

Populasi Bakteri *Rhizobium* di Tanah pada beberapa Tanaman dari Pulau Buton, Kabupaten Muna, Propinsi Sulawesi Tenggara

Sri Purwaningsih¹

Makalah diterima 17 Maret 2008 / disetujui 13 November 2008

ABSTRACT

Population of *Rhizobium* Bacteria in the Soil at Several Plant from Buton Island, Muna Regency, Southeast Sulawesi (S. Purwaningsih): The research was conducted in order to know population of *Rhizobium* bacteria in the soil at several plant from Buton island, Muna regency, Southeast Sulawesi. The purpose of the study was to get the population data and pure cultures of *Rhizobium* bacteria. *Rhizobium* bacteria were isolated from 13 sample from rhizosphere of fruit plant, 14 sample soil from rhizosphere of yield plant, 5 sample soil from rhizosphere of horticulture plant, and 8 samples soil was from forest plant. Isolation was conducted in standard medium of Yeast Extract Mannitol Agar (YEMA), the inoculation at (27-28°C), and the population was counted by plate count methods. The growth characteristic of strain was observed by using YEMA medium mixed respectively with Brom Thymol Blue and Congo Red as an indicators. The population of *Rhizobium* bacteria was in the range of 7-115 × 10⁵ CFU g⁻¹ soil, and the highest population was found from the sample soil from rhizosphere with *Ipomea batatas* plant. Forty nine gave of pure culture, thirty five isolates can be grouped as fast growing, while fourteen can be grouped as slow growing.

Keywords: *Rhizobium* bacteria, YEMA, YEMA+ BTB, YEMA+Congo Red

PENDAHULUAN

Pulau Buton merupakan salah satu pulau kecil yang termasuk dalam wilayah Sulawesi Tenggara, yang memiliki nilai keanekaragaman hayati yang tinggi, terutama keanekaragaman hewan, tumbuhan dan mikroba. Usaha penggalian sumber daya hayati tersebut belum banyak dilakukan, baik flora, fauna maupun mikrobanya. Untuk itu perlu dilakukan eksplorasi mengenai potensi biota, terutama yang berhubungan dengan kesuburan tanah, salah satunya adalah mikroba tanah (bakteri tanah). Bakteri tersebut dikenal luas perannya sebagai biofertilizer yang dapat meningkatkan efisiensi penggunaan pupuk sintetik, sehingga sangat menunjang sistem pertanian yang berwawasan lingkungan (Susilowati *et al.*, 2003)

Untuk meningkatkan tingkat kesuburan tanah dan produktivitas hutan di kawasan pulau ini perlu didukung data dan informasi tentang bakteri tanah yang ada di kawasan tersebut terutama bakteri penambat nitrogen (salah satunya adalah bakteri *Rhizobium*). Bakteri *Rhizobium* merupakan mikroba yang mampu mengikat nitrogen bebas yang berada di udara menjadi ammonia (NH₃) yang akan diubah menjadi asam amino yang

selanjutnya menjadi senyawa nitrogen yang diperlukan tanaman untuk tumbuh dan berkembang, sedangkan *Rhizobium* sendiri memperoleh karbohidrat sebagai sumber energi dari tanaman inang (Allen dan Allen, 1981). Penambatan nitrogen secara biologis diperkirakan menyumbang lebih dari 170 juta ton nitrogen ke biosfer per tahun, 80% di antaranya merupakan hasil simbiosis antara bakteri *Rhizobium* dengan tanaman leguminosa (Peoples *et al.*, 1997 dalam Prayitno *et al.*, 2000). Dalam keadaan lingkungan yang memenuhi persyaratan tumbuh, simbiosis yang terjadi mampu memenuhi 50% atau bahkan seluruh kebutuhan nitrogen tanaman yang bersangkutan dengan cara menambat nitrogen bebas (Saono, 1981). Di samping itu bakteri *Rhizobium* tersebut mempunyai dampak yang positif baik langsung maupun tidak langsung terhadap sifat fisik dan kimia tanah, sehingga mampu meningkatkan kesuburan tanah (Alexander, 1977), namun dalam kehidupannya bakteri *Rhizobium* tersebut sangat dipengaruhi oleh kondisi tanah, terutama pH tanah (Skerman, 1977) kondisi fisik, kimia serta biologi tanah (Sprent, 1976). Selain itu faktor kompetisi merupakan faktor paling kritis yang menghambat kesuksesan inokulasi

¹Bidang Mikrobiologi, Puslit Biologi-LIPI, Bogor, Jl. Juanda 18, Bogor 16123

S. Purwaningsih: Populasi Bakteri *Rhizobium* di Tanah pada beberapa Tanaman

Rhizobium, kompetisi tidak hanya ada pada *Rhizobium*, tetapi ada pada semua mikroba dalam kaitannya dengan ekologi mikroba (Saraswati dan Susilowati, 1999), serta efisiensi inokulan *Rhizobium* untuk jenis tanaman tertentu perlu diperhatikan.

Mengingat besarnya peranan bakteri *Rhizobium*, maka keberadaan bakteri tersebut perlu dikonservasi dan diisolasi dalam bentuk koleksi kultur. Koleksi kultur bakteri memberikan jaminan bahwa bakteri yang telah dideskripsikan tersimpan dengan aman dan baik, sehingga tersedia setiap saat untuk keperluan generasi sekarang dan masa mendatang. Untuk selanjutnya isolat-isolat bakteri dari daerah tersebut yang akan digunakan kembali di kawasan ini sehingga mempunyai peluang keberhasilan yang lebih tinggi dari pada penggunaan inokulan yang berasal dari lokasi lain (Anas *et al.*, 1998).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui populasi bakteri *Rhizobium*, dan untuk mendapatkan isolat murni sebagai kultur murni ("Culture collection") serta mengetahui sifat fisiologisnya, yang nantinya dapat dikembangkan sebagai sumber plasma nutfah mikroba penyubur tanah.

BAHAN DAN METODE

Persiapan Sampel

Sebanyak 40 contoh tanah dari perakaran tanaman, yang diambil dari kedalaman 0-15 cm dari permukaan tanah, yang terdiri dari 13 contoh tanah dari perakaran tanaman buah-buahan pada ketinggian 75 m dpl, 14 contoh tanah dari perakaran tanaman ladang pada ketinggian 75 m dpl, 5 contoh tanah dari perakaran tanaman perkebunan, pada ketinggian 75 m dpl, dari Desa Watulansi, Kecamatan Wakorumba Utara, dan 8 contoh tanah dari perakaran tanaman hutan di Pulau Buton, pada ketinggian 375 m dpl, Kabupaten Muna, Provinsi Sulawesi Tenggara. Medium yang digunakan untuk isolasi bakteri *Rhizobium* adalah medium YEMA (*Yeast Extract Mannitol Agar*) (Vincent, 1970) yang terdiri dari: K_2HPO_4 0,5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g, NaCl 0,1 g, $CaCO_3$ 3 g, Mannitol 10 g, Yeast extract 3 g, Agar 20 g, aquades 1.000 ml, dengan pH 6,8.

Isolasi bakteri *Rhizobium*

Isolasi bakteri *Rhizobium* dilakukan dengan cara membuat seri pengenceran. Sebanyak 1 gram sampel tanah dimasukkan ke dalam 9 ml larutan garam fisiologis (NaCl 0,85%) dalam tabung reaksi, kemudian

divortek, dibuat seri pengenceran dengan cara memipet larutan sebanyak 1 ml dimasukkan kedalam 9 ml larutan NaCl 0,85%, dan seterusnya sampai diperoleh seri pengenceran $10^{-1} - 10^{-7}$. Masing-masing seri pengenceran dipipet sebanyak 0,1 ml dan dituangkan ke dalam petridish yang telah berisi medium tersebut diatas dan diratakan dengan spatula. Medium yang telah berisi sampel kemudian diinkubasikan pada suhu kamar (27-28°C), setiap hari diamati pertumbuhannya dan dihitung jumlah koloninya. Koloni *Rhizobium* dicirikan oleh warna merah muda, bulat dan cembung. Penghitungan jumlah koloni dilakukan dengan metode cawan hitung (*plate count*) (Lay, 1994). Isolat yang didapat dipindahkan ke dalam medium agar miring, kemudian dimurnikan sampai mendapatkan isolat yang murni (yang terdiri dari 1 koloni).

Pemurnian dan Karakterisasi

Pemurnian dilakukan dengan cara koloni diambil dengan Ose dimasukkan dalam aquadest steril (5 ml), kemudian divortek, dipipet 0,1 ml dimasukkan dalam petridish yang berisi media, diratakan dengan spatula, kemudian diinkubasikan pada suhu kamar (27-28°C), koloni yang tumbuh (tunggal) ditanam dalam media miring dalam tabung reaksi (sebagai kultur murni). Untuk pengujian karakterisasi isolat bakteri *Rhizobium* ditumbuhkan dalam media selektif yang dibuat dengan cara memodifikasi media dasar (YEMA) dengan penambahan beberapa jenis pewarna sebagai indikator yaitu Congo Red dan Brom Thymol Blue (Somasegaran, 1984), kemudian diamati pertumbuhan dan perubahan warnanya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Untuk sampel tanah dari daerah perakaran tanaman buah-buahan yang terdiri dari 13 sampel menunjukkan bahwa populasi bakteri *Rhizobium* tertinggi pada perakaran tanaman langsung (*Lansium domesticum*) yaitu (49×10^5 CFU g^{-1} tanah) (Tabel 1).

Untuk sampel tanah dari daerah perakaran tanaman ladang yang terdiri 14 sampel menunjukkan bahwa populasi bakteri *Rhizobium* tertinggi pada perakaran tanaman singkong (*Manihot utilisima*) yaitu 115×10^5 CFU g^{-1} tanah (Tabel 2).

Untuk sampel tanah dari daerah perakaran tanaman perkebunan yang terdiri dari 5 sampel menunjukkan bahwa populasi bakteri *Rhizobium* tertinggi pada perakaran tanaman kelapa (*Cocos nucifera*) yaitu 89×10^5 CFU g^{-1} tanah (Tabel 3).

Untuk sampel tanah dari daerah perakaran tanaman hutan yang terdiri 8 sampel menunjukkan bahwa populasi bakteri *Rhizobium* tertinggi pada perakaran tanaman *Myristica patua* yaitu 72×10^5 CFU g⁻¹ tanah (Tabel 4).

Dilihat dari keseluruhan populasi bakteri *Rhizobium* di tanah pada beberapa tanaman tersebut diatas menunjukkan bahwa populasinya termasuk tidak banyak, hal ini menunjukkan bahwa kondisi tanah pada daerah tersebut diatas termasuk kurang subur, karena tanah pertanian yang subur mengandung lebih dari 100 juta mikroba per gram tanah. Berbagai bakteri

penambat nitrogen telah banyak diisolasi dari rhizosfer dan rhizoplane tanaman non leguminosae, namun efisiensi penambatan N₂ masih rendah, hal ini mungkin disebabkan karena bakteri yang hidup di daerah rhizosfer harus berkompetisi dengan mikroba tanah yang lain untuk mendapatkan eksudat akar untuk kelangsungan hidupnya (Kirchhof *et al.*, 1997; James *et al.*, 2001).

Apabila dibandingkan antara sampel tanah pada daerah perakaran tanaman dengan sampel tanah dari tanah yang tidak ada tanamannya menunjukkan bahwa jumlah *Rhizobium* lebih banyak pada tanah yang

Tabel 1. Populasi bakteri *Rhizobium* dari perakaran tanaman buah-buahan Desa Watulansi, Kecamatan Wakorumba Utara, Kabupaten Muna, Provinsi Sulawesi Tenggara pada ketinggian 75 m dpl.

No sampel	Perakaran tanaman	Populasi bakteri <i>Rhizobium</i> (CFU X 10 ⁵ g ⁻¹ tanah)	Jumlah isolat
1 BTB	Mangga (<i>Mangifera</i> sp.)	38	2
2 BTB	Kedondong (<i>Spondias</i> sp.)	19	1
3 BTB	Jeruk (<i>Citrus</i> sp.)	41	2
4 BTB	Jambu mete (<i>Anacardium occidentale</i>)	16	1
5 BTB	Nanas (<i>Ananas comosus</i>)	48	2
6 BTB	Jambu biji (<i>Psidium guajava</i>)	15	1
7 BTB	Sirsak (<i>Annona squamosa</i>)	26	1
8 BTB	Pisang (<i>Musa paradisiaca</i>)	39	1
9 BTB	Papaya (<i>Carica papaya</i>)	19	1
10 BTB	Nangka (<i>Artocarpus heterophyllus</i>)	23	2
11 BTB	Rambutan (<i>Nephelium lappaceum</i>)	33	1
12 BTB	Langsat (<i>Lansium domesticum</i>)	49	1
13 BTB	Tanpa tanaman	7	1

Tabel 2. Populasi bakteri *Rhizobium* dari perakaran tanaman ladang Desa Watulansi, Kecamatan Wakorumba Utara, Kabupaten Muna, Provinsi Sulawesi Tenggara pada ketinggian 75 m dpl.

No sampel	Perakaran tanaman	Populasi bakteri <i>Rhizobium</i> (CFU X 10 ⁵ g ⁻¹ tanah)	Jumlah isolat
1 BTL	Tomat (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	74	1
2 BTL	Labu siam (<i>Sechium edule</i>)	91	2
3 BTL	Cabe (<i>Capsicum frutescent</i>)	87	1
4 BTL	Ubi jalar (<i>Ipomea batatas</i>)	115	2
5 BTL	Singkong (<i>Manihot utilisima</i>)	108	1
6 BTL	Dadap (<i>Erythrina</i> sp.)	87	1
7 BTL	Gamal (<i>Glyciridia</i> sp.)	69	1
8 BTL	Kacang hijau (<i>Vigna radiata</i>)	52	1
9 BTL	Jagung (<i>Zea mays</i>)	41	1
10 BTL	Kacang tanah (<i>Arachis hypogaea</i> L.)	26	1
11 BTL	Talas (<i>Alocasia esculenta</i>)	19	1
12 BTL	Terong (<i>Solanum melongena</i>)	37	1
13 BTL	Kacang panjang (<i>Vigna unguiculata</i>)	28	1
14 BTL	Tanpa tanaman	8	1

S. Purwaningsih: Populasi Bakteri *Rhizobium* di Tanah pada beberapa Tanaman

Tabel 3. Populasi bakteri *Rhizobium* dari perakaran tanaman perkebunan Desa Watulansi, Kecamatan Wakorumba Utara, Kabupaten Muna, Provinsi Sulawesi Tenggara pada ketinggian 75 m dpl.

No sampel	Perakaran tanaman	Populasi bakteri <i>Rhizobium</i> (CFU X 10 ⁵ g ⁻¹ tanah)	Jumlah isolat
1 BTK	Coklat (<i>Theobroma cacao</i>)	39	1
2 BTK	Mrica (<i>Piper nigrum</i>)	75	1
3 BTK	Kopi (<i>Coffea</i> sp.)	62	1
4 BTK	Kelapa (<i>Cocos nucifera</i>)	89	2
5 BTK	Tanpa tanaman	18	1

Tabel 4. Populasi bakteri *Rhizobium* dari perakaran tanaman hutan di Pulau Buton, Kabupaten Muna, Provinsi Sulawesi Tenggara pada ketinggian 375 m dpl.

No sampel	Perakaran tanaman	Populasi bakteri <i>Rhizobium</i> (CFU X 10 ⁵ g ⁻¹ tanah)	Jumlah isolat
1 BTH	<i>Mangifera</i> sp.	14	1
2 BTH	<i>Canarium hirsuta</i>	23	1
3 BTH	<i>Pometia pinnata</i>	39	2
4 BTH	<i>Dracontomelondao</i> sp.	54	1
5 BTH	<i>Delinia cerrata</i>	43	1
6 BTH	Myrisica patua	72	2
7 BTH	<i>Cynnamomon</i> sp.	31	1
8 BTH	<i>Quercus</i> sp.	65	1
9 BTH	Tanpa tanaman	11	1

bertanaman. Hal ini disebabkan karena tanaman melakukan aktivitas metabolisme akar yang mengeluarkan senyawa metabolit melalui akar kedalam tanah yang disebut dengan eksudat. Eksudat tersebut terdiri dari senyawa-senyawa gula, asam amino, asam organik, glikosida, senyawa nucleotide dan basanya, enzim, vitamin dan senyawa indole, sehingga dapat digunakan sebagai nutrisi untuk bakteri didalam tanah, sehingga dapat mempertahankan kelangsungan hidupnya. Seperti yang dilaporkan oleh Gibson (1981) bahwa aktivitas metabolisme dan senyawa metabolit yang dilepaskan oleh tanaman melalui akar merupakan faktor yang sangat menentukan keadaan mikrobiologi tanah pada daerah perakaran.

Apabila dibandingkan antar jenis tanaman populasinya sangat bervariasi. Adanya perbedaan populasi antar marga dan spesies tersebut mungkin disebabkan oleh aktivitas metabolisme akar dari masing-masing tanaman berbeda, yang menyebabkan perbedaan komposisi eksudat, yang akan menentukan populasi bakteri pada daerah perakaran. Seperti pada hasil penelitian Stolassa dan Ernest (1905 dalam Waksman, 1952) bahwa populasi bakteri pada daerah perakaran tanaman semuanya jauh lebih banyak dari

pada tanaman biji-bijian. Satu gram tanah dari perakaran tanaman mengandung 7 sampai 8 juta bakteri, sedangkan pada tanaman barley mengandung 5 sampai 6 juta dan tanaman gula beets 1 sampai 2 juta. Penelitian ini juga ditunjang oleh hasil penelitian Hoffman, (1914 dalam Waksman, 1952) bahwa 27 dari 32 sampel tanah permukaan dan sekitar perakaran tanaman mempunyai populasi bakteri lebih banyak dibandingkan dengan tanah di dalam dan di luar perakaran. Selain itu faktor kesuburan tanah, kandungan O₂, unsur hara, serta faktor fisik dan biologi tanah juga mempengaruhi populasi bakteri tanah.

Setelah dilakukan pemurnian didapatkan isolat bakteri *Rhizobium* sebanyak 49 isolat murni, diketahui bahwa 10 isolat pertumbuhannya kurang subur yang ditandai (+), 22 isolat ditandai (+++). Setelah dilakukan karakterisasi menunjukkan bahwa dalam media YEMA yang ditambah Congo red semuanya berwarna merah muda yang berarti tidak menyerap warna merah dari indikator Congo Red, keadaan ini menunjukkan cirikas dari bakteri *Rhizobium*. Seperti yang dikatakan oleh Soekartadiredja (1992) bahwa salah satu cirikas bakteri *Rhizobium* adalah tidak menyerap warna merah pada media yang mengandung

Tabel 5. Pertumbuhan bakteri *Rhizobium* pada media selektif pada sampel tanah dari Desa Watulansi, Kecamatan Wakorumba Utara, dan hutan Pulau Buton Kabupaten Muna, Provinsi Sulawesi Tenggara.

Nomor isolat	YEMA	YEMA + CR	YEMA +BTB
1 BTBY (1)	++	Merah muda	Kuning
1 BTBY (2)	++	Merah muda	Biru
2 BTBY (1)	+++	Merah muda	Kuning
3 BTBY (1)	++	Merah muda	Kuning
3 BTBY (2)	+++	Merah muda	Kuning
4 BTBY (1)	+	Merah muda	Biru
5 BTBY (1)	++	Merah muda	Kuning
5 BTBY (2)	+++	Merah muda	Kuning
6 BTBY (1)	++	Merah muda	Kuning
7 BTBY (1)	+	Merah muda	Biru
8 BTBY (1)	+++	Merah muda	Kuning
9 BTBY (1)	++	Merah muda	Kuning
10 BTBY (1)	++	Merah muda	Kuning
11 BTBY (1)	+	Merah muda	Biru
12 BTBY (1)	++	Merah muda	Kuning
13 BTBY (1)	+	Merah muda	Biru
1 BTLY (1)	++	Merah muda	Kuning
2 BTLY (1)	+++	Merah muda	Kuning
2 BTLY (2)	+++	Merah muda	Kuning
3 BTLY (1)	+	Merah muda	Biru
4 BTLY (1)	++	Merah muda	Biru
4 BTLY (2)	+++	Merah muda	Kuning
5 BTLY (1)	++	Merah muda	Kuning
6 BTLY (1)	+	Merah muda	Biru
7 BTLY (1)	+++	Merah muda	Kuning
8 BTLY (1)	++	Merah muda	Kuning
9 BTLY (1)	+++	Merah muda	Kuning
10 BTLY (1)	+	Merah muda	Biru
11 BTLY (1)	++	Merah muda	Kuning
12 BTLY (1)	+++	Merah muda	Kuning
13 BTLY (1)	++	Merah muda	Biru
14 BTLY (1)	++	Merah muda	Kuning
1 BTKY (1)	+++	Merah muda	Kuning
2 BTKY (1)	+	Merah muda	Biru
3 BTKY (1)	++	Merah muda	Kuning
4 BTKY (1)	+++	Merah muda	Kuning
4 BTKY (2)	++	Merah muda	Biru
5 BTKY (1)	++	Merah muda	Kuning
1 BTKY (1)	++	Merah muda	Kuning
2 BTKY (1)	++	Merah muda	Kuning
3 BTKY (1)	+++	Merah muda	Kuning
3 BTKY (1)	+	Merah muda	Biru
4 BTKY (1)	+++	Merah muda	Kuning
4 BTKY (2)	++	Merah muda	Kuning
5 BTKY (1)	+++	Merah muda	Kuning
6 BTKY (1)	+++	Merah muda	Kuning
6 BTKY (2)	+++	Merah muda	Kuning
7 BTKY (1)	+	Merah muda	Biru
8 BTKY (2)	++	Merah muda	Kuning

Keterangan: + = kurang subur, ++ = subur, +++ = sangat subur, CR = Congo Red, BTB = Brom Thymol Blue

S. Purwaningsih: Populasi Bakteri *Rhizobium* di Tanah pada beberapa Tanaman

Congo Red. Dari 49 isolat tersebut dalam media YEMA yang ditambah Brom Thymol Blue, 35 isolat termasuk dalam kelompok tumbuh cepat (*fast growing*) yang ditandai dengan perubahan warna menjadi kuning, sedangkan 14 isolat lainnya termasuk dalam kelompok tumbuh lambat (*slow growing*) yang ditandai perubahan warna menjadi biru.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa jumlah bakteri *Rhizobium*, pada daerah perakaran tanaman lebih banyak dibandingkan dengan sampel yang tidak ada tanaman (tanpa tanaman). Jumlah bakteri *Rhizobium* berkisar antara $7 - 115 \times 10^5$ CFU g^{-1} tanah, dan jumlah tertinggi pada perakaran tanaman ubi jalar (*Ipomea batatas*). Didapatkan 40 isolat murni, 35 isolat termasuk dalam kelompok tumbuh cepat, dan 14 isolat lainnya termasuk dalam kelompok tumbuh lambat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Pimpro dan Tolok Ukur Inventarisasi dan Karakterisasi Sumber Daya Hayati atas dukungannya, sehingga kegiatan ini dapat berjalan dengan baik. Ucapan terima kasih juga kepada Drs. Tahan Uji, Agus Sujadi dan Wardi yang telah membantu dalam pengambilan sampel tanah dari lapangan.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, M. 1977. Soil Microbiology. 2nd ed. John Wiley and Sons. Inc. New York. 472 p.
- Allen, O.N., and E. K. Allen. 1981. The Leguminosae. The University of Wisconsin. Press. Madison. 812 p.
- Anas, I., K. Widyastuti, A.A.I. Kesumadewi dan G. Kirana. 1998. Mikroba penambat nitrogen dan pelarut fosfat dari rhizosfer padi dan tanah rawa kawasan PLG satu juta hektar, Kalimantan Tengah. Prosiding Pertemuan Ilmiah Tahunan Permi, Bandar Lampung, 14-15 Desember 1998. h: 582-591.
- Gibson, A.H. 1981. Current Perspectives in Nitrogen Fixation. Proceeding of the fourth International Symposium on Nitrogen Fixation. Aust. Academy of Sci. Camberra, Australia, 1-5 Desember 1980. 534 p.
- James, E.K., F.L. Olivares, A.L.M. de Oliveira., F.B. dos Reis J.r., L.G. da Silva and V.M. Reis. 2001. Further observations on the interaction between sugarcane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse condition. J. Exp. Botany 52: 547-760.
- Kirchhof, G., V.M. Reis, J.L. Baldani., B. Eckert., J. Dobreiner., and A. Hartman. 1997. Occurrence, physiological, and molekuler analysis of endophitic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. Plant and Soil 194: 45-55.
- Lay, B.W. 1994. Analisis Mikroorganisme di Laboratorium. P.T. Raja Grafindo Persada. 168 h.
- Prayitno, J., J.J. Weinman., M.A. Djordjevic dan B.G. Rolfe. 2000. Pemanfaatan protein pendar hijau (Green Fluorescent Protein) untuk mempelajari kolonisasi Bakteri *Rhizobium*. Prosiding Seminar Nasional Biologi XVI. Institut Teknologi Bandung, Bandung, 26-27 Juli 2000. pp. 272-377.
- Saono, S. 1981. Mikrobiologi di Indonesia. Kumpulan Makalah Kongres Nasional Mikrobiologi III, Jakarta, 26-28 Nopember 1981. pp. 348-354.
- Saraswati, R dan D.N. Susilowati. 1999. *Rhizobium* dan pemanfaatannya sebagai pupuk hayati. Seminar sehari Workshop Peranan Culture Collection dan Preservasi Mikroorganisme. Jurusan FMIPA UI, Jakarta 8-9 Maret 1999. 13 h.
- Skerman, P.J. 1977. Tropical forage Legumes. F.A.O of the Uno. Rome. 609 p.
- Soekartadiredja, E.M. 1992. Perubahan Inefektivitas dan Efektivitas Penambatan pada galur *Rhizobium* setelah perlakuan pasasi in Vivo. Thesis. Univ. Padjadjaran. 231 h.
- Somasegaran, P and H.J. Hoben. 1984. Methods in legume *Rhizobium* Technology. University of Hawaii. NIFTAL. Project and Mircen. 387 p.
- Sprent, J.L. 1976. Symbiotic Nitrogen Fixation in Plant. P.S. Nutman (Ed). Combridge. Univ. Press. 584 p.
- Susilowati, D.N., Rosmimik, R. Saraswati., R.D.M. Simanungkalit dan L. Gunarto. 2003. Koleksi, Karakterisasi dan Preservasi Mikroba Penyubur Tanah dan Perombak Bahan Organik. Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman, Bogor, 23-24 September 2003. p. 85.
- Vincent. J.M. 1970. A Manual of the Practical study of the root Nodule Bacteria International Biological Programme. London. Handbook. No 15. 164 p.
- Waksman. S.A. 1952. Soil Microbiology. John Willey and Sons. Inc. New York. London. 345 p.