Hayati, Juni 1994, hlm.10-14
ISSN 0854-8587

Vol.1, No.1

Keterkaitan Keefektifan Simbiotik Kelompok Bredirhizobium Kedelai dengan Ciri-Ciri Serologis dan Aktivitas Hidrogenase

TEDJA IMAS* DAN D. DODIT HADIJAYA

Jurusan Biologi FMIPA IPB, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144

Diterima 27 April 1994/Disetujui 19 Juni 1994

Thirty eight effectively slow-growing soybean bradyrhizobia strains isolated from Kabupaten Majalengka were reacted to 14 antisera developed from strains of the same area but had higher levels of symbiotic effectiveness. Those strain agglutination reactions with three antiserum concentration levels: 1:25, 1:50, and 1:100, showed six reaction types and eleven serogroups with high antiserum frequencies. However, those serogroups did not show a specific symbiotic effectiveness ratio. The bacteroid nitrogenase activities of those strains having higher symbiotic effectiveness than N control, were measured by using gas chromatography. Forty percent of those strains showed Acethylene Reduction Activitities (ARA) total higher than that of USDA 110 strain. ARA total as well as specific ARA of those strains showed positive correlation with their symbiotic effectiveness. H_2 evolution measured by gas chromatography of those strains showed less than that of USDA 110 strain.

PENDAHULUAN

Untuk menyusun strategi agar hanya kelompok bredirhizobium unggul saja yang mendominasi pembintilan di dalam tanah yang pernah ditanami kedelai sebelumnya, maka ciri-ciri populasi bredirhizobium indigenos tersebut perlu diketahui. Meskipun pencirian serologi bukan satu-satunya cara untuk mempelajari keanekaragaman populasi bredirhizobium indigenos, cara ini bermanfaat untuk mengetahui penyebaran galur dan galur-galur lain sekerabat yang mendominasi suatu lokasi atau daerah pada suatu kurun waktu tertentu (Ham *et al.*, 1971).

Penggunaan teknik serologi untuk telaah ekologi memerlukan interpretasi yang cermat mengingat populasi indigenos di dalam tanah sangat heterogen. Hasil pengujian lebih bersifat hasil uji penduga. Pencirian serologi galur bakteri bintil akar akan mempunyai arti khusus bila dapat dipakai untuk menentukan kemampuan menambat N dari galur-galur yang menunjukkan kekerabatan antigenik. Fuhrmann (1990) mengemukakan bahwa karakterisasi serologis merupakan penduga yang bermanfaat untuk keefektifan simbiotik dengan koefisien determinasi sebesar 0.59.

Efektifitas simbiotik menunjukkan kemampuan tanaman berbintil akar memanfaatkan N_2 molekuler yang diekspresikan sebagai nisbah bobot kering tajuk yang diinokulasi galur uji dengan bobot kering tajuk yang diinokulasi galur standar atau diberi 70 ppm N sebagai kontrol (Gibson, 1980). Penambatan N dapat diukur secara tidak langsung berdasarkan kemampuan nitrogenase mereduksi substrat selain nitrogen molekuler. Reduksi proton menjadi molekul H_2 atau reduksi asetilena menjadi etilen dapat digunakan untuk menetapkan aktivitas nitrogenase dalam bintil akar.

Nitrogenase yang mengkatalisis reduksi N_2 menjadi amonia juga menghasilkan H_2 sebagai produk samping. Pembebasan H_2 ini sama dengan hilangnya energi yang sangat bermanfaat dalam proses reduksi N_2 tersebut (Albrecht *et al.*, 1979). Galur dengan hidrogenase aktif dapat mendaur ulang H_2 sehingga energi penambatan N_2 dimanfaatkan secara efisien yang pada gilirannya dapat meningkatkan produksi pepolongan (Keyser *et al.*, 1982). Kemampuan mendaur ulang H_2 berkorelasi positif dengan peningkatan penambatan N dan produksi tanaman (Schubert *et al.*, 1978).

Hidrogenase dapat bertindak mengurangi konsentrasi H_2 dalam bintil akar sampai di bawah taraf penghambatan, melindungi nitrogenase dari inaktivasi oleh O_2 dengan menggunakan H_2 sebagai substrat, mendukung respirasi, serta mengatur sistem agar H_2 yang dibebaskan nitrogenase sebagian dimetabolisme sehingga menghemat energi (Kimou dan Drevon, 1989).

Salah satu kriterium pencirian populasi bredirhizobium indigenos yang mungkin langsung mempengaruhi keefektifan simbiotik ialah fenotipe hidrogenase. Namun, Fuhrmann (1990) menambahkan bahwa fenotipe hidrogenase tidak selalu dapat dipakai untuk menduga keefektifan simbiotik galur.

Penelitian ini bertujuan mempelajari hubungan kelompok serologi galur yang dapat digunakan untuk menduga kemampuan galur menambat N dalam kelompok serologi tertentu dan fenotipe hidrogenase yang dijumpai pada galur-galur yang menunjukkan keefektifan simbiotik tinggi.

BAHAN DAN METODE

Sumber Galur Uji dan Antiserum. Tiga puluh delapan galur uji yang telah diketahui keefektifan simbiotiknya (Tedja Imas, 1991) disiapkan sebagai antigen dengan terlebih dahulu menumbuhkannya pada medium sintetik Bergersen yang dimodifikasi selama tujuh hari pada suhu ruang. Penyiapan galur sebagai antigen dengan kepekatan 10^9 sel ml dilakukan mengikuti Tedja Imas (1991) dan disimpan pada suhu -10°C sebelum digunakan.

*Penulis untuk Korespondensi

Keempat belas antiserum yang dipakai juga berasal dari penelitian Tedja Imas (1991) dan dua di antaranya diproduksi dari galur USDA 110 dan USDA 122. Antiserum diencerkan dengan garam fisiologis yang telah disaring dengan milipor 0.22 mikrometer pada perbandingan 1:25, 1:50, dan 1:100.

Uji aglutinasi di dalam cawan plastik bercekung (*tray agglutination*) dilakukan dengan mereaksikan 0.06 μl antigen ke dalam 0.06 μl antiserum dengan bantuan mikropipet. Selanjutnya dengan mengikuti prosedur Vincent (1970) dilihat hasil reaksi aglutinasi. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya granula halus sampai kasar dengan area jernih di sekitarnya.

Penetapan Efektifitas Simbiotik (ES). Dua puluh galur terpilih disiapkan sebagai inokulum yang diinokulasikan ke akar kedelai Wilis yang ditumbuhkan dalam lingkungan aseptik. Percobaan dilakukan di rumah kaca sampai 42 hari setelah tanam dan disusun dalam Rancangan Acak Lengkap dengan tiga ulangan. Kontrol yang dipakai ialah (i) tanpa pemberian inokulasi dan nitrogen (N0), (ii) tanpa inokulasi namun diberi 0.05% KNO_3 (N), dan (iii) inokulasi galur standar USDA 110.

Bobot kering tanaman bagian atas digunakan untuk menentukan ES setiap galur uji terhadap galur standar dan terhadap kontrol N dengan rumus yang dikemukakan Gibson (1980).

Pengukuran Aktivitas Nitrogenase. Sebelum tanaman dikeringkan dilakukan pengukuran Aktivitas Reduksi Asetilena (ARA) dan pembebasan H_2, masing-masing dengan bantuan kromatografi gas. Bagian batang bawah berikut perakaran dan bintil akar dimasukkan ke dalam botol spesimen 225 ml yang bersumbat karet-silikon. Tahapan pengujian mengikuti prosedur yang direkomendasikan oleh Hardy *et al.* (1968). Kromatografi gas yang dipakai dilengkapi FID (*flame ionization detector*), kolom Porapak N yang berukuran 50-80 mesh, gas pembawa N_2 dengan kecepatan aliran 20 ml/menit 60 psi dengan tipe septum Hamilton Tri-Layer. Aktivitas Reduksi Asetilena total ialah jumlah C_2H_4 yang terbentuk per dua tanaman setiap jam dalam μmol dan ARA spesifik ialah μmol C_2H_4 yang terbentuk setiap gram bobot bintil akar per jam.

Pengukuran Pembebasan H_2. Pembebasan gas H_2 yang dipakai untuk mendeteksi aktivitas hidrogenase diukur dengan kromatografi gas Hitachi D 2000 dilengkapi saringan molekuler 13 x 30/60 SUS dengan gas pembawa N_2 pada kecepatan aliran 30 ml/menit. Pembebasan hidrogen dinyatakan dalam μmol H_2 yang dilepaskan setiap gram bintil akar segar dalam waktu satu jam. Pembebasan H_2 dinyatakan sebagai perbedaan antara H_2 yang diproduksi dan H_2 yang dimetabolisme kembali. Total elektron dari nitrogenase yang dipakai untuk produksi H_2 atau Efisiensi Relatif (ER) dirumuskan sebagai berikut:

$$ER = 1 - \frac{\text{pembebasan } H_2\ (N_2)}{\text{reduksi } C_2H_4\ \ (N_2)}$$

HASIL

Tipe Reaksi Aglutinasi. Dari pengamatan reaksi aglutinasi dijumpai enam tipe reaksi yaitu (i) tipe A, galur bereaksi dengan antiserum pada semua tingkat pengenceran yang berjumlah 200 reaksi (37.6%); (ii) tipe B, galur tidak bereaksi dengan antiserum pada semua tingkat pengenceran, 296 reaksi (55.6%); (iii) tipe C, galur hanya bereaksi dengan antiserum 1:25, 15 reaksi (2.8%); (iv) tipe D, galur hanya bereaksi pada antiserum 1:25 dan 1:50, 18 reaksi (3.4%); (v) tipe E, galur bereaksi hanya dengan antiserum 1:50, 1 reaksi (0.2%); (vi) tipe F galur bereaksi hanya dengan antiserum 1:100, 2 buah (0.4%).

Nilai Efektivitas Simbiotik (ES) Galur Uji dan Kontrol N. Nilai ES kedua puluh galur uji di atas nilai nilai ES kontrol N dan sepuluh di antaranya (50%) mempunyai nilai di atas nilai ES galur standar USDA 110. Nilai ES tertinggi ditunjukkan galur 38 dan yang terendah oleh galur 39 (Tabel 1). Rata-rata nilai ES kedua puluh galur uji terhadap kontrol N sebesar 165.97% dan terhadap galur standar USDA 110 sebesar 99.28%.

Tabel 1. Rata-rata Bobot Kering Tajuk Kedelai Wilis dan Nilai Efektivitas Simbiotik Galur Uji

Sandi Galur	Bobot[a] Kering Tajuk (g/tanaman)	Efektivitas Simbiotik (%)[b]	
		Kontrol N	USDA 110
39	1.14 ab[f]	104.42	60.55
27	1.17 ab	107.51	62.34
15	1.25 abc	114.92	66.65
22	1.40 abc	122.36	74.23
50	1.46 abcd	128.22	77.78
08	1.49 abcd	136.62	79.22
40	1.56 abcde	142.77	82.79
13	1.68 abcdef	146.99	89.17
30	1.74 abcdef	152.46	92.48
17	1.86 abcdef	163.16	98.98
11	1.99 abcdef	174.72	105.99
44	2.09 bcdef	182.36	110.63
26	2.17 cdef	190.52	115.57
04	2.20 cdef	192.60	116.84
42	2.27 cdef	198.88	120.65
41	2.28 def	199.64	121.11
46	2.34 def	205.08	124.41
02	2.35 ef	206.09	125.02
37	2.38 ef	218.11	126.48
38	2.54 f	232.39	134.76
USDA 110[c]	1.88 abcdef	164.84	100.00
Kontrol N[d]	1.09 ab	100.00	57.99
Kontrol No[e]	0.79 a	72.40	41.98

[a] bagian atas tanaman, tanpa akar dan bintil akar, dipanen pada umur 45 hari setelah tanam.
[b] berdasarkan persentase bobot kering tanaman yang diinokulasi galur uji terhadap bobot kering tanaman yang diinokulasi galur standar USDA 110 atau kontrol N.
[c] galur standar.
[d] kontrol tanpa inokulasi namun diberi 0.05% KNO_3.
[e] kontrol tanaman tanpa inokulasi dan N.
[f] angka yang diikuti huruf sama pada satu kolom menunjukkan tidak berbeda nyata dengan uji Turkey pada taraf 5%.

Bobot Kering Bintil Akar dan Nilai Aktivitas Reduksi Asetilena. Pengukuran aktivitas nitrogenase dilakukan ketika tanaman berumur 45 hari. Pada tahap ini kedelai memasuki tahap pembungaan yaitu saat aktivitas nitrogenase bakteroid menunjukkan aktivitas maksimal. Galur uji tidak menunjukkan perbedaan nyata untuk ARA total, semuanya menunjukkan ARA total yang relatif sama

(Tabel 2). Nilai maksimum ARA total ialah 30.38 μmol per dua tanaman per jam atau 15.19 μmol per tanaman per jam yang ditunjukkan galur 38. Aktivitas Reduksi Asetilena total minimum diperlihatkan galur 13 sebesar 2.68 μmol per dua tanaman per jam atau 1.34 μmol per tanaman per jam. Nilai rata-rata ARA total kedua puluh galur uji ialah 9.78 μmol per dua tanaman per jam atau 4.39 μmol per tanaman per jam dengan kisaran 1.34 sampai 15.19 μmol C_2H_4 tanaman/jam. Dari hasil pengukuran ARA total ini ada delapan galur uji yang menunjukkan nilai lebih tinggi dari galur standar USDA 110 yaitu galur dengan sandi 38, 37, 42, 41, 26, 44, 46, dan 40.

Tabel 2. Rata-rata Bobot Kering Bintil Akar Kedelai Wilis dan Nilai Aktivitas Reduksi Asetilena (Total dan Spesifik) dari Galur Uji

Sandi Galur	Bobot Kering[a] Bintil Akar (g/tanaman)	Aktivitas Reduksi Asetilena	
		Total	Spesifik[b]
13	0.09 a[c]	2.69 a	35.61 ab[c]
27	0.12 ab	3.82 a	34.32 a
50	0.13 ab	2.89 a	24.06 a
15	0.13 ab	5.99 a	49.60 abc
30	0.12 ab	4.99 a	38.68 ab
08	0.12 ab	9.31 a	74.09 abc
26	0.12 ab	13.67 a	100.25 c
17	0.13 ab	6.19 a	43.42 abc
39	0.13 ab	3.52 a	26.11 a
04	0.15 ab	10.62 a	75.03 abc
USDA 110	0.14 ab	11.09 a	72.34 abc
40	0.15 ab	11.78 a	76.64 abc
22	0.15 ab	4.24 a	27.04 a
02	0.17 ab	6.72 a	41.58 abc
44	0.16 ab	12.01 a	57.42 abc
42	0.17 abc	14.87 a	78.98 abc
46	0.18 abc	11.83 a	61.86 abc
11	0.21 abc	8.15 a	36.49 ab
41	0.24 bc	14.63 a	63.66 abc
37	0.26 bc	17.33 a	68.71 abc
38	0.32 c	30.38 a	94.84 bc
Kontrol N	0.0	0.0	0.0
Kontrol No	0.0	0.0	0.0

[a] nilai rata-rata dari tiga ulangan.
[b] dihitung berdasarkan aktivitas reduksi asetilena total terhadap bobot kering bintil akar.
[c] angka-angka selajur yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut uji banding Tuckey pada taraf 5%

Aktivitas Reduksi Asetilena spesifik galur uji yang bernilai sama dengan ARA spesifik galur standar USDA 110 berjumlah 11 galur (Tabel 2) sedangkan nilai ARA spesifik berikut ARA total galur di atas nilai galur standar USDA 110 ditunjukkan oleh galur 26, 38, 40, dan 42. Galur-galur dengan aktivitas nitrogenase di atas galur standar USDA 110 diukur aktivitas hidrogenasenya.

Aktivitas Hidrogenase. Aktivitas hidrogenase ini lebih tepat dikatakan sebagai fenotipe hidrogenase mengingat yang diukur ialah pembebasan H_2 dari bakteroid. Dua galur uji, 26 dan 41, tidak mengeluarkan gas H_2/tanaman/jam. Sedangkan tiga galur lainnya menunjukkan jumlah gas H_2 yang ber-variasi dari 0.37 sampai 1.60 μmol H_2/tanaman/jam (Tabel 3).

Tabel 3. Efektivitas Simbiotik (ES), Aktivitas Nitrogenase (ARA Total), Pembebasan Hidrogen, dan Efisiensi Relatif (ER) Beberapa Galur Uji terhadap Galur Standar USDA 110

Sandi Galur	ES KNO_3	ARA Total μmol C_2H_4/ tanaman/ jam	Pembebasan H_2		ER
			μmol H_2/ tanaman/ jam	μmol H_2/ g BBBA/ jam	
38	232.4	15.19	1.45	1.47	0.90
37	218.1	8.66	1.60	2.26	0.91
41	199.6	7.31	0.0	0.0	1.00
42	198.8	7.43	0.37	0.72	0.95
26	190.5	6.84	0.0	0.0	1.00
USDA 110	164.8	5.54	1.00	2.81	0.92

BBBA: bobot basah bintil akar

PEMBAHASAN

Berdasarkan reaksi aglutinasi positif dibentuk kelompok serologis yaitu galur-galur yang bereaksi dengan antiserum atau antibodi yang disandikan dengan angka I sampai XI. Galur-galur yang berada di dalam satu kelompok diduga memiliki kekerabatan antigenik yang erat dan penyebaran jumlah galur dalam kelompok ternyata tidak sama (Tabel 4).

Tabel 4. Pengelompokan Galur Uji Secara Serologis dengan Menggunakan 14 Antiserum

Kelompok Serologis	Sandi Galur	Jumlah
I	13	1
II	14, 15, 19, 44	4
III	04, 12, 22, 32	4
IV	03, 05, 48	3
V	01, 08, 11, 31, 34, 38, 39, 41, 46, 49	10
VI	33, 36, 29	3
VII	02, 06	2
VIII	35, 45	2
IX	09, 17, 24, 27, 40	5
X	16, 37	2
XI	10, 21	2

Hampir semua galur uji dapat dikenali antiserum 43, kecuali galur 16, 21, dan 37. Sebagian besar galur uji dikenali antiserum 07, 18, 23, 26, 30, dan 43. Hal ini berarti galur 43 memiliki determinan antigenik yang umum dan hampir semua galur-galur uji berkerabat dengan galur-galur 07, 18, 23, 26, 30, dan 43.

Dikaitkan dengan bobot kering tajuk yang mempunyai hubungan yang erat dengan keefektifan simbiotik (r= 0.996) maka kelompok serologi tidak menunjukkan hubungan yang nyata dengan keefektifan simbiotik galur. Dengan kata lain kelompok serologi tidak menunjukkan suatu tingkat keefektifan simbiotik tertentu atau kelompok serologi tidak dapat dipakai untuk menduga kemampuan bersimbiosis yang efektif dari galur-galur yang terhimpun di dalam kelompok serologi yang bersangkutan. Hasil ini berbeda dengan Fuhrmann (1990) yang mengemukakan kelompok serologi merupakan penduga keefektifan galur.

Pengamatan secara terpisah dengan hanya menggunakan peringkat pengenceran antiserum 1:100 kemudian dilanjutkan dengan percobaan penegasan nilai ES galur, diketahui galur 27 tidak dikenali oleh semua antiserum dan galur 13 dikenali oleh semua antiserum yang dipakai, masing-masing menunjukkan nilai ES 85.3 dan 85.7 dengan perbedaan sebesar 0.4. Data ini juga menyatakan bahwa pencirian antigenik tidak memberikan suatu informasi yang tegas mengenai keefektifan simbiotik.

Aktivitas Reduksi Asetilena spesifik merupakan aktivitas dari sejumlah bintil akar segar atau dalam bobot kering (BKBA). ARA spesifik galur uji berikut standar nyata pada taraf 95% dengan kisaran 24.06 sampai 100.25 μmol C_2H_4/g BKBA/jam sedangkan rata-ratanya 55.42 μmol.

Koefisien korelasi (r) ARA total dengan BKBA sebesar 0.84 sedangkan koefisien determinasi (r^2) 0.71, berarti ARA total berkorelasi positif terhadap bobot kering bintil akar. Selanjutnya r ARA spesifik dengan BKBA ialah 0.42 dan r^2 = 0.18, berarti peningkatan BKBA tidak diikuti dengan peningkatan ARA spesifik secara nyata. Terhadap bobot kering tajuk, ARA total dan ARA spesifik menunjukkan koefisien korelasi masing-masing sebesar 0.73 dan 0.60, sedangkan koefisien determinasi 0.53 dan 0.36. Dengan demikian ARA total berkorelasi positif dengan bobot kering tajuk sedangkan antara ARA spesifik dengan bobot kering tajuk terdapat hubungan yang kurang tegas.

Antara ARA total dengan efektifitas simbiotik, begitu pula ARA spesifik dengan ES, kedua-duanya menunjukkan koefisien korelasi 0.77 dan 0.63 sedangkan koefisien determinasi 0.60 dan 0.39. Dengan demikian peningkatan ARA total maupun ARA spesifik diikuti dengan peningkatan keefektifan simbiotik.

Sebagian besar pepolongan berbintil akar mengalami kehilangan lebih dari 30% energi total yang diperuntukkan bagi sistem nitrogenase dalam bentuk pembebasan H_2 (Schubert *et al.*, 1978). Namun, pembebasan H_2 tidak dijumpai pada simbiosis kedelai dengan galur yang diketahui memiliki aktivitas hidrogenase karena itu mekanisme penggunaan energi penambatan nitrogen menjadi efisien (Keyser *et al.*, 1982). Ditambahkan pula, bintil akar yang membebaskan H_2 dapat menunjukkan aktivitas hidrogenase tetapi pada taraf hanya mampu mendaur ulang H_2 sebahagian. Lebih jauh Sadowsky *et al.* (1983) melaporkan bakteri bintil akar tumbuh cepat pada fase bakteroid tidak mengekspresi aktivitas hidrogenase karena membebaskan H_2. Sebaliknya, bakteri bintil akar tumbuh lambat tidak membebaskan H_2.

Dua galur uji yang tidak membebaskan H_2 yaitu galur dengan sandi 26 dan 41 (Tabel 3). Dengan keefektifan simbiotik dan aktivitas nitrogenase di atas galur standar USDA 110, galur uji membebaskan H_2 pada kisaran 0 sampai 1.6058 μmol H_2/tanaman/jam. Kemampuan galur pada fase bakteroid untuk membebaskan H_2 masih di bawah kemampuan galur standar dengan kisaran 0 sampai 2.26 μmol H_2 setiap gram bobot basah bintil akar dalam waktu satu jam. Mengingat galur USDA 110 diketahui sebagai galur yang memiliki aktivitas hidrogenase maka kelima galur uji diduga juga mempunyai aktivitas hidrogenase yang diperkuat dengan nilai efisiensi relatif sebesar 0.90 sampai 1.00. Pembebasan H_2 dengan nilai lebih besar dari nol seperti galur 42, 38, dan 37 menunjukkan bahwa aktivitas hidrogenase hanya mendaur ulang sebagian gas H_2.

Berdasarkan hasil penelitian ini, kesimpulan sementara yang dapat diutarakan ialah : (i). kelompok serologi tidak menunjukkan tingkat keefektifan simbiotik tertentu dari galur-galur yang terhimpun dalam kelompok serologi yang bersangkutan atau yang diduga memiliki kekerabatan antigenik yang erat; (ii). aktivitas atau fenotipe hidrogenase yang dideteksi melalui pembebasan H_2 masih dijumpai sekalipun relatif sedikit pada galur-galur dengan tingkat keefektifan simbiotik dan aktivitas nitrogenase tertentu.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Drs. Murtado, M.S. dan Sdr. Susti dari Puslitbangtan Bogor atas bantuan teknis penggunaan kromatografi gas; serta Yuli Lestari, Erny Yuniarti, dan Luhut Romhers atas bantuan pelaksanaan teknis penelitian. Ucapan terima kasih disampaikan juga kepada Direktur Pembinaan Penelitian dan Pengembangan Masyarakat Dirjen DIKTI atas dana pelaksanaan penelitian, serta Ketua Lembaga Penelitian dan Dekan FMIPA IPB atas kepercayaan yang diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

Albrecht, S.L., R.J. Maier, F.J. Hanus, S.A. Russel, D.W. Emerich, and H. J. Evans. 1979. Hydrogenase in *Rhizobium japonicum* Increases Nitrogen Fixation by Nodulated Soybeans. *Science*. **203**:1255-1257.

Fuhrmann, J. 1990. Symbiotic Effectiveness of Indigenous Soybean Bradyrhizobia as Related to Serological, Morphological, Rhizobitoxine, and Hydrogenase Phenotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(1):224-229.

Gibson, A.H. 1980. Methods for Legumes in Glasshouses and Controlled Environment Cabinets. p. 175-177. *In* F. J. Bergersen (ed.), *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. Toronto: John Wiley & Sons.

Ham, G.E., L.R. Frederick, and L.C. Anderson. 1971. Serogroups of *Rhizobium japonicum* in Soybean Nodules Sampled in Iowa. *Agron. J.* **63**(3):69-72.

Hardy, R.W.F., R.D. Holsten, E.K. Jackson, and R.C. Burns. 1968. The Acethylene-Ethylene Assay for N_2 Fixation Laboratory and Field Evaluation. *Plant Physiol.* **43**:1185-1267.

Keyser, H.H., P. van Berkum, and D.F. Weber. 1982. A Comparative Study of the Physiology of Symbioses Formed by *Rhizobium japonicum* with *Glycine max*, *Vigna unguilata* and *Macroptilium atropurpureum*. Plant Physiol. **70**:1626-1630.

Kimou, A. and J.J. Drevon. 1989. Hydrogen Metabolism and Nitrogen Fixation of Soybean (*GLycine max* L.) Inoculated with Different Strains of *Rhizobium* spp. *Biol. Fertil. Soils*. 7:259-262.

Sadowsky, M.J., H.H. Keyser, and B.B. Bohlool. 1983. Biochemical Characterization of Fast and Slow-Growing Rhizobia that Nodulate Soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33:716-722.

Schubert, K.R., N.T. Jennings, and H.J. Evans. 1978. Hydrogen Reactions of Nodulated Leguminous Plant. II. Effects on Dry Matter Accumulation and Nitrogen Fixation. *Plant Physiol.* **61**:398-401.

Tedja Imas. 1991. Kekerabatan Serologik Isolat Bakteri Bintil Akar Kedelai Tumbuh Lambat dan Efektif Asal Lahan Sawah. Tesis. Bogor: Fakultas Pascasarjana IPB.

Vincent, J. M. 1970. A Manual for Practical Study of the Root Nodule Bacteria. IBP Handbook no. 15. Oxford: Blackwell Scientific Publication.