

PERAN *EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDES* (EPS) DALAM SIMBIOSIS LEGUM-RHIZOBIA

Ramdana Sari* dan **Retno Prayudyaningsih**

Balai Litbang Lingkungan Hidup dan Kehutanan Makassar
Jl. P. Kemerdekaan Km 16 Makassar, Sulawesi Selatan, 90243
Telp. (0411) 554049, Fax (0411) 554058
*E-mail: ramdana_sari@yahoo.co.id

ABSTRAK

*Rhizobia merupakan bakteri bintil akar yang mampu menambat nitrogen dari udara dan mengubahnya menjadi ammonia dan nitrat yang dapat dimanfaatkan langsung oleh tanaman untuk mendukung pertumbuhan dan perkembangannya. Isolat rhizobia yang diperoleh dari bintil akar sengon buto (*Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb) memiliki morfologi yang bervariasi. Koloni bakteri tertutupi lendir dengan ketebalan berbeda-beda yang disebut Extracellular polysaccharides (EPS). Senyawa ini berperan dalam simbiosis legum dan rhizobia dalam mendukung proses pengenalan bakteri terhadap akar inang serta infeksi, seperti yang terjadi pada akar tanaman sengon buto. Selain itu, EPS melindungi sel rhizobia dari kecaman lingkungan yang ekstrim serta pertahanan terhadap senyawa antimikrobal tanaman, membantu bakteri dalam memperoleh makanan, berperan dalam pembentukan mikroagregat dan memantapkan agregat tanah serta melindungi enzim nitrogenase yang sensitif terhadap oksigen di dalam bintil akar.*

Kata Kunci: *Rhizobia, bintil akar, Extracellular polysaccharides (EPS).*

I. PENDAHULUAN

Tanah merupakan habitat berbagai mikroorganisme yang hidup di dalamnya dan sekaligus mendukung jutaan kehidupan di atasnya. Pertumbuhan tanaman sangat bergantung terhadap keberadaan mikroorganisme tanah, sebaliknya tanaman mempengaruhi kehidupan mikroorganisme. Mikroorganisme tanah bertanggung jawab terhadap sebagian besar proses-proses biologis seperti pada siklus unsur hara dan proses dekomposisi bahan organik sehingga keberadaannya dapat mempengaruhi kualitas tanah secara fisik, kimia, maupun biologi. Aktivitas mikroorganisme tanah akan mempengaruhi kualitas pertumbuhan tanaman sehingga menentukan

produktivitas lahan. Sebaliknya, keberadaan dan potensi mikroorganisme tanah ditentukan oleh keberadaan vegetasi.

Rhizobia merupakan bakteri yang termasuk salah satu kelompok mikroorganisme tanah yang banyak digunakan sebagai biofertilizer untuk meningkatkan kualitas tanah, khususnya pada lahan-lahan marginal. Bakteri ini dapat membentuk bintil akar (nodul) dan bersimbiosis dengan akar tanaman legum. Rhizobia merupakan salah satu jenis bakteri penambat nitrogen (N) yang mampu hidup di dalam tanah, yaitu pada daerah rhizosfer, akan tetapi kemampuannya untuk menambat N di udara hanya dapat dilakukan ketika bersimbiosis dengan akar legum (Shahzad *et al.*, 2012). Oleh karena itu, rhizobia juga disebut dengan bakteri penambat nitrogen simbiotik.

Penambatan N secara biologis merupakan proses perubahan molekul N atmosfer menjadi bentuk ion ammonia (NH_4^+) dan nitrat (NO_3^-) oleh mikroorganisme, sehingga dapat dimanfaatkan langsung oleh tanaman (Simon *et al.*, 2014). Kemampuan rhizobia untuk menambat N dapat mengurangi pemanfaatan pupuk kimia dalam pertanian. Berrada dan Benbrahim (2014) menyatakan bahwa hampir 90% kebutuhan N tanaman dapat dipenuhi melalui simbiosis legum-rhizobia ini. Secara umum simbiosis keduanya dapat meningkatkan produktivitas pertanian, pemeliharaan dan restorasi lahan kritis, serta mengurangi penggunaan pupuk kimia sehingga membatasi resiko polusi air yang dapat mempengaruhi fungsi ekosistem.

Efektivitas penambatan nitrogen oleh rhizobia dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti temperatur, kelembapan tanah, pH, salinitas, maupun kecocokan antara host (inang) dengan bakteri (Simon *et al.*, 2014). Kemampuan bakteri rhizobia untuk menginfeksi akar legum dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya produksi senyawa *Extracellular polysaccharides* (EPS). Tulisan ini bertujuan untuk membahas peran EPS dalam membantu bakteri rhizobia menginfeksi akar legum jenis sengon buto (*Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb) sehingga dapat aktif menambat nitrogen bebas dari atmosfer.

II. INTERAKSI RHIZOBIA DENGAN AKAR LEGUM

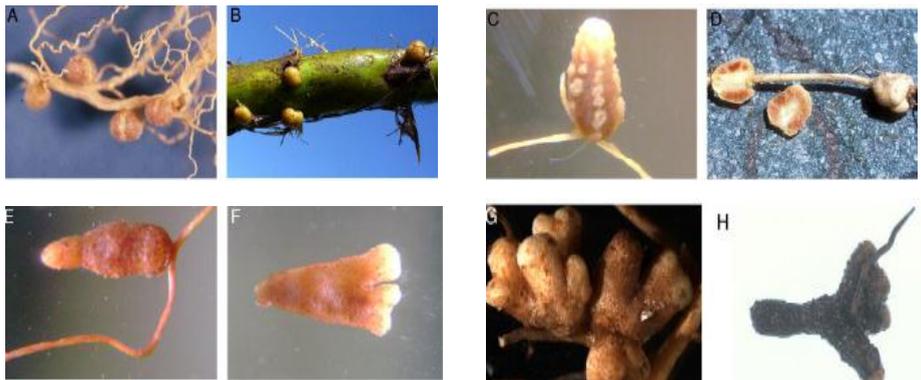
Legum merupakan famili dari kelompok Dicotyledoneae yang terbagi menjadi tiga subfamili yang dibedakan berdasarkan tipe bunga, yaitu Caesalpinioideae, Mimosoideae, dan Papilionoideae.

Tanaman dari kelompok Mimosoideae dan Papilionoideae umumnya memiliki bintil akar sedangkan pada kelompok Caesalpinoideae hanya sebagian kecil membentuk bintil akar. Jenis tanaman dari kelompok legum ini dapat tumbuh pada daerah yang kurang subur, karena memiliki kemampuan untuk memperoleh N dari udara (dengan bantuan bakteri rhizobia) dan mengubahnya menjadi protein. Adanya perbedaan kemampuan adaptasi dari tiap jenis tanaman legum pada lahan kritis sehingga diperlukan pemilihan tanaman legum yang tepat untuk diaplikasikan pada proses restorasi (Howieson dan Dilworth, 2016).

Nitrogen merupakan salah satu unsur hara makro esensial bagi pertumbuhan tanaman, akan tetapi ketersediaan unsur N yang dapat dimanfaatkan langsung oleh tanaman di dalam tanah sangat terbatas (Franche *et al.*, 2009). Di sisi lain, kandungan N pada atmosfer sekitar 79% dari total gas penyusun atmosfer (Khan *et al.*, 2008) tetapi tidak mampu dimanfaatkan langsung oleh tanaman. Simon *et al.* (2014) menyatakan bahwa bentuk N tersedia (dapat dimanfaatkan langsung oleh tanaman) dalam tanah yaitu dalam bentuk ion ammonia (NH_4^+) dan nitrat (NO_3^-). Ion nitrit (NO_2^-) dapat dimanfaatkan oleh tanaman tapi cenderung tidak stabil serta bersifat toksik dalam kadar yang tinggi. Senyawa N_2 di atmosfer masuk ke dalam tanah secara fisik (karena kilat dan hujan) maupun secara biologis oleh mikroorganisme penambat nitrogen (simbiotik ataupun nonsimbiotik).

Rhizobia merupakan salah satu jenis bakteri penambat N yang bersimbiosis dengan akar legum membentuk bintil akar seperti pada sengon buto (*Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb). Bakteri ini mampu bertahan hidup di dalam tanah hingga menginfeksi akar tanaman legum, akan tetapi populasi bakteri dapat berkurang jika mendapatkan tekanan dari lingkungan, seperti keasaman, kekeringan dan temperatur yang tinggi. Bladergroen dan Spaink (1998) menyatakan simbiosis antara bakteri rhizobia dengan tanaman inangnya tergantung pada pengenalan atau molekul sinyal spesifik yang diproduksi oleh keduanya. Apabila kebutuhan N di dalam tanah tidak mencukupi, maka tanaman akan melepaskan senyawa *flavonoid* yang merupakan sinyal bagi bakteri rhizobia. Sebagai respon dari sinyal ini, maka bakteri akan melepaskan faktor *Nod* (*Nodulation factor*), dihasilkan dari biosintesis dan sekresi *lipochitooligosaccharides* (LCOs), yang memicu perubahan bentuk akar tanaman.

Polisakarida yang dihasilkan Rhizobia masuk ke dalam bulu-bulu akar dan bereaksi dengan sel-sel bulu akar. Proses ini diikuti dengan terbentuknya *polygalacturonase* yang menyebabkan depolimerisasi pektin dinding sel. Hal ini memudahkan Rhizobia masuk ke dalam akar (Rao, 1977 dalam Arsyad, 2007). Dudley *et al.* (1983) dalam Simon *et al.* (2014) bahwa ketika rhizobia sudah berada di dalam sel akar, maka sel bakteri akan membelah dan menggandakan diri secara cepat (pada tahap ini bakteri disebut dengan bakteroid). Hal ini menyebabkan jaringan akar berkembang sehingga akar mengalami pembengkakan dan terbentuklah bintil akar (nodul). Proses penambatan N dan perubahan menjadi NH_4^+ terjadi di dalam bintil akar. Bentuk dan ukuran bintil akar bervariasi tetapi semuanya memiliki struktur dan modifikasi dari sel akar yang normal. Bentuk-bentuk bintil akar legum dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Morfologi bintil akar legum. A. *Determinate, desmodioid*; B. *Determinate, aeschynomenoid*; C. *Indigoferoid*; D. *Lupinoid*; E. *Indeterminate unbranched*; F. *Indeterminate with one or few branches*; G. *Indeterminate with many branches*; H. *Woody* (Sumber: Howieson and Dilworth, 2016).

Bintil akar dengan tipe *Determinate (desmodioid)* cenderung berbentuk bulat dan memiliki lentisel (umumnya lentisel bergaris tapi terkadang seperti bintang). Bintil dengan tipe *Determinate (aeschynomenoid)* tidak memiliki lentisel, bintil ini berasosiasi dengan akar *lateral* atau *adventif* pada legum. Tipe *Indigoferoid* mirip dengan bintil *Indeterminate*, walaupun strukturnya belum pernah dijelaskan secara detail dan sejauh ini hanya dilaporkan terdapat pada tanaman Indigoferaeae. *Indeterminate unbranched* merupakan tipe bintil akar

yang umum ditemukan pada tanaman *Mimosa*, tipe *Indeterminate with one or few branches* umumnya terdapat pada tanaman Papilionaceae, sedangkan tipe *Indeterminate with many branches* ditemukan pada semua subfamily. Pada beberapa jenis tanaman, seperti *Ormosia* dan *Crotalaria*, dapat ditemukan lebih banyak percabangan pada bintilnya. Umumnya bintil akar pada tipe *Indeterminate with one or few branches* dan *Indeterminate with many branches* tidak bercabang pada saat masih muda. Tipe bintil akar *Woody* umumnya ditemukan pada tanaman Caesalpiniaceae dan Papilionaceae, memiliki lapisan *scleroid woody* ketika sudah tua (Howieson and Dilworth, 2016).

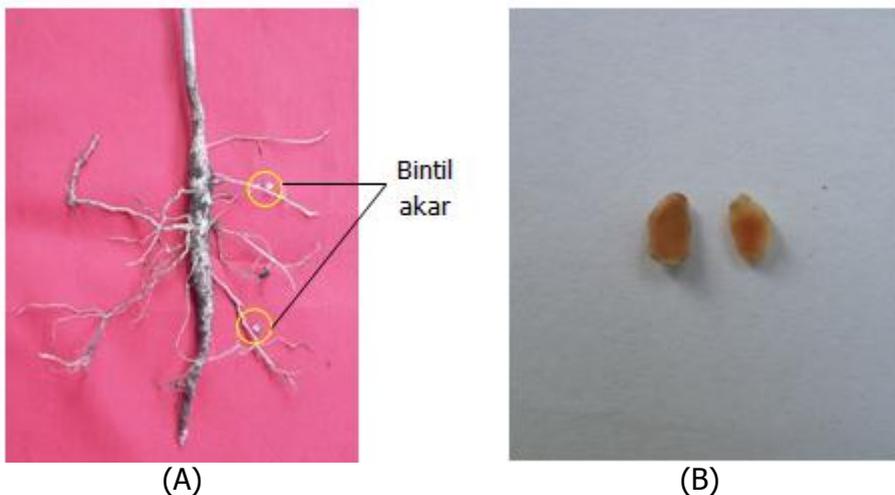
Spesifisitas inang berkaitan dengan kemampuan beberapa spesies rhizobia untuk membentuk bintil pada tanaman legum yang spesifik. Pemanfaatan strain rhizobia sebagai inokulan kadang mengalami kegagalan saat diaplikasikan di lapangan karena memanfaatkan bakteri rhizobia yang tidak efektif dan *non-competitive* (sebagai inokulan). Tanaman legum umumnya akan membentuk bintil sebagai respon dari infeksi beberapa strain rhizobia, tetapi tidak semuanya akan efektif dalam menambat N (ada yang rendah, sedang, bahkan sangat bagus dalam menambat N). Beberapa strain mampu menstimulasi pembentukan bintil tapi tidak mampu menambat N. Adanya kecocokan antara bakteri dengan inang menghasilkan bintil yang efektif, ditandai dengan ukuran yang relatif besar, berada pada akar utama dan akar lateral yang dekat dari permukaan tanah, serta bagian dalam bintil berwarna pink atau merah (mengandung *leghemoglobin*). Inokulasi yang tidak cocok antara rhizobia dengan inang akan menghasilkan bintil yang tidak efektif, ditandai dengan ukuran yang kecil namun jumlahnya banyak dan tersebar pada sistem perakaran. Ketika bintil pecah, bagian dalamnya terlihat berwarna hijau atau putih (tidak mengandung *leghemoglobin*). Inokulasi bakteri-inang yang tidak cocok bahkan terkadang tidak akan membentuk bintil akar sehingga proses penambatan N tidak akan terjadi (Simon *et al.*, 2014).

Isolat rhizobia yang akan dijadikan sebagai inokulan untuk diaplikasikan pada lahan bekas tambang dalam rangka restorasi, sebaiknya menggunakan sumber inokulan yang diperoleh langsung dari bintil akar legum yang tumbuh pada suatu tempat (*in situ*) yang menjadi target restorasi berbasis mikroorganisme simbiotik. Hal ini disebabkan karena bakteri sudah terbukti mampu beradaptasi dan bertahan hidup terhadap kondisi lingkungan, seperti pH, struktur

tanah, porositas, kandungan unsur logam dan logam pada tanah, serta iklim.

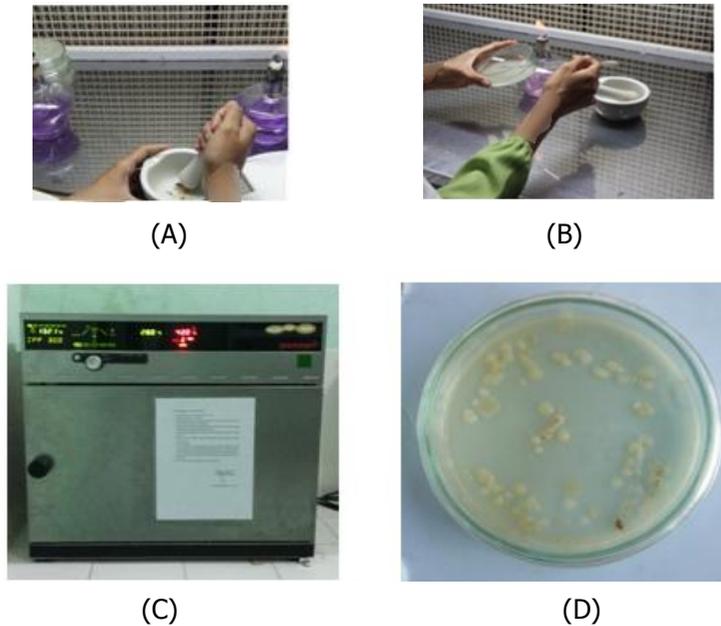
III. SENYAWA EPS MEMBANTU RHIZOBIA DALAM MENGINFEKSI AKAR LEGUM

Koloni isolat rhizobia yang tumbuh pada permukaan media *Yeast Extract Mannitol Agar* (YEMA) memiliki lendir yang disebut *Extracellular polysaccharides* (EPS). Keberadaan senyawa ini dapat dilihat pada saat menumbuhkan bakteri rhizobia pada media YEMA. Untuk mengisolasi bakteri rhizobia dari bintil akar sengon buto, maka harus memperhatikan kondisi bintil akar.



Gambar 1. (A). Bintil akar Sengon Buto (*Enterolobium cyclocarpum*); (B). Bagian dalam bintil akar yang sudah dibelah terlihat berwarna merah.

Proses isolasi diawali dengan mencuci bintil akar dengan air yang mengalir untuk menghilangkan tanah yang menempel pada permukaannya lalu dibersihkan menggunakan etanol 95% dan H_2O_2 3%. Penggerusan bintil akar pada mortar dengan menambahkan 1 - 2 tetes NaCl fisiologis. Suspensi diinokulasikan ke dalam cawan petri yang berisi media YEMA, diinkubasi pada inkubator (temperatur $26^{\circ}C$) selama 3 x 24 jam. Media YEMA merupakan media umum untuk menumbuhkan bakteri rhizobia.

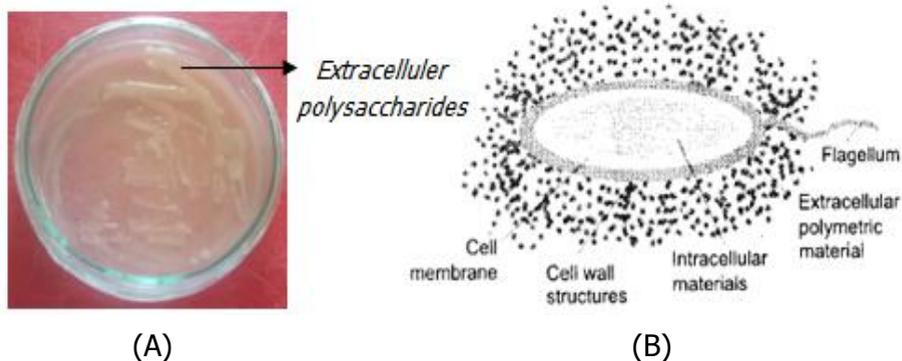


Gambar 2. (A). Penggerusan bintil akar Sengon Buto *Enterolobium cyclocarpum*; (B). Inokulasi suspensi bakteri pada media YEMA; (C). Bakteri ditumbuhkan pada inkubator; (D). Isolat bakteri rhizobia yang telah tumbuh setelah inkubasi selama 3 x 24 jam.

Koloni-koloni rhizobia yang telah tumbuh memperlihatkan karakteristik morfologi yang bervariasi. Ada yang berbentuk *circular*, *irregular* dengan tepi *entire*, *curlied*, dan *lobate*. Beberapa koloni menunjukkan permukaan yang bervariasi, seperti *convex*, *raised*, dan *flat* dengan koloni berwarna kuning, putih dan coklat. Isolat bakteri terlihat memiliki lendir dengan ketebalan yang berbeda-beda. Hal ini sesuai dengan proses identifikasi yang dilakukan oleh Bhargava *et al.* (2016) bahwa bakteri rhizobia hasil isolasi dari tanaman legum liar di Tirupati, India, berbentuk *regular* dan *irregular* dengan elevasi permukaan koloni *flat* dan *convex*. Tepi koloni berbentuk *lobate* dan *entire*, berwarna putih dan memiliki lendir.

Wingender *et al.* (1999) dalam Mu'minah *et al.* (2016) menyatakan bahwa EPS umumnya terdapat di sekeliling membran sel bagian luar bakteri (eukariota maupun prokariota). Produksi senyawa polisakarida merupakan karakteristik rhizobia dan berperan dalam proses infeksi dan pembentukan bintil akar pada legum. Sintesis EPS

oleh sel mikroorganisme tergantung pada ketersediaan karbon dan nitrogen pada media pertumbuhan (Nirmala *et al.*, 2011) serta sistem fisiologis bakteri dan kondisi fermentasi (Mu'minah *et al.*, 2016). Umumnya mikroorganisme menggunakan karbohidrat sebagai sumber karbon serta garam ammonium dan asam amino sebagai sumber nitrogen, dimana jenis dan konsentrasinya sangat berpengaruh terhadap produksi EPS (Nirmala *et al.*, 2011). Produksi EPS juga tergantung pada spesies rhizobia yang menginfeksi tanaman legum yang berbeda. Media YEMA yang digunakan sebagai media pertumbuhan rhizobia mengandung *mannitol* sebagai sumber karbon bakteri serta *yeast extract* sebagai sumber nitrogen.



Gambar 3. (A). *Extracellular polysaccharides* berupa lendir pada permukaan koloni rhizobia (sumber : koleksi pribadi penulis); (B). Ilustrasi susunan sel bakteri (sumber : Mittleman, 1985 dalam Haryono dan Setiadi, 2006).

Nirmala *et al.* (2011) mengidentifikasi kandungan monomer-monomer gula pada EPS yang dihasilkan oleh *Rhizobium* Vm6 seperti glukosa, galaktosa, rhamnosa, raffinosa dan xylosa. Selanjutnya Ghosh *et al.* (2005) mengamati bahwa kandungan EPS pada *Rhizobium* DL10 yaitu glukosa, galaktosa, rhamnosa, arabinosa dan xylosa. Hal ini mengindikasikan bahwa ada beberapa perbedaan kandungan monomer-monomer gula pada jenis rhizobia yang berbeda. Sedangkan menurut Bladergroen dan Spaink (1998) bahwa bentuk utama dari EPS berupa *succinoglycan* yang disebut EPS I dimana tinggi atau rendahnya berat molekul tergantung pada keadaan media pertumbuhan. Pada kondisi lingkungan kekurangan fosfor (P), beberapa bakteri dapat menghasilkan EPS alternatif yang mengandung *galactoglucan*, disebut EPS II. Tipe EPS ini juga memiliki

variasi pada berat molekulnya. Bhargava *et al.* (2016) menjelaskan bahwa senyawa EPS dengan konsentrasi tertinggi umumnya dihasilkan oleh jenis rhizobia yang tumbuh cepat dan EPS terendah dihasilkan oleh jenis rhizobia tumbuh lambat. Hal ini disebabkan karena jenis *fast growing* rhizobia dapat memanfaatkan lebih banyak jenis sumber karbon dibandingkan *slow growing* rhizobia, seperti pada *Rhizobium* yang diisolasi dari *Indigofera ambylantha*, *I. Carlesii*, dan *I. Potaninii* dapat menggunakan berbagai jenis karbohidrat seperti galaktosa, laktosa, sukrosa, mannanosa, xylosa, salisin, dan citrat sebagai sumber karbon (Wei *et al.*, 2002 dalam Kumari *et al.*, 2009).

Eksopolisakarida dikenal juga sebagai 'polimer adhesif'. Makromolekul ini merupakan faktor penting pada suatu proses pembentukan *biofilm* oleh mikroorganisme pada permukaan padat. Senyawa ini juga membantu mikroorganisme dalam tahap pra-kondisi pengenalan permukaan substrat/inang sehingga proses adhesi pun dapat berjalan dengan baik. Parkar *et al.* (2001) dalam penelitiannya menyimpulkan bahwa penghilangan lapisan EPS dari sel *Bacillus spp.* dengan menggunakan asam trikloroasetat atau lysozim menyebabkan kemampuan perlekatan bakteri pada permukaan besi menjadi berkurang. Selain itu, EPS juga berperan terhadap susunan dan pemeliharaan koloni sel dan struktur *biofilm* yang matang, serta meningkatkan ketahanan *biofilm* terhadap lingkungan yang stres dan tercemar.

Polisakarida yang dihasilkan oleh rhizobia berperan dalam interaksi tanaman dengan bakteri, seperti invasi dan perkembangan bintil akar, pelepasan bakteri dari benang infeksi, perkembangan bakteroid, perlindungan dari kecaman lingkungan yang ekstrim serta pertahanan terhadap senyawa antimikrobia tanaman. Infeksi akar legum oleh rhizobia dibagi dalam dua tahap, yaitu pengenalan lektin rambut akar oleh karbohidrat spesifik yang dihasilkan oleh rhizobia dan pengikatan bakteri ke bagian ujung rambut akar yang dibantu oleh senyawa EPS (Hidayat, 2013).

Mu'minah *et al.* (2016) menambahkan bahwa EPS berperan dalam pembentukan mikroagregat serta dapat memantapkan agregat tanah melalui pembentukan jembatan polimer. Selain itu, EPS juga membantu bakteri dalam memperoleh makanan (Czacyk dan Myska, 2007). Polisakarida juga mampu melindungi bakteri rhizobia pada tanah yang mengalami gangguan secara biotik maupun abiotik serta membatasi terjadinya difusi oksigen masuk ke dalam bintil

sehingga melindungi enzim nitrogenase yang sensitif terhadap oksigen di dalam bintil akar (Bhargava *et al.*, 2016) sehingga proses penambatan N dapat berjalan dengan baik.

IV. KESIMPULAN

Rhizobia merupakan salah satu jenis prokariotik yang mampu menambat N dari atmosfer. Oleh karena itu, bakteri ini banyak digunakan sebagai inokulan dalam proses restorasi lahan kritis berbasis mikroorganisme. Proses penambatan dan pengubahan N menjadi senyawa yang dapat langsung digunakan oleh tanaman hanya bisa dilakukan ketika bersimbiosis dengan akar legum. Isolat rhizobia yang diisolasi dari bintil akar sengon buto memiliki bentuk *circular* dan *irreguler*, tepi *entire*, *curlied*, dan *lobate*. Permukaan koloni memiliki tipe *convex*, *raised*, dan *flat* dengan warna kuning, putih dan cokelat. Isolat bakteri terlihat memiliki lendir yang disebut *Extracellular polysaccharides* (EPS). Makromolekul ini berperan penting dalam proses infeksi bakteri terhadap akar inang, terutama pada tahap awal pengenalan bakteri terhadap permukaan akar (substrat). Selain itu, EPS juga mampu melindungi sel bakteri pada kondisi lingkungan yang ekstrim serta membatasi difusi oksigen masuk ke dalam bintil (melindungi enzim nitrogenase yang sensitif terhadap oksigen) sehingga proses penambatan nitrogen dapat berjalan dengan baik.

V. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada saudara Edi Kurniawan, S.Hut, M.Hut dan Hajar, S.Hut, M.Hut yang telah membantu selama kegiatan di lapangan serta Hartini, SP., A. Sri Rahmah Dania, S.Si., dan Mutiah Ummusyahidah, S.Hut. yang telah membantu selama proses penelitian di laboratorium mikrobiologi BP2LHK Makassar.

DAFTAR PUSTAKA

Arsyad, R. H. 2007. Penggunaan *Rhizobium* dan mikrob pelarut fosfat (MPF) untuk memperbaiki pertumbuhan bibit Akasia (*Acacia mangium* dan *Acacia crassicarpa*). [Skripsi]. Fakultas Pertanian. Institut Pertanian Bogor.

- Berrada, H. and F. K. Benbrahim. 2014. Taxonomy of the rhizobia : current perspectives. *British Microbiology Research Journal*, 4 (6) : 616 - 639.
- Bhargava, Y., J. S. R. Murthy, T. V. R. Kumar, and M. N. Rao. 2016. Phenotypic, stress tolerance and plant growth promoting characteristics of rhizobial isolates from selected wild legumes of Semi-arid Region, Tirupati, India. *Advances in Microbiology*, 6 (1) : 1 - 12.
- Bladergroen, M. R and H. P. Spaink. 1998. Genes and signal molecules involved in the rhizobia-leguminosae symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 1 (4) : 353 - 359.
- Czaczyk, K. and K. Myszk. 2007. Biosynthesis of Extracellular Polymeric Substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. *Polish Journal of Environment Study*, 16 (6) : 799 - 806.
- Franche, C. K. Lindstrom, and C. Elmerich. 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil*, 321 (1) : 35 - 59.
- Ghosh, A. C., S. Ghosh, and P. S. Basu. 2005. Production of extracellular polysaccharides by a *Rhizobium* species from root nodules of the leguminous tree *Dalbergia lanceolaria*. *Engineering in Life Sciences*, 5 (4) : 378 - 382.
- Haryono dan T. Setiadi. 2006. Pengambilan senyawa polisakarida ekstraseluler dari mikroorganisme dalam lumpur aktif sebagai adsorben logam berat. *Jurnal Teknik Kimia Indonesia*, 5 (2) : 453 - 460.
- Hidayat, C. 2013. Struktur dan fungsi eksopolisakarida dalam simbiosis legum-*rhizobium*. *Jurnal ISTEK*, 7 (1) : 18 - 32.
- Howieson, J. G. and M. J. Dilworth. 2016. Working with Rhizobia. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR).
- Khan, M. H. R., Mohiuddin, M., and M Rahman. 2008. Enumeration, isolation and identification of nitrogen-fixing bacterial strains at seedling stage in rhizosphere of rice grown in non-calcareous grey flood plain soil of Bangladesh. *Journal of the Faculty of Environmental Science and Technology*, 13 (1) : 97 - 101.
- Kumari, B. S., M. R. Ram, and K. V. Mallaiah. 2009. Studies on *exopolysaccharide* and *indole acetic acid* production by *Rhizobium* strains from Indigofera. *African Journal of Microbiology Research*, 3 (1) : 10 - 14.

- Mu'minah, Baharuddin, H. Subair, dan F. B. Darwisah. 2016. Potensi bakteri penghasil eksopolisakarida asal rhizosfer tanaman kentang untuk memproduksi eksopolisakarida. *Jurnal Sains dan teknologi*, 16 (2) : 101 - 106.
- Nirmala, P. O. S. Aysha, S. Valli, A. Reena, and P. V. Kumar. 2011. Production of *extracellular polysaccharides* by a *Rhizobium* species from root nodules of *Vigna mungo* (hepper). *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archives*, 2 (4) : 1209 - 1214.
- Parkar, S. G., S. H. Flint, J. S. Palmer, and J. D. Brooks. 2001. Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. *Journal Applied Microbiology*, 90 (6) : 901 - 908.
- Shahzad, F., M. Shafee, F. Abbas, S. Babar, M. M. Tariq, and Z. Ahmad. 2012. Isolation and biochemical characterization of *Rhizobium meliloti* from root nodules of Alfalfa (*Medico sativa*). *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 22 (2) : 522 - 524.
- Simon, Z., K. Mtei, A. Gessesse, and P. A. Ndakidemi. 2014. Isolation and characterization of nitrogen fixing bacteria from cultivated and uncultivated soils of Northern Tanzania. *American Journal of Plant Sciences*, 5 (26) : 4050 - 4067.