Hayati, Juni 1995, hlm. 74-79
ISSN 0854-8587

Vol. 2, No. 2

Seleksi Galur *Bradyrhizobium japonicum* Indigenos Toleran Media Asam-Aluminium

(Screening of Indigenous Strains of Bradyrhizobium japonicum for Tolerance to Acid-Aluminium Media)

TANTRI ENDARINI, ARIS TRI WAHYUDI DAN TEDJA IMAS*

Jurusan Biologi FMIPA IPB, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144

Diterima 19 Oktober 1995 / Disetujui 6 Desember 1996

Twenty five indigenous strains of *Bradyrhizobium japonicum* were screened employing acid-Aluminium media, in which 50 µM Al(K Al $(SO_4)_2.12H_2O$) was added and pH adjusted to pH 4.5. Nine strains which are acid tolerance grew well with compact colonies after 10 days of incubation. The selected strains, which were able to grow in Keyser-Munns media containing 50 µM Al, 200 µM Mn, 50 µM Ca, 5 µM P and pH 4.5, showed an extended lag phase. Only two of them were able to reach an optical density of 10^6-10^7 cells/ml in less than two weeks. Those two strains designated as tolerant to acid and aluminium were able to rise the pH of growth media as well as to produce ammonium as an alternative way to overcome toxicity of the stress media.

PENDAHULUAN

Peningkatan produksi kedelai dewasa ini lebih mengarah ke daerah dengan tanah yang kurang subur di antaranya tanah dengan keasaman tinggi sehingga memerlukan penanganan yang lebih intensif. Kedelai yang merupakan produk pertanian yang sedang dikembangkan memiliki permasalahan bila ditumbuhkan pada tanah masam (Baharsjah *et al.*, 1985).

Bakteri bintil akar sebagai simbion kedelai tumbuh optimum pada pH 6-7 tetapi beberapa galur di antaranya mampu tumbuh pada pH 4.5 (Jordan, 1984). Media asam dapat memperpanjang fase lag, menurunkan laju pertumbuhan dan frekuensi pembelahan sel bakteri bintil akar (Keyser dan Munns, 1979a dan b). Seleksi terhadap bakteri bintil akar toleran asam dapat dilakukan mengingat sifat toleransi pada media asam bersifat konsisten dan stabil (Munns dan Keyser, 1981). Dilaporkan pula, galur toleran asam adalah galur yang secara genetik toleran atau galur yang telah mengalami proses adaptasi fisiologi sehingga menjadi galur yang toleran asam (Keyser dan Munns, 1979a).

Penelitian ini bertujuan untuk menyeleksi galur *Bradyrhizobium japonicum* asli Majalengka yang toleran pH 4.5 dan konsentrasi Al tinggi pada media agar dan media kaldu yang mengandung Mn tinggi, Ca rendah dan P rendah. Selanjutnya ingin diketahui pula keterkaitan galur toleran asam-Al dengan produksi amonium.

BAHAN DAN METODE

Sumber Galur. Galur yang diuji adalah 25 galur *Bradyrhizobium japonicum* yang diisolasi dari daerah Majalengka. Galur ini disimpan pada media agar-agar miring Manitol Ekstrak Khamir (MEK) pada suhu 4 °C.

Peremajaan Galur. Galur *B. japonicum* diremajakan pada media agar-agar MEK (modifikasi Vincent, 1970) ditambah merah kongo 0.0025%. Kemudian koloni tunggal yang terbentuk dipindahkan ke dua tabung agar-agar miring MEK untuk biakan kerja dan biakan simpan.

Sebanyak satu lup biakan murni dipindahkan ke dalam lima mililiter media kaldu MEK dan diinkubasi pada suhu 28 °C di atas alat kocok 140 rpm yang diatur penggoyangannya satu jam sekali selama lima hari. Suspensi bakteri yang akan digunakan diencerkan dalam garam fisiologi steril sesuai dengan kepekatan yang dibutuhkan.

Seleksi Galur Uji pada Media Agar-agar Asam-Al Ayanaba. Media dibuat sesuai dengan komposisi Ayanaba *et al.*, (1983). Tiga media yang digunakan berturut-turut ialah (i) media kontrol (LP = *Low* P) dengan pH 6-7, (ii) media asam (AS) dengan pH 4.5 dan (iii) media asam-Al (AL) dengan pH 4.5 yang ditambahi 50 uM Al. Penambahan NaOH atau HCl untuk penetapan pH media LP, AS dan AL dilakukan sebelum dan setelah sterilisasi pada suhu 50 °C dengan bantuan pH meter digital tipe Horiba F.81.

Penggunaan indikator ungu bromkresol (BCP) 0.005% pada media LP dan indikator hijau bromkresol (BCG) 0.005% pada media AS dan AL digunakan untuk mendeteksi perubahan pH media akibat pertumbuhan bakteri.

Suspensi galur uji dalam kaldu MEK yang berumur lima hari dengan kepekatan 10^9 sel/ml RO = 0.43 (Trihadi, 1991) diteteskan masing-masing sebanyak 0.5 µl menggunakan mikropipet di atas media agar-agar LP, AS, dan AL. Setiap media cawan dibagi menjadi beberapa juring dan setiap juring ditetesi satu suspensi galur yang berbeda (duplo). Inkubasi dilakukan dalam ruang gelap pada suhu 28 °C.

* Penulis untuk korespondensi

Pertumbuhan koloni diamati setiap hari selama 10-25 hari. Tingkat toleransi galur terhadap media asam-Al dikelompokkan berdasarkan penampakan koloni pada media AS dan AL (Tabel 1).

Tabel 1. Penetapan Tingkat Toleransi Galur pada Media Asam-Al Ayanaba

Tingkat Toleransi	Media Asam pH 4.5	Media Agar-agar AL pH 4.5 + 50 uM Al	Skor
Toleran	kuat	kuat	3
Agak toleran	kuat	kurang kuat	2
Agak toleran	kurang kuat	kurang kuat	2
Sensitif	lemah	lemah	1
Sangat sensitif	sangat lemah	sangat lemah	0

Galur toleran dengan skor 3, diuji kemampuan hidupnya dalam media kaldu Keyser dan Munns (1979a).

Galur *B. japonicum* Toleran Asam-Al Seleksi Galur Toleran Asam pada Media Kaldu Keyser dan Munns. Media kaldu dibuat sesuai dengan komposisi Keyser dan Munns (1979a). Dua macam media yang digunakan yaitu (i) media kontrol (K) pH 4.5 dan nutrien lengkap yang mengandung 300 µM Ca dan 1000 µM P dan (ii) media perlakuan (P) adalah media dasar dengan pH 4.5 ditambah faktor-faktor keasaman 50 µM Al, 200 µM Mn, 50 µM Ca dan 5 µM P.

Suspensi galur uji dari kaldu MEK berumur 5 hari dengan kepekatan 10^6 sel/ml RO = 0.12 (Trihadi, 1991) dipipet sebanyak 2 % v/v ke dalam 150 ml media kaldu Keyser dan Munns (triplo). Inkubasi dilakukan di atas alat kocok 140 rpm yang diatur penggoyangannya satu jam sekali pada suhu 28 °C. Pengukuran pH media kaldu dilakukan setiap dua hari selama 25 hari menggunakan pH meter digital dan kerapatan populasi pada panjang gelombang 470 nm (Ayanaba *et al.*, 1983).

Toleransi Galur Uji pada Media Kaldu Ayanaba dan Produksi Amonium. Media yang digunakan dalam tahap ini ialah (i) media kaldu LP dan (ii) media kaldu AL, sesuai komposisi Ayanaba *et al.* (1983). Suspensi galur uji dari kaldu MEK berumur lima hari diinokulasikan sebanyak 2% v/v dengan kepekatan 10^3 sel/ml, RO=0.05 (Trihadi, 1991) ke dalam media kaldu Ayanaba (triplo). Inkubasi dilakukan di atas alat kocok 140 rpm yang diatur penggoyangannya satu jam sekali pada suhu 28 °C. Pengamatan dilakukan setiap lima hari sekali selama 25 hari meliputi pengukuran pH dan kerapatan populasi (470 nm). Demikian pula penetapan konsentrasi NH_4^+ dikerjakan menggunakan metode Biru Indofenol (Keeney dan Nelson, 1982).

HASIL

Seleksi Koloni Galur Toleran Asam-AL. Pertumbuhan koloni galur uji pada media kontrol pH 7.0 menunjukkan penampakan yang berbeda-beda (Tabel 2). Sebanyak 11 galur (44%) menunjukkan penampakan koloni yang kuat diikuti perubahan warna indikator BCP dari ungu menjadi kuning dalam waktu 10 hari. Galur yang pertumbuhannya kuat tetapi tidak mengubah indikator menjadi kuning dalam jangka waktu 10 hari, berjumlah 10 galur (40%). Galur ini dapat mengubah warna indikator setelah lebih dari 10 hari. Galur yang pertumbuhannya kurang kuat pada media LP sebanyak 4 galur (16%), juga mampu mengubah warna indikator namun dalam waktu yang lebih lama.

Tabel 2. Penampakan Koloni Galur Uji dan Perubahan Warna Indikator BCP (0,0025%) pada Media LP pH 7.0 dalam Kondisi Gelap dan Suhu 28°C Selama Sepuluh Hari

Sandi Galur Uji	Penampakan Koloni	Perubahan Warna Indikator (hari ke-)
06,36	kuat	6
23	kuat	7
07,10	kuat	8
01,03,11,12,14	kuat	9
34	kuat	10
18,19,21,25,26,27,33,37,39,50	kuat	tidak berubah
41,44,46,47	kurang kuat	tidak berubah

Seleksi koloni pada media AS (pH 4.5) menghasilkan 16 (64%) galur toleran dengan penampakan koloni kuat, 4 galur (16%) kurang kuat, 3 galur (12%) lemah dan 2 galur (8%) sangat lemah (Tabel 3).

Tabel 3. Penampakan Koloni Galur Uji pada Media AS (asam) pH 4.5 dalam Kondisi Gelap dan Suhu 28°C

Sandi Galur Uji	Penampakan Koloni (hari ke-10)	Jumlah
01, 03, 06, 11, 12, 14, 19, 23, 25, 26, 27, 33, 36, 37, 39, 44	kuat	16
07, 34, 41, 46	kurang kuat	4
10, 18, 47	lemah	3
21, 50	sangat lemah	2

Dari 16 galur toleran media AS (pH 4.5) dihasilkan 9 galur (36%), yang toleran pada media asam (pH 4.5) ditambah 50 µM Al. Sebanyak 11 galur (44%) memperlihatkan penampakan koloni kurang kuat, 3 galur (12%) lemah dan 2 galur (8%) galur sangat lemah (Tabel 4).

Tabel 4. Penampakan Koloni Galur Uji pada Media AL (pH 4.5 50 µM Al), dalam Kondisi Gelap dan Suhu 28 °C

Sandi Galur Uji	Penampakan Koloni (hari ke-10)	Jumlah
01, 06, 11, 12, 14, 25, 33, 36, 37	kuat	9
03, 07, 19, 34, 39, 23, 26, 27, 41, 44, 46	kurang kuat	11
10, 18, 47	lemah	3
21, 50	sangat lemah	2

Tingkat toleransi ditentukan berdasarkan penampakan koloni galur uji pada media AS dan AL seperti tampak pada

Tabel 5. Galur dengan koloni tampak kuat pada media AS dan AL dikategorikan galur toleran (skor 3). Sedangkan galur dengan koloni tampak kuat dan kurang kuat pada media AS tetapi kurang kuat pada media AL dikategorikan agak toleran (skor 2). Galur dengan koloni tampak lemah pada kedua media AS dan AL dikategorikan sensitif, sedangkan galur yang sangat sensitif menunjukkan penampakan koloni sangat lemah pada kedua media.

Tabel 5. Tingkat Toleransi Galur Uji pada Media Agar AS dan AL Ayanaba *et al.*

Sandi Galur Uji	Media AS	Media AL	Skor	Jumlah
01, 06, 11, 12, 14, 25, 33, 36, 37	kuat	kuat	3	9
03, 19, 23, 26, 27, 39, 44	kuat	kurang kuat	2	11
07, 34, 41, 46	kurang kuat	kurang kuat		
10, 18, 47	lemah	lemah	1	3
21, 50	sangat lemah	sangat lemah	0	2

Ketahanan Hidup Galur Uji dalam Media Kaldu Asam-Al dan Produksi Amonium. Pola pertumbuhan galur uji pada media K dan P dapat dilihat pada Gambar 1. Kedua galur menunjukkan perpanjangan fase lag baik pertumbuhan dalam media K maupun P. Namun perpanjangan fase lag tersebut secara nyata terlihat dalam media P. Galur 33 memperlihatkan pertumbuhan yang cenderung meningkat pada media P dengan laju yang lebih lambat dibandingkan pertumbuhannya pada media K. Sedangkan galur 01 memperlihatkan kurva pertumbuhan yang cenderung mendatar saja pada media P.

Pertumbuhan galur 11 pada media kaldu LP (pH 7.0) memperlihatkan laju pertumbuhan yang pesat, kepekatan populasi 10^8-10^9 sel/ml (RO = 0.43) dapat dicapai dalam waktu 240 jam. Galur 07 mampu mencapai kepekatan ± 10^7-10^8 sel/ml (RO = 0.13) dalam waktu 120 jam sedangkan galur 18 hingga akhir pengamatan hanya mencapai kepekatan kurang dari 10^3 sel/ml (RO = 0.05).

Pada media AL galur 11 mampu mencapai kepekatan 10^6-10^7 sel/ml pada jam ke-360, galur 07 tidak mampu mencapai kepekatan dengan tingkat kekeruhan yang terdeteksi ($<10^3$ sel/ml) sampai akhir pengamatan, sedangkan galur 18, tampaknya tidak memperlihatkan pertumbuhan

Kurva yang memperlihatkan pertumbuhan galur toleran, agak toleran dan sensitif selama pengamatan berlangsung dapat dilihat pada Gambar 2. Tingkat pertumbuhan masing-masing galur pada media kaldu LP lebih tinggi dibandingkan pertumbuhannya pada media kaldu AL. Pertumbuhan galur toleran pada media kaldu LP dan AL lebih tinggi dibandingkan pertumbuhan galur agak toleran dan sensitif. Pertumbuhan ketiga galur diikuti perubahan pH media mulai jam ke-120. (data tidak ditampilkan).

Sementara itu produksi amonium juga memperlihatkan hasil yang berbeda-beda untuk setiap galur uji (Tabel 6).

Tabel 6. Jumlah Amonium yang Dihasilkan Galur Toleran (T), Agak Toleran (I) dan Sensitif (S) pada Media LP dan AL

Waktu (jam)	Jumlah Amonium (g/ml)					
	Media LP			Media AL		
	G 11	G 07	G 18	G 11	G 07	G 8
2	31.20	31.20	31.20	TT	TT	TT
120	156.00	93.60	31.20	22.28	TT	4.46
240	405.60	218.39	13.37	31.20	4.45	13.37
360	138.17	75.77	13.37	66.86	31.20	13.37
480	343.19	111.43	TT	405.59	102.51	22.28
600	316.45	156.00	13.37	289.71	111.43	22.28

TT = Tidak Terdeteksi

PEMBAHASAN

Pengamatan pada media LP memperlihatkan bahwa seluruh galur uji menghasilkan produk metabolisme yang bereaksi asam. Hal ini sesuai dengan pernyataan Munns dan Keyser (1981).

Penampakan koloni yang kuat dan kurang kuat pada media LP diduga karena perbedaan kemampuan galur uji dalam memanfaatkan P rendah (5 µM P) secara efisien. Cassman *et al.* (1981b) menyatakan bahwa galur bakteri bintil akar memiliki kemampuan yang berbeda-beda dalam memanfaatkan P rendah secara efisien. Galur yang menampakkan koloni kuat diduga memiliki kemampuan yang lebih efisien dalam memanfaatkan P rendah dibandingkan galur yang menampakkan koloni kurang kuat.

Pengamatan pada media AS menunjukkan bahwa *B. japonicum* masih mampu tumbuh pada pH media 4.5. Keyser dan Munns (1979a) menyatakan bahwa keasaman (pH 4.8) hanya sedikit menghambat pertumbuhan populasi bakteri bintil akar tumbuh lambat. Jordan (1984) menambahkan bahwa *B. japonicum* biasanya toleran asam (pH 4.5), bahkan 30% dari galur-galur yang diteliti toleran pada pH 4.0.

Berkaitan dengan ini O'Hara *et al.* (1989) menyatakan bahwa galur yang toleran asam memiliki pengaturan pH sitoplasma yang lebih efisien dibandingkan galur sensitif. Galur toleran asam (pH 5.6) memiliki kemampuan untuk memelihara kestabilan dan mengatur pH internal (pHi) mendekati basa pada saat pH eksternal (pHe) menurun, sedangkan galur sensitif memiliki kemampuan yang terbatas untuk mengatur pHi tersebut.

Dari 16 galur yang tumbuh pada media AS, hanya ada 9 galur yang toleran media AL. Hal ini menunjukkan bahwa galur toleran asam belum tentu toleran asam-Al. Keyser dan Munns (1979b) mengemukakan bahwa galur yang toleran pada media asam tidak selalu toleran pada media asam yang dibubuhi dengan konsentrasi Al tinggi. Hal ini mungkin disebabkan karena Al lebih bersifat menghambat atau bahkan dapat menghentikan pertumbuhan bakteri.

Galur toleran (skor 3) pada media agar AL (pH 4.5 + 50 µM Al) mampu tumbuh pada media kaldu Keyser dan Munns pH 4.5 dengan nutrien lengkap atau media kontrol (K), karena dapat mencapai kepekatan lebih besar dari 10^7 sel/ml (RO = 0.13) dalam waktu kurang dari dua minggu. Taylor *et al.* (1991) menyatakan bahwa kepadatan sel yang menunjukkan tingkat kekeruhan yang nyata (*visible turbidity*) dapat digunakan untuk menggolongkan galur yang toleran asam. Galur uji 01 dan 33 mampu mencapai kekeruhan yang terdeteksi, yaitu 10^7 sel/ml dalam kisaran waktu 123-265 jam (Gambar 1). Hasil ini memenuhi persyaratan yang dikemukakan oleh Wood dan Cooper (1985).

Pada awal fase pertumbuhan selalu dijumpai fase lag yang panjang. Berkaitan dengan ini Taylor *et al.* (1991) melaporkan bahwa keasaman secara nyata dapat memperpanjang fase lag sehingga mempengaruhi pertumbuhan selanjutnya dan mengakibatkan penurunan jumlah sel terutama pada awal fase pertumbuhan.

Apabila kepadatan populasi mencapai lebih dari 10^7 sel/ml maka peningkatan pertumbuhan akan diikuti dengan peningkatan pH media (Keyser dan Munns, 1979a dan b). Peningkatan pH media kontrol (K) pada saat kepadatan populasi tersebut dicapai berkisar antara 5.00-6.45. Hal ini menunjukkan bahwa produk metabolit yang dihasilkan pada media K yang mengandung manitol bersifat basa, hasil ini sesuai dengan pendapat Jordan (1984).

Pertumbuhan galur uji pada media kaldu asam dengan faktor-faktor keasaman (50 µM Al, 200 µM Mn, 50 µM Ca dan 5 µM P) menunjukkan perilaku yang berbeda-beda. Galur yang pertumbuhannya cenderung meningkat yaitu galur 33. Galur ini mencapai kepekatan 10^6 sel/ml dalam waktu kurang dari 336 jam (171 jam) pada pH media 4.66. Keasaman media tersebut masih tergolong tinggi. Dengan kata lain, galur tersebut toleran pada media kaldu dengan keasaman tinggi dan faktor-faktor keasaman.

Pertumbuhan pada media kaldu Ayanaba *et al.* (1983) menunjukkan perilaku galur yang toleran (11), agak toleran (07) dan sensitif (18). Media kaldu LP yang mengandung konsentrasi P sebesar 5 µM P kurang menghambat pertumbuhan bakteri bintil akar. Hal ini disebabkan bakteri tersebut mampu memanfaatkan kadar P rendah walaupun dengan tingkat efisiensi yang berbeda-beda (Cassman *et al.*, 1981b). Thornton dan Davey (1983) melaporkan, penghambatan terlihat nyata apabila media mengandung 1 µM P pada pH 4.2.

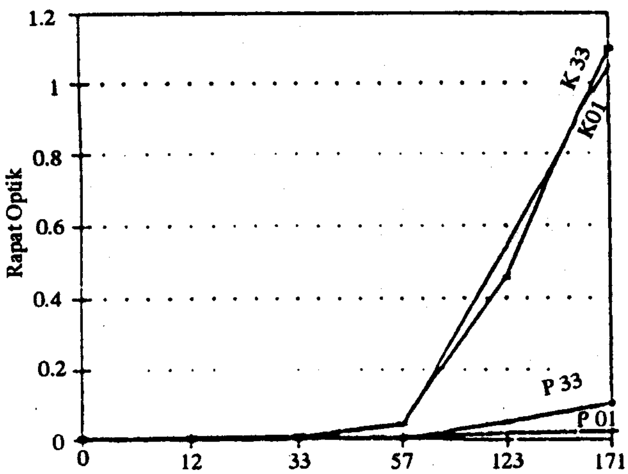
Dari data Tabel 6 dapat diketahui bahwa galur toleran mampu mengatasi cekaman media dengan cara memanfaatkan Na-glutamat sebagai sumber C dan N satu-satunya, yang kemudian menghasilkan amonium sebagai hasil metabolismenya. Telah diungkapkan bahwa galur agak toleran mampu bertahan dan tumbuh dengan laju yang lebih lambat (Gambar 2) dibandingkan galur toleran sedangkan galur sensitif tidak mampu bertahan dan mungkin akhirnya mati. Galur toleran dan galur agak toleran mengakumulasi amonium pada kedua media (LP dan AL) sedangkan galur sensitif menunjukkan jumlah amonium yang menurun pada media LP dan meningkat sedikit sampai akhir pengamatan pada media AL. Berkaitan dengan ini Reeve *et al.* (1993) melaporkan bahwa bakteri bintil akar yang ditumbuhkan pada media yang mengandung asam amino dapat menghasilkan metabolit alkali yang menyebabkan peningkatan pH media.

Berbeda dengan pernyataan Ayanaba *et al.* (1983) bahwa galur toleran mengakumulasi amonium pada media AL, sedangkan galur sensitif mengakumulasi amonium pada media LP, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa galur toleran mengakumulasi amonium baik pada media LP maupun AL sedangkan galur sensitif menunjukkan penurunan jumlah amonium pada media LP dan peningkatan sedikit pada media AL. Gambar 3 memperlihatkan jumlah amonium yang dihasilkan galur-galur toleran (11), agak toleran (07) dan sensitif (18) pada media LP dan AL. Pada media kaldu tersebut galur toleran dan agak toleran menunjukkan jumlah amonium yang cenderung meningkat sekalipun pada jam ke-360 terlihat adanya penurunan akibat kekeliruan di dalam penyiapan pengukuran jumlah amonium.

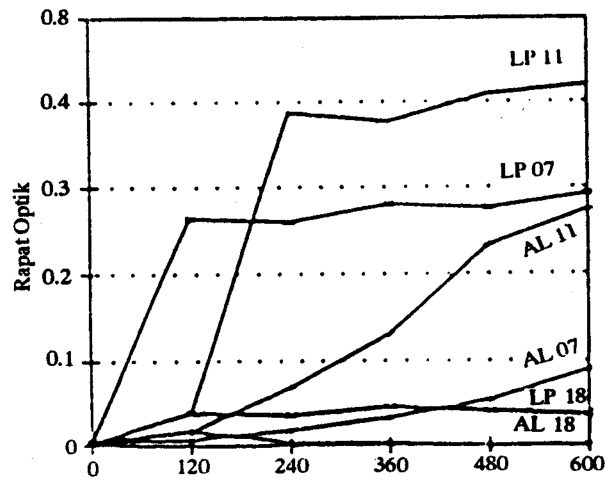
Telah dikemukakan bahwa perbedaan galur toleran, agak toleran dan sensitif asam-Al dapat dikaitkan dengan produksi amonium yang dihasilkan dalam media cekaman (Gambar 4 dan 5). Namun demikian telaah ini perlu dipelajari lebih lanjut dalam hubungannya dengan Na-glutamat yang memacu pembentukan amonium pada galur toleran dan agak toleran. Demikian pula pengaturan pH sitoplasma galur toleran asam-Al akibat pH eksternal yang rendah.

Seleksi terhadap 25 galur uji *Bradyrhizobium japonicum* asli Majalengka pada media agar Ayanaba menghasilkan sembilan galur (36%) yang toleran asam-Al. Seleksi lebih lanjut pada media kaldu Keyser dan Munns pH 4.5 yang mengandung faktor-faktor keasaman (50 µM Al, 200 µM Mn, 50 µM Ca dan 5 µM P) hanya menghasilkan dua galur (11 dan 33) yang mampu mencapai kepekatan 10^6-10^7 sel/ml dalam waktu kurang dari dua minggu.

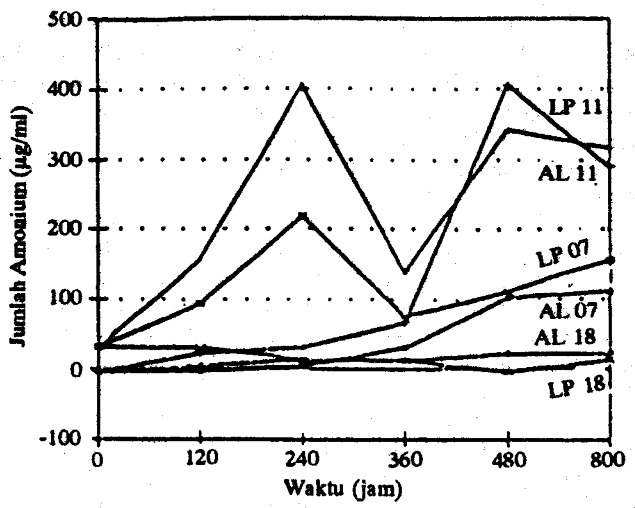
Galur toleran yang ditumbuhkan pada media kaldu Ayanaba dengan pH 4.5, 50 µM Al dan natrium glutamat sebagai sumber C dan N satu-satunya menunjukkan hubungan yang positif antara pertumbuhan *B. japonicum* dan peningkatan pH (r=0.9745) serta produksi amonium (r=0.9064).



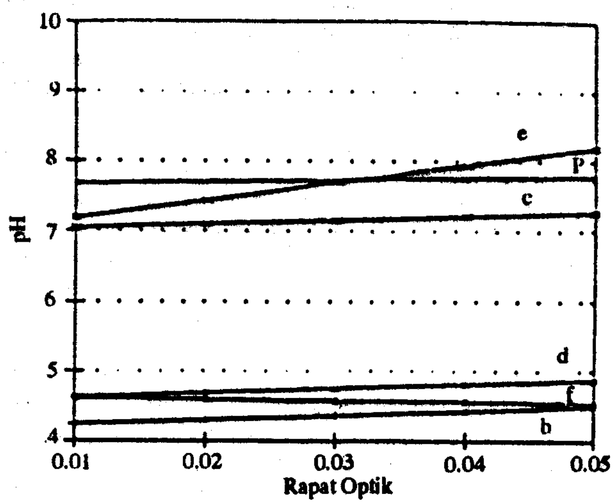
Gambar 1. Pertumbuhan Galur 01 dan 33 pada Media Kaldu K dan P yang Diamati pada Selang Waktu Tertentu



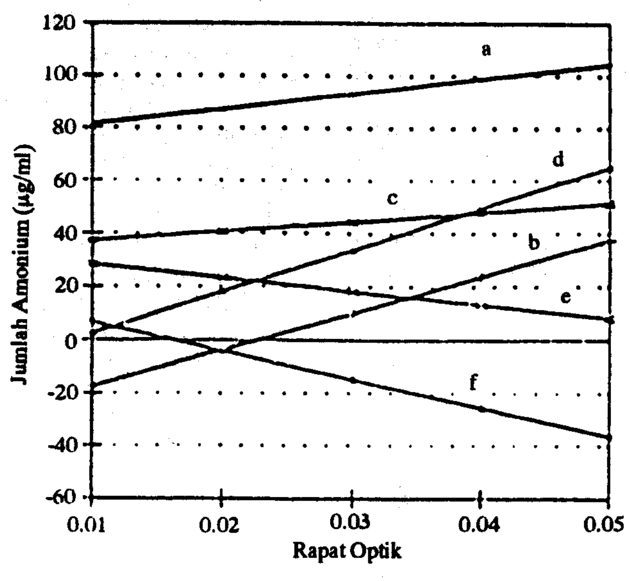
Gambar 2. Pertumbuhan Galur Toleran (11), Agak Toleran (07) dan Sensitif (18) pada Media Kaldu8 LP dan AL



Gambar 3. Jumlah Amonium yang Dihasilkan Galur Toleran (11), Agak Toleran (07) dan Sensitif (18) pada Media Kaldu LP dan AL



Gambar 4. Hubungan antara Pertumbuhan Galur Toleran (11), Agak Toleran (07) dan Sensitif (18) pada Media Kaldu LP dan AL. a. LP 11, r = 0.7803; b. AL 11 = r = 0.9745; c. LP 07, r = 0.9856; d. AL 07, r = 0.9651; e. LP 18, r = 0.9643; f. AL 18, r = 0.1828.



Gambar 5. Hubungan antara Pertumbuhan Galur Toleran (11), Agak Toleran (07) dan Sensitif (18) pada Media Kaldu LP dan AL. a. LP 11, r = 0.7803; b. AL 11 = r = 0.9064; c. LP 07, r = 0.9856; d. AL 07, r = 0.9512; e. LP 18, r = 0.9643; f. AL 18, r = -0.6499.

DAFTAR PUSTAKA

√**Ayanaba, A., S. Asanuma and D.N. Munns.** 1983. An Agar Plate Method for Rapid Screening of *Rhizobium* for Tolerance to Acid-Aluminium Stress. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **47**:256-258.

Baharsjah, J.S., D. Suardi, dan I. Las. 1985. Hubungan Iklim dengan Pertumbuhan Kedelai. hlm. 87-102. *Dalam* S. Somaatmadja *et al.* (ed.), *Kedelai*. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Puslitbangtan. Bogor.

Cassman, K.G., D.N. Munns, and D. P. Beck. 1981a. Phosphorus Nutrition of *Rhizobium japonicum*: Strain Difference in Phosphate Storage and Utilization. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **45**:517-520.

____________________. 1981b. Growth of *Rhizobium* strain at Low Concentration of Phosphate. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **45**:520-523.

Jordan, D.C. 1984. Family III. *Rhizobiaceae* Conn. 1938, p. 234-244. *In* N. R. Kreig and J. G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9th ed., vol. 1. Baltimore: The Williams and Wilkins Co.

Keyser, H.H. and D.N. Munns. 1979a. Effects of Calcium, Manganese, and Aluminium on Growth of Rhizobia in Acid Media. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **43**:500-503.

________________________. 1979b. Tolerance of Rhizobia to Acidity, Aluminium, and Phosphate. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **43**:519-523.

Keeney, D.R. and D.W. Nelson. 1982. Nitrogen-Inorganic Forms. p. 643-698. *In* A. L. Page (ed.), *Methods of Soil Analysis*. Wisconsin: Soil Sci. Soc. Am.

Munns, D.N. and H.H. Keyser. 1981. Response of *Rhizobium* Strains to Acid and Aluminium Stress. *Soil Biol. Biochem.* **33**:115-118.

O'Hara, G.W., J.G. Thomas, J.D. Michael and R.G. Andrew. 1989. Maintenance of Intracellular pH and Acid Tolerance in *Rhizobium meliloti. Appl. Environ. Microbiol.* **55**:1870-1876.

Reeve, W. G., R. P. Triwari, M. J. Dilworth and A. R. Glenn. 1993. Calcium Affects The Growth and Survival of *Rhizobium meliloti*. *Soil. Biol. Biochem.* **25**:581-586.

Taylor, R.W., M.L. Williams and K.R. Sistani. 1991. N_2 Fixation by Soybean *Bradyrhizobium* Combinations Under Acidity, Low P and High Al Stresses. *Plant and Soil.* **131**:293-300.

Thornton, F.C. and C.B. Davey. 1983. Acid Tolerance of *Rhizobium trifolii* in Culture Media. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **47**:496-501.

Trihadi, J. 1991. Uji Aglutinasi Galur-galur Bakteri Bintil Akar Kedelai Tumbuh Lambat dan Efektif. Bogor: Skripsi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor.

Vincent, J.M. 1970. A Manual for The Practical Study of the Root Nodule Bacteria. IBP Handbook 15. Oxford Blackwell Scientific Publication.

Wood, M. and J.E. Cooper. 1984. Aluminium Toxicity and Multiplication of *Rhizobium trifolii* in a Defined Growth Medium. *Soil Biol. Biochem.* **16**:571-576.

____________________. 1985. Screening Clover and *Lotus* Rhizobia for Tolerance Acidity and Aluminium. *Soil Biol. Biochem.* **17**:493-497.