



## KEANEKARAGAMAN DAN KARAKTERISASI AWAL BAKTERI *RHIZOBIUM* PADA TANAH RHIZOSFER KEDELAI, KACANG HIJAU, KACANG PANJANG, DAN KACANG TANAH

Af'idzatuttama<sup>1\*</sup>, Khairul Anwar<sup>2</sup>, Khansa Amara<sup>3</sup>

<sup>1,2</sup>Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Muria Kudus, Indonesia

<sup>3</sup>Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Pembangunan Nasional Veteran, Surabaya, Indonesia

Email: [afidzatuttama@umk.ac.id](mailto:afidzatuttama@umk.ac.id)

### Abstract

*Legume plants play an important role in agricultural systems. Nitrogen is an essential nutrient required by plants for both vegetative and generative growth. Nitrogen-fixing bacteria commonly used in agriculture belong to the genus Rhizobium spp. Rhizobium is a Gram-negative bacterium that inhabits the rhizosphere region of plants. Agronomically, this bacterium has the ability to form symbiotic relationships with leguminous plants, which play a significant role in maintaining soil fertility. Peanut, soybean, yardlong bean, and mung bean were the legume crops used in this study. Isolation of Rhizobium bacteria was carried out using the serial dilution method from  $10^{-1}$  to  $10^{-5}$ . The isolates obtained were subjected to hemolysis testing and morphological characterization on YEMA (Yeast Extract Mannitol Agar) medium. Blood agar medium was used for the hemolysis test. The highest population of Rhizobium bacteria was found in mung bean and yardlong bean rhizosphere soils, each with  $3.0 \times 10^6$  CFU/g. Most Rhizobium isolates exhibited milky white, translucent white, and pink colony colors. A total of 16 isolates were obtained from soybean, 16 from yardlong bean, 7 from peanut, and 8 from mung bean. Morphologically, Rhizobium colonies were generally circular, flat, and exhibited whitish-pink to translucent coloration.*

**Keywords:** Legume Plant, Nitrogen Fixation, Rhizobium

### Abstrak

Tanaman Legum merupakan tanaman yang memiliki peranan penting dalam sistem pertanian. Nitrogen termasuk salah satu unsur penting yang dibutuhkan oleh tanaman baik secara vegetatif maupun generative. Bakteri penambat nitrogen yang sering digunakan yaitu dari genus *Rhizobium* spp. Bakteri *Rhizobium* merupakan bakteri Gram negative yang hidup di daerah perakaran tanaman. Bakteri ini secara agronomis memiliki kemampuan untuk membentuk symbiosis dengan tanaman polong-polongan yang memiliki peran penting untuk menjaga kesuburan tanah. Kacang tanah, kedelai, kacang Panjang, dan kacang hijau merupakan tanaman dari kelompok legum yang digunakan dalam penelitian ini. Isolasi bakteri *Rhizobium* dilakukan menggunakan metode pengenceran secara berseri dari pengenceran  $10^{-1}$  hingga  $10^{-5}$ . Isolat yang ditemukan kemudian dilakukan uji hemolisis dan pengamatan karakter morfologi pada media YEMA. Media yang digunakan untuk uji hemolisis yaitu media agar darah. Populasi tertinggi bakteri *Rhizobium* ditemukan pada kacang hijau dan kacang Panjang yaitu  $3,0 \times 10^6$  CFU/g dan  $3,0 \times 10^6$  CFU/g. Isolat bakteri *Rhizobium* sebagian besar berwarna putih keruh, putih bening, dan merah muda. Total isolat yang ditemukan pada kedelai yaitu 16 isolat, kacang panjang 16

isolat, kacang tanah 7 isolat, dan kacang hijau 8 isolat. Bentuk morfologi bakteri *Rhizobium* berbentuk bulat datar, berwarna putih kemerahan muda, bening, dan datar.

Kata Kunci : Tanaman Legum, Penambat N, *Rhizobium*

## 1. Pendahuluan

Tanaman Legum merupakan tanaman yang memiliki peranan penting dalam sistem pertanian. Nitrogen termasuk salah satu unsur penting yang dibutuhkan oleh tanaman baik secara vegetatif maupun generative (Mpapa, 2016). Tanaman legum memiliki kemampuan memfiksasi nitrogen yang ada di alam. Secara umum unsur nitrogen (N<sub>2</sub>) tersedia di alam secara bebas dalam bentuk ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) dan nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Di atmosfer, nitrogen tersedia berkisar 78%-80% N<sub>2</sub> akan tetapi tanaman tidak dapat menyerap secara langsung (Tando, 2018). Salah satu cara yang dilakukan oleh tanaman agar dapat menyerap N<sub>2</sub> bebas di alam yaitu melakukan simbiosis dengan bakteri yang memiliki kemampuan menambat nitrogen. Bakteri penambat nitrogen biasanya berasosiasi dengan tanaman Legum dengan terbentuknya bintil akar di daerah perakaran (Hutasoit et.al., 2017). Bakteri yang berasosiasi dengan tanaman legum ini akan dijadikan sebagai indikator efisiensi dalam pemupukan nitrogen dan pengembangan inokulan spesifik lokal.

Bakteri penambat nitrogen yang sering digunakan yaitu dari genus *Rhizobium* spp. Bakteri *Rhizobium* merupakan bakteri Gram negative yang hidup di daerah perakaran tanaman. Bakteri ini secara agronomis memiliki kemampuan untuk membentuk symbiosis dengan tanaman polong-polongan yang memiliki peran penting untuk menjaga kesuburan tanah (Somasegaran, 1994). Bakteri rhizobium Sebagian besar habitatnya berada di daerah rhizosfer. Ketika tanaman legum dalam jumlah yang melimpah maka rhizobia di dalam bintil akar jumlahnya melebihi rhizobia di tanah. Bakteri ini dapat tumbuh dalam kondisi “persisten” dimana mampu bertahan hidup selama lebih dari satu tahun tanpa makanan (Denison, 2000).

Kelimpahan bakteri *Rhizobium* pada tanaman legum berbeda-beda tergantung dengan beberapa factor seperti kecocokan lingkungan tumbuh, ketersediaan tanaman inang, dan ketersediaan nutrisi. Sebagian besar spesies *Rhizobium* yang bersimbiosis dengan tanaman legum yaitu *R. leguminosarum*, *R. alamae*, *R. lentis*, *R. metallidurans*, *R. smilacinae*, *R. phaseoli*, *R. pusense*, dan *R. japonicum* (Velazquez, 2017)). Sedangkan kelompok *Rhizobium* lainnya yang berada di dalam tanah yaitu *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, dan *Allorhizobium*. Selain itu, banyak jenis mikroorganisme lain yang mampu memfiksasi nitrogen tanpa adanya symbiosis dengan tanaman legum. Mikroorganisme ini berasal dari 2 genus Archaea, 38 genus Bacteria, dan 20 genus Cyanobacteria (Salazar, 2009).

Kacang tanah, kedelai, kacang Panjang, dan kacang hijau merupakan tanaman dari kelompok legum yang digunakan dalam penelitian ini. Variasi kondisi lahan saat pengambilan sampel tanah berpotensi menghasilkan keragaman populasi bakteri *Rhizobium*. Berdasarkan dengan penelitian sebelumnya, isolasi *Rhizobium* hanya dilakukan pada sampel tanah dari salah satu tanaman legum. Identifikasi *Rhizobium* pada tanaman kacang tanah dilakukan dengan menganalisis bakteri bintil akar yang aktif dan tidak aktif

(Hartanti & Oktavia, 2009). Namun dalam penelitian ini membandingkan tentang kelimpahan populasi bakteri *Rhizobium* pada beberapa jenis tanaman legum. Sehingga hasil penelitian ini dapat digunakan untuk menganalisis distribusi populasi *Rhizobium* antar tanaman legum. Selain itu, hasil penelitian dapat digunakan sebagai preferensi inang dari bakteri *Rhizobium*. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan menganalisis keragaman dan mengidentifikasi awal bakteri *Rhizobium* pada tanah rizosfer tanaman legum. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai potensi bakteri *Rhizobium* lokal sebagai sumber inokulan hayati yang dapat mendukung sistem pertanian berkelanjutan.

## 2. Bahan dan Metode

Penelitian dilaksanakan pada Bulan November sampai Bulan Januari 2026. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Muria Kudus.

Bahan yang digunakan tanah rhizosfer (tanaman kedelai, kacang hijau, kacang tanah, dan kacang Panjang), media spesifik YEMA (*Yest Extract Mannitol Agar*), larutan fisiologis 0,85%, air steril, alcohol 70%, KOH 3%, dan media agar darah. Alat yang digunakan yaitu segitiga penyebar, Bunsen, mikropipet, timbangan analitik, microtip 1 ml, vortex, sendok, rak tabung reaksi, tabung reaksi, laminar, dan cawan petri.

Pengambilan sampel tanaman rhizosfer berasal dari lahan perakaran tanaman kedelai, kacang hijau, kacang tanah, dan kacang Panjang. Tanah diambil menggunakan sekop dengan kedalaman kurang lebih 1 m di area perakaran tanaman. Hal ini diasumsikan karena bakteri *Rhizobium* yang hidup aktif di daerah rhizosfer berada pada kedalaman 1 m. Selain itu, perakaran tanaman legum memiliki kedalaman mencapai 100 m dari permukaan tanah. Sampel tanah yang sudah diambil disimpan dalam kantong plastic dan diberi label berdasarkan jenis tanamannya.

Sampel tanah ditimbang sebanyak 10 g kemudian dimasukkan kedalam larutan 90 ml larutan fisiologis NaCl 0,85% steril. Larutan dihomogenkan menggunakan vortex selama 10 menit. Sebanyak 1 ml larutan tanah dari Erlenmeyer dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 9 ml aquades steril. Larutan tanah dalam tabung reaksi dihomogenkan menggunakan vortex selama 10 detik. Larutan dilakukan pengenceran secara berseri dari pengenceran  $10^{-1}$  hingga  $10^{-5}$ .

Inokulasi bakteri dilakukan dengan cara memipet 0,1 ml larutan sampel tanah pada masing-masing seri pengenceran menggunakan mikropipet kedalam cawan petri yang berisi. Media spesifik YEMA. Hasil inokulasi disimpan dalam kondisi ruang selama 24-48 JSI (jam setelah inokulasi). Koloni yang sudah tumbuh kemudian dihitung jumlahnya berdasarkan karakter morfologis pada media YEMA. Pengamatan dilakukan selama 24 JSI dan 48 JSI.

Karakterisasi koloni bakteri yang diduga sebagai *Rhizobium* dilakukan dengan pengamatan secara morfologi pada media spesifik dan uji hemolisis. Pengujian koloni bakteri yang bersifat patogenik terhadap tanaman dilakukan menggunakan uji hemolisis. Media yang digunakan untuk uji hemolisis yaitu media agar darah. Sebanyak 1 lup inokulasi kolono bakteri ditumbuhkan pada media agar darah. Koloni diinkubasi selama 48

jam. Pengamatan dilakukan dengan mengamati terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri.

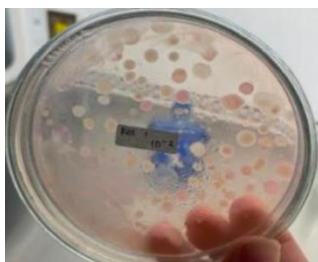
### 3. Hasil dan Pembahasan

Pengambilan sampel tanah berasal dari tanaman Leguminase yaitu kacang tanah, kacang hijau, kedelai, dan kacang Panjang. Tanaman yang digunakan untuk isolasi bakteri *Rhizobium* berada pada fase vegetative dan kondisi sehat. Masing-masing sampel tanaman diambil pada 4 lahan yang berbeda. Hasil isolasi populasi bakteri *Rhizobium* ditampilkan pada tabel 1. Populasi bakteri *Rhizobium* disajikan dalam data jumlah kononi (CFU/g tanah). Populasi *Rhizobium* tidak ditemukan pada lahan 3 dan 4 tanaman kacang hijau. Selain itu, tanaman kacang tanah lahan 4 juga tidak ditemukan bakteri *Rhizobium*. Perbedaan populasi antar jenis tanaman maupun jenis lahan mengindikasikan bahwa terdapat interaksi antara tanaman dan bakteri *Rhizobium*. Interaksi mikroorganisme dengan akar tanaman biasanya dalam bentuk eksudat akar yang berperan membantu aktivitas metabolisme akar. Semakin bertambah umur tanaman maka akar yang tumbuh dan aktif semakin banyak sehingga eksudat yang dikeluarkan semakin banyak. Eksudat akar tersebut dimanfaatkan oleh tanaman sebagai bahan untuk bertahan hidup dan memperbanyak diri. Eksudat akar merupakan senyawa metabolit sekunder yang dikeluarkan oleh akar yang digunakan untuk interaksi dengan berbagai mikroorganisme di tanah (Purwaningsih, 2008). Faktor yang sangat menentukan keadaan mikroorganisme tanah pada daerah perakaran yaitu senyawa kimia yang dikeluarkan oleh akar dalam bentuk metabolit sekunder seperti asam amino, enzim, senyawa indole, asam organik, dan glikosida (Gripson, 1981).

**Tabel 1.** Populasi bakteri *Rhizobium* dari perakaran tanaman legum

Jenis Tanah	Lahan 1	Lahan 2	Lahan 3	Lahan 4
	CFU/g tanah			
Kedelai	$1,9 \times 10^3$	$7 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$	$9 \times 10^5$
Kacang Hijau	$1 \times 10^4$	$3,0 \times 10^6$	-	-
Kacang Panjang	$1 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^6$
Kacang Tanah	$1,2 \times 10^5$	$1,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^5$	-

Hasil tabel 1 populasi bakteri yang ditemukan masih tergolong rendah. Hal ini menunjukkan bahwa lahan pengambilan sampel berada pada kondisi kurang subur. Berdasarkan (Kirchhof et al., 1997 & James et al., 2001) menyebutkan bahwa lahan pertanian dikatakan subur apabila mengandung lebih dari 100 juta mikroorganisme per gram tanah. Kerapatan bakteri yang ditemukan pada jumlah koloni berkisar  $1 \times 10^5$  CFU/g tanah. Populasi tertinggi bakteri *Rhizobium* ditemukan pada kacang hijau dan kacang Panjang yaitu  $3,0 \times 10^6$  CFU/g dan  $3,0 \times 10^6$  CFU/g. Selain itu, populasi bakteri rizosfer dipengaruhi oleh factor lingkungan seperti, kelembaban, suhu, ketersediaan bahan organik, dan pH tanah yang menjadi syarat hidup bagi mikroba (Pamungkas & Irfan, 2018). Bakteri *Rhizobium* mampu tumbuh secara optimal pada suhu 25-30 °C, pH 6-7, serta memiliki ketersediaan unsur hara seperti zat besi, fosfor, belerang, dan kalsium. Lahan kacang hijau dan kacang Panjang dimungkinkan memiliki kondisi yang optimal sebagai habitat untuk pertumbuhan bakteri *Rhizobium* (Liem et al, 2019).



**Gambar 1.** Kerapatan populasi bakteri *Rhizobium* pada media YEMA

Isolat bakteri *Rhizobium* yang tumbuh pada media spesifik YEMA ditandai dengan warna isolat yang beragam. Warna isolat yang diduga bakteri *Rhizobium* yaitu putih keruh, putih bening, merah muda, putih kekuningan, dan putih kemerahan. Sebagian besar isolat *Rhizobium* yang tumbuh berwarna putih-kemerah-mudaan. Isolat – isolat yang tumbuh kemudian dihitung kerapatan populasinya dalam CFU/g tanah (Gambar 2).

Isolat yang diduga sebagai bakteri *Rhizobium* kemudian dikarakterisasi dengan pengujian hemolisis. Pengujian hemolisis ini bertujuan untuk memastikan bahwa isolat *Rhizobium* tidak bersifat patogen terhadap mamalia (Af'idzatuttama et al., 2022). Isolat yang menunjukkan zona bening di area sekitar koloni bakteri kemudian dieliminasi. Sedangkan isolat yang tidak menunjukkan zona bening di sekitar koloni bakteri yang diduga sebagai bakteri *Rhizobium*.



**Gambar 2.** Uji hemolisis isolat bakteri *Rhizobium* pada media agar darah

Isolat yang berhasil dilakukan uji hemolisis kemudian dikarakterisasi warna dan bentuk koloninya. Isolat yang tumbuh awal mulanya berwarna putih keruh maupun putih bening pada 24-48 jam inkubasi. Kemudian berubah warna menjadi merah muda setelah 48 jam inkubasi. Bakteri *Rhizobium* termasuk bakteri yang memiliki pertumbuhan yang cepat pada 3-5 hari setelah diinkubasi. Fase Pertumbuhan maksimum bakteri *Rhizobium* berkisar 4-48 jam inkubasi (Purwani & Sucahyono 2020). Umumnya isolatnya berwarna putih susu (Fajrin et al, 2017). Isolat-isolat tersebut ditumbuhkan pada media YEMA tanpa congored. Bentuk morfologi bakteri *Rhizobium* berbentuk bulat datar, berwarna putih kemerah mudaan, bening, dan datar. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian (Irfan, 2014). yang menyebutkan bahwa pada umumnya *Rhizobium* koloninya berbentuk bulat datar, diskrit, datar, maupun kerucut pada permukaan agar.



**Gambar 3.** Bentuk koloni isolat *Rhizobium* pada media YEMA

Setelah dilakukan pemurnian, isolat bakteri *Rhizobium* didapatkan dari tanaman legum sebanyak 47 koloni bakteri dengan warna morfologi yang bervariasi. Pada lahan kedelai dan kacang tanah, isolat bakteri *Rhizobium* yang ditemukan paling banyak yaitu 16 isolat. Lahan kacang tanah sebanyak 7 isolat dan lahan kacang hijau sebanyak 8 isolat (Tabel 2). Perbedaan jumlah koloni yang ditemukan pada masing-masing tanaman legum menunjukkan bahwa terdapat variasi kemampuan kolonisasi bakteri rizosfer dengan masing-masing tanaman inang.

Lahan kedelai isolat bakteri yang ditemukan keseluruhan berwarna merah muda-keputihan, pink kekuningan, dan merah muda-kuning. Dominansi isolat yang berwarna merah muda ini mengindikasikan bahwa *Rhizobium* dapat dicirikan dengan warna koloninya (Sari et al, 2018). Perbedaan warna koloni pada masing-masing sampel tanaman legum mengindikasikan bahwa terdapat perbedaan karakter secara fisiologis. Bakteri yang memiliki karakter fisiologis berbeda ini bisa dimungkinkan memiliki genus maupun spesies yang berbeda. Hasil isolasi pada lahan kacang panjang ditemukan isolat yang didominasi warna merah muda-keputihan. Selain itu terdapat variasi warna merah fanta dan merah kekuningan yang mengindikasikan bahwa isolat yang ditemukan lebih beragam dan bervariasi. Isolat yang ditemukan pada lahan kacang tanah memiliki kemiripan dengan isolat yang ditemukan pada lahan kedelai dan kacang Panjang. Sedangkan isolat *Rhizobium* yang ditemukan pada lahan kacang hijau sebagian besar berwarna merah muda, namun ditemukan juga isolat yang berwarna kuning. Perbedaan warna antar isolat ini mengindikasikan bahwa terdapat pengaruh yang spesifik antara komunitas bakteri rizosfer dengan tanaman inangnya. Selain itu, lahan yang ada tanamannya maupun tidak ada tanamannya akan memengaruhi jumlah *Rhizobium* yang didapatkan. Hal ini sesuai dengan penelitian (Purwaningsih, 2008). bahwa sampel tanah dari tanah yang tidak ada tanamannya dengan sampel tanah pada daerah perakaran tanaman menunjukkan jumlah *Rhizobium* yang lebih banyak pada tanah yang ada tanamannya.

**Tabel 2.** Karakteristik warna koloni isolat bakteri *Rhizobium* pada Rizosfer tanaman Legum

Komoditas	Jumlah Isolat	Kode Isolat	Warna Koloni
Kedelai	16	KD1	Pink-kekuning kuninga
		KD2	Merah muda-keputihan
		KD3	Merah muda-kuning
		KD4	Merah muda
		KD5	Merah muda
		KD6	Merah muda
		KD7	Merah muda-keputihan

Komoditas	Jumlah Isolat	Kode Isolat	Warna Koloni
		KD8	Merah muda
		KD9	Merah muda-keputihan
		KD10	Merah Muda
		KD11	Merah muda
		KD12	Putih bening
		KD13	Merah muda-keputihan
		KD14	Merah muda
		KD15	Merah muda
		KD16	Merah muda
Kacang Panjang	16	KP1	Merah muda
		KP2	Merah muda-Bening
		KP3	Merah Fanta
		KP4	Putih-Kemerah mudaan
		KP5	Putih-Kemerah mudaan
		KP6	Merah muda-Keputih-putihan
		KP7	Mutih-Kemerahmudaan
		KP8	Putih-Kemerah mudaan
		KP9	Merah muda
		KP10	Merah muda
		KP11	Merah muda-kekuningan
		KP12	Merah muda-Keputihan
		KP13	Merah muda
		KP14	Merah muda
		KP15	Merah muda
		KP16	Merah muda
Kacang Tanah	7	KT1	Merah muda
		KT2	Merah muda
		KT3	Merah muda
		KT4	Merah muda
		KT5	Merah-Keputih putihan
		KT6	Merah-Keputih putihan
		KT7	Merah muda
Kacang Hijau	8	KH1	Merah muda
		KH2	Merah muda
		KH3	Merah muda
		KH4	Merah muda-kekuningan
		KH5	Merah muda
		KH6	Merah muda
		KH7	Merah muda-kekuningan
		KH8	Merah muda

#### 4. Simpulan

Isolai bakteri *Rhizobium* dilakukan pada tanaman legum yaitu kacang tanah, kacang hijau, kedelai, dan kacang panjang. Populasi bakteri *Rhizobium* hasil isolasi paling banyak ditemukan pada lahan kacang Panjang. Isolat bakteri *Rhizobium* sebagian besar berwarna putih keruh, putih bening, dan merah muda. Total isolat yang ditemukan pada kedelai yaitu 16 isolat, kacang Panjang 16 isolat, kacang tanah 7 isolat, dan kacang hijau 8 isolat. Isolat bakteri *Rhizobium* yang ditemukan dapat dijadikan sebagai isolat lokal yang dikembangkan menjadi kandidat biofertilizer spesifik lokal.

#### 5. Referensi

- Afidzatuttama, Nawangsih, AA., Mutaqin, K.K. (2022). Potensi bakteri filosfer pada daun kubis untuk mengendalikan penyakit busuk lunak oleh *Pectobacterium carotovorum* pada sawi putih. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*, 18(3), 115-124. Doi 10.14692/jfi.18.3.115-124.
- Denison, R. F. (2000). Legume sanctions and the evolution of symbiotic cooperation by rhizobia. *The American Naturalist*, 156, 567-576.
- Fajrin, V., Erdiansyah, I., & Damanhuri. (2017). Koleksi dan identifikasi bakteri penambat N pada pusat lokasi tanaman kedelai edamame (*Glycine max* L. Merr) di Kabupaten Jember. *Journal of Applied Agricultural Sciences*, 1(2), 43-153. <https://doi.org/10.25047/agriprima.v1i2.35>

- Gibson, A. H. (1981). Current perspectives in nitrogen fixation. In *Proceedings of the Fourth International Symposium on Nitrogen Fixation* (pp. 1–534). Australian Academy of Science.
- Hartanti, O., D. Oktavia., B. Identifikasi bakteri pada bintil akar aktif dan tidak aktif serta *Rhizobium* Tanaman Kacang Panjang. *Jurnal Kingdom*, 9(2), 138-147.
- Hutasoit, R., Tarigan, A., & Sirait, J. (2017). Tanaman pakan leguminosa dalam sistem integrasi dengan perkebunan jeruk. *Pastura*, 7(1), 32–36.
- Irfan, M. (2014). Isolasi dan enumerasi bakteri tanah gambut di perkebunan kelapa sawit PT Tambang Hijau Kecamatan Tambang Kabupaten Kampar. *Jurnal Agroteknologi*, 5(1), 1–8.
- James, E. K., Olivares, F. L., de Oliveira, A. L. M., dos Reis, F. B., da Silva, L. G., & Reis, V. M. (2001). Further observations on the interaction between sugarcane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. *Journal of Experimental Botany*, 52, 547–760.
- Kirchhof, G., Reis, V. M., Baldani, J. I., Eckert, B., Döbereiner, J., & Hartmann, A. (1997). Occurrence, physiological, and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. *Plant and Soil*, 194, 45–55.
- Liem, J., L., Arianita, B., A., Sugiati, S., Handoko, Y., A., 2019. Optimalisasi bakteri *Rhizobium japonicum* sebagai penambat nitrogen dalam Upaya peningkatan produksi jagung. *Jurnal Galung Tropika*, 8(1), 64-73.
- Mpapa, B. L. (2016). Analisis kesuburan tanah tempat tumbuh pohon jati (*Tectona grandis* L.) pada ketinggian yang berbeda. *Agrista*, 20(3), 1–5.
- Pamungkas, R., D., S. (2018). Isolasi bakteri *Rhizobium* dari Tumbuhan Leguminosa yang Tumbuh di Lahan Bergambut. *Jurnal Agroteknologi*.9(1), 31-40.
- Purwani, J., Suchayono, D. (2020). Viabilitas *Rhizobium* dalam formula bahan Pembawa dan cara inokulasi dalam Teknik produksi pupuk hayati. *Jurnal Agrosains dan Teknologi*. 5(2), 99-107.
- Purwaningsih, S. (2008). Populasi bakteri *Rhizobium* di tanah pada beberapa tanaman dari Pulau Buton, Kabupaten Muna, Provinsi Sulawesi Tenggara. *Jurnal Tanah Tropika*, 14(1), 65–70.
- Salazar, A., et al. (2009). Role of plant growth-promoting bacteria in sustainable agriculture. *Basha Foundation*.
- Sari, E., Flatian, A. N., Sari, Z. I., & Sulaeman, E. (2018). Isolasi dan karakterisasi *Rhizobium* dari *Glycine max* L. dan *Mimosa pudica* Linn. *Jurnal Penelitian Biologi, Botani, Zoologi, dan Mikrobiologi*, 3(2), 55–62.
- Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (1994). *Handbook for rhizobia: Methods in legume-Rhizobium technology*. Springer-Verlag.
- Tando, E. (2018). Upaya efisiensi dan peningkatan ketersediaan nitrogen dalam tanah serta serapan nitrogen pada tanaman padi sawah (*Oryza sativa* L.). *Buana Sains*, 18(2), 171–180.
- Velázquez, E. (2017). Current status of the taxonomy of bacteria able to establish nitrogen-fixing legume symbiosis. In *Microbes for legume improvement* (pp. 1–43).