

Karakterisasi *Rhizobia Indigenus* Edamame sebagai Kandidat Pupuk Hayati

Characterization of Edamame Indigenus Rhizobia as a Candidate of Biofertilizer

Sattya Arimurti

Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

ABSTRACT

Five isolates, named R1, R3, R4, R6 and R7, were successfully isolated from leguminous edamame nodules, and characterized as indigenous rhizobia bacteria. All isolates were grown in a YEMA medium containing antibiotics ampicillin, streptomycin, rifampicin, tetracycline, chloramphenicol or penicillin. Cultivation revealed that R3 can grow in a medium containing all antibiotics, but not for R1 when they grow in a medium containing rifampicin. R7 could not grow when the medium contain streptomycin and rifampicin. Furthermore, R4 and R6 only grow at medium containing tetracycline. it seemed that R1 and R3 are more resistant against some antibiotics comparing with others. When YEMA containing bromthymol blue 1% medium was used, R1 produced the yellowish acid and R3 produced blue alkali. R1 also utilized dulcitol and L-histidin as carbon and nitrogen source. R3 utilize the carbon source from dulcitol but cannot utilize the nitrogen source from L-histidin. Base on these results above, it can be suggested that R1 and R3 identified as *Rhizobium leguminosarum* and *Bradyrhizobium japonicum*.

Keywords: *indigenus Rhizobia, Rhizobium leguminosarum, Bradyrhizobium japonicum*

PENDAHULUAN

Rhizobia merupakan bakteri simbiotik yang mampu menambat N₂ dengan membentuk bintil akar pada tanaman kacang-kacangan. Pemanfaatan Rhizobia sebagai pupuk hayati dapat meningkatkan efisiensi pemupukan N. Pada tanaman kacang-kacangan, rhizobia mampu memberikan kontribusi ketersediaan nitrogen sebesar 24-584 N/ha/tahun dibandingkan dengan bakteri nonsimbiotik yang hanya sebesar 15 kg/ha/tahun (Shantharam & Mattoo 1997). Hasil penelitian Tetty (2006) menunjukkan bahwa pada semua umur pengukuran, pertambahan tinggi tanaman yang diinokulasi Rhizobia strain mutan CB3171rif50 lebih cepat dan menghasilkan produksi hijauan segar tertinggi secara nyata (P<0,05) yaitu 2106 g/pohon yang setara 18.72 ton/ha, dibandingkan dengan yang tanpa inokulasi dan tanpa penambahan nitrogen yang sebesar 4.94 ton/ha.

Penggunaan pupuk hayati memiliki prospek yang cukup cerah di masa mendatang, karena dapat meningkatkan produktivitas tanah, membantu ketersediaan hara dan dan menekan pencemaran lingkungan (IAAAD 2008). Namun penggunaan pupuk hayati masih

menghadapi kendala dalam hal pemilihan galur-galur mikroba unggul yang sesuai dengan kondisi tanah tertentu (spesifik lokasi).

Shantharam & Mattoo (1997) mengemukakan bahwa isolat-isolat untuk pupuk hayati sebaiknya diisolasi dari daerah tertentu dan diinokulasikan kembali ke lingkungan yang sama untuk menjamin kesuksesan inokulasi. Dengan demikian perlu dilakukan usaha pencarian rhizobia lokal dari lokasi pertanaman kedelai dengan ekosistem yang berbeda.

Kedelai edamame merupakan salah satu komoditas penting di Jember sejak tahun 1997 sampai sekarang, hal ini diikuti juga dengan berdirinya PT Mitratani 27 Jember (Nataatmadja 2007). Arimurti *et al.* 2000 melaporkan bahwa rhizobia *indigenus* J-4 dari pertanaman kedelai edamame dari daerah di sekitar Jember tahan terhadap kadar NaCl 2% dan efektif pada pembentukan bintil akar pada tanaman kedelai edamame (Arimurti & Utarti 2001)

Pemanfaatan inokulan rhizobia sebagai pupuk hayati terkadang mengalami kegagalan sebagai akibat lebih tingginya daya kompetisi di lingkungan. Menurut Triplett & Sadowsky (1992) kompetisi merupakan faktor paling

kritis yang mempengaruhi kesuksesan inokulasi rhizobia di lapang. Semakin tinggi kemampuan Rhizobia berkompetisi, maka semakin besar kemungkinan keberhasilan aplikasinya. Oleh karena itu perlu dilakukan karakterisasi terhadap rhizobia indigenous edamame. Karakterisasi terhadap rhizobia dapat dilakukan dengan analisis fenotipik antara lain ketahanan terhadap antibiotik, morfologi koloni (Fuhrmann 1990) dan analisis genetik salah satunya analisis profil plasmid (Bromfield *et al.*, 1987), PFGE (Susilowati 1999) dan PCR-RLPF (Wolde-meskel *et al.* 2005, Kwon *et al.* 2005, Bahena *et al.* 2008).

Analisis ketahanan terhadap antibiotik dapat digunakan untuk memilih rhizobia *indigenous* edamame yang mampu berkompetisi untuk pupuk hayati. Semakin tahan rhizobia terhadap berbagai antibiotik maka daya kompetisi dalam tanah semakin tinggi. Mekanisme antibiotik dapat menghambat pertumbuhan mikroba berbeda-beda. Ampisilin mampu menghambat pertumbuhan mikroba dengan cara menghambat ikatan pada peptidoglikan pada dinding sel, sedangkan tetrasiklin menghambat perlekatan tRNA yang membawa asam amino ke ribosom, sehingga penambahan asam amino ke rantai polipeptida yang sedang dibentuk terhambat (Naim 2003). Streptomisin dan kloramfenikol mengganggu pembentukan ikatan peptida selama pertumbuhan rantai polipeptida dengan menghambat kerja peptidil transferase (Tortora *et al.* 2004) sehingga enzim menjadi inaktif dan sintesis protein menjadi terhambat. Penisilin dengan menghambat sintesis dinding sel bakteri dan rifampisin dengan cara menghambat proses transkripsi dan replikasi (Long 1991). Fuhrmann (1990) menyatakan bahwa antibiotik yang umum digunakan untuk menguji rhizobia adalah streptomisin, rifampisin, kloramfenikol dan tetrasiklin. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengkaraktirasi rhizobia *indigenous* edamame.

METODE

Tahapan penelitian untuk mengkaraktirasi rhizobia *indigenous* adalah pengujian ketahanan terhadap antibiotik, pembuatan kurva pertumbuhan, pengamatan morfologi makroskopis, mikroskopis dan pengamatan fisiologis.

Pengujian ketahanan terhadap antibiotik

Rhizobia yang digunakan pada penelitian ini adalah 5 isolat rhizobia indigenous edamame yang diisolasi dari daerah Jember yaitu isolat R1, R3, R4, R6, R7.

Pengujian ketahanan isolat rhizobia terhadap antibiotik dilakukan secara invitro pada media Yeast Ekstrak Mannitol Agar (YEMA). Pengujian menumbuhkan 5 µl biakan isolat rhizobia yang berumur 24 jam pada media YEMA yang telah diberi antibiotik. Antibiotik yang digunakan adalah ampisilin, streptomisin, kloramfenikol, rifampisin dan tetrasiklin dengan konsentrasi 25, 50, 100, 250, 500 dan 1000 ppm. Diinkubasi pada suhu ruang dan diamati pertumbuhan dari rhizobia tersebut. Pengujian dilakukan dengan 2 ulangan.

Selanjutnya pada konsentrasi antibiotik yang tertinggi dimana rhizobia masih menunjukkan pertumbuhan dilakukan uji dengan Sumur Agar (Madigan *et al.* 1997). Pada metode ini pada media YEMA dibuat sumur-sumur yang diisi dengan 40 µl antibiotik dengan konsentrasi tertentu dan selanjutnya 100 µl rhizobia yang berumur 24 jam disebar dan diamati adanya zona penghambatannya. Selanjutnya dipilih 2 isolat rhizobia yang memiliki ketahanan terhadap antibiotik terbaik.

Pembuatan kurva pertumbuhan

Pembuatan kurva pertumbuhan isolat rhizobia dilakukan dengan cara menumbuhkan rhizobia pada media Yeast Ekstrak Mannitol Broth (YEMB) 5 ml selama 7 hari. Selanjutnya dengan umur 1 hari jumlah rhizobia dihitung dengan menggunakan metode total plate count.

Pengamatan morfologi dan karakter fisiologis

Pengamatan morfologi meliputi pewarnaan Gram, morfologi mikroskopis, morfologi makroskopis yang meliputi bentuk, diameter, elevasi, konsistensi dan warna koloni. Karakter fisiologis rhizobia yang diamati meliputi kemampuan membentuk asam atau basa pada media YEMA ditambah dengan 1 % *bromthymol blue* (BTB), kemampuan tumbuh pada sumber karbon dulcitol dan sumber nitrogen L-histidin serta uji katalase (Holt *et al.* 1994).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ketahanan Rhizobia *indigenous* edamame terhadap antibiotik

Sebagian besar mikroba pada tingkat tertentu dalam hidupnya dipengaruhi oleh kegiatan mikroba lain. Pengaruh tersebut dapat terjadi baik secara langsung maupun tidak langsung. Salah satu dari fenomena antagonisme yaitu antibiosis. Dalam hal ini salah satu dari dua populasi organisme yang berinteraksi menghasilkan senyawa antibiotik. Antibiotik adalah substansi kimia alamiah hasil metabolisme sekunder mikroba, yang mempunyai kemampuan baik menghambat pertumbuhan maupun membunuh mikroba lain (Masters *et al.* 2005).

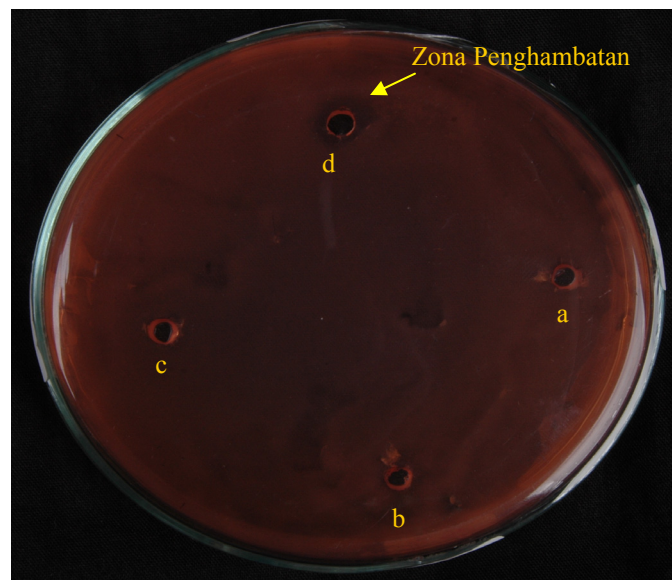
Pengujian ketahanan rhizobia terhadap antibiotik bertujuan untuk mengetahui tingkat

kemampuan kompetisi rhizobia. Semakin banyak dan tinggi konsentrasi ketahanan rhizobia terhadap antibiotik maka semakin besar kemampuan berkompetisi. Ketahanan rhizobia terhadap antibiotik dapat diamati dengan tidak terbentuknya zona hambat oleh antibiotik, hal ini dapat dilihat pada Gambar 1.

Hasil Penelitian yang disajikan pada Tabel 1 menunjukkan bahwa rhizobia R1 dan R3 lebih tahan terhadap antibiotik yang diuji dibandingkan dengan rhizobia yang lain. Rhizobia R3 tahan terhadap ampisilin 400 ppm, streptomisin 100 ppm, rifampisin 200 ppm, tetrasiklin 400 ppm, klorampenikol 800 ppm dan penisilin 400 ppm. Sedangkan rhizobia R1 tahan terhadap ampisilin 50 ppm, streptomisin 25 ppm, tetrasiklin 25 ppm, klorampenikol 800 ppm dan penisilin 800 ppm dan tidak tahan terhadap rifampisin. Rhizobia R7 tahan terhadap ampisilin 25 ppm, tetrasiklin 25 ppm, klorampenikol 200 ppm dan penisilin 800 ppm tetapi tidak tahan pada streptomisin dan rifampisin. Sedangkan rhizobia R4 dan R6 hanya tahan terhadap tetrasiklin 25 ppm dan tidak tahan terhadap antibiotik lain.

Berdasarkan hasil di atas diketahui bahwa rhizobia *indigenus* edamame mempunyai ketahanan yang berbeda terhadap antibiotik. Ketahanan yang tidak sama terhadap antibiotik dapat disebabkan oleh struktur fisiologis masing-masing rhizobia, seperti kemampuannya menghasilkan suatu enzim. Menurut Katzung (1995). Enzim yang dihasilkan suatu bakteri yang tahan terhadap antibiotik berfungsi merusak struktur antibiotik sehingga antibiotik tersebut menjadi berkurang efektivitasnya dan mampu mengubah permeabilitas membran sehingga antibiotik tidak sampai masuk pada ribosom.

Streptomisin merupakan antibiotik yang dapat digunakan juga sebagai pestisida untuk menghambat pertumbuhan bakteri, fungi dan algae (Masters *et al.* 2005). Pada penelitian ini rhizobia R1 dan R3 tahan terhadap streptomisin. Hasil ini menunjukkan bahwa rhizobia R1 dan R3 dapat diaplikasikan pada tanah-tanah pertanian yang telah diberi pestisida yang berbahan dasar streptomisin. Berdasarkan hasil ketahanan terhadap antibiotik, maka rhizobia R1 dan R3 dipilih sebagai kandidat pupuk hayati dan dikarakterisasi lebih lanjut.



Gambar 1. Ketahanan Rhizobia R1 pada berbagai antibiotik (a: akuades, b: streptomisin 25 ppm, ampisilin 50 ppm, tetrasiklin 25 ppm).

Tabel 1. Ketahanan Rhizobia terhadap antibiotic.

Antibiotika	Konsentrasi (ppm)	Rhizobia				
		1	3	4	6	7
Ampisilin	0	+	+	+	+	+
	25	+	+	-	-	+
	50	+	+	-	-	-
	100	-	+	-	-	-
	200	-	+	-	-	-
	400	-	+	-	-	-
	800	-	-	-	-	-
Streptomisin	0	+	+	+	+	+
	25	+	+	-	-	-
	50	-	+	-	-	-
	100	-	+	-	-	-
	200	-	-	-	-	-
	400	-	-	-	-	-
	800	-	-	-	-	-
Rifampisin	0	+	+	+	+	+
	25	-	+	-	-	-
	50	-	+	-	-	-
	100	-	+	-	-	-
	200	-	+	-	-	-
	400	-	-	-	-	-
	800	-	-	-	-	-
Tetrasiklin	0	+	+	+	+	+
	25	+	+	+	+	+
	50	-	+	-	-	-
	100	-	+	-	-	-
	200	-	+	-	-	-
	400	-	+	-	-	-
	800	-	-	-	-	-
Klorampenicol	0	+	+	+	+	+
	25	+	+	-	-	+
	50	+	+	-	-	+
	100	+	+	-	-	+
	200	+	+	-	-	+
	400	+	+	-	-	-
	800	+	+	-	-	-
Penisilin	0	+	+	+	+	+
	25	+	+	-	-	+
	50	+	+	-	-	+
	100	+	+	-	-	+
	200	+	+	-	-	+
	400	+	+	-	-	+
	800	+	-	-	-	+

Keterangan: + = mampu tumbuh, - = tidak mampu tumbuh, Isolat 1, 4, 6 dan 7 diamati setelah 24 jam inkubasi, Isolat 3 setelah 120 jam inkubasi

Kurva pertumbuhan *Rhizobia indigenus* edamame

Kurva pertumbuhan menunjukkan pola pertumbuhan mikrob. Ada empat fase pada pertumbuhan mikrob yaitu fase adaptasi, fase eksponensial, fase stasioner dan fase kematian (Madigan 1997). Tabel 2 dan Gambar 2 menunjukkan jumlah sel dan pola pertumbuhan sel rhizobia R1 dan R3. *Rhizobia* R1 menunjukkan kurva pertumbuhan dengan pola pertumbuhan meningkat setelah diinokulasi dan mencapai puncak dengan jumlah sel tertinggi diperoleh setelah inkubasi hari ke 3 dengan jumlah sel $3,3 \times 10^{16}$ CFU/ml, selanjutnya menurun sampai hari ke hari ke 5. Sedangkan rhizobia R3 memiliki pola yang sama dengan R1 tetapi tumbuh lebih lambat

dengan jumlah sel tertinggi diperoleh setelah inkubasi hari ke 5 dengan jumlah sel $2,1 \times 10^{12}$ CFU/ml.

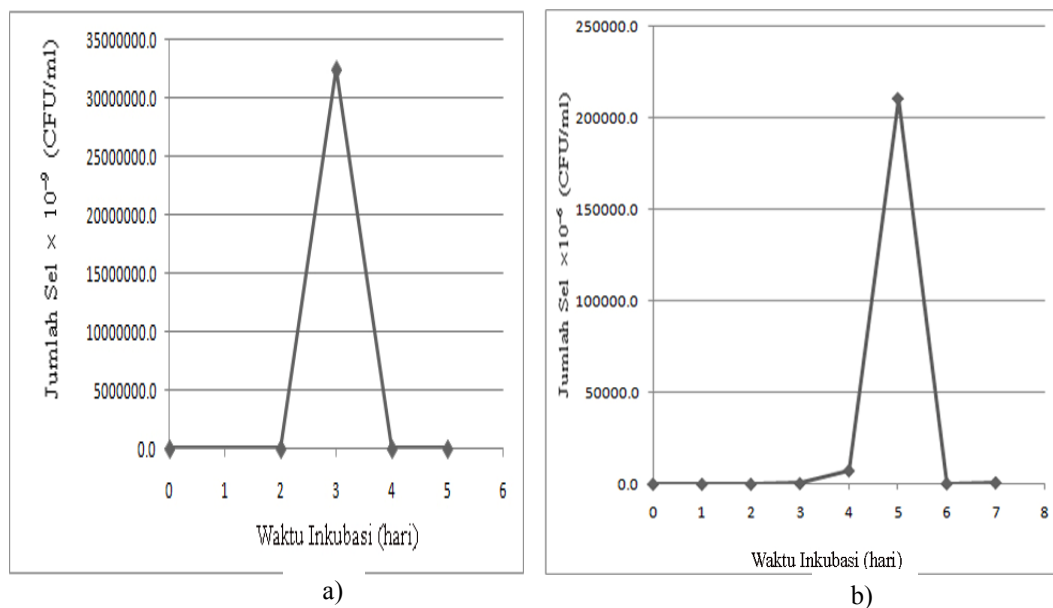
Morfologi dan fisiologi *Rhizobia indigenus* edamame

Hasil pengamatan morfologis makroskopis, mikroskopis dan fisiologis rhizobia R1 dan R3 ditunjukkan pada Tabel 3. Berdasarkan penampakan koloni rhizobia pada media YEMA menunjukkan bahwa rhizobia R1 tumbuh cepat, koloni berbentuk bundar, berelevasi cembung, agak tembus cahaya, lengket dan berwarna putih susu dan katalase positif. Hasil karakterisasi secara mikroskopis menunjukkan bahwa rhizobia R1 berbentuk batang dan merupakan bakteri Gram negatif.

Tabel 2 . Jumlah sel *Rhizobia indigenus* edamame.

Waktu inkubasi (hari)	Jumlah sel (CFU/ml)	
	Rhizobia R1	Rhizobia R3
0	$2,1 \times 10^6$	$9,0 \times 10^5$
1	-	$5,3 \times 10^6$
2	$1,2 \times 10^{13}$	$3,0 \times 10^8$
3	$3,3 \times 10^{16}$	$3,9 \times 10^8$
4	$3,1 \times 10^{11}$	$7,3 \times 10^{10}$
5	$2,4 \times 10^9$	$2,1 \times 10^{12}$
6	-	$2,9 \times 10^9$
7	-	$8,5 \times 10^9$

Keterangan : - Tidak ada data



Gambar 2. Pertumbuhan (a) *Rhizobia* R1 dan (b) R3 pada media YEMA.

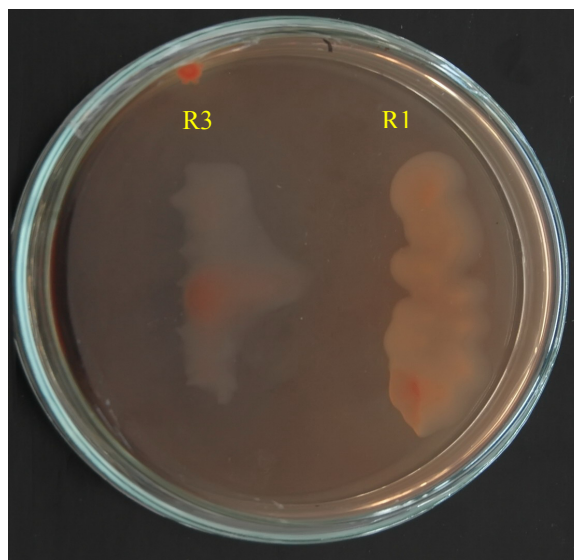
Pada media YEMA yang diberi BTB rhizobia R1 bersifat asam yang ditunjukkan dengan perubahan warna merah menjadi merah kekuningan (Gambar 3). Rhizobia R1 mampu tumbuh pada media dengan sumber karbon dulsitol dan dengan sumber nitrogen L-histidin.

Menurut Holt *et al.* (1994), rhizobia *Rhizobium leguminosarum* menunjukkan ciri tumbuh cepat, bereaksi masam pada media YEMA, koloni berbentuk berelevasi cembung, agak tembus cahaya, lengket dan berwarna putih susu dan mampu tumbuh pada media dengan sumber karbon dulsitol dan dengan sumber N L-histidin. Berdasarkan hal tersebut maka isolat rhizobia R1 dimasukkan pada species *Rhizobium leguminosarum*. Genus *Shinorhizobium* memiliki ciri yang sama dengan *Rhizobium* tetapi tidak mampu tumbuh pada sumber karbon dulsitol dan dengan sumber N L-histidin. Menurut Bahena *et al.* (2008) berdasarkan analisis molekuler dan karakter fenitipik menunjukkan bahwa *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926^{AL} sinonim dengan *R. leguminosarum*.

Koloni *Rhizobium* menghasilkan lendir yang sangat banyak. Hal ini mengindikasikan tingginya produksi eksopolisakarida (EPS). EPS berfungsi untuk meningkatkan viskositas sekeliling sel, sehingga dapat mengurangi

jumlah O₂ dan mengurangi penekanan terhadap aktivitas nitrogenase, melindungi sel bakteri dari pengaruh kondisi tercekam (pH, kekeringan, fluktuasi potensial air), mengkelat Al³⁺ dan Mn²⁺, menghalangi difusi H₃O⁺ pada permukaan sel, sehingga dapat menghalangi sel bakteri dari ion yang bersifat toksik yang sering dijumpai pada kondisi tanah masam, memacu pembentukan gel dengan adanya Ca²⁺, sehingga berperan di dalam pelekatan pada rambut akar, molekul penanda proses infeksi (Fuhrmann 1990).

Penampakan koloni media YEMA menunjukkan bahwa rhizobia R3 tumbuh lambat, koloni berbentuk bundar, berelevasi cembung berwarna putih susu. Hasil karakterisasi secara mikroskopis menunjukkan bahwa rhizobia R3 berbentuk batang dan merupakan bakteri Gram negatif. Pada media YEMA yang diberi BTB bersifat basa yang ditunjukkan dengan perubahan warna merah menjadi biru kemerahan (Gambar 3). Rhizobia R3 tidak mampu tumbuh pada media dengan sumber karbon dulcitol tetapi mampu tumbuh pada media dengan sumber nitrogen L-histidin. Berdasarkan kunci karakterisasi Holt *et al.* (1994) menunjukkan bahwa rhizobia R3 termasuk species *Bradyrhizobium japonicum*.



Gambar 3. Uji Rhizobia R1 dan R3 pada YEMA + 1% BTB. Rhizobia R1 bereaksi masam merah kekuningan) sedang Rhizobia R3 bereaksi basa (biru kemerahan).

Tabel 3. Karakter Rhizobia *indigenus* edamame.

No	Karakterisasi	Rhizobia	
		R1	R3
1	Morfologi mikroskopis	Bentuk batang	Bentuk batang
2	Sifat Gram	Gram negatif	Gram negatif
3	Morfologi makroskopis		
	Diameter koloni (3 hari, 28°C)	2 mm	1 mm
	Lama Pertumbuhan	2 hari	5 hari
	Bentuk	bundar	bundar
	Elevasi	cembung	cembung
	Konsistensi	lengket	Tidak lengket
	Warna	Putih berlendir	putih
4	Karakter fisiologis		
	Kemampuan membentuk asam atau basa pada media YEMA + 1 % <i>bromo timol blue</i>	asam	basa
	Kemampuan tumbuh pada sumber karbon dulcitol	+	-
	Kemampuan tumbuh pada sumber nitrogen L-histidin	+	+
	Katalase	positif	positif

Keterangan : + = mampu tumbuh, - = tidak mampu tumbuh

Pada uji katalase, isolat rhizobia R1 dan R3 menunjukkan sifat katalase positif. Menurut Madigan *et al.* (1997) katalase dimiliki oleh semua organisme bersifat aerob obligat. Aktivitas katalase tampak dengan adanya gelembung-gelembung kecil di dalam suspensi bakteri dan H₂O₂ 3%. Gelembung yang terbentuk akibat dari struktur molekul H₂O₂ tidak stabil, sehingga H₂O₂ dengan katalase terurai menjadi air dan oksigen.

KESIMPULAN

Hasil uji ketahanan terhadap antibiotik menunjukkan bahwa Rhizobia R1 dan R3 memiliki ketahanan yang lebih tinggi dibandingkan Rhizobia R4, R6 dan R7. Rhizobia R1 tahan terhadap ampisilin 50 ppm, streptomisin 25 ppm, tetrasiklin 25 ppm, klorampenikol 800 ppm dan penisilin 800 ppm dan tidak tahan terhadap rifampisin. Sedangkan Rhizobia R3 tahan terhadap ampisilin 400 ppm, streptomisin 100 ppm, rifampisin 200 ppm, tetrasiklin 400 ppm, klorampenikol 800 ppm dan penisilin 400 ppm. Selanjutnya Rhizobia R1 dan R3 digunakan sebagai kandidat pupuk hayati

Hasil identifikasi menunjukkan Rhizobia R1 termasuk *Rhizobium leguminosarum* dengan jumlah sel tertinggi (3,3 x 10¹⁶ CFU/ml) setelah inkubasi hari ke 3 dan Rhizobia R3 termasuk *Bradyrhizobium japonicum* yang tumbuh lambat dengan jumlah

sel 2,1 x 10¹² CFU/ml setelah inkubasi hari ke 5.

Ucapan terima kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, yang telah membiayai penelitian ini sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Penelitian No. 022/SP2H/PP/DP2M/III/2008.

DAFTAR PUSTAKA

- Arimurti S, Sutoyo, Winarsa R. 2000. Isolasi dan Karakterisasi Rhizobia asal Pertanian Kedelai di Sekitar Jember. *J. Ilmu Dasar*. 1:39-47
- Arimurti S & Utarti E. 2001. Pengaruh Rhizobia *indigenus* I₄ terhadap pertumbuhan vegetatif dan serapan Nitrogen tanaman kedelai edamame. *Biosantifika* 5(1):103-110.
- Bahena MHR, Fraile PG, Peix A, Valverde A, Rivas R, Igual JM, Mateos PF, Molina EM, Velázquez E. 2008. "Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889^{AL}, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926^{AL} and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926^{AL}. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. Nov". *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 2484-2490
- Bromfield ESP, Thurman NP, Whitwill ST, Barran LR. 1987. Plasmids and symbiotic effectiveness of representative phage types from two indigenous populations of *Rhizobium meliloti*. *J. Gen Microbiol*. 133:3457-3466.

- Fuhrmann J. 1990. Symbiotic effectiveness of indigenous soybean bradyrhizobia as related to serological morphological, rhizobitoxine and hydrogenase phenotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:224-229
- Douglas CR. 1985. Atlas of Drug Reactions. New York, NY: ChurchillLivingstone
- Fuhrmann J. 1990. Symbiotic effectiveness of indigenous soybean bradyrhizobia as related to serological, morphological, rhizobitoxine and hydrogenase phenotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* **6**:224-229
- Holt GH, NR Krieg, PHA Eath, JT Stanley & ST Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th ed.* The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- IAARD. 2008. *Biofertilizer*. <http://iaard.go.id/res-highlight/one/2> [akses bulan Desember 2008]
- Katzung BG. 1995. *Farmokologi Dasar dan Klinik*. Edisi keenam. Alih bahasa Staf Dosen Fakultas Kedokteran Sriwijaya dari *Basic and Clinical Pharmacology*. Six Edition. Jakarta: EGC.
- Kwon SW, Park JY, Kim JS, Kang JW, Cho YH, Lim CK, Parker MA, Lee GB. 2005. Phylogenetic analysis of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* on the basis of 16S rRNA gene nd internally transcribed spacer region sequences. *Int J Syst Evol Microbio.* **55** : 263-270.
- Long & James W. 1991. *Essential Guide to Prescription Drugs 1992*. New York: Harper Collins Publishers..
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 1997. *Brock Biology of Microorganism*. Eight Edition. New Jersey: Prentice-Hall, Inc.
- Masters, Susan B, Trevor, Anthony J, Katzung, Bertram G. 2005. *Katzung & Trevor's pharmacology*. New York: Lange Medical Books/McGraw Hill, Medical Pub.
- Nataatmadja. 2007. *Permintaan Jepang Belum Bisa dipenuhi*. *Kompas*. <http://www.kompas.co.id>. [Diakses 20 Juni 2007]
- Naim R. 2003. *Cara Kerja dan Mekanisme Resistensi Antibiotik*. [serial on line] <http://www.kompas>. [Diakses 3 Juni 2007].
- Sadowsky MJ, Keyser HH, Bohlool B. 1983. Biochemical characterization of fast-growing and slow-growing rhizobia that nodulate soybean. *Int. J.Sys.Bacteriol.* **33**:716-722
- Shantharam S & Mattoo AK. 1997. Enhancing biological nitrogen fixation: An appraisal of current and alternative technologies for N input into plans. *Plant and Soil.* **194**:205-216.
- Somasegaran P & Halliday J. 1982. The dilution of liquid cultures of *Rhizobia* to increase production capacity of inoculant production plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**:330-333
- Susilowati. 1999. *Keragaman Genetik Sejumlah Bakteri Bintil Akar Kedelai Asal Indonesia Berdasarkan Analisis PFGE*. Thesis. Bioteknologi. IPB. Bogor.
- Trautmann NM, Porter KS, Wagenet RJ. 2005. *Nitrogen: The Essential Element*. Cornell University.
- Tetty. 2006. Respon inokulasi strain mutan Rhizobia pada *Calliandra calothyrsus*. Balitnak. <http://balitnak.litbang.deptan.go.id>. [iakses 20 Maret 2007].
- Triplett EW & Sadowsky MJ. 1992. Genetics of competition for nodulation of legumes. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**:399-428
- Tortora JG, Funke RB, Case LC. 2004. *Microbiology: an introduction*. Eighth edition. San Francisco: Pearson Education, Inc.
- Wolde-meskel' E, Terefework Z, Frostegard A, Lindstrom K. 2005. Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from agroforestry legume species in southern Ethiopia. *Int J Syst Evol Microbiol.* **55** : 1439-1452.