imobilisasi *Rhizobium* di rizosfer yang menginduksi pembentukan nodula serta selanjutnya jumlah nodula seperti pada *faba bean* (Dashadi *et al.*, 2011) dan kedelai (Nandi *et al.*, 2013).

Aplikasi *Azotobacter* penghasil EPS, menimbulkan beberapa masalah baik pada level produksi EPS maupun aplikasinya. Produksi EPS di media kimia (Hindersah dan Sudirja, 2012) terlalu mahal sehingga diperlukan media perbanyak alami yang efektif tetapi berbiaya rendah. Beberapa media yang cukup layak digunakan adalah pupuk organik cair serta molase yang mengandung nitrogen karena produksi EPS *Azotobacter* memerlukan nitrogen (Gauri *et al.*, 2012).

Efek inokulasi *Azotobacter* penghasil EPS untuk meningkatkan pertumbuhan kedelai juga belum dipastikan. Oleh karena itu penelitian dilakukan dengan tujuan untuk memperoleh media berbasis bahan organik untuk menginduksi produksi EPS *A. chroococcum*; juga meningkatkan pertumbuhan tajuk dan akar serta serapan nitrogen kedelai varietas Anjasmoro pada fase vegetatif awal setelah aplikasi inokulan cair *A. chroococcum* penghasil EPS.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini terdiri atas dua tahap yaitu 1) Penentuan media produksi EPS rizobakteri *A. chroococcum* dan 2) Percobaan pot untuk mengevaluasi efek inokulasi inokulan cair *A. chroococcum* terhadap pertumbuhan vegetatif kedelai. Kedua percobaan dilakukan di Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran Jatinangor dari Maret sampai Juni 2014.

Bahan Biologis

Azotobacter chroococcum disediakan oleh Laboratorium Biologi dan Bioteknologi Tanah. Produksi EPS isolat tersebut adalah 7-9 g L⁻¹ pada media kimia suhu kamar, dan menghasilkan fitohormon kinetin 19.7 mg L⁻¹, benziladenin-9-glukosida 4 mg mL⁻¹, GA5 38 mg L⁻¹ dan GA7 28 mg L⁻¹ pada media kimia bebas N suhu kamar. *Bradyrhizobium* diisolasi dari rizosfer kedelai var. Anjasmoro yang benihnya berasal dari Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi (Balitkabi) Malang.

Media Produksi Inokulan

Sebagai perlakuan kontrol, produksi EPS *Azotobacter* dilakukan pada media kimia menurut Hindersah dan Sudirja (2012) yang mengandung sukrosa 10 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 1 g, NaCl 0.5g, CaCO₃ 0.1 g, NaNO₃ 0.1 g, FeSO₄ 0.1 g, Na₂MoO₄ 10 mg, pada pH 7. Media produksi EPS lainnya adalah pupuk organik cair komersial dengan N total rendah 0.1% mengandung unsur hara makro dan mikro sesuai standard SNI; dan Molase (N total 0.27%, C-organik 27.89%, P₂O₅ 0.18%, K₂O 2.61%) diperoleh dari PT PG Jatitujuh.

Media Tanam

Kedelai ditanam di tanah Inceptisol Jatinangor dengan kesuburan kimia rendah; tekstur liat berdebu, pH 5.83; C-organik 1.63%, N total 0.16%; P tersedia 24.17 mg 100g⁻¹, K tersedia 15.31 mg 100g⁻¹, KTK 19.80 me 100g⁻¹. Kompos kotoran sapi dengan C/N 23 dan pH netral diproduksi oleh Fakultas Peternakan Unpad ditambahkan untuk meningkatkan kadar C-organik tanah.

Penelitian Tahap Pertama: Penentuan media produksi untuk optimasi produksi EPS *Azotobacter*

Percobaan laboratorium tanpa rancangan berbagai media pertumbuhan bakteri dengan media Vermani sebagai kontrol. Media yang diuji adalah pupuk organik cair (POC) dengan konsentrasi 5% dan 10%; molase dengan konsentrasi 2% dan 5%; molase 0.5% + NH₄Cl (0.1% b/v) dan molase 1% + NH₄Cl (0.1 % b/v).

Sebanyak 1 L media steril di dalam fermentor ukuran 2 L diinokulasi dengan 5% *Azotobacter* dan kultur diinkubasi selama tiga hari pada suhu kamar dengan pengadukan 100 rpm. Kadar EPS dan kepadatan sel diukur pada hari ketiga secara duplo. Eksopolisakarida diukur dengan metode gravimetrik setelah ekstraksi dengan aseton dan disentrifugasi 9 000 rpm (Hindersah dan Sudirja, 2012). Kepadatan sel diukur dengan Metode Plat Pengenceran (Kizilkaya, 2009) menggunakan media kimia menurut Hindersah dan Sudirja (2012) untuk *Azotobacter* penghasil EPS. Data EPS dan kepadatan sel dibandingkan secara kuantitatif dengan metode ranking untuk menentukan media terbaik. Produksi EPS untuk percobaan selanjutnya dilakukan pada media terbaik berdasarkan penelitian ini.

Penelitian Tahap Kedua: Uji hayati pengaruh *Azotobacter* penghasil EPS terhadap pertumbuhan vegetatif tanaman kedelai

Percobaan rumah kaca dengan Rancangan Acak Lengkap terdiri atas perlakuan tanpa dan dengan inokulan cair *A. chroococcum* kepadatan 10⁶ CFU g⁻¹, 10⁷ CFU g⁻¹ dan 10⁸ CFU g⁻¹. Inokulan cair *A. chroococcum* diproduksi menggunakan media terbaik berdasarkan penelitian pertama, yaitu media molase 1% dengan ditambah NH₄Cl 0.1%.

Tanah diambil secara komposit pada kedalaman 0-20 cm, dihomogenasi dan disterilkan pada otoklaf. Inokulan *A. chroococcum* sebanyak 50 mL disemprotkan merata ke 2 kg tanah yang mengandung 20 g pupuk kandang sapi. Tanah tanpa perlakuan inokulasi disemprot dengan air destilasi steril dengan jumlah yang sama. Tanah dimasukkan ke dalam polibag tanpa lubang drainase dan diinkubasi selama tujuh hari pada kapasitas lapang. Benih kedelai var. Anjasmoro disterilisasi permukaan dengan HgCl 0.5% dan etanol 70%; dan diinokulasi dengan inokulan cair *Bradyrhizobium* sp. kepadatan 10^7 CFU mL⁻¹. Benih kedelai ditanam di dalam lubang sebanyak dua benih; tanaman dipelihara selama tiga minggu di rumah kaca dengan kelembaban tanah pada kapasitas lapang.

Tinggi tanaman diukur seminggu sekali dan pada minggu ketiga dilakukan pengukuran populasi sel *Azotobacter* di rizosfer dengan metode Plat Pengenceran, serapan N, serta berat kering akar dan tajuk, dan SR ratio tanaman setelah pengeringan 70°C. Data dianalisis dengan analisis ragam (Uji F) dan dilanjutkan dengan Uji Duncan Multiple Range Test jika terdapat signifikansi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar EPS

Molase 1% yang diperkaya NH₄Cl (0.1% b/v) menginduksi produksi EPS lebih tinggi dibandingkan dengan enam jenis media lainnya (Tabel 1). Eksopolisakarida disintesis di dalam sitoplasma bakteri dari gula glukosa (Schimid *et al.*, 2015) dan nitrogen berperan dalam pembentukan EPS (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2011). Konsentrasi gula di molase dapat mencapai 71.2% (Fusconi *et al.* 2005) namun kadar N-NO₃ hanya 0.025% (Younis *et al.*, 2010) sehingga NH₄Cl menginduksi sintesis EPS. Konsentrasi EPS di media molase + NH₄Cl jauh lebih tinggi daripada di media Vermani (Vermani *et al.*, 1997) yang telah digunakan untuk untuk menginduksi sintesis EPS (Hindersah dan Sudirja, 2012).

Penambahan N dari NH₄Cl meningkatkan kadar N larutan molase untuk mendukung produksi EPS *Azotobacter*

(Tabel 1). Pengayaan N di dalam media molase diperlukan untuk menghindari fase lag dan menginduksi produksi EPS *Azotobacter*. Pada media molase tanpa penambahan sumber N, kadar EPS meningkat 18.5-20.0 kali lipat daripada EPS di media kontrol (Tabel 1). Penambahan NH₄Cl ke dalam 1% molase dengan jelas meningkatkan kadar EPS sampai 24%. Hasil penelitian ini sejalan dengan beberapa penelitian yang menyimpulkan bahwa produksi EPS bakteri di media cair diinduksi oleh penambahan nitrogen. Ammonium sulfat adalah bahan anorganik terbaik untuk menginduksi sintesis biosurfaktan *A. chroococcum* sampai 80% (Auhim dan Mohamed, 2013). Penambahan NH₄Cl ke dalam 3% molase telah dibuktikan pula dapat menginduksi pertumbuhan bakteri pemfiksasi N₂ *Acetobacter diazotrophicus* L1 (Nita *et al.*, 2012).

Tahap pertama biosintesis EPS *Azotobacter* adalah konversi metabolit gula heksosa menjadi prekursor alginat GDP-mannuronic acid di dalam sitosol sel bakteri (Gauri *et al.*, 2012). Selanjutnya GDP-mannuronic acid dari sitosol ditransfer ke membran sitoplasma dan dipolimerisasi, selanjutnya dikeluarkan ke luar membran yang melibatkan sejumlah protein membran maupun protein periplasma. Oleh karena itu penambahan N dalam meningkatkan produksi EPS *Azotobacter*. Serupa dengan produksi EPS, media molase 1% + NH₄Cl (0.1% b/v) paling meningkatkan kepadatan sel *A. chroococcum* pada hari ketiga (Tabel 1). Peningkatan biomassa *A. chroococcum* sekitar tiga kali pada media sukrosa dengan amonium klorida dibandingkan dengan pada media sukrosa saja juga dibuktikan oleh Gutiérrez-Rojas *et al.* (2011). Populasi *Azotobacter* di akhir inkubasi mencapai 5.12×10^8 CFU/mL, lebih besar daripada batas minimal populasi bakteri pupuk hayati (10^6 CFU/mL) yang ditetapkan oleh Permentan no 70 tahun 2011 tentang pupuk organik, pupuk hayati dan pembenah tanah. Perlakuan terbaik dipilih dengan metode ranking, angka ranking terkecil yaitu 2, diperoleh pada perlakuan media 1% molase + 0.1% amonium klorida (Tabel 1). Dengan demikian inokulan cair *A. chroococcum* penghasil EPS diproduksi pada media cair tersebut untuk digunakan pada percobaan selanjutnya di tahap kedua.

Tabel 1. Eksopolisakarida *A.chroococcum* pada berbagai media produksi inokulan cair

Media	EPS (g L ⁻¹)	Populasi (x10 ⁷ CFU mL ⁻¹)	Ranking EPS	Ranking populasi	Ranking total
Vermani	0.92	9.6	7	5	12
POC 5%	1.07	9.8	6	4	10
POC 10%	1.20	19.2	5	3	8
Molase 2%	17.06	8.2	4	7	11
Molase 5%	18.41	9.4	3	6	9
Molase 0.5%+ NH ₄ Cl	20.18	30.3	2	2	4
Molase 1%+ NH ₄ Cl	22.39	51.2	1	1	2

Keterangan: EPS = eksopolisakarida; CFU = colony forming unit; POC = pupuk organik cair

Populasi *Azotobacter* di Rizosfer dan Serapan Nitrogen Tanaman

Inokulasi *A. chroococcum* penghasil EPS pada percobaan pot dengan tanah Inceptisol steril meningkatkan populasi *Azotobacter* di rizosfer kedelai sampai 10^3 CFU mL⁻¹; dan keberadaan *Azotobacter* di rizosfer tanaman kontrol kurang dari 10^3 CFU mL⁻¹ (Tabel 2). Peningkatan kepadatan sel *Azotobacter* di rizosfer memperlihatkan kemampuan *A. chroococcum* eksogen untuk mengkolonisasi rizosfer kedelai. Hasil penelitian pot menunjukkan bahwa kepadatan sel inokulan tidak menentukan kemampuan proliferasi *Azotobacter* di rizosfer kedelai. Kolonisasi rizosfer oleh *Azotobacter* eksogenus berperan penting untuk mendapatkan pengaruh yang diinginkan dari PGPR ini. Mobilisasi *Azotobacter* ke rizosfer kedelai memungkinkan bakteri untuk memperbanyak diri dan beraktivitas dengan sumber nutrisi dari eksudat akar. Kolonisasi akar oleh bakteri potensial tanah adalah titik awal penting untuk meningkatkan pertumbuhan dan selanjutnya produksi tanaman seperti yang dijelaskan oleh Fibach-Paldi *et al.* (2012) untuk bakteri pemfiksasi N₂ *Azospirillum*.

Serapan N tanaman kedelai dengan nyata meningkat dengan pemberian *A. chroococcum* penghasil EPS (Tabel 2). Peningkatan serapan N tanaman berasal dari dua sumber yaitu aktivitas fiksasi N oleh *Azotobacter* eksogen yang berhasil mengkolonisasi rizosfer dan *Bradyrhizobium* di dalam bintil akar kedelai. Peningkatan serapan N ini menjadi titik awal bukti potensi *A. chroococcum* untuk mengganti sebagian atau bahkan seluruh pupuk N anorganik. Hasil

penelitian ini mendukung penelitian Hussain *et al.* (2011), bahwa inokulasi ganda *Bradyrhizobium japonicum* dan *Azotobacter* dikombinasikan dengan sulfur (30 kg ha⁻¹) meningkatkan jumlah N yang diambil dari tanah dan pupuk menjadi 128 kg ha⁻¹.

Pertumbuhan dan Biomassa Tanaman

Inokulasi *A. chroococcum* penghasil EPS mempengaruhi pertumbuhan tanaman kedelai pada umur 21 HST (Tabel 3). Peningkatan pertumbuhan pupus dan akar (meskipun tidak nyata) mendukung penyerapan N oleh tanaman setelah inokulasi *A. chroococcum* (Tabel 2). Raynaud *et al.* (2008) menunjukkan bahwa penyerapan unsur hara tergantung dari jumlah akar, terutama jika nutrisi dan eksudat terbatas, karena sebenarnya keberadaan individu akar tidak tergantung dari asupan nutrisi.

Percobaan ini menunjukkan bahwa panjang akar tidak dipengaruhi bakteri tetapi dengan nyata penambahan berbagai kepekatan inokulan cair meningkatkan berat kering akar kedelai (Tabel 3). Perbedaan berat kering memperlihatkan peningkatan volume akar dan fotosintat yang dialokasikan ke akar serta pembentukan komponen organik akar. Rizobakteri *A. chroococcum* yang digunakan pada penelitian ini menghasilkan 0.0197 µg mL⁻¹ kinetin dan 0.004 µg mL⁻¹ benziladenin-9- glukosida; serta 0.129 µg mL⁻¹ GA₃ dan 0.318 µg mL⁻¹ GA₇. Spesies PGPR ini juga menghasilkan fitohormon asam indole asetat (Aly *et al.*, 2012) yang dapat menginduksi pertumbuhan akar. Fitohormon seperti AIA secara tidak langsung berperan

Tabel 2. Perubahan populasi *Azotobacter* di rizosfer dan serapan N tanaman kedelai dengan inokulasi *A. chroococcum* penghasil EPS

Kepadatan inokulan <i>A. chroococcum</i> (CFU mL ⁻¹)	Populasi <i>Azotobacter</i> * (x10 ³ CFU g ⁻¹)	Serapan N (mg per tanaman)
Kontrol	0.71a	2.81a
10 ⁶	3.06b	3.66ab
10 ⁷	5.24b	3.91b
10 ⁸	7.94b	4.13b

Keterangan: *Data hasil transformasi. Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata berdasarkan DMRT pada $\alpha = 5\%$

Tabel 3. Biomasa tanaman kedelai setelah inokulasi *A. chroococcum* pada 21 hari setelah tanam

Kepadatan inokulan <i>A. chroococcum</i> (CFU mL ⁻¹)	Tinggi pupus (cm)	Panjang akar (cm)	Berat kering		T/A*
			Tajuk (g)	Akar (g)	
Kontrol	30.2a	25.36a	0.64	0.12a	6.15b
10 ⁶ CFU mL ⁻¹	35.5ab	29.88a	0.71	0.25b	2.86a
10 ⁷ CFU mL ⁻¹	36.1ab	29.98a	0.74	0.29b	3.08a
10 ⁸ CFU mL ⁻¹	38.2b	31.06a	0.77	0.29b	3.19a

Keterangan: *T/A adalah rasio berat kering tajuk dan akar. Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata berdasarkan DMRT pada $\alpha = 5\%$

pula dalam memperbaiki akuisisi fosfor oleh tanaman melalui perbaikan pertumbuhan perakaran (Marschner *et al.*, 2011).

KESIMPULAN

Media cair dengan komposisi 1% molase dan 0.1% NH₄Cl mendukung proliferasi sel dan juga produksi eksopolisakarida *Azotobacter*. Hasil pada percobaan pot adalah aplikasi inokulan *A. chroococcum* yang diproduksi pada media tersebut dapat mengkolonisasi rizosfer kedelai pada 21 hari setelah tanam. Kemampuan tersebut menyebabkan peningkatan pertumbuhan tinggi tanaman, bobot kering akar dan serapan N kedelai umur 21 hari setelah tanam dengan nyata.

UCAPAN TERIMAKASIH

Tim Peneliti berterimakasih kepada Ditlitabmas Dikti yang telah menyediakan dana Penelitian Strategis Nasional 2014 untuk pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Aly, M.M., H. El-Sayed, A. El-Sayed, S.D. Jastaniah. 2012. Synergistic effect between *Azotobacter vinelandii* and *Streptomyces* sp. isolated from saline soil on seed germination and growth of wheat plant. J. Am. Sci. 8:667-676.
- Auhim, S.H., N.H. Odaa. 2013. Optimization of flocculation conditions of exopolysaccharide bioflocculant from *Azotobacter chroococcum* and its potential for river water treatment. J. Microbiol. Biotech. Res. 3:93-99.
- Auhim, H.S., A.I. Mohamed. 2013. Effect of different environmental and nutritional factors on biosurfactant production from *Azotobacter chroococcum*. Internat. J. Adv. Pharmacy Biol. Chem. 2:477-481.
- Dashadi, M., H. Khosravi, A. Moezzi, H. Nadian, M. Heidari, R. Radjabi. 2011. Co-Inoculation of *Rhizobium* and *Azotobacter* on growth indices of faba bean under water stress in the green house condition. Adv. Studies Biol. 3:373-385.
- Fibach-Paldi, S., S. Burdman, Y. Okon. 2012. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol. Lett. 326: 99-108.
- Fusconi, R., M.J.L. Godinho, N.R.S. Bossolan. 2005. Characterization and culture on sugarcane molasses of *Gordonia polyisoprenivorans* CCT 7137, a new strain isolated from contaminated groundwater in Brazil. World J. Microbiol. Biotech. 21:1425-1431.
- Gauri, S.S., S.M. Mandal, B.R. Pati. 2012. Impact of *Azotobacter* exopolysaccharides on sustainable agriculture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 95:331-8.
- Gutiérrez-Rojas, I., A.B. Torres-Geraldo, N. Moreno-Sarmiento. 2011. Optimizing carbon and nitrogen sources for *Azotobacter chroococcum* growth. African J. Biotech. 10:2951-2958.
- Helmy, H., P. Suryatmana, E. Kardena, N. Funamizu, Wisjnuprpto. 2008. Biosurfactants production from *Azotobacter* sp. and its application in biodegradation of petroleum hydrocarbon. J. Appl. Industrial Biotech. Trop. Reg. 1:1-5.
- Hindersah, R., R. Sudirja. 2012. Suhu dan waktu inkubasi untuk optimasi kandungan eksopolisakarida dan fitohormon inokulan cair *Azotobacter* sp. LKM6. J. Natur Indon. 13:67-71.
- Hussain, K., M. Islam, M.T. Siddique, R. Hayat, S. Mohsan, 2011. Soybean growth and nitrogen fixation as affected by sulfur fertilization and inoculation under rainfed conditions in Pakistan. Int. J. Agric. Biol. 13: 951-955.
- Kizilkaya, R. 2009. Nitrogen fixation capacity of *Azotobacter* spp. strains isolated from soils in different ecosystems and relationship between them and the microbiological properties of soils. J. Environ. Biol. 30:73-82.
- Naseem, H., A. Bano. 2014. Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their exopolysaccharide in drought tolerance of maize. J. Plant Interact. 9:689-701.
- Marschner, P., D. Crowley, Z. Rengel. 2011. Rhizosphere interaction between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis - model and research methods. Soil Biol. Biochem. 43:883-894.
- Nandi, R.G., K. Shrivastava, S. Khemuka. 2013. Synergistic effect of co-inoculating gum liquid inoculums of *Rhizobium japonicum* and *Azotobacter chroococcum* on grain yield of *Glycine max*. Biosci. Biotech. Res. Asia 10:759-765.
- Nita, P., G. Pallavi, S. Shubhangi, S. Hemlata, P. Neha, K. Balasaheb. 2012. Liquid formulations of *Acetobacter diazotrophicus* L1 and *Herbaspirillum seropedicae* J24 and their field trials on wheat. Internat. J. Environ. Sci. 3:1116-1129.
- Raynaud, X., B. Jaillard, P.W. Leadley. 2008. Plants may alter competition by modifying nutrient bioavailability in rhizosphere: A modeling approach. Amer. Naturalist. 171:44-58.

- Razie, F., I. Anas, A. Sutandi, Sugiyanta, L. Gunarto. 2013. Efisiensi serapan hara dan hasil padi pada budidaya SRI di persawahan pasang surut dengan menggunakan kompos diperkaya. *J. Agron. Indonesia* 41:89-97.
- Schmid, J., V. Sieber, B. Rehm. 2015. Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Frontier in Microbiol.* 6:496. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00496>. [13 September 2015].
- Vermani, M.V., S.M. Kelkar, M.Y. Kamat. 1997. Studies in polysaccharide production and growth of *Azotobacter vinelandii* MTCC 2459, a plant rhizosphere isolate. *Lett. Appl. Microbiol.* 24:379-383.
- Younis, M.A.M., F.F. Ezayen, M.A. Nour-Eldein, M.S.A. Shabeb. 2010. Optimization of cultivation medium and growth condition for *Bacillus subtilis* KO strain isolated from sugar cane molasses. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 7:31-37.