

PENGARUH INOKULASISEJUMLAHISOLAT *AZOSPIRILLUM* TERHADAP PERTUMBUHAN DAN SERAPAN PUPUK N PADA TANAMAN JAGUNG

[The Effect of *Azospirillum* Inoculation on Growth and N Fertilizer Uptake in Maize]

S Gandanegara^{El}, S Slamet, Idawati dan M Lina
Puslitbang Teknologi Isotop dan Radiasi,
Badan Tenaga Nuklir Nasional

ABSTRACT

Two greenhouse experiments had been conducted to study the effect of inoculation of some *Azospirillum* isolates on maize growth in sand culture and sterilized soil. In the first experiment some growth parameters were used, i.e., root length and root surface area, dry weight of root, shoot, and shoot length. Inoculation enhanced plant growth, as shown by increased of all plant growth parameters. Root length and root surface area were sensitive parameter and could be used for evaluating the effect of inoculation. The best plant performance achieved by inoculation with *Azospirillum* isolates Btl No. 8 and No. 11 and with the increase of plant biomass 24 and 53% over control, respectively. In the second experiment, six selected *Azospirillum* isolates were evaluated on growth, N uptake, and N contribution in maize plants. ¹⁵N isotope dilution method was used to measure the N contribution from fertilizer. Uninoculated control plants showed low dry weight and contribution from N fertilizer, 3.09 gram and 10.84%. Inoculation increased mineral nutrition expressed in higher N plant yield and N contribution from fertilizer. N plant yield ranging from 147 to 189 mg N as compared to 134 mg N in control plants. The high contribution of N fertilizer (13.21-14.35 %) achieved by inoculation with *Azospirillum* isolates No. 6, 7, 8, and RDCB Az 1.

Kata kunci/ key words: Isolat *Azospirillum*/ *Azospirillum* isolate, tanaman jagung/corn, teknik ¹⁵N/¹⁵N technique, kontribusi N dari pupuk/N contribution from fertilizer

PENDAHULUAN

Azospirillum merupakan bakteri tanah yang digolongkan ke dalam kelompok Rhizobacteria Pemacu Pertumbuhan Tanaman (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*), yaitu kelompok bakteri tanah yang menghasilkan hormon pertumbuhan tanaman. Hormon yang diproduksi kelompok tersebut terutama IAA menyebabkan perubahan morfologi dan fisiologis sistem perakaran tanaman yang dinokulasi (Fallik *et al.* 1994), yang tergantung dari jumlah inokulum dan strain yang digunakan (Arsac *et al.* 1990). Perubahan yang terjadi antara lain peningkatan pembelahan sel pada ujung akar (Levanony *et al.* 1989), penambahan ukuran diameter serta penambahan jumlah akar lateral kecambah jagung (Hartmann *et al.* 1983).

Penelitian asosiasi *Azospirillum* dengan akar rerumputan dan tanaman lain telah lama dilakukan secara ekstensif. Sejumlah laporan menunjukkan keberhasilan inokulasi *Azospirillum* pada tanaman jagung meningkatkan pertumbuhan, mempercepat pembungaan (Cohene *et al.* 1980), dan meningkatkan efisiensi penggunaan pupuk (Fages, 1994).

Tujuan penelitian yang dilakukan adalah untuk menguji keefektifan asosiasi sejumlah isolat *Azospirillum* dengan tanaman jagung.

BAHAN DAN METODE

Asal isolat *Azospirillum*

Isolat *Azospirillum* yang digunakan adalah isolat yang telah diseleksi oleh LIPI dan P3TIR - Batan. Metode isolasi menggunakan cara yang dilakukan oleh Baldani *et al.* 1984, yaitu mengisolasi bakteri dari akar tanaman yang ditutnuhkan di pot dengan menggunakan tanah dari lokasi tertentu. Pada penelitian ini, isolasi dilakukan dari akar tanaman jagung yang ditumbuhkan dengan tanah rhizosfir tanaman jagung yang diambil dari beberapa lokasi kebun jagung di Propinsi Jawa Barat dan Lampung (Tabel 1).

Persiapan inokulan

Isolat ditutnuhkan dalam media cair MPSS (Krieg *et al.* 1984) selama 2 x 24 jam pada suhu kamar. Biakan dipusingkan pada kecepatan 10.000 rpm, dan endapan bakteri dicuci 2 kali dengan air suling steril, kemudian diencerkan kembali sehingga jumlah sel sekitar 3×10^8 cfu/ml.

Tabel 1. Asal isolat *Azospirillum* yang digunakan

No. Isolat	Asal (Lokasi)	Diuji dalam	
		Percobaan I	Percobaan II
LIPI Az 1	Akar padi, Cugenang	tidak	ya
BtJ No. 2	Cisarua, Puncak	ya	tidak
BtJ No. 6	Cihideung Lembang	tidak	ya
BtJ No. 7	Lembang	tidak	ya
BtJ. No. 8	Subang Jawa Barat	ya	ya
BtJ. No. 9	Purwakarta, Jawa Barat	ya	tidak
BtJ No. 10	KP Taman Bogo, Lampung Timur	ya	ya
BtJ No. 11	Karangrejo, Lampung Timur	ya	tidak
BtJ No. 12	Tanjungan, Lampung Selatan	ya	tidak
BtJ No. 13	Sukaresmi, Cianjur	ya	tidak
BtJ No. 14	Cibinong Jawa Barat	ya	tidak

Fercobaan I Seleksi isolat *Azospirillum*

Benih jagung varietas Bisma dikecambahkan pada cawan petri steril selama 2 x 24 jam pada suhu kamar. Empat kecambah jagung yang berumur 2 hari dan seragam (panjang akar dan tunas 1 mm) ditanam dalam gelas plastik 300 ml yang berisi sekitar 75% pasir steril yang sudah dilembabkan dengan campuran air suling dan larutan hara Fachraeus steril. Inokulasi dilakukan dengan memberikan 1 ml suspensi bakteri ke pada akar jagung. Kemudian kecambah ditumbun kembali dengan pasir steril.

Pada waktu kecambah berumur 4 hari, gelas plastik dipindahkan ke rumah kaca. Dua hari kemudian tanaman dijarangkan menjadi 2 tanaman/gelas plastik. Tanaman diberi 20 ml larutan nutrisi Fachraeus steril setiap hari yang ditambahkan pada cawan petri yang diletakkan di dasar gelas plastik. Panen dilakukan pada umur 3 minggu. Kemudian dilakukan pengukuran tinggi tanaman, panjang akar, luas permukaan akar, bobot kering akar dan tanaman bagian atas sebagai parameter pertumbuhan tanaman yang digunakan untuk dasar seleksi terhadap isolat yang dicobakan.

Luas permukaan akar diukur dengan cara titrimetri menurut Carley dan Watson (1966) yang telah dimodifikasi. Pada metode ini, akar dicuci dengan air suling dan dibebaskan dari pasir yang melekat. Akar kemudian ditiriskan dan direndam dalam larutan HCl 1.0 N selama 15 menit. Kelebihan

HCl dihilangkan dengan meniriskan akar. Akar kemudian direndam dalam 250 ml larutan air suling, dan 100 ml larutan tersebut kemudian dititrasi dengan NaOH 1.0 N dengan phenolftalein sebagai indikator. Nilai luas permukaan akar dinyatakan dengan jumlah NaOH yang digunakan untuk menetralkan HCl.

Akar dan tanaman bagian atas kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 70°C selama 2 x 24 jam dan ditimbang untuk memperoleh data bobot kering.

Percobaan II Dengan tanah

Dua kilogram tanah latosol Pasar Jumat kering udara dimasukkan ke dalam kantong plastik berwarna hitam dan disterilkan dengan sinar gamma dari ⁶⁰Co pada dosis 50 kGy. Tanah steril kemudian dimasukkan ke dalam pot plastik yang berdiameter 15 cm dan tinggi 11 cm.

Pada percobaan ini digunakan satu isolat *Azospirillum* hasil seleksi Puslit Bioteknologi-LIPI, yaitu isolat *Azospirillum* LIPI Az 1 dan lima isolat BtJ No. 6, 7, 8, 10, dan 12 (koleksi P3TIR-Batan). Benih jagung varietas Bisma diinokulasi dengan isolat *Azospirillum* dengan bahan pembawa gambut steril, sehingga tiap benih memperoleh 10⁶ cfu. Empat butir benih jagung ditanam dalam pot dan penjarangan tanaman menjadi 2 tanaman/pot dilakukan seminggu setelah tanam.

Pemberian pupuk dasar P dan K setara dengan takaran 90 P₂O₅ (SP-36) kg/ha dan 60 kg K₂O (KC1)/ha, yang didasarkan atas luas permukaan pot, dilakukan dengan cara dibenam pada jarak 5 cm dari kecambah jagung.

Untuk mengukur sumbangan N dari inokulasi *Azospirillum* digunakan teknik pengenceran isotop ¹⁵N. Pada metode tersebut pupuk N bertanda-¹⁵N dalam jumlah yang sama diberikan pada tanaman kontrol maupun tanaman yang diinokulasi (Zapata *et al.* 1990). Pada percobaan ini, pupuk N diberikan bersama-sama dengan pupuk P dan K, setara dengan taraf 30 kg N/ha (¹⁵N-ammonium sulfat 4,68 % eksis atom).

Panen dilakukan pada umur 2 bulan. Akar dan bagian atas tanaman dikeringkan dan ditimbang untuk mendapatkan bobot kering tanaman. Persentase N tanaman ditentukan dengan metode Kjeldahl, sedangkan eksis atom (e.a) % ¹⁵N sampel diukur dengan ¹⁵N analyzer YASCO Model N-151.

Nilai N yang berasal dari pupuk (%Nbdp) ditentukan sebagai berikut:

$$\% \text{ Nbdp} = \left[\frac{\text{e. a. } \% \text{ } ^{15}\text{N sampel}}{\text{e.a. } \% \text{ } ^{15}\text{N pupuk}} \right] \times 100 \% \text{ (Zapata et al. 1990)}$$

$$\text{Jumlah N berasal dari pupuk (JNbdp)} = \% \text{ Nbdp} \times \text{kandungan N-total tanaman}$$

$$\text{Efisiensi penggunaan pupuk N} = \left(\frac{\text{JNbdp}}{\text{Jumlah pupuk N yang diberikan}} \right) \times 100\%$$

HASIL

Percobaan I

Hasil percobaan I disajikan pada Tabel 2. Dari sejumlah parameter yang diukur (tinggi tanaman, panjang akar, bobot akar, dan bobot tanaman bagian atas) terlihat kecenderungan perbaikan masing-masing parameter akibat inokulasi BtJ No. 2, 6, 8, 9, 10, dan 11. Isolat BtJ No. 13 memberikan hasil yang terdekat dengan hasil yang diperoleh tanaman kontrol.

Tanaman jagung yang diinokulasi dengan isolat BtJ No. 8 dan 11 menunjukkan nilai panjang akar dan luas permukaan akar yang lebih tinggi, dibandingkan dengan tanaman yang diinokulasi dengan isolat lain. Kedua isolat tersebut juga menyebabkan pertumbuhan tanaman yang lebih baik, yang ditunjukkan oleh kenaikan bobot kering tanaman 24 - 53% (Tabel 2).

Tabel 2. Pengaruh sejumlah isolat *Azospirillum* terhadap pertumbuhan bagian tanaman jagung var. Bisma (percobaan I)

Perlakuan	Ttan, cm	Pj. Akar, cm	Bbt. Akar, g	Bbt. Bat, g	Bbt. Tan, g	Pertam. vs kontrol	Titri, ml NaOH
Kontrol	35,98 a	18,29 d	0,11 a	0,44 a	0,55 a	100	2,92
BtJ No. 2	39,06 a	22,50 be	0,13 a	0,51 a	0,64 a	116	3,14
BtJ.No. 8	42,58 a	24,62 be	0,14 a	0,70 a	0,84 a	153	3,29
BtJ.No 9	39,22 a	20,48 cd	0,12 a	0,53 a	0,65 a	118	3,08
BtJ.No. 10	40,74 a	25,02 b	0,13 a	0,54 a	0,67 a	122	3,02
BtJ. No. 11	42,28 a	28,46 a	0,13 a	0,55 a	0,68 a	124	3,57
BtJ. No. 12	41,22 a	22,66 be	0,13 a	0,52 a	0,65 a	118	3,70
BtJ. No. 13	38,84 a	21,58 c	0,13 a	0,41 a	0,54 a	99	3,69
BtJ. No. 14	40,42 a	19,82 cd	0,13 a	0,51 a	0,64 a	116	3,39
K.K, %	8	13	32	37	35		32

Keterangan: Angkadan huruf yang sama dibelakangnya menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata pada uji BNT (P<0,05)

Tabel 3. Bobot kering bagian tanaman, % N sampel, dan kandungan N (percobaan II)

Perlakuan	Bobot akar, g/pot	Bobot ta- nsunan bag. Atas, g/pot	Bobot tanaman, g/pot	Persentase N, %	Kandungan N, mg N/pot
Kontrol	3,09 abc	6,59 be	9,68 be	2,03 a	134b
LIP I Az 1	5,05 a	9,75 a	14,80 a	1,89 a	182 a
BtJ No. 6	3,89 ab	9,25 ab	13,14 ab	2,03 a	187 a
BtJ No. 7	4,05 ab	7,80 abc	11,85 abc	1,96 a	147 ab
BtJ No. 8	3,63 abc	8,69 abc	12,33 abc	2,20 a	189 a
BtJ No. 10	1,63 c	6,02 c	7,70 c	2,21a	133 b
BtJ No. 12	1,97 be	5,98 c	7,80 c	2,31a	134 b
K. K., %	43	25	29	9	20

Keterangan: Angka dengan huruf yang sama dibelakangnya menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata pada uji BNT ($P < 0,05$)

Tabel 4. Ekses atom ^{15}N , N bdp, Efisiensi peng.pupuk N (percobaan II)

Inokulasi	Kandungan N- total, mg N/pot	ekses atom ^{15}N , %	N yang berasal dari pupuk		Efisiensi peng.pupuk, %
			%	mgN	
Kontrol	134 b	0,51c	10,84 c	20,46 d	3,76 d
LIPI Az 1	182 a	1,32 b	28,10 b	78,05 a	14,35 a
BtJ No. 6	187 a	1,26 b	26,99 b	71,85 a	13,21a
BtJ No. 7	147 b	1,65 ab	35,26 ab	72,74 ab	13,51ab
BtJ No. 8	189 ab	1,42 ab	30,24 ab	75,55 a	13,89 a
BtJ No.10	133 b	1,79 a	38,25 a	62,21 be	11,44 be
BtJ No. 12	134 b	1,76 a	37,50 a	61,43 c	11,29 c
K. K., %	20	20	20	12	12

Keterangan: Angka dengan huruf yang sama dibelakangnya menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata pada uji BNT ($P < 0,05$)

Percobaan

Hasil percobaan II disajikan pada Tabel 3 dan 4. Bobot akar, bobot tanaman bagian atas, bobot keseluruhan tanaman, dan kandungan N dapat ditingkatkan secara nyata dengan inokulasi LIPI Az 1, BtJ No. 6, BtJ No. 7, dan BtJ No. 8. Isolat BtJ 10 dan BtJ. No. 12 yang dalam percobaan I menunjukkan pertumbuhan awal yang baik pada pasir steril, setelah diuji dalam percobaan II yang menggunakan tanah ternyata tidak mampu memperbaiki pertumbuhan tanaman, karena pertumbuhan tanaman mendekati pertumbuhan tanaman kontrol. Pertumbuhan tanaman bagian atas terbaik diperoleh dari imokulasi LIPI Az 1, BtJ No. 6, BtJ No. 7, dan BtJ No. 8 disusul oleh isolat BtJ. No. 7.

Data penyerapan N pupuk pada Tabel 4 memberikan informasi yang lebih rinci tentang keefektifan isolat yang diinokulasikan, meskipun data agronomis yang dibahas dari Tabel 3 menunjukkan isolat BtJ No. 7 tidak seefektif isolat LIPI Az 1, BtJ No. 6, dan BtJ No. 8. Data serapan N dari pupuk menunjukkan bahwa inokulasi BtJ No. 7 memiliki efek yang sama baiknya dengan ketiga isolat tersebut.

Isolat BtJ No. 10 dan 12 tetap tidak dapat memberikan perbaikan pertumbuhan maupun serapan N pupuk. Hasil yang diberikan tanaman yang diinokulasi kedua isolat tersebut mendekati hasil tanaman kontrol.

PEMBAHASAN

Pengaruh perangsangan terhadap tanaman yang disebabkan oleh inokulasi *Azospirillum* adalah terjadinya perubahan morfologis dan fisiologis pada akar. Perubahan morfologis akar yang dapat diukur, antara lain panjang, luas permukaan akar, dan bobot kering akar. Dari ketiga parameter tersebut, panjang akar yang paling peka dalam menguji pengaruh *Azospirillum* pada tanaman muda. Kepekaan parameter tersebut ditunjukkan juga pada percobaan serupa dalam menentukan konsentrasi *Azospirillum* optimum untuk inokulasi (Arsac *et al.* 1990). Pertumbuhan tanaman bagian atas tidak dapat dijadikan parameter dalam pengujian *Azospirillum* pada tanaman yang sangat muda karena pada tanaman umur 3 minggu, penyerapan air dan mineral yang disebabkan perubahan morfologis perakaran belum mampu meningkatkan pertumbuhan akar dan bagian atas tanaman sehingga belum mampu menunjukkan perbedaan yang nyata antar perlakuan pada parameter bobot kering akar, tanaman bagian atas, ataupun tinggi tanaman. Hal ini didukung oleh pendapat Tien *et al.* 1979 dan Arsac *et al.* 1990, yang menyatakan bahwa penambahan jumlah akar lateral dan akar rambut yang disebabkan karena inokulasi *Azospirillum* tidak menyebabkan perbedaan yang nyata pada bobot akar tanaman berumur muda.

Perkembangan sistem perakaran yang meningkat pada stadium awal pertumbuhan karena inokulasi *Azospirillum* pada serealia merupakan hal yang penting untuk pertumbuhan tanaman selanjutnya. Beberapa peneliti menduga bahwa pengaruh *Azospirillum* tersebut tampaknya berasal dari peningkatan pertumbuhan akar pada stadium awal, yang terjadi pada 2-3 minggu setelah tanam (Fages, 1994). Tanaman yang diinokulasi menjadi lebih mampu menyerap hara yang dibutuhkan, yang terlihat pada peningkatan kandungan N-total tanaman dan kontribusi N yang berasal dari pupuk yang terlihat dari Percobaan 2. Hal yang berlawanan ditunjukkan oleh perlakuan inokulasi dengan inokulasi dengan isolat BU. No. 10 dan 12. Jika pada percobaan 12 ke dua isolat tersebut memberikan efek perbaikan pada pertumbuhan pada tanaman jagung berumur muda. Pada Percobaan 2 hasil yang diberikan ini tidak lebih baik dari yang

dicapai pada tanaman kontrol. Komposisi tanah yang digunakan untuk tumbuh mungkin tidak cocok untuk ke dua isolat tersebut. Kemungkinan lain adalah pengaktifan penyerapan hara untuk pertumbuhan lebih lanjut dan hal ini tidak dapat dipenuhi ke dua isolat tersebut. Jika perangsangan terhadap perkembangan akar berlanjut terus maka dapat diharapkan perbaikan pertumbuhan tanaman. Hal ini terlihat jelas pada hasil inokulasi oleh isolat LIPI Az 1, Btr No. 6, dan BtJ No. 8. Namun bobot akar yang diinokulasi dengan BU No. 7 sebaik tanaman yang diinokulasi dengan ketiga isolat tersebut di atas. Serapan N pupuk tanaman dari tanaman yang diinokulasi oleh keempat isolat tersebut sama baiknya. Perbaikan nutrisi tanaman sebagai akibat inokulasi *Azospirillum* juga dilaporkan oleh Fages, 1994 pada beberapa pengujian tanaman jagung.

Sumner, 1990 menekankan peranan penting isolat homolog (isolat yang berasal dari akar tanaman yang sama) untuk keberhasilan inokulasi di lapang, terutama bila lahan mengandung strain alami. Namun, isolat LIPI Az 1 yang berasal dari akar tanaman padi menunjukkan asosiasi yang baik dengan tanaman jagung. Hasil pengujian isolat LIPI Az 1 dalam Percobaan 2 didukung oleh beberapa percobaan lain yang dilakukan Puslit Bioteknologi-LIPI. Isolat tersebut telah diidentifikasi dengan analisis RAPD sebagai *Azospirillum lipoferum* (Dini Ariani, 2001) yang umumnya mendominasi akar tanaman yang memiliki lintas fotosintesis C4 (Rocha *et al.*, 1981 yang dikutip oleh Dell Gallo dan Fendrik, 1994), seperti tanaman jagung dan tebu.

KESIMPULAN

Dari kedua percobaan di atas dapat diambil beberapa kesimpulan.

1. Parameter luas permukaan akar dan panjang akar merupakan parameter yang peka untuk evaluasi keefektifan asosiasi sejumlah isolat *Azospirillum* dengan tanaman jagung.
2. Pada percobaan dengan tanah steril tampak bahwa inokulasi *Azospirillum* meningkatkan pertumbuhan tanaman dan kandungan N total tanaman, disamping meningkatkan efisiensi pemupukan N.

3. Isolat *Azospirillum* BtJ. No. 6, 7, 8 dan LIPI Az 1 lebih efisien dalam penggunaan pupuk.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Kepala Pulitbang Teknologi Isotop dan Radiasi, Badan Tenaga Nuklir Nasional atas fasilitas yang diberikan sehingga kegiatan penelitian ini dapat dilakukan.

Ucapan terima kasih juga diberikan kepada para teknisi yang membantu kelan-caran penelitian ini yang merapakan sebagian dari kegiatan penelitian Proyek IAEA TC No. INS 5/028.

DAFTAR PUSTAKA

- Arsac JF, Lamothe C, Mulard D and Fages J. 1990.** Growth enhancement of maize (*Zea mays* L) through *Azospirillum lipoferum* inoculation : effect of plant genotype and bacterial concentration. *Agronomie* 10: 640-654.
- Baldani VLD, Baldani JI and Dobereiner J. 1983.** Effect of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. *Canadian Journal of Microbiology* 29, 924-929.
- Carley HE and Watson RD. 1966.** A new gravimetric method for estimating root surface area. *Soil Science* 102,289-291.
- Cohen E, Okon Y, Kigel I, Noor I, and Henis Y. 1980.** Increase in Dry Matter and N total in *Zea mays* and *Setaria italica* Associated with Nitrogen fixing/ *Azospirillum* spp. *Plant Physiology* 66, 746-749.
- Del Gallo M and Fendrikl. 1994.** The Rhizosphere and *Azospirillum*. Dalam: *Azospirillum/Plant Association*, Ed. by Y. Okon, Boca Raton, Fla. Him 57-75.
- Dini Ariani. 2001.** Report on the job-training in National Institute of Biotechnology and Genetic Engineering (NIBGE), Faisalabad, Pakistan, 10 pages.
- Fages J. 1994.** *Azospirillum* inoculant and Field Experiment. Dalam: *Azospirillum/ Plant Association*, Ed. by Y. Okon, Boca Raton, Fla., Him 87-109.
- Fallik E, Sarig S and Okon Y. 1994.** Morphology and Physiology of Plant Roots Associated with *Azospirillum*, Dalam *Azospirillum/Plant Association*, Ed. by Y. Okon, Boca Raton, Fla., Him. 77-86.
- Hartmann A, Singh M and Klingmuller W. 1983.** Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indole acetic acid. *Canadian Journal of Microbiolog* 29, 916.
- Krieg N, Rand J, and Dobereiner J. 1984.** Genus *Azospirillum*. Dalain: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. I. Edited by N. R. Krieg and J. E. Holt. Williams and Wilkins, Baltimore/ London. Him. 94-103.
- Levanony H and Bashan Y. 1989.** Enhancement of cell division in wheat root tips and growth of root elongation zone induced by *Azospirillum brasilense* Cd. *Canadian Journal of Botany* 67, 2216.
- Sumner ME. 1990.** Crop response to *Azospirillum* inoculation. *Advance in Soil Science* 12, 54.
- Tien TM, Gaskins MH, and Hubbell DH. 1979.** Plant growth substance produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Applied Environmental Microbiology* 37, 1016.
- Zapata, F. 1990.** Isotope techniques in soil fertility and plant nutrition studies. Dalam: *Use of Nuclear Techniques in Studies of Soil-Plant Relationship*. Training Course Series No. 2, IAEA, Vienna, Him 61-127.