



**KEMAMPUAN TUMBUH ISOLAT *Azotobacter* TERHADAP
BERBAGAI pH MEDIA**

SKRIPSI

TANAH - BAKTERIOLOGI

Aasal :	Hadiah	Klass
	Pembelian	637.4
	06 MAY 2008	NOV
		K
Pengatalog :		

Oleh :

Munira Novita W.
NIM. 031810401080

JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER

2007



**KEMAMPUAN TUMBUH ISOLAT *Azotobacter* TERHADAP
BERBAGAI pH MEDIA**

SKRIPSI

diajukan untuk memenuhi persyaratan penyelesaian program sarjana sains
Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Jember

Oleh

**MUNIRA NOVITA W.
NIM 031810401080**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER**

2007

PERSEMBAHAN

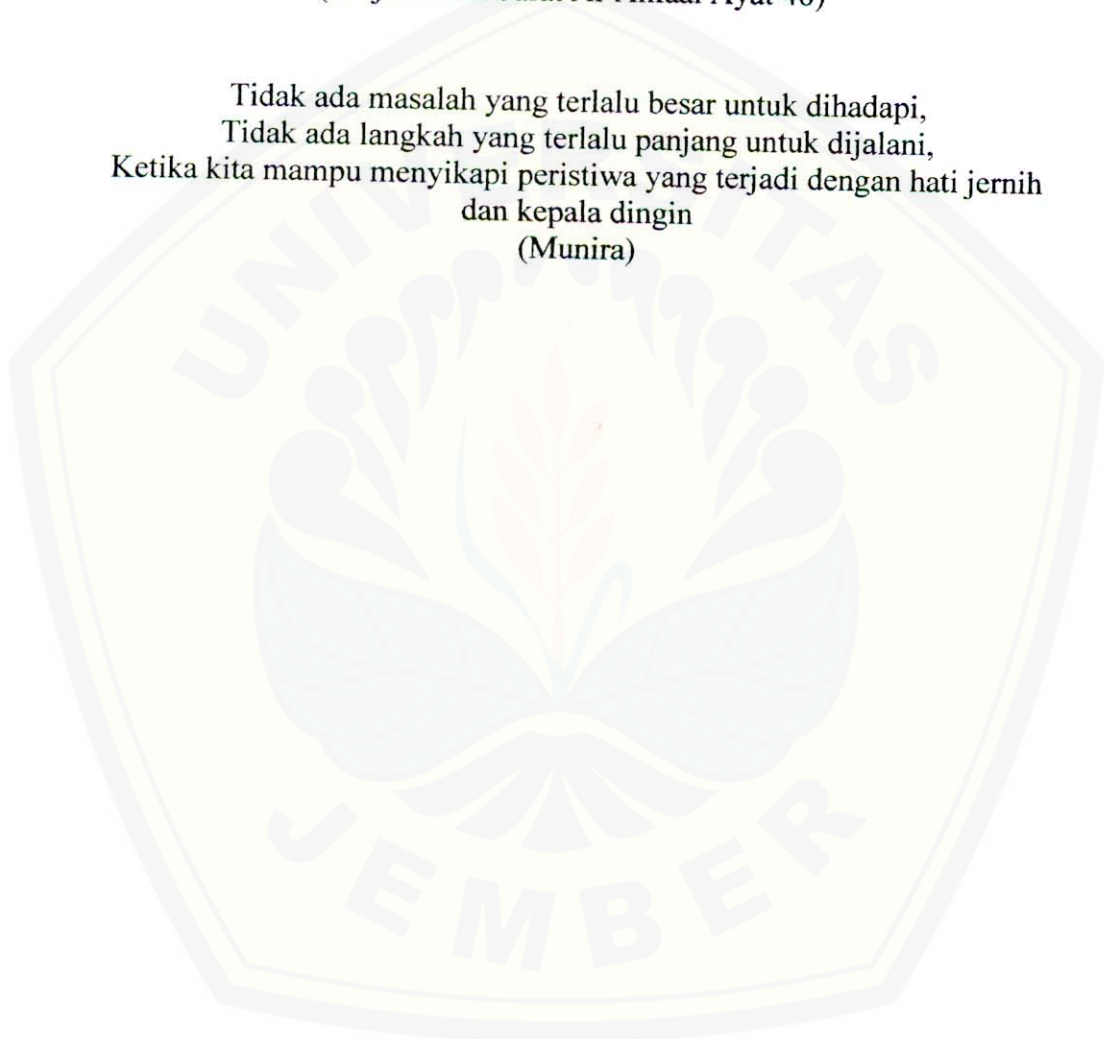
Segala puji milik Allah SWT sebaik-baik pelindung dan penolong serta sebenar-benar pemberi petunjuk, skripsi ini saya persembahkan dengan penuh rasa cinta kasih kepada:

1. Ayahanda H. M. Zarkasyi dan Ibunda Tercinta Hj. Rifka Pramita S., terimakasih atas doa, dukungan dan kasih sayang yang tiada terhingga,
2. Adik-adikku tersayang Fahrizal Dwi Pamungkas dan Auralia Sakinah Lestari, terima kasih telah memberikan senyum dan tawa terbaiknya telah menemani hari-hari ku melewati rumitnya perjalanan ini,
3. Keluarga besar Surabaya dan Ponorogo terima kasih atas doa dan dukungannya,
4. Guru dan Dosen yang telah memberikan ilmu dan membuatku tahu akan banyak hal.

MOTTO

Dan bersabarlah, Sesungguhnya Allah beserta orang-orang yang sabar.
(Terjemahan Surat Al-Anfaal Ayat 46)^{*}

Tidak ada masalah yang terlalu besar untuk dihadapi,
Tidak ada langkah yang terlalu panjang untuk dijalani,
Ketika kita mampu menyikapi peristiwa yang terjadi dengan hati jernih
dan kepala dingin
(Munira)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Munira Novita W.

Nim : 031810401080

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul: “Kemampuan Tumbuh Isolat *Azotobacter* Terhadap Berbagai pH Media” adalah benar-benar hasil karya sendiri kecuali jika disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan hasil karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Nopember 2007

Yang menyatakan,



Munira Novita W.
NIM 031810401080

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diterima oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada:

hari : SELASA

tanggal: 06 NOV 2007

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

Tim Penguji

Ketua,



Sattya Arimurti, S.P., M.Si
NIP. 132 240 149

Sekretaris,



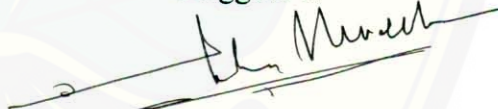
Esti Utarti, S.P., M.Si
NIP. 132 243 344

Anggota I



Drs. Siswanto, M.Si
NIP. 132 046 350

Anggota II



Dr. Kahar Muzakhar, S.Si
NIP. 132 083 605

Mengesahkan

Dekan Fakultas MIPA Universitas Jember,



Ir. Sumadi, M.S
NIP. 130 368 784

RINGKASAN

Kemampuan Tumbuh Isolat *Azotobacter* Terhadap Berbagai pH Media; Munira Novita W., 031810401080; 2007: 25 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pegetahuan Alam Universitas Jember.

Azotobacter merupakan salah satu bakteri tanah yang mampu menambat nitrogen bebas (N_2) dari udara dan merubahnya menjadi bentuk NH_3 . *Azotobacter* mampu menambat 10-20 mg nitrogen per gram gula (Allison dalam Wedhastri, 2002). Selain itu *Azotobacter* mampu menghasilkan hormon tumbuh yang dapat dimanfaatkan oleh tanaman berupa IAA dan giberelin (Vancura dan Macura dalam Hanafiah, 2005).

Azotobacter bersifat sensitif terhadap konsentrasi ion hidrogen yang tinggi (asam). *Azotobacter* dapat tumbuh pada pH media dengan kisaran 4,5 hingga 9,0 dengan pertumbuhan optimum pada pH media 7,2 – 8,2 (Dhanasekar dalam Saribay, 2003). Setiap spesies *Azotobacter* memiliki tingkat sesitifitas yang berbeda pada media asam. *Azotobacter chroococcum* dan *Azotobacter vinelandii* dapat bertahan hidup hingga pH media 5,5, sedangkan *Azotobacter macrocytogenes* memiliki kemampuan hidup pada pH media 4,6 (Saribay, 2003). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan tumbuh isolat *Azotobacter* terhadap berbagai pH media AMA.

Metode yang digunakan adalah menentukan karakteristik morfologi *Azotobacter* berdasarkan Cappucino dan Sherman (1996) meliputi pengujian katalase (Cappucino dan Sherman, 1996), pengujian produksi IAA (Gordon dan Weber dalam Susilowati *et al.*, 2003) dan uji kemampuan tumbuh pada berbagai pH media (pH 2 hingga pH 12) dengan melakukan seri pengenceran ($10^{-1} - 10^{-8}$) ditumbuhkan secara *drop plate* dan penghitungan kepadatan selnya menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC).

Hasil penelitian terhadap 20 isolat yang diidentifikasi morfologi berdasarkan kunci identifikasi Cappucino dan Sherman (1996), menunjukkan bahwa Az 11 memiliki kemiripan dengan *Azotobacter vinelandii*, sedangkan isolat yang lain mirip dengan *Azotobacter macrocytogenes*. Isolat Az 4, Az 9, dan Az 19 memiliki kemiripan dengan *Azotobacter macrocytogeas* tetapi memiliki fluoresens biru. Az 11 mampu tumbuh pada pH 4 sampai pH 8 dengan pola pertumbuhan yang sama yaitu terus meningkat dari inkubasi 24 sampai 42 jam selanjutnya menurun sampai jam ke-48. Pertumbuhan tertinggi terjadi pada pH 6 dengan jumlah sel tertinggi pada jam ke-24 dengan jumlah sel $3,3 \times 10^8$ CFU/ml. Berbeda dengan Az 11, Az 16 pada pH 4 sampai pH 12 menunjukkan pola pertumbuhan mendatar sampai jam ke-18, selanjutnya jumlah sel menurun sampai jam ke-48. Pertumbuhan tertinggi terjadi pada pH 8 yang dicapai pada jam ke-18 dengan jumlah sel $1,54 \times 10^{11}$ CFU/ml. Isolat Az 19 merupakan *Azotobacter* yang mirip dengan Az 16 kecuali warna fluoresens. Az 19 memiliki pola pertumbuhan yang mendatar pada pH 2 sampai pH 10. Pertumbuhan tertinggi pada pH 6 dengan jumlah sel $8,3 \times 10^5$ dicapai pada jam ke 6. Hasil penelitian secara umum dapat diketahui bahwa isolat Az 11, Az 16 dan Az 19 memiliki pertumbuhan optimum pada pH netral (pH 6). Hal ini sesuai dengan habitat asal tiga isolat *Azotobacter* yang memiliki rata-rata pH 6,7.

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunianya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Kemampuan Tumbuh Isolat *Azotobacter* Terhadap Berbagai pH Media”, skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

Penulis ingin mengucapkan terima kasih yang tiada terhingga kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penyusunan skripsi ini, dan juga penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

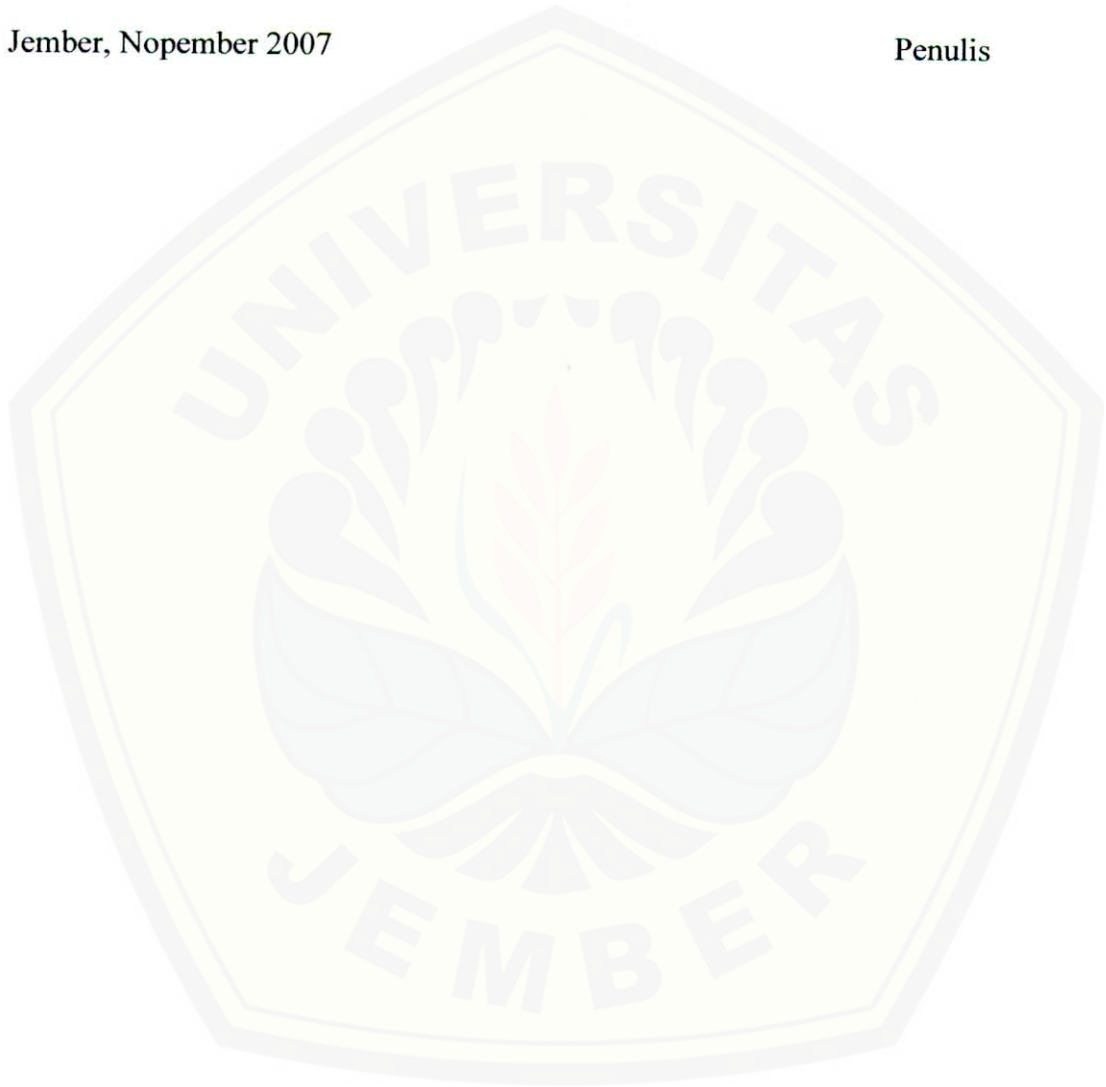
1. Sattya Arimurti, S.P., M.Si., selaku Dosen Pembimbing Utama dan Esti Utarti, S.P., M.Si., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah memberikan pengarahan, bimbingan, dan dukungan mulai tahap penelitian hingga terselesainya skripsi ini,
2. Drs. Siswanto, M.Si. dan Dr. Kahar Muzakhar, S.Si, selaku Dosen Penguji, yang telah memberikan masukan yang berguna bagi penulis sampai terselesainya skripsi ini,
3. Ir Endang Susetyaningsih yang dengan sabar membantu penulis selama masa-masa penelitian,
4. Seluruh Guru dan Dosen yang telah berjasa bagi pendidikanku,
5. Sahabat seperjuangan Mikrobiologi “ Linda, Dini, Fuad, Syafi’, Ila, Titis, dan Jefri “, terima kasih atas kerjasamanya selama penelitian,
6. Semua pihak yang telah membantu dan mendukung terselesainya penulisan skripsi ini.

Semoga amal dan budi baiknya mendapat balasan dari Allah SWT.

Skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, untuk itu penulis mengharapkan kritik dan saran demi kesempurnaan skripsi ini. Selain itu, penulis mohon maaf apabila ada pihak yang belum tersebut dalam skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca dan kemajuan ilmu pengetahuan.

Jember, Nopember 2007

Penulis



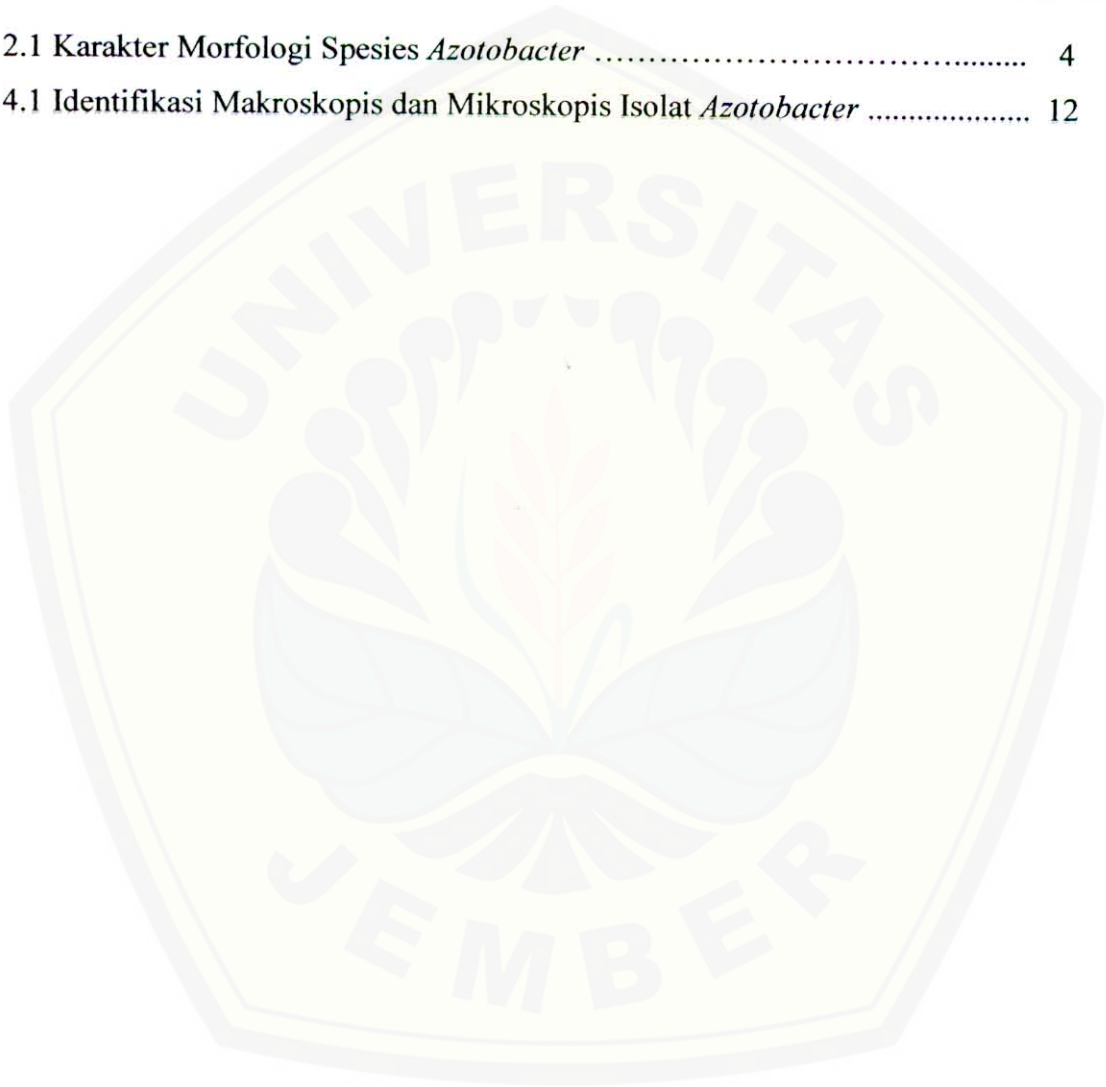
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
RINGKASAN	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian.....	2
1.3.1 Tujuan Penelitian	2
1.3.2 Manfaat Penelitian	2
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Azotobacter</i>	3
2.2 Pengaruh pH Terhadap pertumbuhan <i>Azotobacter</i>	6
BAB 3. METODE PENELITIAN	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	7
3.2 Alat dan Bahan.....	7
3.3 Prosedur Penelitian.....	8
3.3.1 Identifikasi <i>Azotobacter</i>	8

3.3.2 Uji Kemampuan Tumbuh Isolat <i>Azotobacter</i> Pada Berbagai pH Media.....	10
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Karakteristik Morfologi Makroskopis dan Mikroskopis.....	11
4.2 Kemampuan Tumbuh Isolat <i>Azotobacter</i> Pada berbagai pH Media.....	13
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	16
5.2 Saran.....	16
DAFTAR PUSTAKA	17
LAMPIRAN	20

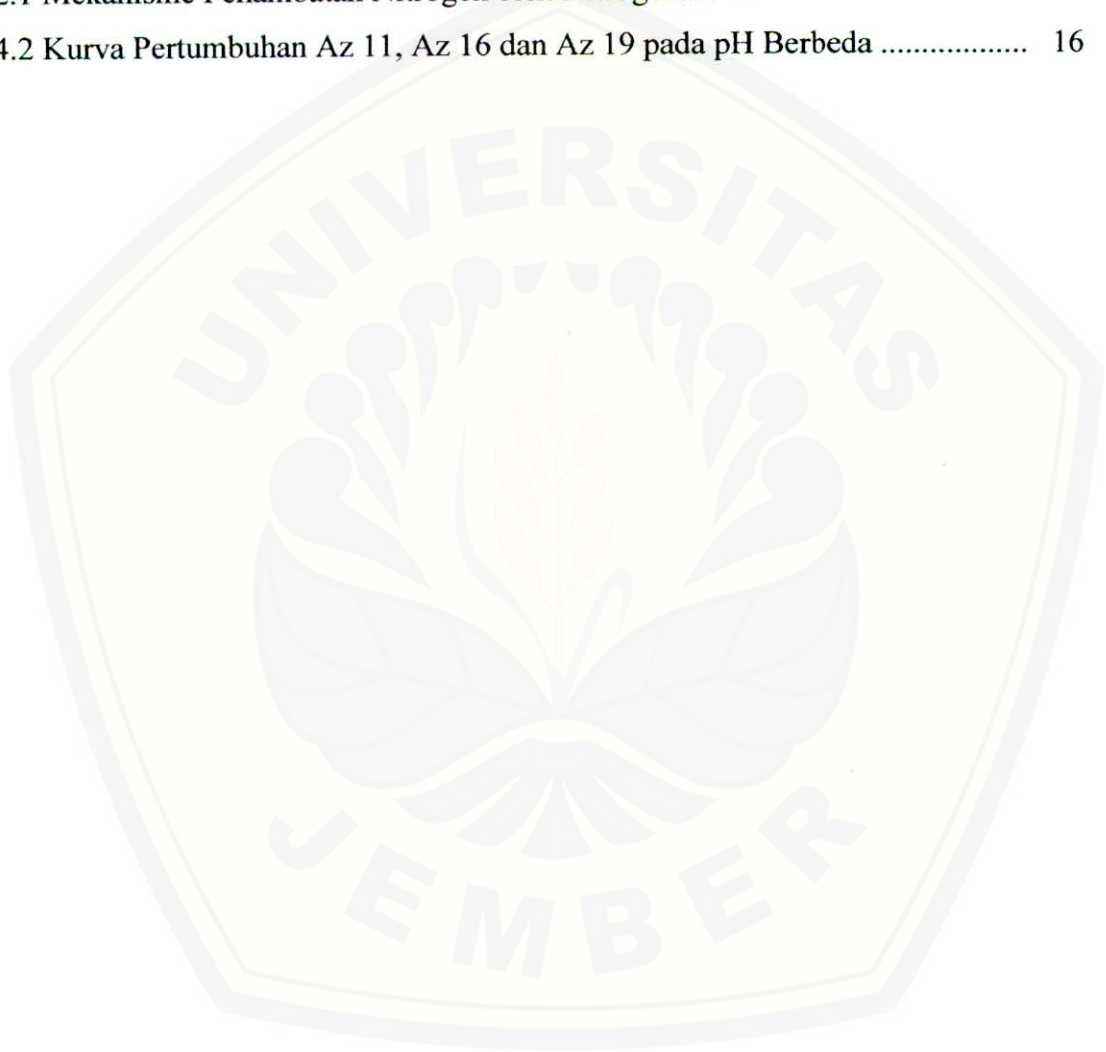
DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Karakter Morfologi Spesies <i>Azotobacter</i>	4
4.1 Identifikasi Makroskopis dan Mikroskopis Isolat <i>Azotobacter</i>	12



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Mekanisme Penambatan Nitrogen oleh Nitrogenase	5
4.2 Kurva Pertumbuhan Az 11, Az 16 dan Az 19 pada pH Berbeda	16



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Komposisi Media Agar Manitol Ashby	21
B. Komposisi Larutan Salkowski	21
C. Potensi Produksi IAA Isolat <i>Azotobacter</i>	21
D. Data Jumlah Sel Az 11 Pada pH Media AMA	23
E. Data Jumlah Sel Az 16 Pada pH Media AMA	24
F. Data Jumlah Sel Az 19 Pada pH Media AMA	25
G. Perubahan pH Media AMA Cair	26



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Azotobacter merupakan salah satu bakteri tanah nonsimbiotik yang mampu menambat nitrogen bebas (N_2) dari udara dan merubahnya menjadi bentuk NH_3 . *Azotobacter* mampu menambat 10-20 mg nitrogen per gram gula (Allison, dalam Wedhastri, 2002). Selain itu *Azotobacter* mampu menghasilkan hormon tumbuh yang dapat dimanfaatkan oleh tanaman berupa IAA, giberelin dan sitokinin (Vancura dalam Hindersah, 2004). Vancura dan Macura dalam Hanafiah (2005), menyatakan bahwa *Azotobacter* dapat menghasilkan IAA sebanyak 0,05-1,0 $\mu\text{g/ml}$ cairan kultur.

Pemanfaatan *Azotobacter* di Eropa Timur dapat meningkatkan hasil panen tanaman budidaya seperti gandum, barley, jagung, gula bit, wortel, kubis dan kentang sebesar 12% (Rao dalam Wedhastri, 2002). Hasil penelitian Hindersah dan Simarmata (2004) menunjukkan bahwa inokulasi *Azotobacter* berpengaruh positif pada tinggi tajuk tanaman *lettuce* yang berumur 3 minggu sebesar 27,7%. Kennedy *et al* (2004) membuktikan bahwa aplikasi *Azotobacter* pada tanaman padi dapat meningkatkan hasil panen sebesar 20% (meningkat 0,9 ton/ha), sedangkan pada tanaman kapas meningkat sebesar 15-28%.

Azotobacter bersifat sensitif terhadap konsentrasi ion hidrogen yang tinggi (asam). *Azotobacter* dapat tumbuh pada pH media dengan kisaran 4,5 hingga 9,0 dengan pertumbuhan optimum pada pH media 7,2 – 8,2 (Dhanasekar dalam Saribay, 2003). Setiap spesies *Azotobacter* memiliki tingkat sensitifitas yang berbeda pada media asam. *Azotobacter chroococcum* dan *Azotobacter vinelandii* dapat bertahan hidup hingga pH media 5,5, sedangkan *Azotobacter macrocytogenes* memiliki kemampuan hidup pada pH media 4,6 (Saribay, 2003).

Pada penelitian terdahulu diperoleh 20 isolat *Azotobacter* asal rizosfer tebu (Arimurti *et al*, belum publikasi). Untuk menentukan keberhasilan isolat tersebut

sebagai pupuk hayati perlu dikarakterisasi kemampuan tumbuh terhadap pH media, sehingga perlu diuji kemampuan tumbuhnya pada berbagai pH media AMA.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, maka permasalahan yang ingin diungkap dalam penelitian ini adalah bagaimanakah kemampuan tumbuh isolat *Azotobacter* terhadap berbagai pH media AMA?

1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

1.3.1 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan tumbuh isolat *Azotobacter* terhadap berbagai pH media AMA.

1.3.2 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan bermanfaat bagi ilmu pengetahuan, memberikan informasi mengenai kemampuan tumbuh *Azotobacter* terhadap berbagai pH media AMA. Selanjutnya *Azotobacter* yang terpilih dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai pupuk hayati.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Azotobacter*

Azotobacter termasuk bakteri Gram negatif dan bersifat aerobik tetapi dapat tumbuh dengan tekanan oksigen rendah. *Azotobacter* memiliki sel dengan diameter 1,5 – 2,0 μm , pleomorfik, berbentuk batang hingga bulat, tunggal, bergabung, tidak beraturan, dan kadang-kadang membentuk rantai. *Azotobacter* tidak menghasilkan endospora, membentuk kista, pergerakan dengan *peritrichous flagella*. Setiap spesies menghasilkan pigmen yang dapat larut atau tidak larut. Bersifat kemoorganotrof, menggunakan gula, alkohol dan garam-garam dari asam organik untuk tumbuh (Holt *et al.*, dalam Razie, 1994).

Menurut Holt *et al.* (1994) *Azotobacter* terdiri dari 6 spesies, yaitu *A. armeniacus*, *A. beijerinckii*, *A. chroococcum*, *A. saliestris*, dan *A. vinelandii*. Rao (1994) menyatakan terdapat 7 spesies *Azotobacter* yaitu *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. paspali*, *A. gilis*, *A. beijerinckii*, *A. macrocytogenes*, *A. indica*. Menurut Cappucino dan Sherman (1996) *Azotobacter* terdiri dari 3 spesies yaitu *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. macrocytogenes*. Tetapi menurut Euzaby (2007) *Azotobacter* terdiri dari 8 spesies, yaitu *A. armeniacus*, *A. beijerinckii*, *A. chroococcum*, *A. macrocytogenes*, *A. nigricans*, *A. paspali*, *A. saliestris*, dan *A. vinelandii*.

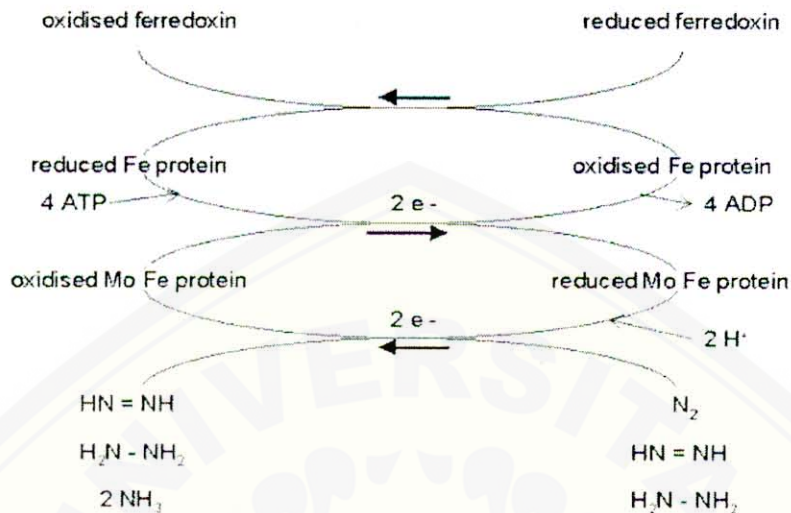
Menurut Cappucino dan Sherman (1996) ciri-ciri untuk membedakan spesies antara lain dengan pigmentasi koloni dan fluoresens dibawah UV dapat diketahui sebagai berikut: *A. chroococcum* pigmentasi koloni berwarna coklat kehitaman dan tidak berfluoresens; *A. vinelandii* pigmentasi koloni tidak berwarna dan berfluoresens; dan *A. macrocytogenes* pigmentasi koloni tidak berwarna dan tidak berfluoresens.

Tabel 2.1. Karakter Morfologi Spesies *Azotobacter*

Spesies	Pigmentasi Koloni	Fluoresens di bawah UV	Pigmen Larut Air	Pigmen Tidak Larut Air	Pengamatan Mikroskopis
<i>A. chroococum</i>	Coklat kehitaman	Tidak Fluoresens	-	+	Gram negatif Oval atau basil Sel sering tersusun berpasangan
<i>A. vinelandii</i>	Tidak berwarna	Hijau	+	-	Gram negatif Oval atau basil Sel sering tersusun berpasangan
<i>A. macrocytogenes</i>	Tidak berwarna	Tidak Fluoresens	-	-	Gram negatif Oval dan kokus Sel tersusun tunggal atau berpasangan

Sumber: Cappucino dan Sherman, 1996

Azotobacter adalah spesies rizobakteri yang telah dikenal sebagai agen biologi pemfiksasi nitrogen (N_2), dan mengkonversinya menjadi (NH_3) melalui reduksi elektron dan protonasi gas nitrogen (N_2) (Hindersah dan Simarmata, 2004). Proses penambatan nitrogen oleh *Azotobacter* menggunakan suatu enzim kompleks yang disebut *nitrogenase*. Nitrogenase terdiri dari dua protein yaitu protein yang mengandung Fe yang disebut *dinitrogenase reduktase* dan protein yang mengandung MoFe yang disebut *dinitrogenase* (Deacon, 2007).



Sumber: Deacon, 2007.

Gambar 2.1 Mekanisme Penambatan Nitrogen oleh Enzim Nitrogenase

Proses penambatan nitrogen pada *Azotobacter* dapat dihambat oleh O_2 . Nitrogenase sensitif terhadap O_2 sehingga ketika bersinggungan dengan O_2 menjadi inaktif, akibat terjadi suatu reaksi dengan Fe pada nitrogenase. *Azotobacter* mencegah hal ini dengan cara menghasilkan polisakarida ekstraseluler dengan membentuk suatu lapisan seperti lendir (Deacon, 2007) dan melakukan *respiratory protection* atau *conformational protection* dimana *Azotobacter* menyesuaikan kecepatan respirasinya dengan tekanan parsial oksigen dari luar (Giller dan Wilson, 1993).

Azotobacter selain mampu menambat nitrogen dapat memproduksi fitohormon sehingga dapat dimanfaatkan oleh tanaman untuk meningkatkan pertumbuhannya. Menurut Vancura dalam Hendersah (2004) *Azotobacter* dapat memproduksi fitohormon berupa sitokinin, giberelin dan IAA. Hormon IAA ini diproduksi sebanyak 0.05-1,0 $\mu g/mL$ cairan kultur *Azotobacter* (Vancura dalam Hanafiah, 2005).

2.2 Pengaruh pH Terhadap Pertumbuhan *Azotobacter*

Daya tahan hidup serta aktivitas mikroba sangat bergantung pada habitat hidupnya. Seperti kondisi lingkungan yang optimal serta ketersediaan nutrisi yang dibutuhkan di dalam akvifitasnya. Menurut Rao (1994) faktor-faktor yang mempengaruhi populasi bakteri di dalam tanah adalah temperatur, derajat keasaman (pH) dan nutrisi.

Derajat keasaman (pH) sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri, karena setiap bakteri mempunyai pH optimum dan kisaran toleransi terhadap pH tumbuh yang berbeda (Primary Information, 2007). pH berpengaruh pada aktivitas enzim yaitu terhadap gugus pemberi dan penerima proton pada sisi katalitik enzim yang dapat meningkatkan tingkat ionisasi antara molekul enzim dengan substratnya (Lehniger, 1995).

Yoshida dan Riaudo, dalam Razie (2003) menjelaskan bahwa populasi *Azotobacter* cenderung semakin sedikit bila tanah menjadi semakin masam. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa populasi *Azotobacter* pada tanah alkalin di Mesir sebanyak 10^3 - 10^7 sel/g tanah, sedangkan pada tanah masam di Thailand ditemukan kurang dari 10^4 sel/g tanah.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember. Waktu pelaksanaan penelitian dimulai bulan Mei 2007 sampai dengan bulan September 2007.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas rak tabung reaksi, pipet mikro, tip, eppendorf, jarum ose, pinset, mikroskop, vortex, inkubator, otoklaf, laminar air flow, shaker, neraca analitik, pH meter 440 CORNING, magnetic stirrer, coloni counter, lampu Bunsen, kapas, penggaris, aluminium foil, kertas label, kertas doorslag serta peralatan gelas. Peralatan gelas yang dipakai meliputi cawan petri, tabung reaksi, gelas Beaker, labu Erlenmeyer, gelas ukur, pipet tetes, pipet volume, gelas obyek dan gelas penutup.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain 20 isolat *Azotobacter* koleksi laboratorium mikrobiologi yaitu Az 1 - Az 20, media *Agar Manitol Ashby* (AMA) (lampiran 1). Selain itu juga digunakan bahan-bahan lain yang meliputi akuades, larutan garam fisiologis (NaCl 0,85%), larutan Salkowski (lampiran 2), NaOH, HCl, spirtus, H₂O₂, KOH, reagen pengecatan Gram yang terdiri dari kristal violet (cat Gram A), lugol iodium (cat Gram B), alkohol (cat Gram C), safranin (cat Gram D).

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Karakteristik Morfologi Makroskopis dan Mikroskopis

Isolat *Azotobacter* diidentifikasi dengan pengamatan morfologi secara makroskopis dan mikroskopis berdasarkan kunci identifikasi Cappucino dan Sherman (1996).

a. Pengamatan Morfologi Secara Makroskopis

1) Pengamatan Pigmentasi Koloni

Masing-masing isolat *Azotobacter* dalam media AMA miring diambil 1 ose dan ditumbuhkan pada media AMA steril dalam cawan petri. Kultur dalam cawan petri diinkubasi dengan posisi terbalik pada suhu 28-30°C selama 4-6 hari. Selanjutnya pengamatan pigmentasi koloni dilakukan dengan mengamati pigmen dari koloni yang tumbuh pada cawan petri.

2) Pengamatan Fluoresens

Masing-masing isolat yang telah ditumbuhkan pada media AMA miring ditempatkan dibawah sinar UV pada ruang gelap untuk melihat adanya Fluoresens.

3) Pengamatan Produksi Pigmen Terlarut dan Tidak Terlarut dalam Air

Pengamatan produksi pigmen larut dan tidak larut dalam air dilakukan dengan mengambil 1 ose isolat, dimasukkan ke tabung mikro berisi 1 ml akuades steril dan divortex sampai homogen. Larutan dalam tabung mikro tersebut dibiarkan selama 30 menit dan adanya pigmen terlarut atau tidak larut.

b. Pengamatan Morfologi Secara Mikroskopis

Pengamatan morfologi sel secara mikroskopis dilakukan dengan menggunakan pengecatan Gram. Pengecatan Gram menggunakan metode Cappucino dan Sherman (1996). Morfologi sel diamati dibawah mikroskop pebesaran 400x. Berdasarkan hasil identifikasi dipilih 3 isolat *Azotobacter* yang diduga berbeda spesiesnya berdasarkan perbedaan karakteristik menurut Cappucino dan Sherman (1996).

Uji kelarutan kalium hidroksida (KOH) dilakukan untuk memastikan hasil pengecatan Gram (Shivas dan Beasley, 2005). Uji ini dilakukan dengan cara mengambil satu ose penuh kultur bakteri dan dicampur dengan setetes larutan KOH 3% di atas gelas obyek yang bersih dan diaduk hingga memperoleh suspensi yang rata. Selanjutnya ose diangkat beberapa sentimeter dari gelas obyek. Jika benang lendir bakteri terangkat oleh ose (kira-kira 5-20 cm panjangnya) maka bakteri itu adalah Gram negatif. Jika dihasilkan suspensi berair dan tidak tampak adanya benang

lendir setelah ose digerakkan berulang-ulang, maka kultur bakteri itu adalah Gram positif.

c. Uji Katalase

Uji katalase dilakukan dengan mengambil satu ose penuh biakan bakteri dan diletakkan pada gelas obyek yang bersih dan meneteskan H_2O_2 di atasnya. Jika terdapat gelembung maka dapat dikatakan positif katalase.

d. Uji Produksi IAA

Uji produksi IAA diawali dengan mengkulturkan biakan pada media MA cair dan diinkubasi dalam shaker 120 rpm selama 5-7 hari pada suhu kamar. Kemudian kultur disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 10 menit. Supernatan diuji dengan pereaksi Salkowski pada tabung reaksi steril dan diinkubasi selama 60 menit. Pengukuran absorbansi dilakukan dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 530 nm (Gordon dan Weber dalam Susilowati *et al.*, 2003) dan dibandingkan dengan media AMA yang mengandung IAA.

Setelah melakukan serangkaian uji karakteristik morfologi, katalase, dan produksi IAA, *Azotobacter* dari tiga kelompok dipilih tiga isolat untuk diuji kemampuan tumbuh pada berbagai pH media AMA.

3.3.2 Uji Kemampuan Tumbuh Isolat *Azotobacter* Pada Berbagai pH Media

Isolat *Azotobacter* yang terpilih masing-masing ditumbuhkan pada 25 ml media MA cair dengan pH 2, 4, 6, 8, 10, dan 12 dan diinkubasi pada suhu kamar dalam *shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama 48 jam. Setiap selang waktu 6 jam selama 48 jam diambil 1 ml inokulan dan dilakukan pengenceran sampai 10^{-8} , untuk penghitungan kepadatan selnya per ml dengan metode *Total Plate Count* (TPC). Sebanyak 10 μ l dari masing-masing pengenceran (10^{-1} - 10^{-8}) ditumbuhkan secara *drop plate* dalam media AMA pada pH yang sesuai dengan pH media MA cair. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam dan dihitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh. Jumlah koloni dihitung sebagai jumlah sel per ml yang ditentukan berdasarkan dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Jumlah sel per ml (CFU/ml)} = \Sigma \text{ koloni percawan} \times \frac{1000\mu\text{l}}{10\mu\text{l}} \times \frac{1}{\text{Pengenceran}}$$

Pada akhir inkubasi, dilakukan pengukuran pH media (MA cair) setelah inkubasi 48 jam dengan menggunakan pHmeter 440 CORNING untuk mengetahui ada tidaknya perubahan pH pada media tumbuh.



BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Berdasarkan identifikasi morfologi diperoleh satu isolat mirip dengan *Azotobacter vinelandii*, 16 isolat mirip dengan *Azotobacter macrocytogenes* dan tiga isolat mirip dengan *Azotobacter macrocytogenes* tetapi fluoresens biru.
2. Az 11 mampu tumbuh pada pH 4 - pH 10 dengan pertumbuhan tertinggi pada pH 6, dengan jumlah sel tertinggi berjumlah $3,3 \times 10^8$ CFU/ml pada waktu inkubasi jam ke-24.
3. Az 16 mampu tumbuh pada pH 4 - pH 12 dengan pertumbuhan tertinggi pada pH 8 menghasilkan jumlah sel tertinggi $1,54 \times 10^{11}$ CFU/ml dicapai pada jam ke-18.
4. Az 19 mampu tumbuh pada pH 2 - pH 10 dengan pertumbuhan tertinggi pada pH 6 dicapai pada jam ke-36 dengan jumlah sel $3,5 \times 10^5$ CFU/ml.

5.2 Saran

Disarankan perlu adanya penelitian lebih lanjut pada berbagai pH tanah terhadap isolat Az 11, Az 16, dan Az 19, sehingga pada akhirnya dapat diaplikasikan sebagai pupuk hayati penyedia nitrogen.



DAFTAR PUSTAKA

- Cappucino, J.G., and Sherman, N. 1996. *Microbiology, a Laboratory Manual*. Fourth Edition. California: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- Crum, A. 2003. *Azotobacter*. [on line] <http://www.soil.cses.ut.edu/ch/biol4684/microbes/Azoto.html-8k>. Tanggal Agustus 2007.
- Deacon, J. 2007. *The Nitrogen Cycle and Nitrogen Fixation*. The university of Edinburgh [on line] <http://helios.bto.ed.ac.uk>. [9 Januari 2007].
- Euzeby, J. P. 2007. *List of Prokariotic Names with Standing in Nomenclature-Genus Azotobacter*. [on line] <http://www.bacterio.cict.fr/a/azotobacter.html>. Tanggal 3 Maret 2007.
- Giller, K. E. and Wilson, K. J. 1993. *Nitrogen Fixation in Tropical Cropping Systems*. United Kingdom: C.A.B International.
- Hadioetomo, R. S. 1993. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek*. Jakarta: PT Gramedia.
- Hanafiah, K. A., Anas, I., Napoleon, A., dan Ghoffar, N. 2005. *Biologi Tanah Ekologi dan Mikrobiologi Tanah*. Jakarta: Raja Grafindo Persada.
- Hindersah, R dan Simarmata, T. 2004."Potansi Rizobakteri Azotobacter dalam Meningkatkan Kesehatan Tanah". *Jurnal Nature Indonesia*. 5(2): 127-133. [serial on line] [http://www.unri.ac.id/jurnal/jurnal_natur/vol6\(2\)/regina.pdf](http://www.unri.ac.id/jurnal/jurnal_natur/vol6(2)/regina.pdf) Tanggal 20 Februari 2007.
- Holt, J.G, Krieg, N.R, Sheath, P.H, Staley, J.T and Williams S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition. Philadelphia: Williams and Walkins Inc.
- Indiaagronet. 2007. *Azotobacter*. [on line] <http://www.indiaagronet.com/indiaagronet/Manuers-fertilizers/azotobacter.htm>. Tanggal 19 Januari 2007.

- Lehninger, A.L., 1995. Dasar-Dasar Biokimia. Terjemahan M. Suhartono dari *Basic of Biochemistry* (1987). Jakarta: Erlangga.
- Kennedy, I. R., A.T. M.A. Choundhury and M. L. Kecskes. 2004. Non-Symbiotic Bacterial Diazotrophs In Crop Farming System: Can Their Potensial for Plant Growth Promotion Be Better Exploited? *WWW Soil Biol Biochem* [on line]. <http://www.elsevier.com/locate/soilbio>. Tanggal 4 November 2007.
- Lay, B.W. 1994. *Analisis Mikroba di Indonesia*. Jakarta: PT Raya Grafindo Persada.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko and J. Parker. 1997. *Brock Biology of Microorganism*. Eight Edition. New Jersey: Prentice-Hall, Inc.
- Primary Information. 2007. *Azotobacter*. [on line] <http://www.primaryinfo.com/azotobacter.htm>. Tanggal 23 Februari 2007.
- Rao, S. N. S. 1994. *Mikroorganisme Tanah dan Pertumbuhan Tanaman*. Edisi kedua. Jakarta: UI Press.
- Razie, F. 2003. Karakteristik *Azotobacter* dan *Azospirillum* Dari Rizosfer Padi Sawah Di Daerah Dataran Banjir Kalimantan Selatan Dan Pengaruhnya Terhadap Pertumbuhan Awal Tanaman Padi. *Skripsi*. Bandung: ITB.
- Saribay, G. F. 2003. Growth and Nitrogen Fixation Dynamics of *Azotobacter chroococcum* in Nitrogen-free and Omw Containing Medium. *Thesis*. [on line] <http://etd.lib.metu.edu.tr/upload/1098961/index.pdf>. Tanggal 12 Agustus 2007.
- Shivas, R dan Beasley, D. 2005. *Plant Pathology Herbarium*. Queensland: Departement of Primary Industries and fisheries.
- Suhartono, M.T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi Umum*. Bogor.: Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor.
- Susilowati, D. N., Saraswati, R., Elsanti, Yuniarti, E. 2003. Isolasi dan Seleksi Mikroba Diazotrof Endofitik dan Penghasil Zat Pengatur Tumbuh Pada Tanaman Padi dan Jagung. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman*. [on line] http://prosiding2003_128-144_susilowati_isolasi.pdf. Tanggal 10 Februari 2007.

Wedhastri, S. 2002. Isolasi dan Seleksi *Azotobacter* spp. Penghasil Faktor Tumbuh dan Penambat Nitrogen dari Tanah Masam. *Jurnal Ilmu Tanah dan Lingkungan*. 3 (1) : 45-51.



LAMPIRAN-LAMPIRAN

A. Komposisi Media Agar Manitol Ashby (AMA)

Bahan	Komposisi
Manitol	20 g
NaCl	0,2 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
K ₂ SO ₄	0,1 g
CaCO ₃	5 g
Agar	15 g
Aquades	1000 ml

Untuk memperoleh pH media yang diinginkan dijust dengan menggunakan NaOH dan HCl

B. Komposisi larutan Salkowski

Bahan	Komposisi
FeCl ₃	20 ml
H ₂ SO ₄	400 ml
Air Suling	580 ml

C. Potensi Produksi IAA Isolat *Azotobacter*

No	Diduga Isolat	Kode Isolat	Produksi IAA
1	<i>A. macrocytogenes</i>	Az 1	-
2	<i>A. macrocytogenes</i>	Az 2	-
3	<i>A. macrocytogenes</i>	Az 3	-
4	<i>A. macrocytogenes</i>	Az 5	-
5	<i>A. macrocytogenes</i>	Az 6	-
6	<i>A. macrocytogenes</i>	Az 7	-
7	<i>A. macrocytogenes</i>	Az 8	+
8	<i>A. macrocytogenes</i>	Az 10	-
9	<i>A. macrocytogenes</i>	Az 12	-
10	<i>A. macrocytogenes</i>	Az 13	-
11	<i>A. macrocytogenes</i>	Az 14	+
12	<i>A. macrocytogenes</i>	Az 15	-
13	<i>A. macrocytogenes</i>	Az 16	+
14	<i>A. macrocytogenes</i>	Az 17	-
15	<i>A. macrocytogenes</i>	Az 18	-
16	<i>A. macrocytogenes</i>	Az 20	+
17	<i>A. macrocytogenes</i> *	Az 4	-
18	<i>A. macrocytogenes</i> *	Az 9	-
19	<i>A. macrocytogenes</i>*	Az 19	-
20	<i>A.vinelandii</i>	Az 11	+

* : pigmen biru

D. Data Jumlah Sel *A. vinelandii* Az 11 Pada pH Media AMA

Waktu Inkubasi (Jam)	Σ Sel <i>Azotobacter</i> (CFU/ml)			
	pH 2		pH 4	
	Jumlah	Log Jumlah	Jumlah	Log Jumlah
0	$1,2 \times 10^6$	6,08	$3,20 \times 10^5$	5,51
6	$2,7 \times 10^6$	6,04	$1,10 \times 10^4$	4,04
12	0	0	$6,21 \times 10^5$	5,79
18	0	0	$2,50 \times 10^5$	5,40
24	0	0	$1,45 \times 10^6$	6,16
30	0	0	$7,90 \times 10^6$	6,90
36	0	0	$1,18 \times 10^7$	7,07
42	0	0	$1,33 \times 10^7$	7,12
48	0	0	$2,50 \times 10^6$	6,40

Waktu Inkubasi (Jam)	Σ Sel <i>Azotobacter</i> (CFU/ml)			
	pH 6		pH 8	
	Jumlah	Log Jumlah	Jumlah	Log Jumlah
0	10^5	5,00	$1,16 \times 10^4$	3,06
6	$1,2 \times 10^6$	6,08	$9,30 \times 10^2$	2,97
12	$8,0 \times 10^6$	6,90	$1,45 \times 10^4$	3,16
18	$2,3 \times 10^7$	7,36	$8,60 \times 10^4$	3,90
24	$3,3 \times 10^8$	8,52	$1,50 \times 10^4$	4,18
30	$1,7 \times 10^7$	7,23	$1,12 \times 10^5$	5,05
36	$1,8 \times 10^7$	7,26	$2,01 \times 10^6$	6,30
42	$2,5 \times 10^7$	7,40	$1,08 \times 10^7$	7,04
48	$2,3 \times 10^7$	7,36	$1,30 \times 10^5$	5,11

Waktu Inkubasi (Jam)	Σ Sel <i>Azotobacter</i> (CFU/ml)			
	pH 10		pH 12	
	Jumlah	Log Jumlah	Jumlah	Log Jumlah
0	$9,30 \times 10^2$	2,97	$6,8 \times 10^5$	5,83
6	5×10^2	2,70	$2,2 \times 10^5$	5,34
12	9×10^2	2,95	0	0
18	10^3	3,00	0	0
24	$1,40 \times 10^4$	4,15	0	0
30	$7,30 \times 10^4$	4,86	0	0
36	$9,30 \times 10^5$	5,97	0	0
42	$3,80 \times 10^5$	5,58	0	0
48	$1,29 \times 10^7$	7,11	0	0

E. Data Jumlah Sel *A. macrocytogenes* Az 16 Pada pH Media AMA

Waktu Inkubasi (Jam)	Σ Sel <i>Azotobacter</i> (CFU/ml)			
	pH 2		pH 4	
	Jumlah	Log Jumlah	Jumlah	Log Jumlah
0	9×10^{10}	10,95	$3,54 \times 10^{12}$	12,55
6	$2,80 \times 10^{11}$	11,45	$2,92 \times 10^{11}$	11,47
12	$1,02 \times 10^{11}$	11,01	$1,22 \times 10^{11}$	11,09
18	$1,04 \times 10^{11}$	11,02	$2,23 \times 10^{11}$	11,35
24	0	0	$2,10 \times 10^6$	6,32
30	0	0	$1,70 \times 10^6$	6,23
36	0	0	8×10^6	6,90
42	0	0	$3,40 \times 10^6$	6,53
48	0	0	10^6	6,00

Waktu Inkubasi (Jam)	Σ Sel <i>Azotobacter</i> (CFU/ml)			
	pH 6		pH 8	
	Jumlah	Log Jumlah	Jumlah	Log Jumlah
0	$1,20 \times 10^6$	6,08	$2,80 \times 10^9$	9,45
6	$3,28 \times 10^{11}$	11,52	$9,73 \times 10^{10}$	10,99
12	$1,31 \times 10^{11}$	11,12	$1,51 \times 10^{11}$	11,18
18	$1,90 \times 10^{11}$	11,28	$1,54 \times 10^{11}$	11,19
24	9×10^5	5,95	$1,10 \times 10^7$	7,04
30	$9,10 \times 10^5$	5,96	$8,60 \times 10^6$	6,93
36	8×10^5	5,90	$9,30 \times 10^6$	6,97
42	$7,50 \times 10^5$	5,88	$1,02 \times 10^7$	7,01
48	$8,50 \times 10^5$	5,93	$1,07 \times 10^7$	7,03

Waktu Inkubasi (Jam)	Σ Sel <i>Azotobacter</i> (CFU/ml)			
	pH 10		pH 12	
	Jumlah	Log Jumlah	Jumlah	Log Jumlah
0	$2,30 \times 10^{10}$	10,36	5×10^{10}	10,7
6	$1,11 \times 10^{11}$	11,05	$7,30 \times 10^{10}$	10,86
12	$1,61 \times 10^{11}$	11,21	$1,10 \times 10^{10}$	10,04
18	$9,97 \times 10^{10}$	11,00	$1,72 \times 10^{10}$	10,24
24	$8,50 \times 10^7$	7,93	10^{10}	10,00
30	$9,30 \times 10^7$	6,97	$1,29 \times 10^6$	6,11
36	$8,80 \times 10^7$	6,94	$1,70 \times 10^6$	6,23
42	$7,20 \times 10^7$	6,86	$1,33 \times 10^7$	7,12
48	$7,80 \times 10^7$	6,89	$8,20 \times 10^6$	6,91

F. Data Jumlah Sel *A. macrocytogenes* Az 19 Pada pH Media AMA

Waktu Inkubasi (Jam)	Σ Sel <i>Azotobacter</i> (CFU/ml)			
	pH 2		pH 4	
	Jumlah	Log Jumlah	Jumlah	Log Jumlah
0	$4,60 \times 10^4$	4,66	$1,30 \times 10^6$	6,11
6	$4,40 \times 10^5$	5,64	7×10^5	5,69
12	$5,20 \times 10^5$	5,72	$1,30 \times 10^6$	6,11
18	6×10^5	6,00	$1,67 \times 10^6$	6,22
24	$2,70 \times 10^5$	2,70	$1,02 \times 10^6$	6,01
30	9×10^5	9,00	$1,20 \times 10^6$	6,08
36	0	0	$3,70 \times 10^6$	5,57
42	0	0	6×10^5	5,78
48	0	0	7×10^5	5,85

Waktu Inkubasi (Jam)	Σ Sel <i>Azotobacter</i> (CFU/ml)			
	pH 6		pH 8	
	Jumlah	Log Jumlah	Jumlah	Log Jumlah
0	$2,5 \times 10^5$	5,40	$2,8 \times 10^5$	5,45
6	$8,3 \times 10^5$	5,92	$3,2 \times 10^5$	5,51
12	$2,8 \times 10^5$	5,45	$2,9 \times 10^5$	5,46
18	$2,9 \times 10^5$	5,46	$2,5 \times 10^5$	5,40
24	$2,4 \times 10^5$	5,40	$3,6 \times 10^5$	5,56
30	$2,6 \times 10^5$	5,41	$2,5 \times 10^5$	5,40
36	$3,5 \times 10^5$	5,54	$3,4 \times 10^5$	5,53
42	$2,5 \times 10^5$	5,40	9×10^6	6,95
48	$3,9 \times 10^5$	5,60	0	0

Waktu Inkubasi (Jam)	Σ Sel <i>Azotobacter</i> (CFU/ml)			
	pH 10		pH 12	
	Jumlah	Log Jumlah	Jumlah	Log Jumlah
0	$1,02 \times 10^6$	6,01	$3,3 \times 10^5$	5,52
6	4×10^5	5,60	5×10^5	5,00
12	$2,90 \times 10^5$	5,46	0	0
18	$2,20 \times 10^5$	5,34	0	0
24	$2,40 \times 10^5$	5,38	0	0
30	$1,70 \times 10^5$	5,23	0	0
36	2×10^5	5,30	0	0
42	$2,50 \times 10^5$	5,39	0	0
48	$2,60 \times 10^5$	5,41	0	0

G. Perubahan pH Media AMA Cair Setelah 48 Jam

pH Media Awal	pH Setelah 48 Jam		
	Az 11	Az 16	Az 19
2	6,35	6,70	6,70
4	6,96	7,04	7,01
6	6,96	6,99	6,99
8	7,07	7,18	7,18
10	7,36	7,35	7,39
12	6,99	7,06	7,00

