

Seleksi Biak *Rhizobium* dari Wonogiri, Jawa Tengah terhadap Pertumbuhan Tanaman Kedelai (*Glycine max* L.) pada Media Pasir Steril di Rumah Kaca

Selection of *Rhizobium* strain from Wonogiri, Central Java on the growth of soybean (*Glycine max* L.) on the sand sterile medium in greenhouse

SRI PURWANINGSIH*

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Bogor 16002

Diterima: 3 Maret 2005. Disetujui: 1 Mei 2005.

ABSTRACT

An experiment on the selection of *Rhizobium* strain from Wonogiri, Central Java on the growth of soybean (*Glycine max* L.) on the sand sterile medium in green house. The aim of the experiment the selection and potency of the *Rhizobium* strain to increase the growth of soybean. The experiment was carried out in green house condition in Microbiology Division, Research Center for Biology-LIPI with sterile sand medium. The research design was Completely Randomized Design with three replications for each treatment. The *Rhizobium* strains used were 1 W (isolated from bean, *Vigna radiata*), 2 W (isolated from soybean), 3 W (isolated from bean), 4 W (isolated from soybean), 5 W (isolated from soybean), 6 W (isolated from peanut, *Arachis hypogaea*), 7 W (isolated from peanut), 8 W (isolated from peanut), the controls were uninoculated with *Rhizobium* strain and without urea fertilizer (K_1), uninoculated and with urea fertilizer equal 100 kg/ha (K_2). The plants were harvested after 50 days, the variable of investigation were the dry weight of canopy, roots, nodules root, total plants, number of nodules and 'symbiotic capacity'. The results showed that all of experiment plant which be inoculated with *Rhizobium* able to form nodule. Strain of 2 W (isolated from soybean) has given the best effects on the growth of soybean.

© 2005 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

Key words: *Rhizobium* strain, *Glycine max* L., sand sterile.

PENDAHULUAN

Daerah Wonogiri merupakan kawasan lahan kering yang mempunyai tingkat curah hujan yang kurang/sedikit, keberhasilan budidaya kedelai di lahan kering tersebut sangat tergantung pada penguasaan teknologi yang mampu berpengaruh terhadap meningkatnya produksi kedelai. Terbatasnya ketersediaan air di dalam tanah, akan dapat menghambat serapan unsur hara oleh akar tanaman, proses fotosintesa dan proses fiksasi nitrogen oleh bintil akar yang pada akhirnya menyebabkan rendahnya produksi tanaman, terutama tanaman kacang-kacangan.

Kedelai (*Glycine max* L) merupakan salah satu tanaman budidaya dengan kandungan nutrisi yang tinggi, diantaranya mengandung protein 30-50% (Richard *et al.*, 1984). Kandungan protein yang tinggi memberi indikasi bahwa tanaman kedelai memerlukan hara nitrogen yang tinggi pula. Di Indonesia sampai saat ini produksi kedelai belum dapat memenuhi kebutuhan konsumen dalam negeri. Menurut Sumarno (1999) penyebab utamanya adalah luas areal panen belum memadai dan produktivitas masih rendah, selain itu juga karena teknik budidaya yang masih rendah, tingginya serangan hama dan penyakit, serta tingginya harga pupuk. Salah satu usaha untuk

meningkatkan produktivitas kedelai adalah dengan menggunakan inokulan *Rhizobium* sebagai pupuk hayati. Keuntungan menggunakan inokulan tersebut adalah dari sebagian N yang ditambat tetap berada dalam akar dan bintil akar yang terlepas ke dalam tanah, nitrogen tersebut akan dimanfaatkan jasad lain dan berakhir dalam bentuk ammonium dan nitrat. Apabila jasad tersebut mati maka akan terjadi pelapukan, amonifikasi dan nitrifikasi, sehingga sebagian dari N yang ditambat dari udara menjadi tersedia bagi tumbuhan itu sendiri dan tumbuhan lain di sekitarnya (Soepardi, 1983). Simarmata (1995) mengemukakan bahwa penggunaan berbagai pupuk hayati pada lahan marginal di Indonesia ternyata mampu meningkatkan ketersediaan hara dan hasil berbagai tanaman antara 20-100%, serta dapat menekan pemakaian pupuk buatan dan meningkatkan efisiensi pemupukan. Pasaribu *et al.* (1989) juga mengemukakan bahwa peningkatan hasil kedelai jelas terjadi dengan mengadakan inokulasi *Rhizobium japonicum*. Selain itu bakteri *Rhizobium* mempunyai dampak yang positif terhadap sifat fisik dan kimia tanah (Alexander, 1977), serta memiliki wawasan lingkungan.

Percobaan-percobaan terdahulu menunjukkan bahwa inokulasi pada tanaman kacang-kacangan memberikan peluang yang cukup besar untuk meningkatkan produksi kacang-kacangan tersebut baik kualitas maupun kuantitas, juga mengurangi penggunaan pupuk buatan (Singleton dan Taveres, 1986), namun dalam kehidupannya bakteri *Rhizobium* menunjukkan perbedaan kecocokan, baik terhadap varietas tanaman maupun lingkungan tempat tumbuh. Tingkat kecocokan suatu biak *Rhizobium* dapat

▼ Alamat korespondensi:

Jl. Ir. H. Juanda 18, Bogor 16002.
Tel.: +62-251-324006. Faks.: +62-251-325854
e-mail: novikur@yahoo.co.uk

terlihat dari kemampuan menginfeksi tanaman inang, kemampuan system simbiosis dalam menambat N udara serta tanggapan pertumbuhan tanaman inang (Usman, 1983; Yutono, 1985). Selain itu keberhasilan suatu galur inokulan yang diberikan juga tergantung pada kemampuannya berkompetisi dengan *Rhizobium* asli (indigenous) yang ada di dalam tanah, dan mempunyai kemampuan beradaptasi dengan lingkungan (Frederick, 1975). Oleh karena itu perlu dilakukan suatu usaha seleksi biak *Rhizobium* untuk mendapatkan biak *Rhizobium* yang efektif, efisien dan sekaligus mampu beradaptasi dengan lingkungan tempat tumbuhnya, sehingga diperoleh simbiosis yang optimal.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan biak *Rhizobium* terseleksi yang efektif dan efisien guna meningkatkan pertumbuhan tanaman kedelai.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di rumah kaca Bidang Mikrobiologi, Puslit Biologi-LIPI, pada tahun 2003/2004, dengan menggunakan media pasir steril, dalam pot-pot plastik berukuran 0,5 galon. Sebanyak 1,8 kg pasir steril sebagai media tumbuh. Biji kedelai dikecambahkan dahulu dalam petridish, setelah berkecambah diinokulasi dengan biak *Rhizobium*, didiamkan selama 2 jam, kemudian ditanam ke dalam pot percobaan, dan di atasnya ditambah pasir steril yang telah dicampur dengan parafin dan benzol (steril) setinggi 2 cm sebagai penutup biji yang ditanam.

Sebagai kontrol tanaman tanpa diinokulasi dan tanpa dipupuk N (K_1), dan tanaman tanpa diinokulasi dan ditambah pupuk N setara dengan 100 kg/ha (K_2). Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap dengan masing-masing perlakuan 3 kali ulangan. Untuk mempertahankan kelembaban (24%) dilakukan penyiraman setiap hari dengan menggunakan larutan hara tanpa N terikat seperti yang dilakukan oleh Saono dkk. (1976).

Tanaman dipanen pada umur 50 hari, variabel yang diamati meliputi bobot kering tajuk, akar, bintil akar, tanaman total, dan jumlah bintil, komponen tersebut dikeringkan dalam oven dengan suhu 105°C selama 24 jam. Analisis data dilakukan dengan uji Duncan pada level 5%. Untuk mengetahui kemampuan bersimbiose (Sc) biak-biak *Rhizobium* yang diinokulasikan dilakukan penetapan dengan menggunakan cara Brockwell dkk. (1965) sebagai berikut:

$$Sc = \frac{I - U}{N - U}$$

Sc = kemampuan bersimbiose.

I = rata-rata bobot kering tajuk tanaman yang diinokulasi.

U = rata-rata bobot kering tanaman tanpa diinokulasi dan tanpa N (K_1).

N = rata-rata bobot kering tanaman tanpa diinokulasi dan ditambah pupuk N (K_2).

Nilai Sc dibagi dalam 4 katagori yaitu: E (sangat efektif) jika $Sc > 0,67$, E (efektif) jika $0,33 < Sc < 0,67$, e⁻ (kurang efektif) jika $Sc < 0,33$, dan I (tidak efektif) jika $Sc < 0$.

Selain Sc , pengujian tingkat keefektifan ini dilakukan juga dengan membandingkan bobot kering tanaman total yang diuji dengan bobot kering tanaman kontrol dengan ditambah pupuk N (K_2) yang dinyatakan dengan persen seperti yang dikemukakan oleh Date (*dalam* Vincent, 1982).

Tabel 2. Komposisi larutan hara (10 L larutan A + 10 mL larutan B + 100 mL larutan C + 10 mL larutan D).

Larutan	Unsur yang dikandung	Jumlah
A (standar larutan calcium sulfur)	CaSO ₄ ·2H ₂ O	2,5 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,5 g
	Akuades steril	10 L
B (standar larutan ferric citrate)	Ferric citrate	30 g
	Akuades steril	1 L
C (standar larutan Fosfat)	KH ₂ PO ₄	30 g
	KOH	1,96 g
	Akuades steril	1 L
D (standar larutan trace element)	MnSO ₄ ·H ₂ O	1 g
	ZnSO ₄ ·5H ₂ O	0,25 g
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,25 g
	NaMoO ₂ ·2H ₂ O	0,06 g
	H ₃ BO ₃	0,50 g
	CaCl ₂ ·6H ₂ O	0,05 g
	Akuades steril	1 L

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa biak-biak *Rhizobium* yang diinokulasikan terhadap tanaman kedelai semuanya mampu membentuk bintil akar, hal ini menunjukkan bahwa biak tersebut dapat bersimbiose secara efektif dengan tanaman kedelai, yang ditandai dengan pertumbuhan vegetatif lebih bagus dibandingkan dengan tanaman kontrol tanpa diinokulasi dan tanpa dipupuk N (K_1). Seperti yang dilaporkan oleh Demezas dan Bottomley (1986) bahwa kemampuan simbiosis yang efektif diketahui bahwa biak *Rhizobium* yang diinokulasikan mampu membentuk bintil akar, yang berarti pengikatan nitrogennya berjalan dengan baik.

Table 1. Hasil isolasi nomor biak yang digunakan dari daerah Wonogiri, Jawa Tengah.

No. biak	Tanaman	Diskripsi			
		Asal daerah	Warna	Pertumbuhan	Kelompok (warna koloni)
1 W	Kacang hijau	Talun Ombo	Putih	Lebat	Tumbuh lambat (biru)
2 W	Kedelai	Puwun	Kekuningan	Sangat lebat	Tumbuh cepat (kuning)
3 W	Kacang hijau	Juwangi	Kekuningan	Sangat lebat	Tumbuh cepat (kuning)
4 W	Kedelai	Dringo	Kekuningan	Sangat lebat	Tumbuh cepat (kuning)
5 W	Kedelai	Juwangi	Kekuningan	Sangat lebat	Tumbuh cepat (kuning)
6 W	Kacang tanah	Talun Ombo	Putih	Lebat	Tumbuh lambat (biru)
7 W	Kacang tanah	Dringo	Kekuningan	Sangat lebat	Tumbuh cepat (kuning)
8 W	Kacang tanah	Puwun	Kekuningan	Sangat lebat	Tumbuh cepat (kuning)

Dilihat dari masing-masing variabel yang diamati menunjukkan bahwa untuk bobot kering tajuk nilai tertinggi pada tanaman yang diinokulasi dengan biak No 1 W (isolat dari kacang hijau), mengalami peningkatan sebesar 57,39% dibandingkan dengan tanaman tanpa diinokulasi dan tanpa N (K_1), untuk bobot kering akar nilai tertinggi pada tanaman yang diinokulasi dengan biak No 2 W (isolat dari kedelai) mengalami peningkatan sebesar 89,18% dibandingkan dengan tanaman tanpa diinokulasi dan tanpa N (K_1), dan untuk bobot kering tanaman total nilai tertinggi pada tanaman yang diinokulasi dengan biak No 2 W (isolat dari kedelai) mengalami peningkatan sebesar 56,08% dibandingkan dengan tanaman tanpa diinokulasi dan tanpa N (K_1). Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa untuk semua variabel pertumbuhan yang diamati terdapat perbedaan yang nyata antar biak, hal ini menunjukkan bahwa biak tersebut mempunyai kemampuan simbiosis yang efektif yang mana mampu menambat nitrogen dari udara secara maksimal, yang mengakibatkan pertumbuhan tanaman lebih baik. Pasaribu dkk. (1983) mengemukakan bahwa simbiosis yang efektif dan efisien akan menghasilkan N tertambat yang tinggi, dimana N dapat digunakan oleh tanaman untuk tumbuh dan berkembang, sehingga pertumbuhannya akan menjadi lebih baik.

Dari keseluruhan variabel yang diamati menunjukkan bahwa dari 8 biak *Rhizobium* yang diinokulasikan memberikan hasil pertumbuhan yang sangat bervariasi, tetapi apabila dibandingkan dengan tanaman yang tidak diinokulasi (K_1) terjadi kenaikan pertumbuhan, hal ini berarti bahwa ada kecocokan/keserasian antara biak yang diinokulasikan dengan tanaman inang.

Tabel 3. Nilai rata-rata bobot kering tajuk (BKT), akar (BKA), bintil akar (BKBA), dan tanaman total (BKTT) tanaman kedelai yang diinokulasi dengan biak-biak *Rhizobium*.

Perlakuan	BKT	BKA	BKBA	BKTT
1 W	3,51 ^c	0,31 ^{abc}	0,1405 ^b	4,0539 ^c
2 W	3,40 ^c	0,70 ^e	0,3608 ^c	4,0582 ^c
3 W	2,38 ^c	0,51 ^{cd}	0,0594 ^a	3,1443 ^{ab}
4 W	2,90 ^{bc}	0,42 ^{abc}	0,1501 ^b	3,4796 ^{bc}
5 W	3,18 ^c	0,37 ^{ab}	0,1153 ^b	3,6692 ^{bc}
6 W	3,23 ^a	0,42 ^{abc}	0,1335 ^b	3,8002 ^{bc}
7 W	2,94 ^c	0,31 ^a	0,1165 ^b	3,3672 ^b
8 W	3,06 ^c	0,60 ^{cd}	0,1340 ^b	3,7997 ^{bc}
K_1 (tanpa N)	2,23 ^a	0,37 ^{ab}	0	2,6000 ^a
K_2 (+N)	5,72 ^d	0,89 ^f	0	6,6100 ^d
BNT 5%	0,65	0,15	0,0424	1,6681

Tabel 4. Pembintilan, nilai kapasitas simbiosis dan persentase keefektifan (PK) biak *Rhizobium* yang diinokulasikan terhadap tanaman kedelai (umur 50 hari).

Perlakuan	Pembintilan	Jumlah bintil	Kapasitas simbiosis (nilai riil) (nilai nisbi)	PK (%)	
1 W	+	35,33 ^d	e	0,36	61,32
2 W	+	18,33 ^{abc}	e	0,34	61,39
3 W	+	13,66 ^{ab}	e ⁻	0,04	47,56
4 W	+	13,00 ^a	e ⁻	0,19	52,64
5 W	+	19,00 ^{abc}	e ⁻	0,27	55,50
6 W	+	39,33 ^d	e ⁻	0,28	57,49
7 W	+	23,33 ^c	e ⁻	0,20	50,94
8 W	+	13,00 ^a	e ⁻	0,23	57,48
K_1 (tanpa N)	-	0	0	0	0
K_2 (+N)	-	0	0	0	0

Tabel 5. Nilai rata-rata tertinggi dan persentase peningkatan hasil pertumbuhan tanaman kedelai yang diinokulasi dengan biak *Rhizobium*.

Parameter	No. biak (yang tertinggi)(g)	% peningkatan *)
BKT (umur 50 hari)	1 W (3,51)	57,39
BKA (umur 50 hari)	2 W (0,70)	89,18
BKBA (umur 50 hari)	2 W (0,3608)	0
BKTT (umur 50 hari)	2 W (4,0582)	56,08
JB (umur 50 hari)	7 W (39,33)	0

Keterangan: *) % peningkatan = $((K_n - K_1):K_1) \times 100\%$; K_n = pengukuran hasil tanaman yang diinokulasi; K_1 = pengukuran hasil tanaman tanpa diinokulasi.

Sumarno dan Harnoto (1983) mengemukakan bahwa inokulasi akan berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan dan hasil apabila inokulan yang diberikan mampu bersaing dengan mikroba asli tanah dan inokulan tersebut merupakan inokulan yang efektif dan efisien terhadap tanaman, serta mempunyai keserasian dengan tanaman inangnya, dan Freire (1977) menambahkan bahwa teknik dan waktu inokulasi juga sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan dan hasil panen, Setiap biak mempunyai kemampuan yang berbeda dalam penyesuaian serta kemampuan bersaing dengan mikroba setempat.

Ke delapan biak *Rhizobium* yang diinokulasikan terhadap tanaman kedelai menunjukkan bahwa kemampuan bersimbiose biak No 1 W dan 2 W menunjukkan nilai Sc yang efektif dan biak No 3 W, 4 W, 5 W, 6 W, 7 W, dan 8 W menunjukkan kurang efektif. Dari hasil pengujian kemampuan bersimbiose dapat diambil kesimpulan bahwa walaupun biak-biak tersebut yang diinokulasikan mampu menginfeksi suatu akar tanaman, belum tentu biak tersebut efektif terhadap tanaman itu (kedelai). Seperti dikemukakan Usman (1983) bahwa suatu bakteri yang dapat menginfeksi tanaman inang tertentu tidak selalu efektif. Banyak jenis *Rhizobium* yang cukup dan sangat efektif atau tidak efektif sama sekali melainkan biak tersebut mempunyai sifat infeksi, namun tidak selalu sanggup membentuk bintil akar efektif penuh, namun dapat membentuk bintil akar efektif parsial, sehingga hasil penambatan nitrogennya tidak cukup untuk memenuhi kebutuhan N tanaman inangnya.

Persentase keefektifan biak *Rhizobium* yang diinokulasikan tertinggi pada tanaman yang diinokulasi dengan biak No 2 W (isolat dari tanaman kedelai), kemudian diikuti pada tanaman yang diinokulasi dengan biak No 1 W, 6 W, 8 W, 5 W, 4 W, 7 W dan 4 W. Persentase keefektifan ini sangat bervariasi tergantung dari keefektifan dari masing-masing biak yang diinokulasikan dan kecocokan terhadap tanaman inang, apabila terjadi kecocokan antara biak dengan tanaman inang akan terjadi simbiosis yang efektif. Seperti misalnya isolat yang berasal dari tanaman kedelai menghasilkan pertumbuhan tanaman lebih baik dibandingkan pada tanaman yang diinokulasi dengan isolat yang berasal dari tanaman kacang hijau. Simbiosis antara strain-strain *Rhizobium* dengan spesies leguminosa terdapat perbedaan dalam keserasiannya, bahkan perbedaan dalam hubungan simbiosis itu terdapat antara strain-strain *Rhizobium* dengan varietas tanaman leguminosa. Hubungan yang serasi menghasilkan bintil akar yang sangat efektif dalam menambat N udara (Yutono, 1985). Selain itu faktor lingkungan dan fisiologi juga sangat berpengaruh. Gibson (1981) mengemukakan bahwa pembentukan bintil akar yang baik dari hasil penambatan N pada akar tanaman legume merupakan suatu rangkaian

yang kompleks dari proses fisiologi yang meliputi interaksi antara tanaman inang dengan biak yang diinokulasikan.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa semua biak yang diinokulasikan mampu membentuk bintil akar, tetapi tidak semua biak efektif untuk tanaman kedelai. Hasil terbaik diperlihatkan oleh biak No. 2 W (isolat dari tanaman kedelai dari Desa Puwun). Biak tersebut dapat dikembangkan sebagai inokulan pupuk hayati untuk tanaman kedelai.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander. M., 1977. *Soil Microbiology*. 2nd edition. New York: John Wiley and Sons Inc.
- Brockwell, J.F., W. Hely, and C.A. Neal-Smith. 1965. Some Symbiotic as effective field nodulation of *Lobus hipidus*. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* 6 (23): 365-370.
- Demezas. D.H and P.J. Bottomley. 1986. Autecology in Rhizospheres and Nodulating Behavior of Indigenous *Rhizobium trifolii*. *Applied and Environmental Microbiology* 52 (4-6): 1014-1019.
- Frederick.L.R. 1975. Soybean inoculation. In. R.M. Goodman (ed) *Expanding the Use of Soybean*. Intern. Agronomy Publication College of Agriculture University of Illinois, Urbana Campaign.
- Freire, J.R.J., 1977. Inoculation of Soybean. In. Vincent, J.M., A.S. Whitney, and J. Bose (eds.). *Exploiting the legume Rhizobium symbiosis in tropical agriculture*. College of Tropical Agriculture Miscellaneous Publication 145. Hawaii: Departement of Agronomy and Soil Science. University of Hawaii.
- Gibson. A.H. 1981. Current Perspectives in nitrogen fixation. *Proceedings of the Fourth International Symposium on Nitrogen Fixation*. Australian Academy of Science. Camberra, Australia. 1-5 December 1980. 534 p.
- Pasaribu. D., N. Sunarlim, Sumarno, Y. Supriati, R. Saraswati, P. Sutjipto, and S. Karana. 1989. Penelitian Inokulasi *Rhizobium* di Indonesia. Dalam Syam, M., Rusdi, dan A. Widjono. *Risalah Penelitian Penambatan Nitrogen Secara Hayati pada Kacang-kacangan*. Pusat Penelitian Tanaman Pangan, Departemen Pertanian-Pusat Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi-LIPI, Bogor, 30-31 Agustus 1988.
- Pasaribu. D., N. Sunarlim, M. Fathan, M. Sudjadi, Hartono, dan L. Sumarsono. 1983. *Maksimalisasi hasil Kedelai di Wonosari-Yogyakarta. Identifikasi Komponen dan Paket Teknologi Kacang-kacangan pada Lahan Tegalan*. Bogor: Balai Penelitian Tanaman Pangan.
- Richard. J.D., J.G. Louis, and Henry. 1984. *Soybeans Crop Production*. 5th edition. Englewood Cliffs, N.J.: Practice Hall. Inc.
- Saono, S., H. Karsono, and D. Suseno. 1976. Studies on the effect of different rhizobial strains on *Phaseolus lunatus* in sand culture. *Annales Bogoriense* 6 (2): 143-154.
- Simarmata, T. 1995. *Strategi Pemanfaatan Mikroba Tanah (Pupuk Biologi) dalam era Bioteknologi untuk Meningkatkan Produktivitas Lahan Marginal di Indonesia menuju Pertanian Berwawasan Lingkungan*. Bandung: Fakultas Pertanian UNPAD.
- Singleton, P.W., and J.W. Taveres. 1986. Inoculation response of legumes in relation to the number and effectiveness of indigen *Rhizobium* population. *Applied and Environmental Microbiology* 51 (6): 1013-1018.
- Soepardi, G. 1983. *Sifat dan Ciri Tanah 2*. Bogor: Jurusan Ilmu Tanah, Fakultas Pertanian, IPB.
- Sumarno dan Harnoto. 1983. Kedelai dan cara Bercocok Tanamnya.. *Bulletin Teknik Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan* 6: 1-63.
- Sumarno, 1999. Strategi pengembangan produksi kedelai nasional mendukung Gema Palagung 2001. Dalam: N. Sunarlim, D. Pasaribu, dan Sunihardi (ed.). *Strategi Pengembangan Kedelai. Prosiding Lokakarya Pengembangan Produksi Kedelai Nasional*. Puslitbangtan, Bogor, 16 Maret 1999. h: 7-13.
- Usman. R., 1983. *Penelitian Mengenai Isolasi, Media Pemiakan serta Metode Pengelompokan Spesies Rhizobium*. [Disertasi S-3]. Bandung: Universitas Padjadjaran. 360 h.
- Vincent. J.M., 1982. *Nitrogen Fixation in Legumes*. Sidney: Academic Press.
- Yutono. 1985. Inokulasi *Rhizobium* pada kedelai. Dalam Somaatmadja, S., M. Ismunaji, Sumarno, M. Syam., S.O. Manurung, dan Yuswadi (eds). *Kedelai*. Bogor: Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Puslitbangtan.