

## Deteksi Bakteri Endofit Dan Pengaruh *Microbacterium arborescens* Terhadap Pertumbuhan Sorgum Manis (*Sorghum bicolor*)

Riana Nindita Putri<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada

### Abstract

This research aims to detect the presence of potential endophytic bacteria, one of which is *Microbacterium arborescens* and study the effects on the growth of local variants of sweet sorghum plants from farmers in Sleman, Yogyakarta. This research began with infection of *Microbacterium arborescens* bacteria on sorghum seeds. Sorghum plants were grown in sterile media for 14 days after germination to observe seven growth parameters, including root length, number of lateral roots, stem length, number of leaves, leaf length, wet weight, and dry weight. Analysis of sweet sorghum growth parameters based on the one way ANOVA statistical test. Samples of infected and uninfected sorghum plants in the roots, stems, and leaves were amplified for the 16s rRNA gene using Bioline PCR hotstart mix. The primers used are universal primer Primer 27 f (59-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-39) and 1492 r (59- TAC GGH TAC CTT GTT ACG ACT T-39). The root length and number of lateral roots between sweet sorghum with and without *Microbacterium arborescens* infection showed significant differences. The length of the control roots was 9.24 cm, the treatment plants were 6.38 cm, the control plants had six treatment roots, and the treatment plants had ten lateral roots.

**Keywords:** sweet sorghum, *Microbacterium arborescens*, 16s rRNA gene, growth-promoting bacteria

### Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan bakteri endofit potensial, salah satunya *Microbacterium arborescens* serta mempelajari pengaruh yang ditimbulkan pada pertumbuhan tanaman sorgum manis varian lokal dari petani di Sleman, Yogyakarta. Penelitian ini diawali dengan infeksi bakteri *Microbacterium arborescens* dan ditumbuhkan pada media steril selama 14 hari setelah perkecambahan untuk diamati tujuh parameter pertumbuhan meliputi panjang akar, jumlah akar lateral, panjang batang, jumlah daun, panjang daun, berat basah, dan berat kering. Analisis parameter pertumbuhan sorgum manis berdasarkan uji statistik one way ANOVA. Sampel tanaman sorgum terinfeksi dan tidak terinfeksi pada bagian akar, batang, dan daun diamplifikasi gen 16s rRNA menggunakan Bioline PCR hotstart mix. Primer yang digunakan yaitu primer universal Primer 27 f (59-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-39) dan 1492 r (59- TAC GGH TAC CTT GTT ACG ACT T-39). Panjang akar dan jumlah akar lateral antara sorgum manis dengan dan tanpa infeksi *Microbacterium arborescens* menunjukkan beda nyata. Panjang akar kontrol sebesar 9,24 cm sedangkan tanaman perlakuan sebesar 6,38 cm, sedangkan tanaman kontrol memiliki jumlah akar perlakuan 6 buah dan tanaman perlakuan sebanyak 10 buah akar lateral.

**Kata kunci:** sorgum manis, *Microbacterium arborescens*, gen 16s rRNA, bakteri pemacu tumbuh

---

\* Corresponding Author: **Riana Nindita Putri**, Email : [riananindita93@gmail.com](mailto:riananindita93@gmail.com), Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Jl. Teknika Sel., Sendowo, Sinduadi, Kec. Mlati, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta 5528, Indonesia

## Pendahuluan

Bakteri endofit merupakan bakteri yang mengkolonisasi jaringan tanaman inang tanpa menimbulkan kerugian bagi tanaman inangnya dan dapat hidup pada bagian tanaman (Fan et al., 2012). Beberapa bakteri endofit dapat berperan sebagai plant growth-promoting bacteria (PGPB) dengan meningkatkan pertumbuhan tanaman melalui mekanisme langsung dan tidak langsung. Pemacuan langsung melalui produksi zat pengatur tumbuh dan peningkatan ketersediaan nutrisi meliputi nitrogen, fosfat, dan besi oleh bakteri endofit (Rashid et al., 2012). Secara tidak langsung, peningkatan pertumbuhan juga dapat disebabkan oleh peningkatan ketahanan tanaman terhadap patogen atau pengaruh pengendalian patogen oleh bakteri endofit melalui mekanisme kompetisi, induksi resistensi tanaman, dan produksi antibiotik, enzim degradasi, atau inisiasi pembentukan siderofor (Liu et al., 2013).

Isolasi bakteri endofit dari sorgum manis (*Sorghum bicolor*) varietas FS501 berumur 3 bulan dan telah memasuki fase generatif, yang ditumbuhkan pada tanah alfisol Mulo, Gunung Kidul telah dilakukan oleh Suryani (2016). Dari penelitian tersebut diperoleh 14 bakteri endofit yang kemudian diuji potensinya sebagai PGPB oleh de Fretes et al (2018). Hasil uji potensial diketahui terdapat beberapa bakteri pemacu tumbuh potensial, salah satunya bakteri *Microbacterium arborescens* (Ma24) yang mampu meningkatkan pertumbuhan sorgum manis melalui 3 mekanisme yaitu fiksasi nitrogen, solubilisasi fosfat, dan produksi senyawa indol-acetic-acid (IAA).

Belum ditemukan penelitian mengenai potensi PGPB bakteri *Microbacterium arborescens*. Terkait hasil penelitian de Fretes (2018) penting untuk mendeteksi

keberadaan bakteri endofit pemacu tumbuh sebagai representasi kemampuan hidup bakteri di dalam tanaman target. Pengaruh infeksi bakteri *Microbacterium arborescens* terhadap pertumbuhan sorgum manis dari varietas berbeda perlu untuk dipelajari sebagai dasar konstruksi pupuk hayati berbasis konsorsium mikrobia.

## BAHAN DAN METODE

### Infeksi *Microbacterium arborescens* pada tanaman sorgum manis

Biji sorgum diperoleh dari petani lokal di wilayah Sleman, Yogyakarta. Biji dibersihkan dengan akuades steril dan direndam dengan akuades steril baru selama 5 menit. Biji bersih direndam dengan larutan alkohol 70% selama 3 menit untuk sterilisasi kulit luar biji. Biji steril dibilas kembali menggunakan akuades steril dan direndam selama 5 menit untuk menghilangkan residu alkohol. Biji sorgum kontrol tidak dilakukan infeksi sedangkan biji dengan perlakuan diinfeksi terlebih dahulu. Infeksi diawali dengan merendam biji pada medium TSB yang berisi 108 populasi *Microbacterium arborescens* dalam medium TSB 20 ml. Perkecambah biji sorgum menggunakan media agarose 1% dalam akuades. Biji sorgum diletakan pada permukaan agarose dan dipastikan dalam keadaan steril. Biji diinkubasi selama 3-4 hari sampai muncul akar dan tunas. Kecambah sorgum selanjutnya dipindahkan pada medium zeolite steril dengan wadah petri diameter 15cm. Setiap petri ditumbuhkan 1 kecambah sorgum. Inkubasi tanaman dilakukan pada incubator suhu 30° C dengan 18 jam penyinaran terang dan 6 jam gelap. Tanaman disiram menggunakan larutan Hogland setiap 2 hari sekali. Tanaman sorgum dipanen setelah 14 hari setelah pindah tanam. Pengukuran

parameter pertumbuhan dilakukan setelah panen dengan kriteria meliputi berat basah, berat kering, panjang akar, jumlah akar lateral, panjang batang, panjang daun, dan jumlah daun.

### **Ekstraksi DNA tanaman sorgum terinfeksi**

DNA dari tanaman sorgum yang telah diinfeksi bakteri beserta kontrolnya diekstraksi menggunakan Purelink Plant Total DNA purification kit (Invitrogen, ThermoFisher) dengan modifikasi. Sampel tanaman dipisahkan bagian akar, batang, dan ujung untuk selanjutnya digerus menggunakan nitrogen cair menjadi bubuk. Bubuk sampel dimasukkan dalam tube 1,5 ml lalu ditambahkan 250 µl resuspension buffer (R2) dan dihomogenisasi selama 5 detik dengan vortex. Campuran sampel ditambahkan 15 µl 20% SDS, 15 µl RNase A (20 mg/ml) dan 30 µl lisozim (100 mg/ml). Campuran sampel diinkubasi suhu 60°C menggunakan waterbath selama 20 menit dengan membolak-balik tube setiap 3 menit. Lisat disentrifus dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit, supernatan diambil untuk dipindahkan tube 1,5 ml baru. Supernatan ditambahkan 100 µl precipitation buffer (N2) lalu dicampur sempurna dan disimpan dalam suhu -20°C selama 10 menit. Lisat disentrifus 13.000 rpm selama 5 menit lalu 250 µl supernatan dipindahkan tube baru disertai penambahan 375 µl binding buffer (B4). Seluruh campuran (625 µl) diambil dan dilewatkan pada Purelink Spin Catridge untuk proses purifikasi. Kolom purifikasi disentrifus 10.000 rpm selama 30 detik disertai pembuangan larutan sisa. Pembilasan kolom menggunakan 500 µl wash buffer (W4) dengan setrifus 10.000rpm selama 30 detik. Kolom dibilas ulang sebanyak dua kali dengan 500 µl wash buffer (B5) dan disentrifus 10.000 rpm selama 30 detik. Kolom purifikasi disentrifus dalam keadaan kosong 13.000 rpm selama 1 menit. DNA pada kolom dilarutkan dengan

penambahan 50 µl elution buffer (E1) suhu 60°C lalu disentrifus 13.000 rpm selama 2 menit. Sampel DNA disimpan dalam tube Eppendorf 1,5 ml pada suhu -20°C.

### **Pengukuran konsentrasi dan Kemurnian DNA**

Kemurnian dan konsentrasi DNA hasil isolasi ditentukan dengan metode spektroskopi dengan menggunakan spektrofotometer Uv (Hoefer) pada Panjang gelombang 260nm dan 280nm. Kerapatan optic pada Panjang gelombang 260nm setara dengan 50 ng/ml DNA (Sambrook et al., 1989). Kemurnian DNA ditunjukkan oleh perbandingan nilai antara nilai kerapatan optic pada panjang gelombang 260nm dan 280nm. Nilai perbandingan di bawah 1,8 menunjukkan adanya kontaminasi senyawa dengan berat molekul tinggi seperti protein, sedangkan nilai perbandingan di atas 2,0 menunjukkan adanya kontaminasi berupa senyawa dengan berat molekul rendah yaitu RNA (Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1995).

### **Amplifikasi gen 16s rRNA dengan PCR**

Keberhasilan analisis komunitas berbasis amplifikasi gen target sangat bergantung pada hasil PCR (Polymerase Chain Reaction). Pada penelitian ini dilakukan amplifikasi gen 16s rRNA untuk mengetahui keragaman bakteri sampel. Amplifikasi menggunakan primer universal 27 f (59-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-39) DAN 1492 r (59- TAC GGH TAC CTT GTT ACG ACT T-39) (Mao et al, 2012).

Reaksi PCR menggunakan 2x Bioline kit PCR Hostart. Total volum campuran untuk PCR sebanyak 25 µl dengan komposisi meliputi 12,5 µl Bioline kit PCR Hostart, forward primer 1 µl, reverse primer 1 µl, ddH<sub>2</sub>O 8,5 µl, dan DNA template 2 µl yang ditunjukkan Tabel 1. Reaksi PCR berlangsung dengan waktu predenaturation 4 menit

dengan suhu 94° C, denaturation 1 menit dengan suhu 92° C, annealing 40 detik pada suhu 55° C, extention 7 menit dengan suhu 68° C dan final extention 10 menit dengan suhu 68° C, dan hold pada suhu 12° C yang

ditunjukkan pada Tabel.2 dengan jumlah siklus sebanyak 35x.

**Tabel 1.** *Komposisi campuran PCR*

| <b>Bahan</b>                   | <b>Volume (µl)</b> |
|--------------------------------|--------------------|
| <i>Bioline kit PCR Hostart</i> | 12,5               |
| <i>forward primer</i>          | 1                  |
| <i>reverse primer</i>          | 1                  |
| ddH <sub>2</sub> O             | 8,5                |
| DNA template                   | 2                  |
| <b>Total</b>                   | <b>2</b>           |

**Tabel 2.** *Program reaksi amplifikasi PCR gen 16s rRNA*

| <b>Tahapan</b>         | <b>Waktu</b> | <b>Suhu (° C)</b> |
|------------------------|--------------|-------------------|
| <i>predenaturation</i> | 4 menit      | 94                |
| <i>denaturation</i>    | 1 menit      | 92                |
| <i>Annealing</i>       | 40 detik     | 55                |
| <i>Extention</i>       | 7 menit      | 68                |
| <i>final extention</i> | 10 menit     | 68                |
| <i>Hold</i>            |              | 12                |
| <b>Jumlah siklus</b>   |              | <b>35x</b>        |

### Visualisasi DNA

Tahap pertama visualisasi merupakan pembuatan gel agarose 1,5 % dengan mencampurkan 0,9 gram agarosa dalam larutan buffer TBE 1x 45 ml dan digoyang sebentar. Campuran agarosa dipanaskan dalam microwave selama 40 detik sampai larut dan ditunggu sedikit dingin. Tambahkan 3 µl cybersafe sebagai pewarna gel pada saat agar mulai hangat. Agarose hangat dituang dalam cetakan agar yang sudah dipasang sisir sumuran sebelumnya dengan hati-hati. Selanjutnya ditunggu selama 30 menit sampai menjendal sehingga sisir dapat diangkat. Gel dipindahkan ke chamber elektroforesis

sampai terendam setinggi 1-2 mm oleh buffer TBE 1x yang sudah disiapkan sebelumnya. Menurut Schluezen et al (2000) hasil amplifikasi gen 16s berukuran 1500 bp.

### Hasil Penelitian dan Pembahasan

#### Deteksi DNA *Microbacterium arborecens* pada tanaman sorgum manis

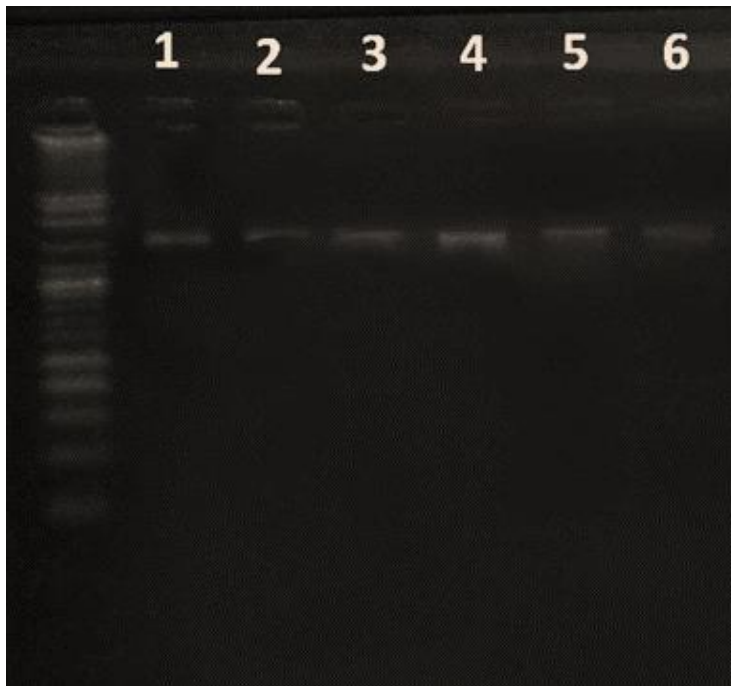
Amplifikasi 16s rRNA merupakan cara mendeteksi dan membuktikan bahwa pada genom sampel tersebut terdapat komunitas bakteri. PCR konvensional mampu mendeteksi dan mengevaluasi kemurnian dan kualitas DNA karena reaksi PCR sangat sensitif dengan adanya kontaminan (Gutierrez-Lucas et al., 2014). Amplifikasi

gen 16s rRNA mampu mendeteksi keberadaan bakteri, karena gen 16s rRNA merupakan penanda molekular yang bersifat ubikuitus dengan fungsi identik pada seluruh organisme prokaryotik (Sharma et al., 2011). Amplifikasi

menggunakan primer universal 27F dan 1492R, primer tersebut mampu mengamplifikasi hampir seluruh gen 16s rRNA dengan produk akhir berukuran 1500 bp (Osborne et al., 2006).

**Gambar 1.**

Hasil amplifikasi DNA sampel dengan primer 27F dan 1492R; sorgum manis lokal kontrol (1) akar; (2) batang; (3) pucuk; sorgum manis lokal dengan infeksi *Microbacterium arborescens*: (4) akar; (5) batang; (6) pucuk



Amplifikasi gen 16s rRNA terjadi pada sampel sorgum manis yang ditunjukkan adanya pita 1500 bp pada sumuran 1 sampai 6. Bakteri dalam jaringan sorgum diduga merupakan bakteri endofit. Hal ini sesuai dengan penelitian de Fretes et al (2018) yang telah mampu mengisolasi 48 isolat dari bagaian akar, batang dan ujung dari sorgum manis varietas FS501. Pengelompokan berdasarkan pola pita dengan analysis rep-PCR dilakukan untuk menghasilkan 14 kelompok bakteri endofit dari sorgum yang ditanam di tanah Mulo. Bakteri endofit yang hasil filogenetik analisis diantaranya

*Lysinibacillus odyssey*, *Bacillus aerius*, *Bacillus depressus*, *Lysinibacillus sinduriensis*, *Microbacterium hydrocarbonoxydans*, *Fictibacillus barbaricus*, *Beijerinckia fluminensis*, *Microbacterium kyungheense*, *Brevibacterium oceani*, *Leifsonia shinshuensis*, *Microbacterium arborescens*, *Bacillus rhizosphaerae*, *Bacillus subterraneus*, dan *Staphylococcus pasteurii* (de Fretes et al., 2018).

Govindasami et al (2017) juga melakukan skrining terhadap bakteri endofit bagian akar tiga kultivar sorgum manis yang ditanam pada 3 jenis tanah

berbeda di India. Sebanyak 280 isolat berhasil diisolasi untuk selanjutnya diidentifikasi berdasarkan analisis restriction length fragment polymorphism (RFLP) gen 16s rRNA. Hasil analisis filogenetik mengungkap *Firmicutes*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Geobacillus*, *Lysinibacillus*, *Microbacterium*, *Ochrobactrum*, *Paenibacillus* dan *Pseudomonas* merupakan genus yang mendominasi bagian akar sorgum manis.

*Microbacterium arborescens* (Mu24) merupakan bakteri endofit yang mampu meningkatkan pertumbuhan tumbuhan melalui tiga mekanisme pemacuan yaitu produksi Indol Acetic Acid (IAA) 39,75 µg/ml pada medium dengan L-triptofan, positif mampu memfiksasi nitrogen pada medium LGI, dan kemampuan solubilisasi fosfat dalam medium Pikovskaya (de Fretes et al., 2018). Govindasami et al (2017) juga mengidentifikasi kemampuan

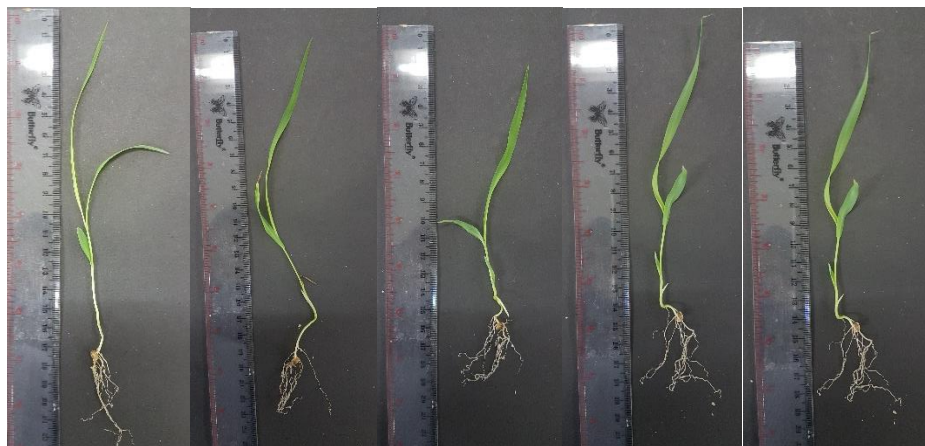
*Microbacterium arborescens* dalam memproduksi IAA dari medium tanpa prekursor L-triptofan sebesar 32,67 µg/ml sedangkan dari medium dengan penambahan precursor L-triptofan sebesar 65,14 µg/ml. *Microbacterium arborescens* (EB-153) dari akar sorgum manis varietas Maldandi 35-1 juga menunjukkan aktivitas enzim ACC deaminase  $6.81 \pm 0.32$  µmol/h a-ketobutyrate/mg protein

### **Pengaruh *Microbacterium arborescens* terhadap pertumbuhan dan fenotip sorgum manis**

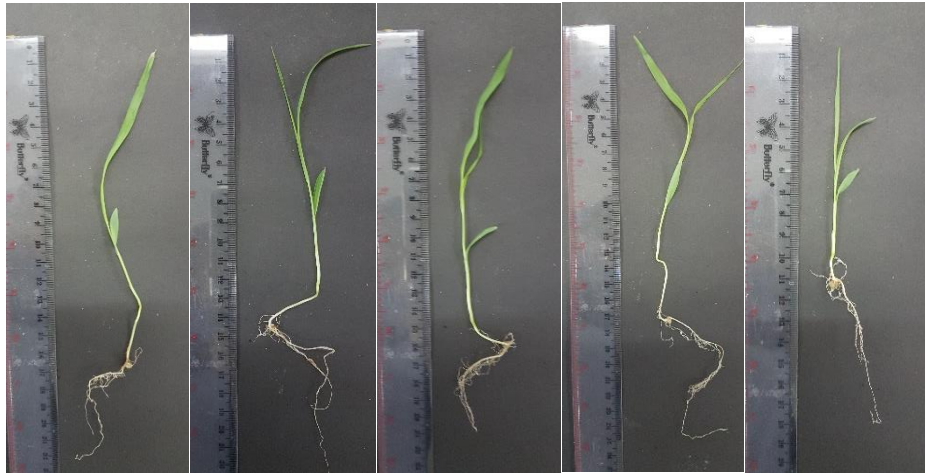
Pada penelitian ini diamati pengaruh *Microbacterium arborescens* terhadap pertumbuhan tanaman sorgum manis. Hasil menunjukkan terdapat perbedaan fenotipik sorgum dengan infeksi dan tanpa infeksi *Microbacterium arborescens* (Gambar.2) serta diamati tujuh parameter pertumbuhan yang ditunjukkan pada Tabel.3.

### **Gambar 2.**

*Perbedaan fenotipik sorgum manis (a) dengan infeksi *Microbacterium arborescens*; (b) tanpa infeksi *Microbacterium arborescens**



(a)



(b)

Perbedaan antara sorgum manis dengan infeksi dan tanpa infeksi *Microbacterium arborescens* terlihat pada jumlah akar dan panjang akar. Tanaman tanpa infeksi *Microbacterium arborescens*

memiliki morfologi akar lebih panjang dibandingkan tanaman dengan infeksi. Sebaliknya, tanaman dengan infeksi memiliki jumlah akar lateral lebih banyak dibandingkan tanaman tanpa infeksi

Tabel 3. Parameter pertumbuhan tanaman sorgum umur 14 hari setelah kecambah

| Parameter            | Rata-rata kontrol | Rata-rata perlakuan | Statistik |
|----------------------|-------------------|---------------------|-----------|
| Panjang akar (cm)    | 9,24              | 6,38                | 0,021*    |
| Jumlah akar lateral  | 6                 | 10                  | 0,006*    |
| Panjang batang (cm)  | 5,98              | 5,57                | 0,615     |
| Jumlah daun          | 3                 | 3                   | 0,067     |
| Panjang daun (cm)    | 7,05              | 8,79                | 0,127     |
| Berat basah (mg)     | 131,18            | 146,55              | 0,305     |
| Berat kering (mg)    | 30,33             | 41,67               | 0,216     |
| Prosentase berat (%) | 23,12             | 28,43               | 0,323     |

\*menunjukkan beda nyata secara statistik ( $p < 0,05$ )

Tinggi tanaman merupakan salah satu variable pertumbuhan yang menunjukkan karakter agronomi (Kartahadimaja et al., 2010) yang penting untuk diamati. Panjang tanaman Tabel.3 dibedakan menjadi panjang akar, panjang batang, dan panjang daun. Hasil pengamatan panjang akar dapat dilihat pada Tabel.3. Tabel menunjukkan

bahwa panjang batang sorgum tanpa infeksi *Microbacterium arborescens* lebih panjang dibanding tanaman kontrol dengan nilai masing-masing 5,98 cm dan 5,57 cm. Jumlah daun kedua perlakuan tidak memiliki perbedaan dengan jumlah daun masing-masing tiga helai. Parameter berat basah, berat kering, dan panjang daun ditunjukkan

lebih tinggi pada tanaman dengan infeksi dibandingkan tanaman tanpa infeksi namun tidak berbeda secara statistik. Berat basah dan berat kering tanaman sorgum perlakuan lebih tinggi dibandingkan tanaman control, hal ini menunjukkan adanya faktor yang mempengaruhi peningkatan berat dari tanaman perlakuan. Kemampuan *Microbacterium arborescens* dalam memproduksi IAA diduga sebagai faktor utama penyebab peningkatan berat basah dan berat kering tanaman perlakuan. IAA merupakan salah satu bentuk hormone auksin yang mendorong terjadinya pembelahan sel dan pemanjangan sel. Induksi IAA mempengaruhi dinding sel dengan mengaktivasi pompa proton (ion H<sup>+</sup>) yang terletak pada membrane plasma sehingga menyebabkan pH pada bagian dinding sel lebih rendah mendekati pH membrane plasma. Aktifnya pompa proton mampu memutuskan ikatan hydrogen di antara selulosa dinding sel, sehingga menyebabkan dinding sel merenggang dan tekanan dalam sel menurun sehingga air dari luar akan masuk ke dalam sel. Semakin banyak air yang masuk maka tekanan dan ukuran dalam sel semakin meningkat, hal ini menyebabkan sel berukuran lebih besar dan lebih berat dalam keadaan basah. Peningkatan massa tanaman perlakuan diduga bukan disebabkan aktivitas auksin dalam mengakumulasi air di dalam sel, namun disebabkan pengaruh auksin dalam memacu pembelahan sel. Hal ini disebabkan oleh adanya aktivitas IAA yang dihasilkan bakteri yang mampu merangsang pembentukan rambut akar serta meningkatkan jumlah dan panjang akar lateral serta akar primer ketika berada dalam rentang konsentrasi ideal (Duca et al., 2014).

## Kesimpulan dan Saran

Deteksi keberadaan bakteri pada sampel tanaman sorgum manis dilakukan untuk memastikan keberadaan bakteri endofit salah satu di antaranya *Microbacterium arborescens* pada jaringan tanaman bagian akar, batang, dan pucuk. Infeksi bakteri *Microbacterium arborescens* pada sorgum varietas lokal dari wilayah Sleman, Yogyakarta mampu memacu pertumbuhan tanaman ditandai dengan perbedaan nyata pada variable panjang akar dan jumlah akar lateral. Peningkatan nilai dari dua variable tersebut dapat menyokong kemampuan akar dalam mensuplai air dan nutrient untuk tanaman sorgum. *Microbacterium arborescens* berpotensi dikonstruksikan menjadi pupuk hayati berbasis konsorsium mikrobial.

## Ucapan Terima Kasih

Terima kasih untuk kawan-kawan BKSDA Jateng terutama di Resort Konservasi Wilayah Cilacap, Seksi Konservasi Wilayah II Pemalang.

## Daftar Pustaka

- Ausubel, F. M. R. Brent, R.E Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl. 1995. Short Protocol in Molecular Biology. 3rd edition. John Wiley & Sons Inc. California, USA
- Schluezen, F. A. Tocilij, R. Zarivach, J. Harms, M. Gluehmann, D. Janell, A. Bashan, H. Bartels, I. Agmon, F. Franceschi & A. Yonath. 2000. Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 resolution. Cell. 102(5): 615-623
- De Fretes., C. Ria, S. Yekti, A. P. Tri, N. N. Donny, W. 2018. Diversity of Endophytic Bacteria in Sweet Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) and their Potential for Promoting Plant Growth. Indian Journal of Science and Technology. 11(11)



- Duca D, Lorv J, Patten CL, Rose D, Glick BR. 2014. Indole-3-acetic acid in plant-microbe Interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 106(1):85–125 enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol*. 7:39-43.
- Fan, B., Chen, X. H., Budiharjo, A., Bleiss, W., Vater, J., and Borriss, R. 2011. Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein. *Journal of Biotechnology*, 151(4), 303–311.
- Govindasamy, V., Raina, S.K., George, P. 2017. Functional and phylogenetic diversity of cultivable rhizobacterial endophytes of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Antonie van Leeuwenhoek*. 110: 925.
- Gutierrez-Lucas, L.R., J.J. Montor-Antonio, and N.M. Cortez-Lopez. 2014. Strategies for extraction, purification and amplification of metagenomic DNA from soil growing sugarcane. *Advances in Biological Chemistry*. 4 : 81-289
- Kartahadimaja, J., R.Wentasari, dan R.N.Sesanti. 2010. Pertumbuhan dan produksi Polong Segar Edamame Varietas Rioko pada Empat jenis Pupuk. *Agrovigor Volume 3 No. 2*. ISSN 1979-5777.
- Liu, F. C., Xing, S. J., Ma, H. L., Du, Z. Y., & Ma, B. Y. 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria affect the growth and nutrient uptake of *Fraxinus americana* container seedlings. *Current Opinion in Biotechnol* 14:303–310
- Rashid, S., Charles, T. C., and Glick, B. R. 2012. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied Soil Ecology*, 61: 217–224
- Sambrook J, Russel DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition. New York: Cold-Spring Harbor Laboratory Pr.
- Suryani, R. 2016. *Isolasi dan Keanekaragaman Bakteri Endofit Sorgum Manis [(Sorghum bicolor (L.) Moench)]*. Thesis. Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Santhanam,R. Van T.L, Arne W., Jay G., Youngjoo O., Ian T.B. 2015. Native root-associated bacteria rescue a plant from a sudden-wilt disease that emerged during continuous cropping. *PNAS*: 112 (36)
- Osborne CA, Galic M, Sangwan P, Janssen PH. 2005. PCR-generated artifact from 16S rRNA gene-specific primers. *FEMS Microbiol Lett* 248:183–187
- Mao, DP., Q. Zhou, C. Y. Chen and Z. X. Quan. 2012. Coverage Evaluation Of Universal Bacterial Primers Using The Metagenomic Datasets. *BMC Microbiology*. 12:66.
- Fajardo, V., Gonzales, I, Martin, I, Rojas, M., Hernandez, P.E., Garcia, T. dkk., 2010. A review of current PCR-based methodologies for authentication of meats from game animal species. *Trends in Food Science and Technologies*. 21, 408-421
- Huang , X. F., J.M. Chaparro, K. F. Reardon, R. Zhang, Q. Shen, J. M. Vivaco. 2014. Rhizosphere interaction : root exudates, microbes, and microbial communities. *Botany* 92: 267-275
- Larsen, J., P. j, Lopez, M.N . Rincon, C. E. G. Esquivel. 2015. Biotic interactions in the rhizosphere in relation to plant and soil nutrient dynamics. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 15: 449-463

- Monteiro, R. A., Schmidt, M. A., de Baura, V. A., Balsanelli, E., Wasseem, R., and Yates, M. G. 2008. Early colonization pattern of maize (*Zea mays* L. Poales, Poaceae) roots by *Herbaspirillum seropedicae* (*Burkholderiales*, *Oxalobacteraceae*). *Genetics and Molecular Biology*, 31(4), 932–937
- Tilak KVBR, Ranganayaki N, Pal KK, De R, Saxena AK, Nautiyal CS, Mittal S, Tripathi AK, Johri BN. 2005. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Curr Sci.* 89:136-150.
- Zulkarnaen, Irmansyah T, Irsal. 2015. Respon pertumbuhan dan produksi beberapa varietas sorgum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) pada berbagai jarak tanam di lahan kelapa sawit TBM I. *J. Online Agroteknologi* 3 (1) : 328 – 339.
- Lavecchia, A. M. Curci, K. Jangid, W. B. Whitman, P. Ricciuti, S. Pascazio, C. Crecchio. 2015. Microbial 16S gene-based composition of a sorghum cropped rhizosphere soil under different fertilization managements. *Biology and fertility of Soils.* 51 : 661-672
- Janda, J. M and Abbott. 2007. 16s rRNA gene sequencing for bacterial identification in diagnostic laboratory : Pluses, perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology.* 55 : 9
- Fakruddin, Mannan KS. 2013. Methods for analyzing diversity of microbial communities in natural environments. *Ceylon J Sci.* 42(1):19-33.
- Dewi, A. R. 2016. Optimalisasi Metode Ekstraksi dan Purifikasi DNA Mikrobial dari Tanah Budidaya Sorghum Manis (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). Skripsi. Program Sarjana Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta