

## PENGARUH APLIKASI *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* P60 TERHADAP MUTU PATOLOGIS, MUTU FISILOGIS, DAN PERTUMBUHAN BIBIT PADI IR 64

Lisa Navitasari<sup>1</sup>, Loekas Soesanto<sup>2</sup>, & Ahadiyah Yugi Rahayu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>STTP Malang, Kementerian Pertanian

<sup>2</sup>Program Studi Agronomi, Program Pascasarjana, Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto

E-mail: lissa\_nav@yahoo.com

### ABSTRACT

***Effect of Pseudomonas fluorescens P60 on pathological and physiological quality and growth of rice IR 64 seedlings.***

The research objectives were (1) detection and identification of seed-borne pathogens of IR 64 rice, (2) testing *Pseudomonas fluorescens* P60 in inhibiting the *in vitro* growth of seed-borne pathogens colonies, (3) testing *P. fluorescens* P60 for pathological and physiological seed quality, and (4) testing *P. fluorescens* P60 on the growth of seedlings in the greenhouse. The results showed that some seed-borne pathogens can be found both on farmers' IR 64 rice and factory's; they were *Aspergillus flavus*, *Alternaria padwickii*, *Pseudomonas glumae*, and *P. syringae*. Application of *P. fluorescens* P60 was able to inhibit the *in vitro* growth of colonies of all seed-borne pathogens, except *P. syringae*. Related to pathological quality, the effect of *P. fluorescens* P60 on percentage of seed-borne pathogens attack did not significantly different from that of benomil but smaller than distilled water. On the physiological quality of seeds, treatment of *P. fluorescens* P60 has the same effect with benomil and distilled water, with germination rate was more than 80%. In the greenhouse study, treatment of seed immersion time in *P. fluorescens* P60 suspension showed that the effect of immersion time as long as 15 minutes and 25 minutes on seedling height, root length, and seedling dry weight did not significantly different. However, 25 minutes immersion time resulted in fresh seedling weight and root dry weight higher than that of 15 minutes immersion time.

Key words: growth of seedlings, pathological and physiological seed quality, *Pseudomonas fluorescens* P60, seedborne pathogen

### ABSTRAK

***Pengaruh aplikasi Pseudomonas fluorescens P60 terhadap mutu patologis, mutu fisiologis, dan pertumbuhan bibit padi IR 64.*** Penelitian bertujuan (1) mendeteksi dan mengidentifikasi patogen tular-benih padi IR 64, (2) menguji pengaruh *P. fluorescens* P60 dalam menghambat pertumbuhan koloni patogen tular-benih secara *in vitro*, (3) menguji pengaruh *Pseudomonas fluorescens* P60 terhadap mutu patologis dan fisiologis benih, dan (4) menguji pengaruh *P. fluorescens* P60 terhadap pertumbuhan bibit padi di rumah kaca. Hasil penelitian menunjukkan bahwa beberapa patogen tular-benih dapat ditemukan baik pada padi IR 64 dari petani maupun dari pabrik; yaitu *Aspergillus flavus*, *Alternaria padwickii*, *Pseudomonas glumae*, dan *P. syringae*. Aplikasi *P. fluorescens* P60 mampu menghambat pertumbuhan koloni semua patogen tular-benih secara *in vitro*, kecuali *P. syringae*. Pengaruh *P. fluorescens* P60 terhadap mutu patologis benih menunjukkan bahwa persentase serangan patogen tular-benih tidak berbeda nyata dengan persentase serangan patogen tular-benih pada perlakuan benomil tetapi lebih kecil dari pada akuades. Terhadap mutu fisiologis benih, perlakuan *P. fluorescens* P60 memiliki pengaruh yang sama dengan benomil dan akuades, dengan daya kecambah di atas 80%. Hasil pengujian di rumah kaca menunjukkan bahwa perlakuan lamaperendaman benih padi dalam suspensi *P. fluorescens* P60 dengan waktu perendaman 15 menit dan 25 menit memiliki pengaruh yang tidak berbeda nyata terhadap tinggi bibit, panjang akar, dan bobot kering bibit. Akan tetapi, waktu perendaman selama 25 menit menghasilkan berat basah bibit dan bobot kering bibit yang lebih tinggi dari pada waktu perendaman selama 15 menit.

Kata kunci: fisiologi pertumbuhan bibit, mutu patologis, patogen tular benih, *Pseudomonas fluorescens* P60

### PENDAHULUAN

Varietas benih padi yang masih dipakai dan disukai petani adalah IR 64 (Hadi *et al.*, 2005). Namun, ketersediaan benih unggul masih menjadi suatu kendala,

diantaranya mutu benih yang masih rendah, baik mutu patologis dan fisiologis benih. Salah satu penyebab rendahnya mutu patologis adalah patogen tular-benih, yang mengakibatkan rendahnya mutu fisiologis benih, diantaranya benih gagal berkecambah dan pertumbuhan

kecambah tidak normal (Agarwal & James, 2000; Sutopo, 1993), sehingga mengakibatkan perlunya perlakuan benih.

Perlakuan benih secara umum dilakukan secara fisik dan kimia. Perlakuan benih secara fisik antara lain merendam benih sebelum tanam, sedangkan perlakuan benih secara kimia menggunakan bahan kimia, seperti gas metil bromida, fosfin, senyawa merkuri florida, cairan merkuri organik, dan fungisida lainnya (Agarwal & James, 2000). Penggunaan bahan kimia sintesis dalam perlakuan benih mengakibatkan penurunan kegigasan benih dan memperpendek masa hidup benih, sehingga perlu alternatif lain dalam perlakuan benih, salah satunya dengan memanfaatkan agensia hayati yang bersifat antifungi dan antibakteri yaitu *Pseudomonas fluorescens* P60. *P. fluorescens* P60 merupakan agensia hayati yang diisolasi dari perakaran tanaman gandum (Soesanto *et al.*, 2011) dan banyak digunakan sebagai pengendalian hayati patogen tular-tanah (Santoso *et al.*, 2007). Namun, potensi *P. fluorescens* P60 belum pernah digunakan dalam perlakuan benih untuk menekan adanya patogen tular-benih. Tujuan penelitian ini adalah (1) mendeteksi dan mengidentifikasi patogen tular-benih Padi IR 64 dari petani dan IR 64 dari pabrik, (2) menguji *Pseudomonas fluorescens* P60 dalam menghambat pertumbuhan koloni patogen tular-benih *in vitro*, (3) menguji *Pseudomonas fluorescens* P60 terhadap mutu patologis dan fisiologis benih, (4) menguji *Pseudomonas fluorescens* P60 terhadap pertumbuhan bibit padi di rumah kaca.

## METODE PENELITIAN

**Tempat dan Waktu.** Penelitian dilaksanakan di Pusat Pengembangan dan Pemberdayaan Pendidik dan Tenaga Kependidikan (PPPPTK) Pertanian Cianjur, Universitas Jenderal Soedirman (UNSOED) Purwokerto, dan Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Cibinong, pada bulan September 2012-Maret 2013

**Deteksi dan identifikasi patogen tular-benih dan penyiapan inokulum.** Patogen tular-benih dideteksi dengan metode *blotter test*. Benih ditumbuhkan dalam cawan Petri yang dialasi kertas stensil basah. Benih diinkubasi pada suhu ruang dengan penyinaran NUV selama 12 jam terang dan 12 jam gelap secara bergantian, selanjutnya selama 24 jam pada suhu -20 °C. Pada hari ketiga, benih kembali diinkubasi pada suhu ruang di bawah penyinaran NUV 12 jam terang dan 12 jam gelap secara bergantian sampai hari ketujuh (ISTA, 2008). Pada hari kedelapan, diamati dan diidentifikasi

patogen dengan kunci identifikasi pictorial atlas (Watanabe, 1994), dihitung persentase tingkat serangan patogen dengan rumus:

$$\text{Persentase serangan} = \frac{\sum \text{benih terinfeksi}}{\sum \text{benih total}} \times 100\%$$

dan isolasi patogen dengan teknik isolasi spora tunggal (Turechek & Stevenson, 1998).

### Pengujian *P. fluorescens* P60 dalam menghambat pertumbuhan koloni patogen tular-benih *in vitro*.

Inokulum diletakkan dengan jarak 3 cm dari tepi cawan Petri dan *P. fluorescens* (kerapatan 10<sup>9</sup> upk/ml) digoreskan memanjang dengan jarak 3 cm dari tepi cawan Petri berlawanan arah dengan letak patogen, diinkubasikan dalam suhu 26-28°C selama 5 hari, dihitung persentase daya hambat (DH) (Ezra *et al.*, 2004; Astuti, 2008), sementara untuk pengujian terhadap patogen bakteri, dilakukan dengan cara menambahkan 6 ml air steril pada biakan patogen bakteri. Selanjutnya diambil suspensi bakteri tersebut sebanyak 100 µl, dituangkan dalam cawan Petri yang berisi medium NA, kemudian kertas saring steril diletakkan di tengah petri tersebut dan di tetesi *P. fluorescens* P60 sebanyak 20 µl (Agustiansyah *et al.*, 2010; Astuti, 2008), dihitung daya hambat dengan rumus berikut.

$$DH = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100\%$$

dengan:

R1= jari-jari pertumbuhan patogen ke arah tepi cawan Petri,

R2= jari-jari pertumbuhan patogen ke arah *P. fluorescens* P60.

### Pengujian *P. fluorescens* P60 terhadap mutu patologis benih.

Pengujian ini menggunakan metode *blotter test*. Pendeteksian patogen dilakukan dengan didesinfeksi dengan NaOCl 1% dan tanpa NaOCl 1%. Benih diinkubasi pada suhu ruang dengan penyinaran NUV selama 12 jam terang, selanjutnya selama 24 jam pada suhu -20 °C. Hari ketiga, benih kembali diinkubasi di bawah penyinaran NUV 12 jam terang dan 12 jam gelap secara bergantian sampai hari ketujuh (ISTA, 2008). Hari kedelapan, diamati, dan identifikasi patogen tular-benih dengan kunci identifikasi Pictorial atlas (Watanabe, 1994), dihitung persentase serangan patogen dengan rumus berikut.

$$\text{Persentase serangan} = \frac{\sum \text{benih terinfeksi}}{\sum \text{benih total}} \times 100\%$$

### Pengujian *P. fluorescens* P60 terhadap mutu fisiologis benih.

**Daya berkecambah benih (DB).** Daya berkecambah benih menggunakan metode uji kertas digulung di atas plastik (UKDDP). Daya berkecambah (DB) dihitung pada hari ke-7 sebagai hitungan I (KN I) dan hari ke-14 sebagai hitungan II (KN II) (ISTA, 2004; Wongvarodom & Naulkong, 2006), dihitung persentase daya berkecambah (DB) dengan rumus berikut.

$$DB = \frac{\sum KNI + \sum KNII}{\sum \text{Benih yang ditanam}} \times 100\%$$

**Berat kering kecambah (BKC).** Kecambah normal yang berumur 14 HST dibersihkan dari bagian biji/kotiledon yang masih menempel kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 80°C selama 24 jam, selanjutnya dimasukkan dalam desikator selama  $\pm$  30 menit dan ditimbang (ISTA, 2004), dihitung berat kering kecambah dengan rumus berikut.

$$BKC = K1 - K0$$

dengan:

K1= Berat awal kecambah sebelum di oven,

K0= Berat akhir kecambah setelah di oven.

**Laju pertumbuhan kecambah (LPK).** Laju pertumbuhan kecambah merupakan metode yang dikembangkan oleh Burris (1976 dalam Copeland & McDonald, 2001). Laju pertumbuhan kecambah dihitung dengan rumus berikut.

$$LPK = \frac{BKKN}{\sum KN} \times 100\%$$

dengan:

BKKN = bobot kering kecambah normal,

KN = jumlah kecambah tidak normal yang dikeringkan dalam oven 60°C selama 3x24 jam.

**Potensi tumbuh maksimum (PTM).** Potensi tumbuh maksimum dihitung berdasarkan persentase benih yang mampu menjadi kecambah normal maupun tidak normal pada pengamatan hari terakhir (hari ke-14) per jumlah benih yang ditanam (ISTA, 2004), dihitung persentase PTM dengan rumus berikut.

$$PTM = \frac{\sum \text{benih yang tumbuh}}{\sum \text{benih yang di tanam}} \times 100\%$$

**Kecepatan tumbuh (KCT).** Menurut Sadjad (1993), Kecepatan tumbuh diukur dengan menghitung kecambah normal dengan rumus berikut.

$$KCT = \sum_0^t \frac{N}{t}$$

dengan:

N= benih yang tumbuh,

t = waktu (24 jam)

**Indeks Ketegaran (IK).** Indeks ketegaran dihitung berdasarkan persentase kecambah normal pada hitungan pertama (7 HST) (ISTA, 2004), dihitung persentase indeks ketegaran (IK) dengan rumus berikut.

$$IK = \frac{\sum \text{KN hitungan I}}{\sum \text{benih ditanam}} \times 100\%$$

### Analisis kandungan kimia benih (Singleton & Rossi, 1965; SNI, 1992).

**Analisis kadar air dengan metode oven (SNI 01-2891-1992 butir 5.1).** Benih yang sudah dihancurkan sebanyak 1-2 g dimasukkan ke dalam botol yang sudah diketahui beratnya, dioven dengan suhu 105°C selama 3 jam, didinginkan dalam desikator, dihitung kadar air dengan rumus berikut.

$$\text{Kadar air} = \frac{W}{W_1} \times 100\%$$

dengan:

W = berat benih sebelum dikeringkan,

W1= berat benih setelah dikeringkan.

**Analisis Protein dengan metode Semimikro Kjedral (SNI 01-2891-1992 butir 7.1).** Benih sebanyak 0,51 g dimasukkan ke dalam labu Kjedral 100 ml, ditambahkan 2 g campuran selen dan 25 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, dipanaskan hingga mendidih. Sebanyak 5 ml larutan diambil dan dimasukkan ke dalam alat penyuling, ditambahkan 5 ml NaOH 30%, serta beberapa tetes indikator PP. Disulingkan selama 10 menit dengan penampung 10 ml larutan asam borat 2% yang telah dicampur indikator dan dititrasi dengan larutan HCL 0.01 N, dikerjakan juga blanko. Dihitung kadar protein (KP) dengan rumus berikut.

$$KP = \frac{(V1 - V2) \times N \times 0.014 \times fk \times fp}{W}$$

dengan:

W = berat benih,

V1 = volume HCl 0.01N yang dipergunakan penitaran contoh,

V2 = volume HCl yang digunakan penitaran blanko,

N = normalitas blanko,

fk = kadar protein,

fp = faktor pengenceran.

**Analisis lemak dengan metode hidrolisis (SNI 01-2891-1992 butir 8.2).** Benih sebanyak 1-2 g dimasukkan ke dalam gelas piala, ditambahkan 30 ml HCl 25%, 20 ml air dan batu didih, dididihkan selama 15 menit, disaring dan dicuci dengan air panas, dikeringkan dan diekstrak dengan pelarut lemak selama 2-3 jam dengan temperatur kurang 80 °C, didinginkan, ditimbang dan dihitung kadar lemak (KL) dengan rumus berikut.

$$KL = \frac{W1 - W2}{W}$$

dengan:

W = berat benih,

W2 = berat lemak sesudah ekstraksi,

W1 = berat lemak sebelum ekstraksi.

**Kadar abu (SNI 01-2891-1992 butir 6.1).** Benih yang sudah dihancurkan sebanyak 2-3 g dimasukkan ke dalam cawan yang diketahui beratnya, diarangkan, diabukan dalam tanur listrik sampai pengabuan sempurna, didinginkan, ditimbang dan dihitung kadar abu (Kab) dengan rumus berikut.

$$Kab = \frac{W1 - W2}{W}$$

dengan:

W = berat benih sebelum diabukan

W1 = Berat benih dan cawan sesudah diabukan

W2 = Berat cawan kosong.

**Analisis kadar karbohidrat (SNI 01-2891-1992).** Kadar karbohidrat dilakukan secara *by different*, yaitu dihitung sebagai selisih 100 dikurangi kadar air, abu, protein, dan lemak.

**Analisis fenol total metode Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965).** Sebanyak 0.1 ml cairan benih dilarutkan dalam metanol (konsentrasi 1 mg sampel/ml), diencerkan menjadi 1 ml dengan akuades, ditambahkan 0.5 ml reagen *Folin Ciocalteu* dan 2 ml larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7.5%, dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit pada suhu 40°C, diukur pada panjang

gelombang 760 nm, dihitung total fenol (TF) dengan rumus berikut.

$$TF = \frac{fp \times \text{nilai } X \times 3,5 \text{ ml} \times 1}{\text{berat sampel}}$$

dengan:

fp = faktor pengenceran,

X = konsentrasi fenol.

**Aplikasi *P. flourescens* P60 terhadap pertumbuhan bibit padi IR 64 di rumah kaca.** Benih diperlakukan dengan *P. flourescens* P60 ditanam dalam polibag berisi tanah 300 g yang telah dipasteurkan, dipupuk dengan anjuran spesifik lokasi Kabupaten Cianjur. Setiap polibag ditanam lima butir benih padi IR 64 dan diulang 3x, diamati tinggi bibit, panjang akar, berat bibit basah, berat bibit kering, dan berat akar kering (Agustiansyah *et al.*, 2010).

**Analisis mikroba dalam medium tanah yang digunakan.** Sebanyak 10 g tanah dimasukkan ke erlenmeyer 250 ml yang berisi 90 ml larutan NaCl 0,85%, digojok 30 menit, didiamkan 10 menit, dilanjutkan pengenceran berseri hingga 10<sup>-7</sup>, diambil 0,1 ml pada pengenceran seri 10<sup>-4</sup>-10<sup>-7</sup> untuk bakteri, 10<sup>-2</sup>-10<sup>-5</sup> untuk jamur, ditumbuhkan dalam cawan Petri medium NA untuk bakteri dan medium PDA dengan *Streptomisin* untuk jamur, *duplo*, diinkubasikan 3-4 hari untuk bakteri, dan 5-7 hari untuk jamur (Saraswati *et al.*, 2007; Kartika, 2012).

**Penghitungan kerapatan koloni akhir *P. flourescens* P60.** Sebanyak 10 g tanah sekitar perakaran dimasukkan ke erlenmeyer 250 ml yang berisi 90 ml air steril, digojok 30 menit, didiamkan 10 menit, dilanjutkan dengan pengenceran berseri, diambil 0,1 ml, ditumbuhkan dalam cawan Petri yang berisi medium King's B, diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang. Koloni yang tumbuh dihitung kerapatannya, *duplo* (Saraswati *et al.*, 2007; Kartika, 2012).

**Analisis IAA dalam *P. flourescens* P60.**

**Analisis IAA secara kualitatif.** Bakteri yang menghasilkan IAA di uji secara kualitatif dengan metode kolorimetri menggunakan reagen *Salkowski* (Gordon & Weber, 1951).

**Analisis IAA secara kuantitatif.** Analisis konsentrasi IAA dengan metode HPLC yaitu dengan mengambil 2 mL kultur cair bakteri di *sentrifuge* pada 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan di ambil di injeksikan pada HPLC. Fase gerak adalah air : asetonitril

(76 : 24 v/v). Kolom yang di gunakan adalah C-18 *reverse phase* dengan detektor UV pada panjang gelombang 280 nm, kecepatan alir 1 ml/ menit, suhu maksimum 85 °C, suhu kolom 32,6 °C, volum injeksi 20 µL dan tekanan 10, 9 MPa. Konsentrasi IAA dari sampel dihitung berdasarkan kurva standar dengan standar IAA murni (Tien *et al.*,1979; Lee, *et al.*, 2004; Patil *et al.*, 2011).

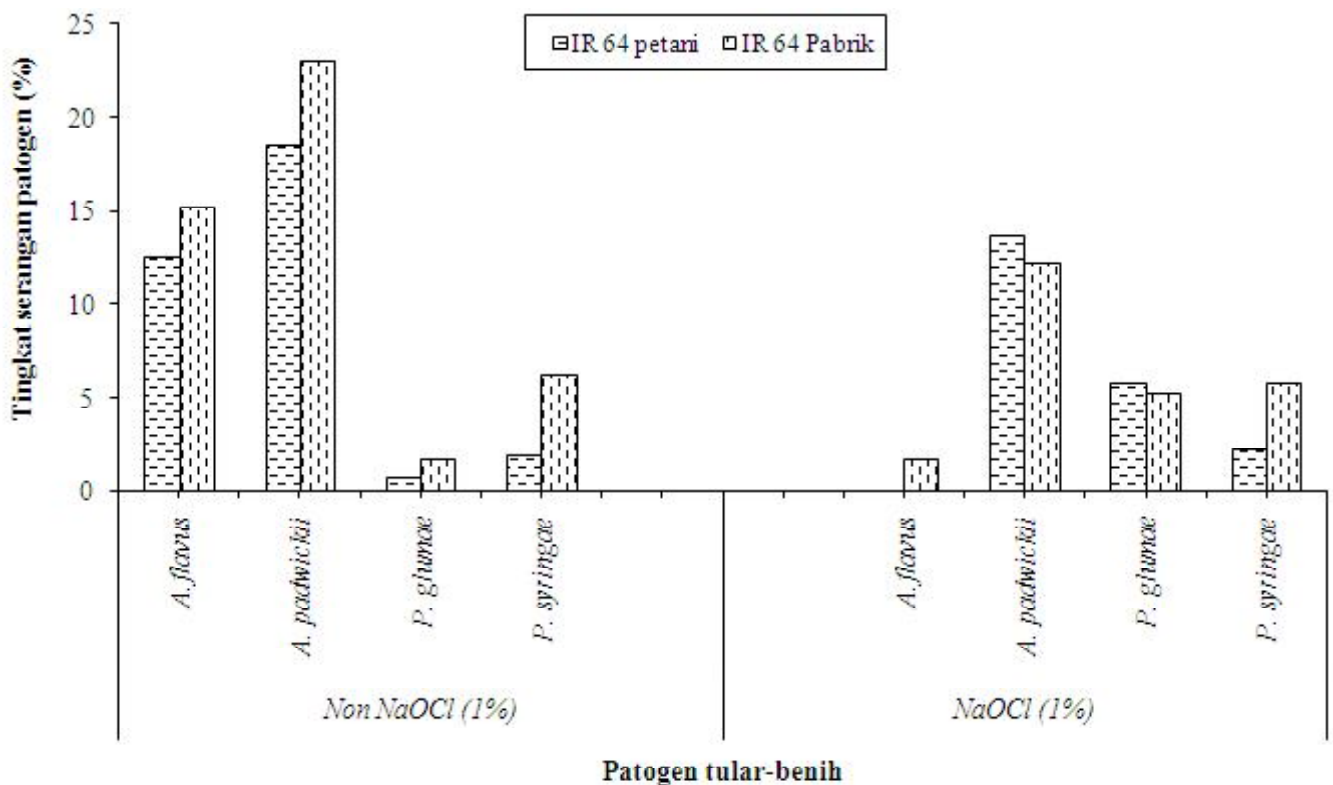
**Analisis Data.** Data yang diperoleh dianalisis sidik ragam (ANOVA) dengan menggunakan *Statistical Analisis System* (SAS 2003). Setiap perlakuan yang berpengaruh nyata dilakukan uji jarak berganda Duncan pada  $\alpha = 0,05$  (Mattjik & Sumertajaya, 2006).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Deteksi dan identifikasi patogen tular-benih padi IR 64.** Hasil deteksi dan identifikasi patogen tular-benih pada padi IR 64 adalah *Aspergillus flavus*, *Alternaria padwickii*, *Pseudomonas glumae*, dan *Pseudomonas syringae* (Gambar 1).

**Daya hambat *P. flourescens* P60 terhadap pertumbuhan koloni patogen *in vitro*.** Pengujian *P. flourescens* P60 terhadap patogen dilakukan untuk melihat keefektifan *P. flourescens* P60 dalam menghambat patogen tular-benih. Secara umum daya hambat maupun zona hambat *P. flourescens* P60 terhadap patogen tidak berbeda nyata dengan daya hambat benomil, namun berbeda nyata terhadap *P. syringae* (Tabel 1).

Tabel 1 menunjukkan bahwa perlakuan *P. flourescens* P60 dan benomil tidak berpengaruh nyata terhadap daya hambat *A. flavus*, *A. padwickii*, dan zona hambat *P. glumae*, namun berpengaruh nyata terhadap zona hambat *P. syringae*. Hal ini menunjukkan bahwa aplikasi *P. flourescens* tidak berbeda nyata dengan aplikasi benomil dalam menghambat *A. flavus*, *A. padwickii* dan *P. glumae*, namun berbeda secara nyata dalam menghambat *P. syringae*. Kemampuan agensia hayati *P. flourescens* P60 dalam menghambat jamur dan bakteri patogen dikarenakan adanya metabolit sekunder yang dihasilkan oleh *P. flourescens* P60 yaitu antibiotika dan senyawa siderofor (Soesanto *et al.*, 2011).



Gambar 1. Persentase serangan patogen tular benih padi IR 64 dari petani dan IR 64 dari pabrik.

Tabel 1. Hasil pengujian perlakuan *Pseudomonas fluorescens* P60 dan benomil terhadap pertumbuhan koloni patogen tular-benih

Perlakuan	Daya hambat terhadap jamur tular-benih (%)		Diameter hambatan terhadap bakteri tular-benih (mm)	
	<i>A. padwickii</i>	<i>A. flavus</i>	<i>P. syringae</i>	<i>P. glumae</i>
<i>P. fluorescens</i> P60	23,92 a	32,79 a	15,67 a	14,33 a
Benomil	17,65 a	34,43 a	12,33 b	9,83 a

Angka yang diikuti huruf yang sama dalam kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji Duncan pada  $\alpha = 0,05$ .

Tabel 2. Hasil sidik ragam tingkat serangan patogen tular-benih pada berbagai perlakuan pestisida (P), sumber benih (SB), dan desinfektan (D) terhadap kesehatan benih

Peubah	P	SB	D	Interaksi P*SB	Interaksi P*D	Interaksi SB*D	Interaksi P*SB*D
Tingkat serangan							
<i>A. flavus</i>	n	n	n	tn	tn	tn	tn
<i>A. padwickii</i>	n	n	n	n	n	n	n
<i>P. glumae</i>	n	n	tn	tn	tn	tn	tn
<i>P. syringae</i>	n	n	n	tn	tn	tn	tn

tn = tidak nyata, n= nyata, P = *P. flourecens* P60 dan Benomil, SB = IR 64 dari Petani dan Sertifikat, dan D = NaOCl dan Tanpa NaOCl 1%.

**Pengaruh *Pseudomonas fluorescens* P60 terhadap mutu patologis benih.** Pengujian *P. fluorescens* P60 terhadap mutu patologis benih perlu dilakukan karena berkaitan dengan ada tidaknya patogen tular-benih, yang ditunjukkan dengan persentase tingkat serangan patogen. Hasil pengujian *P. fluorescens* P60 terhadap mutu patologis ditunjukkan Tabel 2.

Tabel 2 menunjukkan pengaruh nyata pada tingkat serangan patogen *A. flavus*, *A. padwickii*, dan *P. syringae* pada perlakuan benomil, sumber benih dan desinfektan, namun tingkat serangan patogen *P. glumae* pada perlakuan desinfektan menunjukkan pengaruh tidak nyata. Hal ini dikarenakan, *P. glumae* merupakan patogen yang berada di dalam jaringan benih. *P. glumae* umumnya terdapat dalam jaringan dalam benih (biji padi) (Cottyn, 2002), sehingga ketika dilakukan desinfektan di permukaan benih, tidak meminimumkan tingkat serangan patogen tersebut. Disinfestasi ditujukan untuk mematikan jamur, bakteri, atau serangga yang berada di permukaan benih (*surface organism*) tetapi belum menginfeksi permukaan benih (Desai *et al.*, 1997).

Pengaruh yang nyata antar perlakuan, yaitu *P. fluorescens* P60 dan benomil terhadap tingkat serangan patogen, dikarenakan *P. flourecens* P60 memiliki

antibiotik dan siderofor yang bersifat sebagai anti jamur dan anti bakteri (Soesanto *et al.*, 2011). Sementara benomil, memiliki senyawa aktif karbendazim yang bersifat toksik dan fungisida berspektrum luas (Syahbirin *et al.*, 2001). Sumber benih memberikan pengaruh yang nyata dikarenakan perbedaan perlakuan pada benih, yang benih IR 64 dari pabrik telah mengalami proses penyimpanan yang cukup lama dibandingkan dengan benih IR 64 dari petani tanpa proses penyimpanan sehingga lebih rentan diserang oleh patogen tular-benih.

Kombinasi perlakuan *P. flourecens* P60 dan benomil, sumber benih, dan desinfektan juga menunjukkan pengaruh nyata terhadap tingkat serangan *A. padwickii*. Hal ini dikarenakan *A. padwickii* merupakan patogen utama pada benih padi, yang dapat berada di dalam jaringan maupun permukaan benih sehingga ketika diperlakukan dengan *P. flourecens* P60 dan benomil sebagai anti jamur memberikan pengaruh yang nyata terhadap tingkat serangan tersebut. *A. padwickii* merupakan jamur lapangan, secara umum selain bersifat nekrotrof terbawa sebagai kontaminan, juga berada dalam jaringan perikarp benih (Maude, 1996; Sumrahardi, 2000). Perlakuan *P. flourecens* P60 memiliki tingkat serangan patogen yang lebih kecil dan

berbeda nyata dengan perlakuan akuades (Tabel 3). Hal ini menunjukkan *P. flourescens* P60 mampu menekan adanya patogen tular-benih.

Perlakuan *P. flourescens* P60 mampu menekan tingkat serangan patogen *A. flavus*, *A. padwickii*, *P. syringae*, dan *P. glumae*, dikarenakan karakteristik biokimia yang dimiliki *P. flourescens* P60 seperti antibiotik dan siderofor (Soesanto *et al.*, 2011). Dwivedi & Johri (2003) melaporkan, antibiotika *pyoluteorin* (Plt), *pyrrolnitrin* (Prn), *phenazine-1-carboxylic acid* (PCA) and *2,4-di-acetylphloroglucinol* (Phl) bersifat sebagai antijamur dan antibakteri.

**Pengaruh *P. flourescens* P60 terhadap mutu fisiologis benih.** Pengujian *P. flourescens* P60 terhadap mutu fisiologis ditunjukkan untuk melihat sejauh mana pengaruh *P. flourescens* P60 terhadap mutu fisiologis. Hasil pengujian *P. flourescens* P60 terhadap komponen mutu fisiologis benih ditunjukkan Tabel 4 dan Tabel 5.

Tabel 4 dan Tabel 5 menunjukkan perlakuan *P. flourescens* P60 memberikan pengaruh yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan benomil terhadap daya kecambah, potensi tumbuh maksimum, kecepatan kecambah tumbuh, dan indeks ketegaran, namun berbeda nyata terhadap berat kering kecambah dan laju pertumbuhan kecambah. Hasil perlakuan *P. flourescens* P60 dan benomil dengan hasil yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan akuades (kontrol) terhadap kegigasan dan ketegaran benih, menunjukkan bahwa perlakuan *P. flourescens* P60 memiliki pengaruh yang sama dengan perlakuan akuades dan benomil. Daya kecambah di atas 80% menunjukkan *P. flourescens* P60 tidak bersifat toksik (racun) bagi benih. Raka *et al.* (2012) melaporkan, nilai variabel kegigasan total dan kegigasan berpotensi di atas 80% merupakan nilai yang sangat informatif bagi produsen benih. Menurut ISTA (2004), benih memiliki mutu fisiologis baik jika daya berkecambah di atas 80%. Kemampuan suatu benih dalam berkecambah normal juga dipengaruhi oleh kandungan kimia benih.

Tabel 3. Tingkat serangan patogen tular-benih pada berbagai perlakuan

Perlakuan	Tingkat serangan patogen tular-benih (%)			
	<i>A. flavus</i>	<i>A. padwickii</i>	<i>P. syringae</i>	<i>P. glumae</i>
P605	0,31 b	8,69 b	0,75 bc	0,87 bc
P6015	0,25 b	6,81 b	1,31 b	0,19 c
P6025	0,19 b	9,06 b	1,37 bc	0,56 bc
P6040	0,37 b	8,75 b	0,81 bc	1,19 ab
Aqua15	7,25 a	16,37 a	4,06 a	2,37 a
Beno5	0,19 b	4,56 c	0,44 c	2,37 a
NaOCl	0,39 b	6,37 b	1,13 b	1,21 a
Tanpa NaOCl	2,46 a	11,71 a	1,79 a	1,31 a

Angka yang diikuti huruf yang sama dalam kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji Duncan pada  $\alpha = 0,05$ . P605 = *P. flourescens* P60 perendaman 5 menit, P6015 = *P. flourescens* P60 perendaman 15 menit, P6025 = *P. flourescens* P60 perendaman 25 menit, P6040 = *P. flourescens* P60 perendaman 40 menit, Aqua15 = akuades perendaman 15 menit, dan Beno5 = benomil perendaman 5 menit.

Tabel 4. Hasil sidik ragam komponen mutu fisiologis pada perlakuan pestisida

Peubah	Pestisida (P)
Daya berkecambah	tn
Berat kering kecambah	n
Laju pertumbuhan kecambah	n
Potensi tumbuh maksimum	tn
Kecepatan kecambah tumbuh	tn
Indeks ketegaran	tn

tn = tidak berbeda nyata, n = nyata; biopestisida = *P. flourescens* P60, pestisida kimia = benomil.

Tabel 5. Hasil pengujian mutu fisiologis pada berbagai perlakuan

Perlakuan	Mutu fisiologis					
	Kegigasan benih			Ketegaran benih		
	DB (%)	BKC (g)	LPK (%)	PTM (%)	KCT (%/24 jam)	IK (%)
P605	82,33 a	0,34 bc	82,17 abc	82,33 a	1,72 a	75,00 a
P6015	85,33 a	0,35 bc	81,00 bc	85,33 a	1,78 a	77,00 a
P6025	81,67 a	0,34 bc	84,00 abc	81,67 a	1,70 a	77,67 a
P6040	82,00 a	0,32 c	78,00 c	82,00 a	1,71 a	75,33 a
Aqua15	82,00 a	0,36 ab	87,83 ab	82,00 a	1,71 a	78,00 a
Beno5	85,67 a	0,38 a	88,17 a	85,67 a	1,78 a	80,00 a

Angka yang diikuti huruf yang sama dalam kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji Duncan pada  $\alpha = 0,05$ . P605 = *P. fluorescens* P60 perendaman 5 menit, P6015 = P60 perendaman 15 menit, P6025 = P60 perendaman 25 menit, P6040 = P60 perendaman 40 menit, Aqua15 = akuades perendaman 15 menit, Beno5 = benomil perendaman 5 menit, DB = daya berkecambah, BKC = berat kering kecambah, LPK = laju pertumbuhan kecambah, PTM = potensi tumbuh maksimum, KCT = kecepatan kecambah tumbuh, dan IK = indeks ketegaran.

Tabel 6. Hasil analisis kandungan kimia benih setelah perlakuan *Pseudomonas fluorescens* P60

Perlakuan	Kandungan kimia benih		
	Protein (%)	Karbohidrat total (%)	Fenol total (ppm)
Benih IR 64 dari Petani			
Akuades	6,80	83,99	0,40
P6025	5,49	87,00	0,43
P6015	6,57	85,76	0,44
Benih IR 64 dari Pabrik			
Akuades	8,35	84,84	0,22
P6025	7,31	86,27	0,18
P6015	8,71	84,74	0,20

P6025 = *P. fluorescens* P60 perendaman 25 menit dan P6015 = *P. fluorescens* P60 perendaman 15 menit. Sampel benih yang dianalisis pada kondisi kering udara.

**Analisis kandungan kimia benih setelah perlakuan *P. fluorescens* P60.** Analisis kandungan benih setelah perlakuan *P. fluorescens* P60 ditujukan untuk melihat sejauh mana pengaruh aplikasi *P. fluorescens* P60 terhadap kandungan kimia benih yang meliputi karbohidrat, protein, dan fenol total. Hasil analisis kandungan kimia benih ditunjukkan Tabel 6.

Perlakuan *P. fluorescens* P60 dengan waktu perendaman 25 menit pada benih IR 64 dari petani dan benih bersertifikat memiliki kandungan protein paling rendah dibandingkan waktu perendaman 15 menit dan akuades. Hal ini dikarenakan *P. fluorescens* P60 menghasilkan metabolit sekunder berupa enzim protease dan hidrolisis gelatin. Uji hidrolisis gelatin berkaitan dengan kemampuan menghidrolisis protein oleh enzim

protease, sehingga kandungan protein benih pada perlakuan *P. fluorescens* P60 lebih rendah dibandingkan perlakuan akuades (Tabel 6).

Kandungan karbohidrat total secara umum pada perlakuan *Pseudomonas fluorescens* P60 menunjukkan kandungan karbohidrat total lebih tinggi dibandingkan perlakuan akuades (kontrol). Hal ini menunjukkan adanya aktivitas hidrolisis pati *P. fluorescens* P60. Enzim hidrolisis pati (amilase) memecah pati menjadi komponen yang lebih sederhana seperti glukosa (Lestari *et al.*, 2001; Richana *et al.*, 1999). Sementara terhadap total fenol, menunjukkan kandungan fenol total pada benih IR 64 dari petani memiliki kandungan yang lebih tinggi dibandingkan benih IR 64 dari pabrik (Tabel 6). Hal ini diduga *P. fluorescens* P60 memberikan tambahan



fenol pada benih IR 64 dari Petani. Bangera & Thomashaw (1996) melaporkan, antibiotik 2,4 diacetylphloroglucinol merupakan molekul fenol yang diproduksi *P. fluorescens*. Kandungan karbohidrat dan total fenol pada benih setelah perlakuan *P. fluorescens* P60 tidak menghambat perkecambahan dikarenakan benih mampu berkecambah normal dengan daya kecambah di atas 80%, sehingga diperlukan pengujian *P. fluorescens* P60 terhadap pertumbuhan bibit.

**Pengujian aplikasi *P. fluorescens* P60 terhadap pertumbuhan bibit di rumah kaca.** Pengujian aplikasi *P. fluorescens* selanjutnya adalah pengujian terhadap pertumbuhan bibit di rumah kaca selama 21 HST ditunjukkan Tabel 7 dan Tabel 8.

Tabel 7 dan Tabel 8 menunjukkan perlakuan *P. fluorescens* P60, dan benomil menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata terhadap berat akar kering dan berat bibit basah, namun tidak berbeda nyata terhadap tinggi

Tabel 7. Hasil sidik ragam komponen pertumbuhan bibit pada berbagai perlakuan pestisida(P) dan sumber benih (SB) di rumah kaca selama 21 HST

Peubah	Pestisida (P)	Sumber benih (SB)	Interaksi (P*SB)
Tinggi bibit	tn	n	tn
Panjang akar	tn	tn	tn
Berat bibit kering	tn	tn	tn
Berat akar kering	n	tn	tn
Berat bibit basah	n	tn	tn

tn = tidak nyata, n = nyata, pestisida = biopestisida *P. fluorescens* P60, pestisida kimia Benomil, dan SB = IR 64 dari Petani dan IR 64 bersertifikat.

Tabel 8. Hasil pengujian terhadap pertumbuhan bibit pada berbagai perlakuan selama 21 HST di rumah kaca

Perlakuan	Komponen pertumbuhan bibit				
	TB (cm)	PA (cm)	BBB (g)	BBK (g)	BAK (g)
P6015	32,81 ab	12,36 a	3,99 a	0,72 ab	0,16 b
P6025	33,94 a	12,85 a	4,22 a	0,78 a	0,17 a
Aqua15	32,11 b	11,98 a	3,06 b	0,66 b	0,15 b
Beno5	32,49 ab	12,25 a	3,21 b	0,68 ab	0,14 b

Angka yang diikuti huruf yang sama dalam kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji Duncan pada  $\alpha = 0,05$ . P6015 = *P. fluorescens* P60 perendaman 15 menit, P6025 = *P. fluorescens* P60 perendaman 25 menit, Aqua15 = akuades perendaman 15 menit, Beno5 = benomil perendaman 5 menit, TB = tinggi bibit, PA = panjang akar, BBB = berat bibit basah, BAK = berat bibit kering, dan BAK = berat akar kering.

Tabel 9. Peningkatan pertumbuhan bibit tanaman padi

Perlakuan	Peningkatan pertumbuhan bibit (%)				
	TB (cm)	PA (cm)	BBB (g)	BBK (g)	BAK (g)
P6015	2,18	3,17	30,39	9,09	6,67
P6025	5,70	7,26	38,24	18,18	13,33
Beno5	1,18	2,25	4,90	3,03	-6,67

Angka positif (+) menunjukkan adanya peningkatan, sedangkan angka negatif (-) menunjukkan adanya penurunan jika dibandingkan dengan perlakuan akuades. P6015 = *P. fluorescens* P60 perendaman 15 menit, P6025 = *P. fluorescens* P60 perendaman 25 menit, Beno5 = benomil perendaman 5 menit, TB = tinggi bibit, PA = panjang akar, BBB = berat bibit basah, BAK = berat bibit kering, dan BAK = berat akar kering.

bibit, panjang akar, dan berat bibit kering, yang perlakuan *P. flourescens* P60 memiliki nilai yang lebih besar masing-masing sebesar 0,16 g dan 3,99 g pada waktu perendaman 15 menit dan 0,17 g dan 4,22 g pada waktu perendaman 25 menit. Hal ini disebabkan karakteristik *P. flourescens* menghasilkan hormon tumbuh IAA dan melarutkan fosfat.

Secara umum perlakuan *P. flourescens* P60 meningkatkan komponen pertumbuhan bibit tanaman padi di rumah kaca (Tabel 9). Peningkatan komponen pertumbuhan bibit diantaranya dikarenakan formula aplikasi *P. flourescens* P60 memiliki kepadatan koloni awal dan akhir yang tinggi  $10^{11}$  upk/ml (Tabel 10), *P. flourescens* P60 merupakan mikroba pelarut fosfat (Gambar 2), dan produksi IAA oleh *P. flourescens* P60 (Tabel 11), selain itu juga ditemukan mikroba lain pada medium tanah yang digunakan ketika dilakukan analisis

mikroba awal pada tanah yang digunakan sebelum aplikasi *P. flourescens* P60. Mikroba yang ditemukan tersebut bersifat menguntungkan karena tidak bersifat patogenik. Mikroba yang ditemukan yaitu *Pseudomonas* sp. dan *Trichoderma* sp. Mikroba tersebut diduga bersifat secara sinergis dengan *P. flourescens* P60.

Kerapatan koloni *Pseudomonas flourescens* P60 saat aplikasi sebesar  $1,79 \times 10^{11}$  upk/ml secara umum mengalami penurunan di kerapatan koloni akhir, namun terjadi peningkatan di kerapatan koloni akhir dengan perlakuan perendaman *P. flourescens* P60 selama 20 menit pada sumber benih IR 64 dari pabrik. Salah satu penyebab terjadinya penurunan kerapatan koloni adalah kompetisi. Elad & Chet (1987) melaporkan, mekanisme pengendalian biologi umumnya meliputi kompetisi. Sementara peningkatan kerapatan koloni dikarenakan suhu dan pH tanah yang mendukung

Tabel 10. Kerapatan koloni awal dan akhir *Pseudomonas flourescens* P60 pada bibit tanaman padi 21 HST

Perlakuan	Sumber benih	Jumlah koloni <i>P. flourescens</i> P60 (upk/ml)	
		awal	akhir
P6015	IR 64 dari petani	$1,79 \times 10^{11}$	$1,47 \times 10^{11}$
	IR 64 dari pabrik	$1,79 \times 10^{11}$	$1,48 \times 10^{11}$
P6025	IR 64 dari petani	$1,79 \times 10^{11}$	$1,59 \times 10^{11}$
	IR 64 dari pabrik	$1,79 \times 10^{11}$	$1,87 \times 10^{11}$

P6015 = *P. flourescens* P60 perendaman 15 menit, P6025 = *P. flourecens* P60 perendaman 25 menit, HST = hari setelah tanam. Tanah yang di gunakan adalah tanah di sekitar perakaran bibit padi.



Gambar 2. *Pseudomonas flourescens* P60 sebagai mikroba pelarut fosfat (MPF). Tanda panah menunjukkan zona bening pelarutan fosfat pada medium *Pikovskaya*.

Tabel 11. Hasil analisis IAA *Pseudomonas flourescens* P60 menggunakan metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

Sampel <i>Pseudomonas flourescens</i> P60	Kandungan IAA (ppm)
Original (formula asli)	2,97
Pengenceran ke-8 (Formula aplikasi)	2,48

Pengencer yang digunakan adalah larutan fisiologis NaCl 0,85%.

pertumbuhan *P. fluorescens* P60, masing-masing sebesar 26,54°C dan 6,58. Rhodesm (1959) melaporkan, *P. fluorescens* tumbuh pada suhu 12-30°C dan tidak dapat tumbuh pada kondisi pH kurang dari 4,5. Kerapatan koloni memengaruhi produksi IAA yang dihasilkan oleh *P. fluorescens* P60, semakin tinggi kerapatan koloni maka semakin besar kandungan IAA. Hal ini terlihat pada sampel pengenceran ke-8 (formula aplikasi) memiliki kandungan IAA yang lebih kecil dibandingkan sampel asli (tanpa pengenceran) (Tabel 11).

### SIMPULAN

Patogen tular-benih padi IR 64 baik dari petani maupun pabrik menunjukkan adanya *Aspergillus flavus*, *Alternaria padwickii*, *Pseudomonas glumae*, dan *Pseudomonas syringae*. *Pseudomonas fluorescens* P60 memiliki pengaruh yang sama dengan benomil dalam menghambat pertumbuhan koloni *Alternaria padwickii*, *Aspergillus flavus*, dan *P. glumae* *in vitro*. Pengujian *P. fluorescens* P60 terhadap mutu patologis benih menunjukkan persentase tingkat serangan patogen tular-benih lebih kecil dan berbeda dengan akuades, namun tidak berbeda dengan benomil. Sementara terhadap mutu fisiologis benih menunjukkan *P. fluorescens* P60 memiliki pengaruh yang sama dengan perlakuan benomil dan akuades, serta *P. fluorescens* P60 mampu mempertahankan mutu fisiologis dengan daya kecambah diatas 80%. Pengujian *Pseudomonas fluorescens* P60 waktu perendaman 15 menit dan 25 menit terhadap pertumbuhan bibit padi di rumah kaca memiliki pengaruh yang sama dengan akuades dan benomil terhadap tinggi bibit, panjang akar, dan berat bibit kering. Namun berbeda terhadap berat bibit basah dan berat akar kering pada *P. fluorescens* P60 perendaman selama 25 menit.

### DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal VK & James BS. 2000. *Principles of Seed Pathology*. Vol. II. CRC Press. Florida.
- Agustiansyah S, Ilyas, Sudarsono, & Machmud M. 2010. Pengaruh perlakuan benih secara hayati pada benih padi terinfeksi *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* terhadap mutu benih dan pertumbuhan bibit. *J. Agronomi Indones*. 38(3):185–191.
- Astuti RI. 2008. Analisis Karakter *Pseudomonas* sp. sebagai agen Pemacu Pertumbuhan Tanaman dan Biokontrol Fungi Patogen. *Tesis*. IPB. Bogor. (tidak dipublikasikan).
- Bangera MG & Thomashaw LS. 1996. Characterization of a genomic locus required for synthesis of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Plant-Microbe Interaction* 9: 83-90.
- Copeland LO & McDonald MB. 2001. *Principle of Seed Science and Technology*. 4th ed. Kluwer Academic Publisher. Massachusetts.
- Cottyn B. 2002. Bacteria associated with rice seed from Philippine farmers fields. *Tesis*. University of Ghent. Los Banos, Laguna. <http://dspace.irri.org:8080/dspace/bitstream/123456789/446/1/CDPDF2002.Cottyn,B.pdf>. Diakses tgl 5 Maret 2013.
- Desai, BB, Kotecha PM, & Salunkhe DK. 1997. *Seeds Handbook: Biology, Production, Processing, and Storage*. Marcel Dekker, New York.
- Dwivedi D & Johri BN. 2003. Antifungals from Fluorescent *Pseudomonads* : Biosynthesis and regulation. *Curr. Sci*. 85(12): 1693-1703.
- Elad Y & Chet I. 1987. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium damping-off* by bacteria. *Phytopathol*. 77: 190-195.
- Ezra D, Hess WM, & Strobel GA. 2004. New endophytic isolates of *Muscodora albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus. *Microbiology*. 150: 4023–4031. DOI 10.1099/mic.0.27334-0.
- Gordon, SA & Weber RP. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiol*. 26: 192-195.
- Hadi S, Budiarti T, & Haryadi. 2005. Studi komersialisasi benih padi sawah varietas unggul. *Buletin Agronomi*. 33(1): 12–18.
- International Seed Testing Association (ISTA). 2004. *International Rules for Seed Testing*. Zurich. International Seed testing Association.
- International Seed Testing Association (ISTA). 2008. *International Rules for Seed Testing, Annexe to Chapter 7: Seed Health Testing Methods*. Bassersdorf, Switzerland.
- Kartika A. 2012. Teknik Eksplorasi dan Pengembangan Bakteri *Pseudomonas fluorescens*. <http://www.laboratoriumphpbanyumas.com/isiwebsite/A%20GENSIA%20HAYATI/eksplorasi%20Pseudomonas%20flouresens.pdf>. Diakses tgl 24 Juni 2012.

- Lee S, Flores-Encarnaclon M, Contreras-Zentalla M, Garcia-Flores L, Escamilla JE, & Kennedy C. 2004. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrom biogenesis genes. *Journal Bacteriology*. 186 (16): 5384-5391.
- Lestari P, Darwis AA, Syams I, Richana N & Damardjati DS. 2001. Analisis gula reduksi hasil hidrolisis enzimatis pati ubi kayu oleh  $\alpha$ -Amilase Termotabil dan *Bacillus stearothermophilus* T1112. *J. Mikrobiol. Indones.* 6(1): 23-26
- Mattjik AA & Sumertajaya IM. 2006. *Perancangan Percobaan, dengan Aplikasi SAS dan Minitab*. IPB Press. Bogor.
- Maude RB. 1996. *Seedborne Diseases and Their Control, Principles and Practice. Horticulture Research International*. Cambridge. CAB International.
- Patil NB, Gajbhiye M, Ahiwale SS, Gunjal AB, & Kapadnis BP. 2011. Optimization of Indole 3-acetic acid (IAA) production by *Acetobacter diazotrophicus* L1 isolated from sugarcane. *J. Environ. Sci.* 2(1): 295-302.
- Raka, IGN, Astiningsih AAM, Nyana IDN, & Siadi IK. 2012. Pengaruh *dry heat treatment* terhadap daya simpan benih cabai rawit (*Capsicum frutescens* L.). *J. Agric. Sci. and Biotechnol.* 1(1): 1-11.
- Rhodesm E. 1959. The characterization of *Pseudomonas fluorescens* gen. *Microbiol.* 21:221-265.
- Richana NGM, Yusuf, P. Lestari, & Damardjati DS. 1999. Perilaku kultivasi isolat bakteri termofil penghasil  $\alpha$ -amilase. *J. Mikrobiol. Indon.* 4(2): 35-39.
- Sadjad. 1993. *Dari Benih kepada Benih*. Gasindo. Jakarta.
- Santoso SE, Soesanto L, & Haryanto TAD. 2007. Penekanan hayati penyakit moler pada bawang merah dengan *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii* dan *Pseudomonas fluorescens* P60. *J. HPT Tropika.* 7(1): 53-61.
- Saraswati R, Husen E, & Simanungkalit RDM. 2007. *Metode Analisis Biologi Tanah*. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Sumberdaya Lahan Pertanian. Bogor.
- Singleton VL & Rossi JA Jr. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal Enology Viticulture.* 16: 144-158.
- Standar Nasional Indonesia (SNI). 1992. Cara uji makanan dan minuman. SNI 01-2891-1992. Badan Standarisasi Nasional.
- Soesanto L, Mugiastuti E, & Rahayuniati RF. 2011. Biochemical characteristic of *Pseudomonas fluorescens* P60. *J. Biotechnol. and Biodiver.* 2: 19-26.
- Sumrahardi A. 2000. Identifikasi fungi yang berasosiasi dengan benih *Acacia crassicarpa* A. Cunn ex Benth sesat setelah panen dan setelah penyimpanan. *Skripsi*. IPB. Bogor. (tidak dipublikasikan).
- Sutopo L. 1993. *Teknologi Benih*. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Syahbirin G, Purnama H, & Prijono D. 2001. Residu pestisida pada tiga jenis buah impor. *Buletin kimia.* 1: 113-118.
- Tien TM, Gaskins MH, & Hubbel DH. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 37(5): 1016-1024.
- Turechek WW & Stevenso KL. 1998. Effects of host resistance, temperature, leaf wetness, and leaf age on infection and lesion development of pecan scab. *Phytopathol.* 88: 1294-1301.
- Watanabe T. 1994. *Pictorial Atlas of Soil And Seed Fungi, Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species*. CRC Press, Inc., Florida.
- Wongvarodom V & Naulkong S. 2006. Responses of bambara groundnut seed to accelerated aging. *Nat. Sci.* 40: 848-853.