

Fusi Protoplas Intraspesies antar *Bradyrhizobium japonicum*

Rasti Saraswati, Dwi N. Susilowati, dan Elsanti

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

ABSTRAK

Perbaikan mutu genetik inokulum rhizobia dapat dilakukan menggunakan teknik fusi protoplas. Penelitian fusi protoplas intraspesies dilakukan antara *Bradyrhizobium japonicum* L17^{kloram} dengan *B. japonicum* Pd10AB^{kan} dengan tujuan mendapatkan bakteri hasil fusi yang memiliki karakter berbeda dengan parental-nya. Pemanenan sel untuk persiapan protoplas dilakukan pada pertengahan fase eksponensial. Teknik isolasi dan fusi protoplas dilakukan berdasarkan metode Eisa *et al.* tahun 1995, menggunakan lisozim 5 mg/ml sebagai pelisis dinding sel dan *polyethylene glycol* (PEG) 4.000 50% (b/v) sebagai agen fuso-genik. Regenerasi protoplas hasil fusi menggunakan medium nonselektif; sedangkan seleksi bakteri hasil fusi menggunakan medium selektif yang mengandung antibiotik kanamisin (200 µg/ml) dan kloramfenikol (100 µg/ml). Karakterisasi bakteri hasil fusi meliputi pewarnaan Gram, pertumbuhan di medium YEMA yang mengandung *bromthymol blue*, kemampuan menyerap warna *congo red*, pertumbuhan pada medium YEMA yang mengandung NaCl 2%, medium YEMA dengan pH 4,5 dan 9, serta karakterisasi menggunakan pola Resistensi Intrinsik Antibiotik (RIA). Pemanenan sel untuk persiapan protoplas dilakukan pada jam ke-72. Persentase pembentukan protoplas *B. japonicum* L17^{kloram} sebesar 72,84%; sedangkan untuk *B. japonicum* Pd10AB^{kan} sebesar 70,11%. Frekuensi regenerasi *B. japonicum* L17^{kloram} sebesar $5,35 \times 10^{-3}$, sedangkan frekuensi regenerasi protoplas *B. japonicum* Pd10AB^{kan} sebesar $7,93 \times 10^{-4}$. Frekuensi fusi protoplas sebesar $1,17 \times 10^{-4}$. Karakterisasi bakteri hasil fusi menunjukkan bahwa INTRA-1-INTRA-30 merupakan bakteri Gram negatif dan berbentuk batang, tidak dapat hidup pada konsentrasi NaCl 2%, bereaksi basa pada medium yang mengandung *bromthymol blue* dan tidak dapat menyerap warna *congo red*. Bakteri hasil fusi INTRA-1-INTRA-14 dapat tumbuh pada medium YEMA dengan pH 4,5 dan 9, INTRA-15, INTRA-16 dan INTRA-19 dapat tumbuh pada pH 4,5 dan tidak tumbuh subur pada pH 9; sedangkan INTRA-17, INTRA-18, INTRA-20-INTRA-30 dapat tumbuh pada pH 4,5 dan tidak dapat tumbuh pada pH 9. Karakterisasi menggunakan pola Resistensi Intrinsik Antibiotik (RIA) menunjukkan bahwa bakteri hasil fusi terbagi dalam enam kelompok yang berbeda dengan parentalnya. Berdasarkan pengujian kemampuan penambatan N₂, diperoleh hasil bahwa bakteri hasil fusi INTRA memberikan respon nyata terhadap bobot kering tajuk, bobot kering akar dan bintil akar, dan kadar N total tanaman kedelai. Diperoleh INTRA-8 yang memiliki keefektifan simbiotik sebesar 70% terhadap kontrol IoN, dan hal ini tergolong sangat tinggi dibandingkan dengan parental, kontrol IoNo, dan kontrol IoN.

Kata kunci: Fusi protoplas, intraspesies, *B. japonicum*, kemampuan penambatan N₂

ABSTRACT

Genetic improvement of Rhizobia can be carried out by protoplast fusion technique. The aim of this research is to get bacterial protoplast fusion differed from their parental wild types in Nitrogen fixing activity. This intraspecific protoplast fusions was carried out between *B. japonicum* L17-1^{kloram} and *B. japonicum* Pd10Ab^{kan}.

Cells for protoplast preparation were harvested at mid of exponential phase and both isolation and protoplast fusion technique followed Eisa et al method (1995). Lytic of cell wall used lysozyme (a final concentration 5 mg/ml) and fusogenic agent was polyethylene glycol (PEG) 4000 50% (w/v). Protoplast regeneration was done in a non selective medium, but selection of bacterial protoplast fusion was carried out in a selective medium supplemented with kanamycin (200 µg/ml) and chloramphenicol (100 µg/ml). Characterization of bacterial protoplast fusion included Gram staining, the growth in a YEMA medium containing bromthymol blue, Congo red absorption, the growth in a YEMA medium containing 2% NaCl, YEMA with pH 4.5 and 9, and Intrinsic Antibiotic Resistance (IAR). Cell for protoplast preparation harvested at 72 hours. The percentage of bacterial protoplast was estimated 72.84% for *B. japonicum* L17-1^{kan} and 70.11% for *B. japonicum* Pd10AB^{kan}. Regeneration frequencies is about 5.35×10^{-3} for *B. japonicum* L17-1^{kan} and 7.93×10^{-4} for *B. japonicum* Pd10AB^{kan}. Moreover the frequency of fusions is about 1.17×10^{-4} . Characterization of bacterial protoplast fusion revealed that INTRA-1 into INTRA-30 were rod-shaped Gram negative; did not grow on 2% NaCl; alkaline reacted in a medium containing bromthymol blue and did not absorb Congo red. Bacterial INTRA-1 into INTRA-14 grow in a YEMA medium with pH 4.5 and 9; but INTRA-15; INTRA-16 and INTRA-19 only easily grow in pH 4.5, did not easily grow in pH 9. Moreover bacterial INTRA-17; INTRA-18; INTRA-20 into INTRA-30 grow in pH 4.5, but did not grow in pH 9. Bacterial protoplast fusion can be divided into 6 groups based on IAR characterization. We got only INTRA-8 gave significant response to shoot dry weight, root and nodule dry weight and total nitrogen than control. The symbiotic effectivity of INTRA-8 is 70% estimated from control (IoN) and more higher than parental wild types.

Key words: Protoplast fusion; intraspecific; *B. japonicum*; Nitrogen Fixing activity

PENDAHULUAN

Penggunaan inokulan *Rhizobium* untuk meningkatkan produksi kedelai merupakan aplikasi dari *Biological Nitrogen Fixation* yang memiliki banyak keunggulan dibandingkan dengan penggunaan pupuk nitrogen anorganik. Keunggulan tersebut diantaranya ialah tidak menyebabkan pencemaran lingkungan, bahkan dapat mengendalikan pencemaran, meningkatkan kesuburan, dan produktivitas tanah, serta efisiensi penggunaan pupuk (Sardjoko, 1991; Bohlool *et al.*, 1992; Suriawirya, 1995).

Rhizobium ialah bakteri yang mampu menambat N₂ udara melalui simbiosis dengan tanaman kacang-kacangan (Somasegaran dan Hoben, 1994). Keberhasilan penambatan N₂ udara oleh *Rhizobium* tergantung pada interaksi antara faktor-faktor berikut, yaitu keserasian strain *Rhizobium* dengan tanaman inang, kemampuan berkompetisi dengan *Rhizobium* indigen, kemampuan tanaman inang untuk menyediakan nutrisi bagi *Rhizobium* yang bersimbiosis dengannya, serta faktor lingkungan terutama faktor-faktor pembatas dalam tanah, seperti ketersediaan hara makro, mikro, kelembaban tanah, pH, dan suhu (Freire, 1984).

Hasil penelitian inokulasi *Rhizobium* di lapangan menunjukkan bahwa keefektifannya dalam meningkatkan produksi kedelai masih beragam dan mutunya kurang konsisten. Oleh karena itu, diperlukan upaya untuk meningkatkan kemampuan penambatan N₂ melalui perbaikan mutu genetik

strain *Rhizobium* menggunakan teknik genetika yang dikombinasikan dengan prosedur seleksi (Saraswati *et al.*, 1996).

Perkembangan yang pesat dari biologi molekuler memungkinkan untuk memperoleh strain *Rhizobium* yang unggul dengan kemampuan penambatan N₂ yang tinggi melalui teknik rekayasa genetika seperti transformasi, konjugasi, trans-duksi, dan transfeksi. Namun demikian proses proses tersebut hanya berlangsung satu arah dan transfer DNA hanya terjadi dari bakteri donor ke bakteri resipien. Transformasi DNA secara timbal balik telah ditemukan pada beberapa mikroorga-nisme melalui fusi protoplas dari sel yang berbeda. Sel hibrid yang terbentuk mem-bawa sifat kedua induknya (Elkan, 1984; Ibrahim, 1996).

Kemajuan teknologi fusi protoplas memungkinkan untuk mengembangkan sifat-sifat genetik dari bakteri, seperti yang telah dilaporkan pada beberapa jenis bakteri Gram positif (*Bacillus* Cohn) dan bakteri Gram negatif (*Escherichia coli* (Migula) Castellani & Chalmers dan *Providencia alcalifaciens*) (Hopwood, 1981).

Laboratorium Mikrobiologi Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor mempunyai koleksi *Rhizobium* yang memiliki kemampuan penambatan N₂ yang beragam. Untuk meningkatkan kemampuan penambatan N₂ oleh *rhizobium* tersebut telah dilakukan perbaikan mutu genetik antara lain melalui transfer gen *nif* menggunakan metode konjugasi (Arimurti, 2000) dan mutasi dengan etil metil sulfonat. Teknologi fusi protoplas belum pernah dilakukan pada koleksi *Rhizobium* tersebut, sehingga perlu dilakukan penelitian fusi protoplas. Penggunaan teknologi fusi protoplas diharapkan menghasilkan bakteri hasil fusi yang mampu meningkatkan kemampuan penambatan N₂. Penelitian fusi protoplas intraspecies antara strain *Bradyrhizobium japonicum* L17 dengan *B. japonicum* Pd10AB bertujuan memperoleh bakteri hasil fusi yang memiliki karakter berbeda dengan parental.

BAHAN DAN METODE

Seleksi Mutan Resisten Antibiotik

Seleksi mutan resisten antibiotik dilakukan berdasarkan Somasegaran and Hoben (1994). Sebanyak 0,1 ml inokulum sel diinokulasikan dengan cara sebar ke dalam cawan Petri yang berisi YEMA (Yeast Ekstrak Manitol Agar) yang masing-masing mengandung antibiotik ampicilin, kanamisin, kloramfenikol, tetrasiklin dengan kisaran 50-1.000 µg/ml, kemudian diinkubasi selama 5-7 pada suhu 30°C. Frekuensi mutasi dihitung berdasarkan perbandingan banyaknya sel yang tumbuh pada medium antibiotik dengan banyaknya sel awal yang tumbuh pada medium YEMA. Koloni tunggal dari masing-masing perlakuan pada *strain* yang termutasi di-pindahkan ke medium YEM agar padat miring yang mengandung antibiotik, kemudian

diinkubasi pada suhu 30°C. Biakan tersebut digunakan sebagai biakan untuk fusi protoplas.

Pembuatan Kurva Pertumbuhan *B. japonicum*

Sebanyak 1 ml inokulum sel diencerkan sehingga banyaknya sel akhir di dalam 99 ml medium YEMB (Yeast Ekstrak Manitol Broth) mencapai 1×10^2 - 1×10^3 sel/ml yang digunakan sebagai banyaknya sel awal pada jam ke nol kurva pertumbuhan. Kultur bakteri diinkubasi pada suhu 30°C dalam *shaking incubator* dengan kecepatan 100 rpm. Banyaknya sel dihitung menggunakan metode *Total Plate Count* hingga 168 jam.

Isolasi Protoplas

Medium YEMB 99 ml yang mengandung suspensi sel *B. japonicum* (1×10^2 - 1×10^3 sel/ml) diinkubasi pada suhu 30°C dalam *shaking incubator* dengan kecepatan 100 rpm hingga pertengahan fase eksponensial (72 jam). Sebanyak 10 ml suspensi sel (1×10^7 - 1×10^8 sel/ml) dipipet ke dalam tabung sentrifus dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 x g selama 10 menit. Pelet yang diperoleh dicuci 1 kali dengan 1,5 ml *N-Laurylsarcosine* 1% dan 3 kali dengan larutan dapar Tris-HCl 30 mM (pH 7,5) yang mengandung manitol 0,6 M. Sebanyak 1,5 ml lisozim steril dengan konsentrasi akhir lisozim 5 mg/ml yang telah dilarutkan di dalam larutan dapar yang sama kemudian ditambahkan ke dalam pelet yang telah dicuci dan dibuat suspensi. Suspensi sel diinkubasi pada suhu 37°C. Reaksi lisis pertama berlangsung selama 30 menit. Reaksi lisis dilanjutkan setelah mengganti larutan lisozim kemudian diinkubasi kembali selama 30 menit. Protoplas yang ada dalam larutan lisozim disentrifugasi dengan kecepatan 2.000 x g selama 10 menit. Presipitat dicuci dengan larutan dapar Tris-HCl 30 mM (pH 7,5) yang mengandung manitol 0,6 M kemudian disentrifugasi kembali. Pelet protoplas yang terbentuk disuspensi-kkan kembali dengan 3 ml dapar yang sama. Struktur protoplas diamati menggunakan mikroskop fase kontras pada perbesaran 600 x. Perhitungan protoplas dilakukan menggunakan haemositometer sesuai dengan Vincent (1970). Persentase pembentukan protoplas dihitung berdasarkan perbandingan antara banyaknya protoplas yang terbentuk dengan banyaknya sel awal sebelum isolasi (Eisa *et al.*, 1995).

Regenerasi Protoplas

Suspensi protoplas diencerkan 10^{-2} - 10^{-4} , kemudian sebanyak 0,1 ml suspensi protoplas dari masing-masing pengenceran diinokulasikan ke dalam 1,2 ml medium YEM agar lunak yang mengandung manitol 0,6 M dan kemudian dituang di atas medium YEM agar padat yang mengandung manitol 0,6 M. Koloni dapat dihitug setelah diinkubasi selama 15-20 hari. Frekuensi regenerasi dihitung berdasarkan perbandingan banyaknya protoplas yang

tumbuh pada medium regenerasi dengan banyaknya protoplas hasil isolasi (Matsushima and Baltz 1986).

Fusi Protoplas

Sebanyak 1 ml suspensi dari masing-masing protoplas parental yang akan di-fusikan dicampur dengan perbandingan 1 : 1, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2.000 X g selama 10 menit untuk mendapatkan pelet. Sebanyak 1 ml campuran PEG steril ditambahkan ke dalam tabung yang berisi pelet. Suspensi campuran protoplas kemudian langsung dihomogenkan dengan pengocokan perlahan-lahan (10 rpm) pada suhu 30°C. Setelah diinkubasi selama 30 menit, beberapa tetes suspensi campuran protoplas diamati di bawah mikroskop fase kontras pada perbesaran 600 x dan sebanyak 5 ml larutan dapar Tris-HCl 30 mM (pH 7,5) yang mengandung manitol 0,6 M ditambahkan ke dalam suspensi campuran protoplas kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2.000 X g selama 10 menit. Pelet dicuci 3 kali dengan larutan dapar yang sama, lalu disentrifugasi kembali. Pelet protoplas yang terbentuk kemudian disuspensikan dengan 3 ml larutan dapar Tris-HCl 30 mM (pH 7,5).

Regenerasi Protoplas Hasil Fusi

Suspensi protoplas hasil fusi diencerkan 10^0 - 10^{-2} , kemudian 0,1 ml suspensi protoplas dari masing-masing pengenceran diinokulasikan ke dalam 1,2 ml medium YEM agar lunak yang mengandung manitol 0,6 M dan kemudian dituang di atas medium YEM agar padat yang mengandung manitol 0,6 M, kemudian diinkubasi selama 15-20 hari. Semua koloni yang representatif dipindahkan ke dalam medium selektif, kemudian diinkubasi selama 5-7 hari pada suhu 30°C. Frekuensi fusi protoplas dihitung berdasarkan perbandingan jumlah sel yang tumbuh pada medium selektif dengan jumlah protoplas salah satu *strain* parental yang tumbuh pada medium regenerasi (jumlah sel regenerasi terbanyak) (Matsushima and Baltz 1986).

Karakterisasi Bakteri Hasil Fusi

Karakterisasi bakteri hasil fusi yang dilakukan meliputi karakterisasi secara mikroskopis, pengujian pertumbuhan koloni bakteri pada medium yang mengandung *bromthymol blue*, pada medium yang mengandung 25 µg/ml *congo red*, pertumbuhan pada medium YEMA pH 4,5 dan 9, dan pada medium YEMA yang mengandung NaCl 2%. Di samping itu, juga dilakukan karakterisasi bakteri hasil fusi dengan pola Resistensi Intrinsik Antibiotik (RIA) dengan cara sebanyak satu ose biakan bakteri hasil fusi dimasukkan ke dalam 1 ml larutan fisiologis NaCl 0,85%, kemudian dibuat suspensi. Sebanyak 5 µl suspensi ditetaskan di atas medium YEMA dalam cawan Petri yang masing-masing mengandung antibiotik ampisilin, karbenisilin, spektinomisin, tetrasiklin dengan konsentrasi 100 µg/ml, 250 µg/ml, dan 500 µg/ml, serta

kanamisin 200 µg/ml, kloramfenikol 100 µg/ml dan 150 µg/ml kemudian diinkubasi selama 5-7 hari pada suhu 30°C.

Pengujian Kemampuan Penambatan N₂ Bakteri Hasil Fusi

Pengujian ini dilakukan terhadap bakteri hasil fusi INTRA di rumah kaca dengan metode Botol Leonard dan menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 3 ulangan. Kontrol perlakuan yang digunakan ialah (i) tanpa inokulasi dan tanpa pemberian larutan hara KNO₃ dan (ii) tanpa inokulasi dengan pemberian larutan hara KNO₃ 0.05%.

Langkah awal membuat larutan hara Ahmed dan Evans, selanjutnya membuat pasir parafin. Setelah itu dilakukan persiapan media tumbuh berupa arang dengan ukuran <3 mm dan pasir kuarsa yang telah dicuci bersih. Perbandingan pasir dan arang sebesar 3 : 1, dan dicampur dengan 0,4 g CaCO₃ pada setiap botol. Selanjutnya setiap botol ditutup dengan kertas semen dan disterilkan pada suhu 121°C selama 1 jam. Setelah sterilisasi, botol-botol tersebut disimpan di dalam ruangan.

Persiapan inokulan dilakukan dengan menumbuhkan setiap isolat INTRA di dalam medium pertumbuhan YEM selama 4 hari pada suhu ruang. Selanjutnya benih kedelai yang akan digunakan disterilisasi permukaannya terlebih dahulu.

Penanaman dilakukan dengan memasukkan benih kedelai ke dalam lubang yang telah dipersiapkan (3 benih/botol), kemudian diinokulasi (1 ml/benih). Pada saat tanaman berumur 3 hari, botol-botol penumbuhan ini dipindahkan ke rumah kaca dan disusun secara acak. Setelah tanaman berumur 5 hari, kertas aluminium dibuka dan dilakukan penjarangan menjadi 2 tanaman/botol. Tanaman dipelihara dengan cara selalu menambahkan larutan hara ke dalam botol yang sudah mengalami penurunan volume karena pertumbuhan tanaman.

Pemanenan dilakukan setelah tanaman berumur 42 hari, yaitu dengan cara memotong setiap tanaman menggunakan gunting steril, dan memisahkan bagian atas tanaman (tajuk) dengan bagian akar, dan bintil akar. Selanjutnya dilakukan pengamatan dan pengukuran yang meliputi: berat kering tajuk, akar dan bintil akar (dengan cara bagian tanaman dioven pada suhu 70°C selama 2 hari); kadar N tanaman, yaitu dengan metode Kjeldahl.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Seleksi Mutan Resisten Antibiotik

Seleksi mutan resisten antibiotik dilakukan untuk mendapatkan penanda ge-netik mikroba yang nantinya akan digunakan pada proses seleksi hasil fusi proto-plas intraspecies. Berdasarkan hasil seleksi terhadap kedua tetua, *B. japonicum* L17-1 dan *B. japonicum* Pd10AB terhadap antibiotik ampisilin, kanamisin, kloram-fenikol dan tetrasiklin dengan kisaran

konsentrasi 50-1.000 µg/ml diperoleh bahwa mutan *B. japonicum* L17-1 resisten terhadap kloramfenikol (100 µg/ml) dan mutan *B. japonicum* Pd10AB resisten terhadap kanamisin (200 µg/ml).

Banyaknya sel awal *B. japonicum* L17-1 ialah $1,1 \times 10^9$ sel/ml; sedangkan banyaknya sel *B. japonicum* L17-1 yang tumbuh pada medium kloramfenikol (100 µg/ml) ialah $1,5 \times 10^2$ sel/ml, sehingga didapatkan frekuensi mutasi sebesar $1,36 \times 10^{-7}$. Banyaknya sel awal *B. japonicum* Pd10AB ialah $1,4 \times 10^9$ sel/ml; sedangkan banyaknya sel *B. japonicum* Pd10AB yang tumbuh pada medium kanamisin (200 µg/ml) ialah $2,2 \times 10^2$ sel/ml, sehingga didapatkan frekuensi mutasi sebesar $1,57 \times 10^{-7}$. Menurut Somasegaran dan Hoben (1994) rhizobium dianggap mutan resisten antibiotik apabila frekuensi mutasi berkisar 10^{-7} - 10^{-5} . Mutan-mutan yang digunakan merupakan mutan yang memiliki resistensi pada satu jenis antibiotik.

Mutan resisten antibiotik memiliki keuntungan dibandingkan dengan mutan yang diperoleh dari prosedur mutagenik. Pada mutan resisten antibiotik tidak terdapat kerusakan gen lain, karena mutan tersebut tidak diperoleh melalui prosedur mutagenik yang dapat mengakibatkan kerusakan yang dapat terdeteksi maupun yang tidak terdeteksi (Beringer, 1980).

Kurva Pertumbuhan *B. japonicum*

Pembuatan kurva pertumbuhan *B. japonicum* L17-1^{kloram} dan Pd10AB^{kan} dilakukan selama tujuh hari dengan membagi sembilan titik pengamatan. Penghitungan banyaknya sel menggunakan metode TPC yang memiliki keuntungan, yaitu banyaknya sel yang dihitung merupakan sel yang hidup.

Berdasarkan pengamatan kurva pertumbuhan *B. japonicum* L17-1^{kloram} dan Pd10AB^{kan}, pertengahan fase eksponensial dicapai pada jam ke-72 dengan banyaknya sel *B. japonicum* L17-1^{kloram} $3,29 \times 10^7$ sel/ml dan *B. japonicum* Pd10AB^{kan} $8,2 \times 10^7$ sel/ml. Menurut Eisa *et al.* (1995) pemanenan sel rhizobium untuk isolasi protoplas dilakukan pada pertengahan fase eksponensial.

Pemanenan sel yang dilakukan pada fase eksponensial akan menghasilkan lebih banyak protoplas dibandingkan pemanenan sel pada fase lain. Hal tersebut disebabkan komposisi dinding sel masih berubah selama fase eksponensial, sehingga pelisisan sel lebih mudah. Selain itu protoplas yang berasal dari sel tua viabilitasnya lebih rendah (Hopwood, 1981; Smith, 1993). Pemanenan sel pada fase pertumbuhan yang tidak tepat akan mengakibatkan tidak diperolehnya protoplas pada proses isolasi protoplas (Matsushima dan Baltz, 1986).

Penggunaan medium YEMB yang mengandung dapar fosfat sangat dibutuhkan untuk pertumbuhan *B. japonicum* sebelum isolasi protoplas. Apabila digunakan medium YEMB tanpa dapar fosfat, maka saat fase eksponensial berlangsung *B. japonicum* akan menghasilkan eksopolisakarida (EPS) berlebihan yang dapat menyulitkan lisis dinding sel.

Isolasi Protoplas

Pengamatan mikroskopis struktur protoplas hasil isolasi dilakukan menggunakan mikroskop fase kontras (pada perbesaran 600x) pada suspensi protoplas setelah inkubasi satu jam dengan larutan lisozim. Sel *B. japonicum* L17-1^{kloram} dan *B. japonicum* Pd10AB^{kan} sebelum isolasi berbentuk batang; sedangkan sel *B. japonicum* L17-1^{kloram} dan *B. japonicum* Pd10AB^{kan} yang telah kehilangan dinding selnya akibat lisis oleh lisozim mengalami perubahan bentuk sel dari bentuk batang menjadi bentuk bundar. Hal tersebut disebabkan hilangnya dinding sel yang berfungsi untuk mempertahankan bentuk sel. Struktur protoplas rapuh karena membran plasma memiliki kekuatan mekanik yang kecil. Untuk mempertahankan struktur tersebut diperlukan *osmotic stabilizer* (Marquis dan Corner, 1976).

Percobaan Eisa *et al.* (1995) menunjukkan bahwa penggunaan dapar Tris-HCl 30 mM (pH 7,5) yang mengandung manitol 0,6 M sebagai *osmotic stabilizer* untuk mempertahankan struktur protoplas lebih baik dibandingkan apabila menggunakan MgSO₄ 0,6 M. Hasil percobaan yang dilakukan Marquis dan Corner (1976) menunjukkan bahwa ada hubungan antara konsentrasi larutan *osmotic stabilizer* dengan berat molekul *osmotic stabilizer* dalam mempertahankan kestabilan protoplas pada larutan dapar yang mengandung *osmotic stabilizer*. *Osmotic stabilizer* yang memiliki konsentrasi larutan sama dengan berat molekul yang berbeda akan mempunyai pengaruh yang berbeda dalam menjaga kestabilan protoplas. *Osmotic stabilizer* dengan berat molekul besar lebih baik dibandingkan *osmotic stabilizer* dengan berat molekul kecil karena semakin besar luas permukaan zat maka difusinya semakin lambat. Difusi yang cepat akan menyebabkan protoplas pecah, sedangkan difusi yang lambat tidak menyebabkan protoplas pecah (Marquis dan Corner, 1976).

Berdasarkan perhitungan menggunakan haemositometer, banyaknya sel awal *B. japonicum* L17-1^{kloram} 4,05 x 10⁸ sel/ml; sedangkan banyaknya protoplas *B. japonicum* L17-1^{kloram} yang terbentuk sebanyak 2,95 x 10⁸ protoplas/ml, sehingga persentase pembentukan protoplas *B. japonicum* L17-1^{kloram} sebesar 72,84%. Banyaknya sel awal *B. japonicum* Pd10AB^{kan} 4,35 x 10⁸ sel/ml; sedangkan banyaknya protoplas *B. japonicum* Pd10AB^{kan} yang terbentuk 3,05 x 10⁸ protoplas/ml, sehingga persentase pembentukan protoplas *B. japonicum* Pd10AB^{kan} sebesar 70,11%. Hasil tersebut lebih rendah dibandingkan dengan persentase pembentukan protoplas yang didapat oleh Eisa *et al.* (1995) yaitu 80%. Hal tersebut mungkin disebabkan perbedaan strain yang digunakan karena strain yang berbeda memiliki karakter yang berbeda. Percobaan Metcalf dan Deibel (1969) menunjukkan bahwa penggunaan lisozim pada empat strain *Streptococcus faecium* var. *casseliflavus* memberikan hasil yang berbeda. Untuk memperoleh persentase protoplas yang lebih baik diperlukan optimasi penggunaan detergen dan konsentrasi substrat.

Optimasi penggunaan detergen dapat dilakukan dengan meningkatkan konsentrasi *N-Laurylsarcosine* atau menggunakan detergen jenis lain.

Metcalf dan Deibel (1969) menggunakan *N-Laurylsulfate* sebagai detergen dengan konsentrasi 2,3% untuk meningkatkan lisis dinding sel pada *Streptococcus faecium* oleh lisozim.

Menurut Weiss (1976) hal lain yang harus diperhatikan dalam penggunaan lisozim untuk melisis dinding sel adalah perbandingan antara konsentrasi substrat dengan konsentrasi enzim. Peningkatan konsentrasi substrat dapat meningkatkan atau menurunkan kecepatan reaksi enzim (Salle, 1961). Oleh karena itu perlu dicari perbandingan konsentrasi sel *B. japonicum* L17-1^{kloram} dan *B. japonicum* Pd10AB^{kan} yang akan dilisis dengan konsentrasi lisozim yang digunakan.

Regenerasi Protoplas

Regenerasi protoplas *B. japonicum* L17-1^{kloram} dan *B. japonicum* Pd10AB^{kan} dilakukan dengan menanam suspensi protoplas pada medium YEM agar lunak yang mengandung manitol 0,6 M di atas medium YEM agar padat yang mengandung manitol 0,6 M.

Agar lunak yang digunakan untuk regenerasi protoplas berguna untuk mengurangi pengaruh fisik yang dapat merusak protoplas seperti jika menggunakan spatel untuk menyebar suspensi protoplas pada medium agar padat. Kondisi dehidrasi pada medium agar padat dapat meningkatkan frekuensi regenerasi protoplas (Hopwood *et al.* 1981; Matsushima dan Baltz, 1986). Menurut Roger *et al.* (1976), penggunaan medium cair untuk regenerasi protoplas *Bacillus megaterium* menyebabkan dinding sel tidak terbentuk.

Penghitungan sel hasil regenerasi dilakukan pada hari ke-15 sampai dengan hari ke-18. Koloni hasil regenerasi protoplas yang diamati pada hari ke-18 berbentuk bulat dengan diameter koloni 0,5 mm-2 mm, tepian rata, berelevasi cembung, lengket, *opaque*, dan tidak menyerap warna *congo red*.

Bentuk koloni hasil regenerasi protoplas tidak berbeda dengan bentuk koloni sel awal. Waktu regenerasi protoplas *B. japonicum* L17-1^{kloram} dan *B. japonicum* Pd10AB^{kan} lebih lama yaitu 15-18 hari dibandingkan pertumbuhan sel awal yaitu 5-7 hari. Hal tersebut mungkin disebabkan protoplas memerlukan waktu untuk mensintesis dinding sel dan membelah.

Banyaknya protoplas *B. japonicum* L17-1^{kloram} $2,95 \times 10^8$ protoplas/ml; sedangkan jumlah protoplas *B. japonicum* L17-1^{kloram} yang tumbuh pada medium regenerasi $1,58 \times 10^6$ sel/ml, sehingga diperoleh frekuensi regenerasi protoplas *B. japonicum* L17-1^{kloram} sebesar $5,35 \times 10^{-3}$. Banyaknya protoplas *B. japonicum* Pd10AB^{kan} $3,05 \times 10^8$ protoplas/ml; sedangkan banyaknya protoplas *B. japonicum* Pd10AB^{kan} yang tumbuh pada medium regenerasi $2,42 \times 10^5$ sel/ml, sehingga diperoleh frekuensi regenerasi protoplas *B. japonicum* Pd10AB^{kan} sebesar $7,93 \times 10^{-4}$.

Frekuensi regenerasi *B. japonicum* L17-1^{kloram} dan *B. japonicum* Pd10AB^{kan} berbeda dengan hasil yang diperoleh Eisa *et al.* (1995) pada *B. japonicum* TAL 377, yaitu $1,8 \times 10^{-3}$. Hal tersebut kemungkinan disebabkan

perbedaan *strain* yang di-gunakan. Menurut Hopwood (1981) setiap *strain* memerlukan nutrisi dan kondisi yang berbeda untuk mendapatkan regenerasi optimum.

Penggunaan suhu yang berbeda pada waktu pertumbuhan sel sebelum isolasi protoplas (30°C) dan pada waktu lisis (37°C) berguna untuk meningkatkan frekuensi regenerasi pada *B. japonicum* L17-1^{kloram} dan *B. japonicum* Pd10AB^{kan}. Hal tersebut telah dibuktikan oleh Gabor dan Hotchkiss (1979) pada *Bacillus subtilis*. Kombinasi suhu pertumbuhan (37°C) dan lisis (42°C) pada *B. subtilis* me-nyebabkan hasil regenerasi lebih tinggi dibandingkan menggunakan kombinasi su-hu pertumbuhan (30°C) dan lisis (37°C). Pada penelitian ini kombinasi suhu (37°C) dan (42°C) tidak dapat digunakan. Menurut Holt *et al.* (1994) *B. japonicum* tidak dapat hidup pada suhu $\pm 44^\circ\text{C}$.

Fusi Protoplas

Pengamatan mikroskopis fusi protoplas intraspecies antara *B. japonicum* L17-1^{kloram} dengan *B. japonicum* Pd10AB^{kan} menggunakan mikroskop fase kontras (pada perbesaran 600x) dilakukan pada campuran protoplas yang ditambah PEG setelah inkubasi 30 menit. Hasil pengamatan menunjukkan terjadi fusi antara dua protoplas, tiga sampai dengan 10 protoplas, dan lebih dari 10 protoplas. Menurut Suryowinoto (1996) hasil fusi dari dua macam protoplas menggunakan agen fusogenik dapat menghasilkan:

1. *Somatic cross*, apabila fusi terjadi antara dua protoplas yang berbeda *strain*.
2. *Self cross*, apabila fusi terjadi antara dua protoplas dari *strain* yang sama.
3. *Group protoplast fusion*, apabila fusi terjadi antara tiga sampai tujuh protoplas.
4. *Cluster protoplast fusion*, apabila fusi terjadi antara sepuluh protoplas atau lebih. *Cluster fusion* dapat juga merupakan *self fusion*.

Regenerasi Protoplas Hasil Fusi

Regenerasi protoplas hasil fusi menggunakan metode *confluent lawn*, yaitu menamamkan protoplas hasil fusi pada medium nonselektif dan untuk seleksi hasil fusi dilakukan pada medium selektif (Matsushima dan Baltz, 1986). Protoplas hasil fusi ditanam pada medium YEM agar lunak yang mengandung manitol 0,6 M di atas YEM agar padat yang mengandung manitol 0,6 M dan untuk seleksi hasil fusi protoplas dilakukan *replica plating* menggunakan medium selektif yang mengan-dung kanamisin 200 µg/ml dan kloramfenikol 100 µg/ml. Penghitungan sel hasil regenerasi pada medium nonselektif dilakukan pada hari ke-15 sampai dengan hari ke-18. Koloni regenerasi protoplas hasil fusi yang diamati pada hari ke-18 ber-bentuk bulat dengan diameter koloni 0,5 mm-2 mm, tepian rata, berelevasi cem-bung, lengket, *opaque*, dan tidak menyerap warna *congo red*.

Bentuk koloni regenerasi protoplas hasil fusi pada medium nonselektif tidak berbeda dengan bentuk koloni sel parental. Waktu regenerasi protoplas hasil fusi lebih lama yaitu 15-18 hari dibandingkan pertumbuhan sel parental yaitu 5-7 hari.

Banyaknya sel yang tumbuh pada medium nonselektif adalah $1,23 \times 10^3$ sel/ml sedangkan banyaknya sel pada medium selektif ialah $1,85 \times 10^2$ sel/ml. Sel regenerasi terbanyak ialah $1,58 \times 10^6$ sel/ml, sehingga diperoleh frekuensi fusi pro-toplas intraspecies antara *B. japonicum* L17-1^{kloram} dengan *B. japonicum* Pd10AB^{kan} sebesar $1,17 \times 10^{-4}$.

Frekuensi fusi protoplas intraspecies yang diperoleh lebih tinggi dari frekuensi protoplas intraspecies yang dilakukan Eisa *et al.* (1995) yaitu $3,9 \times 10^{-7}$. Hal tersebut mungkin disebabkan regenerasi protoplas hasil fusi dilakukan pada medium kompleks nonselektif sedangkan Eisa *et al.* (1995) menggunakan medium selektif yang berupa medium minimal. Medium kompleks nonselektif merupakan medium yang sangat sesuai digunakan untuk pertumbuhan awal sel karena menyediakan semua nutrisi yang diperlukan untuk pertumbuhan sel (Greasham dan Herber, 1997) dan tidak adanya faktor pembatas seperti senyawa antibiotik pada medium menyebabkan protoplas hasil fusi termasuk yang lemah dapat beregenerasi. Penggunaan medium nonselektif untuk regenerasi menurut Hopwood tahun 1978 dan Hotchkiss dan Gabor tahun 1980 (*lihat* Hopwood 1981) dapat memaksimalkan hasil fusi.

Bakteri hasil fusi yang diperoleh dapat disebut sebagai hasil fusi protoplas intraspecies karena parental tidak dapat tumbuh pada medium seleksi sedangkan produk hasil fusi dapat tumbuh.

Karakterisasi Bakteri Hasil Fusi

Karakterisasi bakteri hasil fusi dilakukan untuk melihat perubahan sifat bakteri hasil fusi dibandingkan dengan parentalnya. Tiga puluh bakteri hasil fusi yang tumbuh pada medium selektif dipilih secara acak. Karakterisasi bakteri hasil fusi dilakukan setelah ke-30 bakteri hasil fusi di subkultur tiga kali pada medium selektif. Karakterisasi meliputi pewarnaan Gram, reaksi pada medium YEMA yang mengandung *bromthymol blue*, kemampuan bakteri hasil fusi menyerap warna *congo red*, pertumbuhan pada medium YEMA yang mengandung NaCl 2%, serta pertumbuhan pada medium YEMA dengan pH 4,5 dan 9.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa INTRA-1-INTRA-30 merupakan bakteri Gram negatif dan berbentuk batang sama dengan parentalnya. Bakteri hasil fusi INTRA-1-INTRA-30 tidak dapat hidup pada konsentrasi NaCl 2%. Ketahanan hidup semua hasil fusi pada konsentrasi NaCl 2% sama dengan parentalnya. Bakteri hasil fusi INTRA-1-INTRA-30 dan strain parental menunjukkan reaksi basa pada medium BTB dan tidak dapat menyerap warna *congo red*.

Pertumbuhan pada medium YEMA dengan pH 4,5 dan 9 menunjukkan bahwa INTRA-3, INTRA-4, INTRA-7, INTRA-11, INTRA-15, INTRA-19, INTRA-23 tumbuh sangat subur pada pH 4,5, INTRA-1, INTRA-2, INTRA-5, INTRA-6, INTRA-8-INTRA-10, INTRA-12-INTRA-14, INTRA-16-INTRA-18, INTRA-20-INTRA-22, INTRA-24-INTRA-30 tumbuh subur pada pH 4,5. Pada pH 9 hanya INTRA-2-INTRA-14 saja yang tumbuh sangat subur, INTRA-1 tumbuh subur, INTRA-15, INTRA-16 dan INTRA-19 tumbuh ti-dak subur dan INTRA-17, 18, INTRA-20-INTRA-30 tidak dapat tumbuh. *Bradyrhizobium japonicum* Pd10AB^{kan} tumbuh sangat subur pada pH 4,5 dan 9; sedangkan *B. japonicum* L17-1^{kloram} tumbuh tidak subur pada pH 4,5 dan 9.

Berdasarkan hasil pengamatan, pertumbuhan pada medium YEMA dengan pH 4,5 dan 9 menunjukkan bahwa INTRA-15-INTRA-30 memiliki sifat gabungan dari kedua strain parental yaitu tahan hidup pada pH 4,5 tetapi tidak tahan pada pH 9; sedangkan INTRA-1-INTRA-14 menunjukkan ketahanan hidup yang sama dengan *B. japonicum* Pd10AB^{kan}.

Berdasarkan pola RIA bakteri hasil fusi terbagi 6 kelompok, yaitu kelompok 1 (INTRA-2, INTRA-5, INTRA-26), kelompok 2 (INTRA-3, INTRA-12, INTRA-20), kelompok 3 (INTRA-1, INTRA-6, INTRA-13, INTRA-19, INTRA-25, INTRA-29), kelompok 4 (INTRA-4, INTRA-8, INTRA-9, INTRA-11, INTRA-16, INTRA-18, INTRA-23, INTRA-27, INTRA-28), kelompok 5 (INTRA-7, INTRA-10, INTRA-14, INTRA-17, INTRA-21, INTRA-22), dan kelompok 6 (INTRA-15, INTRA-24, INTRA-30). Hasil ini menunjukkan bahwa bakteri hasil fusi memiliki karakter yang berbeda dengan parentalnya.

Pengujian Kemampuan Penambatan N₂ Bakteri Hasil Fusi

Berdasarkan hasil pengamatan tampak bahwa bakteri hasil fusi mampu membentuk bintil akar pada tanaman kedelai. Selain itu, rata-rata bobot kering tajuk tanaman kedelai yang diinokulasi bakteri hasil fusi lebih berat daripada kontrol IoNo. Bobot kering tajuk tanaman kedelai yang diinokulasi INTRA-8 dibandingkan parental L17-1 tidak berbeda nyata dan lebih berat dibandingkan dengan parental Pd10AB (Tabel 1).

Tabel 1. Pengaruh perlakuan inokulasi bakteri hasil fusi terhadap rata-rata bobot kering tajuk kedelai

Perlakuan Inokulasi	Rata-rata bobot kering tajuk (g/2 tanaman)
IoN	6,025 a
INTRA-8	4,951 ab
L171	4,668 abc
INTRA-10	4,606 abc
INTRA-23	4,584 abc
INTRA-15	4,558 abc
INTRA-4	4,446 abcd
INTRA-13	4,170 abcd
INTRA-7	3,924 bcd
INTRA-30	3,770 bcd
INTRA-28	3,610 bcd
INTRA-18	3,602 bcd
INTRA-14	3,485 bcd

INTRA-22	3,305 bcde
INTRA-1	3,291 bcde
INTRA-29	3,186 bcde
INTRA-2	3,022 bcde
INTRA-12	3,021 bcde
INTRA-24	2,914 bcde
INTRA-6	2,901 cde
INTRA-21	2,769 cde
Pd10AB	2,512 de
IoNo	1,353 e

Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata dengan uji DMRT pada taraf 5%

Bakteri INTRA-8 memiliki bobot kering akar dan bintil akar paling berat, yaitu 3.198 g per 2 tanaman, namun tidak berbeda nyata dengan kontrol IoNo. INTRA-8 berbeda nyata dengan semua perlakuan hasil fusi, parental Pd10AB dan L17-1, dan kontrol IoN (Tabel 2).

Pada peubah kadar N tanaman ternyata tanaman kedelai yang diinokulasi bakteri hasil fusi lebih rendah daripada yang diinokulasi dengan parental L17-1. Ka-dar N tanaman kedelai yang diinokulasi dengan parental Pd10AB dan L17-1 lebih tinggi daripada kontrol IoN dan IoNo. Semua bakteri hasil fusi memberikan kadar N total tanaman yang berbeda nyata lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol IoN dan IoNo (Tabel 3).

Berdasarkan peubah keefektifan simbiotik diketahui bahwa bakteri hasil fusi INTRA-4, INTRA-8, INTRA-10, INTRA-15, dan INTRA-23 memiliki keefektifan simbio-tik di atas 70% (sangat efektif). Parental L17-1 memiliki keefektifan simbiotik lebih tinggi (sangat efektif) dibandingkan parental Pd10AB (efektif).

Berdasarkan peubah kapasitas simbiotik diketahui bahwa bakteri hasil fusi dapat dikelompokkan menjadi 5 galur yang sangar efektif, 13 galur efektif, dan 1 galur kurang efektif. Berdasarkan peubah kapasitas simbiotik, diketahui galur-galur bakteri hasil fusi INTRA memiliki kapasitas simbiotik berkisar antara 0.31% (INTRA-21) hingga 0.79% (INTRA-8).

Tabel 2. Pengaruh perlakuan inokulasi bakteri hasil fusi terhadap rata-rata bobot kering akar dan bintil akar tanaman kedelai

Perlakuan Inokulasi	Rata-rata bobot kering akar dan bintil akar (g/2 tanaman)
INTRA-8	3,198 a
IoNo	2,062 ab
INTRA-15	1,677 b
INTRA-22	1,560 b
INTRA-10	1,531 b
INTRA-4	1,468 b
INTRA-7	1,444 b
INTRA-28	1,375 b
INTRA-1	1,365 b
INTRA-30	1,314 b
INTRA-2	1,284 b

INTRA-6	1,263 b
INTRA-29	1,237 b
INTRA-23	1,223 b
Pd10AB	1,219 b
INTRA-14	1,207 b
L171	1,183 b
INTRA-18	1,121 b
INTRA-21	1,097 b
INTRA-13	1,069 b
INTRA-12	0,9207 b
INTRA-24	0,8750 b
IoN	0,6273 b

Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata dengan uji DMRT pada taraf 5%

Tabel 3. Pengaruh perlakuan inokulasi bakteri hasil fusi terhadap rata-rata N total tanaman kedelai

Perlakuan Inokulasi	Rata-rata N total per 2 tanaman (%)
L171	3,925 a
INTRA-22	3,898 a
INTRA-30	3,801 ab
INTRA-8	3,794 abc
INTRA-14	3,740 abcd
INTRA-23	3,692 abcde
INTRA-21	3,673 abcdef
INTRA-28	3,562 abcdefg
INTRA-7	3,519 cdefg
INTRA-1	3,480 defgh
INTRA-29	3,444 efghi
INTRA-18	3,405 fghij
INTRA-12	3,382 ghijk
INTRA-6	3,369 ghijk
INTRA-24	3,353 ghijk
Pd10AB	3,330 ghijk
INTRA-10	3,206 hijk
INTRA-13	3,184 ijk
INTRA-15	3,158 jk
INTRA-4	3,127 k
INTRA-2	3,115 k
IoN	2,635 l
IoNo	1,206 m

Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata pada uji DMRT pada taraf 5%

Tabel 4. Keefektifan simbiotik dan kapasitas simbiotik bakteri hasil fusi dan kedua parentalnya (L17-1 dan Pd 10AB)

Perlakuan inokulasi	Rata-rata BK tajuk kedelai per 2 tanaman	Keefektifan simbiotik (%)	Kapasitas simbiotik
INTRA-1	3,291	54,6	0,42 (E)
INTRA-2	3,022	50,2	0,36 (E)
INTRA-4	4,446	73,8	0,67 (SE)
INTRA-6	2,902	48,2	0,34 (E)
INTRA-7	3,924	65,1	0,56 (E)
INTRA-8	4,951	82,2	0,79 (SE)
INTRA-10	4,606	76,5	0,70 (SE)
INTRA-12	3,021	50,1	0,36 (E)
INTRA-13	4,170	69,2	0,61 (E)

INTRA-14	3,485	57,8	0,46 (E)
INTRA-15	4,558	75,7	0,69 (SE)
INTRA-18	3,602	59,8	0,49 (E)
INTRA-21	2,769	46,0	0,31 (KE)
INTRA-22	3,305	54,9	0,42 (E)
INTRA-23	4,584	76,1	0,70 (SE)
INTRA-24	2,914	48,4	0,34 (E)
INTRA-28	3,610	16,6	0,49 (E)
INTRA-29	3,186	52,9	0,40 (E)
INTRA-30	3,770	62,6	0,52 (E)
L171	4,668	77,5	0,71 (SE)
Pd10AB	2,512	41,7	0,25 (KE)
IoNo	1,353	22,5	0,00 (KE)
IoN	6,025	100	1,00 (SE)

Kriteria tidak efektif, kurang efektif, efektif, dan sangat efektif sbb.: $KS < 0 \rightarrow$ tidak efektif; $0 < KS < 0,33 \rightarrow$ kurang efektif; $0,33 < KS < 0,67 \rightarrow$ efektif; $KS > 0,67 \rightarrow$ sangat efektif; $ES > 70\% \rightarrow$ sangat efektif

KESIMPULAN

1. Persentase pembentukan protoplas untuk *B. japonicum* L17^{kloram} sebesar 72,84% dan untuk *B. japonicum* Pd10AB^{kan} sebesar 70,11%; sedangkan frekuensi regenerasi protoplas *B. japonicum* Pd10AB^{kan} sebesar $7,93 \times 10^{-4}$. Selain itu, frekuensi fusi protoplas intraspecies antara *B. japonicum* L17^{kloram} dengan *B. japonicum* Pd10AB^{kan} ialah $1,17 \times 10^{-4}$.
2. Karakterisasi bakteri hasil fusi INTRA-1—INTRA-30 menunjukkan bahwa INTRA-15—INTRA-30 berbeda dengan kedua parentalnya; sedangkan INTRA-1—INTRA-14 hampir sama dengan *B. japonicum* Pd10AB^{kan}.
3. Diperoleh INTRA-8 yang memiliki keefektifan simbiotik sebesar 70% terhadap kontrol IoN, dan hal ini tergolong sangat tinggi dibandingkan dengan parental, kontrol IoNo, dan kontrol IoN.

DAFTAR PUSTAKA

- Arimurti, S. 2000.** Transfer Gen *nif* dari *Rhizobium trifolii* KPR 5035 (pRT 5a: Tn5) ke *Sinorhizobium fredii* terseleksi dengan metode konjugasi dua tetua. Tesis S2 Program Pascasarjana. IPB, Bogor: iv + 38 hlm.
- Beringer, J.E. 1980.** Microbial genetic and biological nitrogen fixation. In Rao, N.S.S. (Ed). *Advances in agricultural microbiology*. Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi. pp. 3-24.
- Bohlool, B.B., J.K. Ladha, D.P. Garrity, and T. George. 1992.** Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: A perspective. In Ladha, J.K.,

- T. George, and B.B. Bohloul (Eds.). *Development in plant and soil sciences: Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 1-10.
- Eisa, E.G., S. Akao, and Y. Kitamoto. 1995.** Enhanced nitrogen fixation capabilities of soybean rhizobia by inter and intra-specific cell fusion. *Jpn. J. Crop Sci.* 64(2):273-280.
- Elkan, G.H. 1984.** Taxonomy and metabolism of *Rhizobium*. In Alexander, M. (Ed.). *Biological nitrogen fixation: Ecology, technology, and physiology*. Plenum Press, New York. pp. 1-38.
- Freire, J.R.J. 1984.** Important limiting factors in soil. In Alexander, M. (Ed.). *Biological nitrogen fixation: Ecology, technology, and physiology*. Plenum Press, New York. pp. 51-72.
- Greasham, R.L. and W.K. Herber. 1997.** Design and optimization of growth media. In Rhodes, P.M. and P.F. Stanbury (Eds.). *Applied microbial physiology: a practical approach*. Oxford University Press, New York. pp. 53-74.
- Hopwood, D.A. 1981.** Genetic studies with bacterial protoplast. *Ann. Rev. Microbiol.* 35:237-272.
- Hopwood, D.A. and H.M. Wright. 1981.** Protoplast fusion in *Streptomyces*: fusions involving ultraviolet-irradiated protoplast. *J. Gen. Microbiol.* 126:21-27.
- Ibrahim, E.G.E. 1996.** *Improved nitrogen fixation capability and extended host specificity of rhizobia by cell fusion*. Disertasi Doktor. Department of Microbial Biotechnology, The United Graduate School of Agriculture Science Tottori University, Japan: iv + 81 hlm.
- Marquis, R.E. and T.R. Corner. 1976.** Isolation and properties of bacterial protoplasts. In Peberdy, J. F., A.H. Rose, H.J. Roger, and E.C. Cocking (Eds.). 1976. *Microbial & plant protoplast*. Academic Press, London. pp. 1-19.
- Matsushima, P. and R.H. Baltz. 1986.** Protoplast fusion. In Demain, A.L. and N.A. Solomon (Eds.). *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington D.C. pp. 170-178.
- Metcalf, R.H. and R.H. Deibel. 1969.** Differential lytic response of Enterococci associated with addition order of lysozyme and anions. *J. Bacteriol.* 99(3):674-680.
- Pelczar Jr, M.J. and E.C.S. Chan. 1988.** Dasar-dasar mikrobiologi 2. Terj. dari *Fundamentals of microbiology*, oleh Hadioetomo, R.S., T. Imas, S.S. Tjitrosomo, and S.L. Angka. UI-Press, Jakarta: viii + 997 hlm.

- Roger, H.J., J.B. Ward, and T.S.J. Elliott. 1976.** Biosynthesis of wall polymers by bacterial protoplast. In Peberdy, J.F., A.H. Rose, H.J. Roger, and E.C. Cocking (Eds.). *Microbial & plant protoplast*. Academic Press, London. pp. 219-234.
- Salle, A.J. 1961.** *Fundamental principles of bacteriology*. 5th ed. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York: viii + 812 hlm.
- Saraswati, R., R.D. Hastuti, Y. Lestari, U. Murdiatmo, dan Komari. 1996.** Pemanfaatan *Bradyrhizobium japonicum* untuk meningkatkan efisiensi pupuk pada tanaman kedelai. Laporan hasil penelitian Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan. hlm. 1-10.
- Sardjoko. 1991.** *Bioteknologi: Latar belakang dan beberapa penerapannya*. PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta: ix + 307 hlm.
- Smith, J.E. 1993.** Prinsip bioteknologi. Terj. dari *Biotechnology principle*, oleh Sumo, U.F., B. Sumantri, A. Subono. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta: vii + 202 hlm.
- Somasegaran, P. and H.J. Hoben. 1994.** *Handbook for rhizobia*. Springer-Verlag, New York: xvi + 450 hlm.
- Suriawirya, U. 1995.** Pengantar mikrobiologi umum. Penerbit Angkasa, Bandung: x + 238 hlm.
- Suryowinoto, M. 1996.** *Pemuliaan tanaman secara in vitro*. Penerbit Kanisius, Yogyakarta: 252 hlm.
- Vincent, J.M. 1970.** *A manual for the practical study of the root-nodule bacteria*. Burgess and Son Ltd. Berkshire: xi + 164 hlm.
- Weiss, R.L. 1976.** Protoplast formation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 128(2):668-670.