

Media Cair Berbasis Molase untuk Meningkatkan Viabilitas dan Produksi Eksopolisakarida *Azotobacter*

Molasses-Based Liquid Media for Increasing Viability and Exopolysaccharide Production of Azotobacter

Reginawanti Hindersah^{1*}, Ety Pratiwi²

¹ Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran, Jalan Raya Bandung-Sumedang Km. 21, Jatinangor, Sumedang 45363, Indonesia

² Balai Penelitian Tanah, Jalan Tentara Pelajar No. 12, Cimanggu, Bogor 16124, Jawa Barat, Indonesia

INFORMASI ARTIKEL

Riwayat artikel:

Diterima: 24 Oktober 2020
Disetujui: 12 Februari 2021
Dipublikasi online: 17 Februari 2021

Kata Kunci:

Eksopolisakarida
Populasi *Azotobacter*
Molase
Nitrogen
Sisteina
Serina

Keywords:

Exopolysaccharide
Azotobacter population
Molasses
Nitrogen
Cystein
Serine

Direview oleh:

Edi Husen, Surono

Abstrak. Inokulan bakteri pemfiksasi nitrogen (N_2) *Azotobacter* umumnya diproduksi pada media bebas N untuk mengoptimalkan fiksasi N_2 , padahal *Azotobacter* juga mensintesis eksopolisakarida (EPS) yang berperan sebagai amelioran tanah. Fiksasi nitrogen dihambat oleh N anorganik sedangkan produksi EPS memerlukan N anorganik. Dengan demikian diperlukan komposisi media yang mendukung produksi EPS tetapi tetap menjaga aktivitas fiksasi N_2 . Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan komposisi media cair *Azotobacter* berbasis molase yang diperkaya dengan asam amino sisteina dan serina untuk menghasilkan sel, EPS, dan N tersedia dengan konsentrasi yang sama dengan media anorganik. Optimasi media dilakukan pada fermentor 2 L pada suhu kamar dengan pengadukan 115 rpm selama 7 hari, kemudian inokulan cair disimpan selama dua bulan pada suhu kamar. Hasil penelitian menjelaskan bahwa pada hari ke-7, media molase 1% + NH_4Cl 0,05% dengan maupun tanpa asam amino menurunkan populasi bakteri dibandingkan dengan media anorganik. Namun produksi EPS di media molase dengan asam amino menyamai kadar EPS di media anorganik. Setelah dua bulan penyimpanan media cair berbasis molase dengan penambahan sisteina 0,25% dan serina 0,1% meningkatkan populasi sel, serta kadar EPS dan N dibandingkan media anorganik, serta mempertahankan pH netral. Percobaan ini menjelaskan bahwa molase dengan NH_4Cl yang diperkaya sisteina dan serina dapat digunakan untuk mengganti media anorganik untuk produksi EPS oleh *Azotobacter*.

Abstract. Inoculants of nitrogen-fixing *Azotobacter* are generally produced on N-free media to optimize N_2 fixation. Nonetheless *Azotobacter* synthesizes exopolysaccharide (EPS) that has a function as soil ameliorant. Nitrogen fixation was carried out in the absence of inorganic N while EPS production was induced by N. Therefore, another media composition is required to produce EPS while maintaining N_2 fixation. The purpose of this study was to obtain the composition of molasses-based *Azotobacter* liquid media with the amino acid cysteine and serine additives to produce cells, EPS, and N with the same concentration as that in inorganic media. The media optimization was carried out on a 2 L fermentor at room temperature with stirring at 115 rpm for 7 days, then the liquid inoculant was stored for two months at room temperature. The results showed that on the 7th day, 1% molasses + 0,05% NH_4Cl media with or without amino acids decreased the bacterial population compared to inorganic media. However, the production of EPS in molasses-based media with amino acids was comparable to that in inorganic media. After two-month storage, molasses-based liquid media with 0.25% cysteine and 0.1% serine increased the cell population, and levels of EPS and N compared to inorganic media; and maintain neutral acidity. This experiment suggested that molasses with NH_4Cl enriched with cysteine and serine can replace inorganic media for EPS production by *Azotobacter*.

Pendahuluan

Penggunaan pupuk hayati berperan penting untuk meningkatkan produktivitas tanah dan tanaman. *Azotobacter* adalah salah satu rizobakteri pemacu pertumbuhan tanaman (RPPT) yang telah digunakan sebagai pupuk hayati. Mekanisme *Azotobacter* sebagai RPPT yang banyak dieksplorasi adalah fiksasi nitrogen

(N_2) dan produksi fitohormon, padahal *Azotobacter* juga menghasilkan eksopolisakarida (Gauri *et al.* 2012).

Eksopolisakarida (EPS) termasuk amelioran yang secara tidak langsung meningkatkan serapa hara dan pertumbuhan tanaman melalui peningkatan kuantitas tanah yang melekat di permukaan akar serta agregasi tanah (Alami *et al.* 2000; Sandhya dan Ali 2015; Costa *et al.* 2018), ketahanan tanaman terhadap kekeringan (Naseem *et*

* Corresponding author: reginawanti@unpad.ac.id

al. 2018), serta ketahanan terhadap salinitas (Abd El-Ghany dan Attia 2020). Inokulasi *A. chroococcum* penghasil EPS dilaporkan meningkatkan jumlah nodula dan bobot tajuk kedelai (Hindersah *et al.* 2019), juga tinggi dan bobot tajuk, serta jumlah daun dan cabang *faba bean* (Abd El-Ghany dan Attia 2020).

Saat ini komposisi media untuk produksi pupuk hayati cair *Azotobacter* lebih ditujukan untuk meningkatkan jumlah sel dan aktivitas fiksasi N₂ pada media tanpa N atau dengan kadar N rendah. Berbeda dengan fiksasi N₂, produksi EPS *Azotobacter* secara *in vitro* memerlukan N anorganik dengan konsentrasi tertentu (Khanafari dan Sepahei 2007; Revin *et al.* 2018). Oleh karena itu formulasi inokulan cair *Azotobacter* untuk fungsi fiksasi N₂ dan produksi EPS perlu memperhatikan kadar N di media.

Formulasi pupuk hayati merupakan tahap penting untuk mendukung proliferasi sel mikroba dan fungsi biologis yang optimal, serta efektivitasnya untuk meningkatkan pertumbuhan tanaman (Alami *et al.* 2018; Neneng 2020). Viabilitas dan efektivitas pupuk hayati dalam bentuk cair maupun padat ditentukan antara lain oleh media pembawa. Sel mikroba yang diperbanyak di media anorganik atau kimia dianggap terbaik untuk mendukung perbanyakan sel karena komposisi nutrisinya tepat untuk mikroba tertentu. Namun media ini mahal sehingga formulasi pupuk hayati disarankan menggunakan bahan dasar yang lebih murah, dan mudah diperoleh.

Penggunaan limbah atau produk samping budidaya atau industri pertanian sebagai substrat mikroba dapat menurunkan harga pupuk hayati. Limbah pabrik gula seperti molase telah digunakan sebagai substrat untuk produksi inokulan cair *Azotobacter* karena terutama mengandung disakarida yang mendukung metabolisme heterotrof. Komposisi karbon di dalam molase didominasi oleh fruktosa, glukosa, dan sukrosa (Xu *et al.* 2015). Komponen penyusun molase termasuk pula kalsium, natrium, komponen bukan gula, dan mineral lainnya (Sardar *et al.* 2013). Komponen sakarida terutama glukosa di dalam molase berperan penting dalam sintesis EPS oleh *Azotobacter* (Gauri *et al.* 2012). Molase umumnya hanya mengandung sedikit unsur N. Mordenti *et al.* (2021) menjelaskan bahwa molase tebu mengandung 41-55 g kg⁻¹ protein kasar sehingga tepat untuk digunakan sebagai media pupuk hayati *Azotobacter* dengan tujuan fiksasi N₂. Namun untuk tujuan meningkatkan fungsi produksi EPS, sumber N lainnya perlu ditambahkan.

Penambahan senyawa anorganik N pada media cair organik telah diketahui dapat meningkatkan bobot EPS

Azotobacter (Khanafari dan Sepahei 2007; da Silva dan Garcia-Cruz 2010; Devianto *et al.* 2020). Penelitian sebelumnya memperlihatkan adanya kenaikan produksi EPS *Azotobacter* sp. pada media molase yang diperkaya NH₄Cl 0,05% (Hindersah *et al.* 2017), namun aktivitas nitrogenase dihambat oleh N ionik terutama amonium (Ayuni *et al.* 2015). Oleh karena itu diperlukan N organik untuk meningkatkan fiksasi N sebagai kompensasi atas penurunan fiksasi akibat NH₄Cl.

Asam amino kecuali glutamat tidak menghambat fiksasi N₂ dan dapat meningkatkan biomassa bakteri pemfiksasi N₂ (Cheng *et al.* 1999). Pada bakteri pemfiksasi N₂, asam amino tertentu berkaitan erat dengan aktivitas enzim nitrogenase. Protein Fe-Polipeptida pada nitrogenase mengandung asam amino sisteina dan serina yang menentukan fungsi protein tersebut (Li 2002). Pada nitrogenase *A. vinelandii*, fungsi serina di dalam protein Fe-Polipeptida tidak dapat digantikan oleh asam amino alanina, sisteina, aspargina atau glisina (Seefeldt dan Mortenson 1993).

Molase tebu mengandung sisteina dan serina dengan kadar yang sangat rendah (Hashizume *et al.* 1966; Mee *et al.* 1979). Pengayaan media cair molase dengan NH₄Cl, asam amino sisteina dan serina akan berperan menjaga aktivitas nitrogenase terutama jika kadar N ionik di media telah menurun dan *Azotobacter* mulai memfiksasi N₂ untuk proliferasi sel dan selanjutnya produksi EPS. Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan komposisi media cair *Azotobacter* berbasis molase dengan penambahan asam amino sisteina dan serina untuk menginduksi pertumbuhan sel dan produksi EPS *Azotobacter* yang sama besarnya dengan media anorganik.

Bahan dan Metode

Percobaan dilakukan di Laboratorium Biologi Tanah Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran (Unpad) pada Juli 2017 - Agustus 2017. Bakteri *Azotobacter* sp. diperoleh dari rizosfer kedelai varietas Anjasmoro. Biakan murni bakteri dipelihara di agar miring media manitol Ashby bebas N (Rao 1977) dengan komposisi manitol 20 g L⁻¹; K₂HPO₄ 0,2 g L⁻¹; MgSO₄.7H₂O 0,2 g L⁻¹; NaCl 0,2 g L⁻¹; K₂SO₄ 0,1 g L⁻¹; CaCO₃ 15 g L⁻¹. Sisteina dan serina *Pharma Grade* diperoleh dari Ajinomoto Singapore.

Percobaan dirancang dengan rancangan acak lengkap untuk menguji kombinasi jenis dan konsentrasi asam amino di dalam media cair berbasis molase diperkaya NH₄Cl. Kontrol percobaan adalah media anorganik terdefinisi untuk menginduksi EPS menurut Vermani *et al.*

(1997), dengan komposisi sukrosa 10 g L⁻¹; KH₂PO₄ 1,0 g L⁻¹; MgSO₄.7H₂O 1,0 g L⁻¹; NaCl 0,5 g L⁻¹; CaCO₃ 0,1 g L⁻¹; NaNO₃ 0,1 g L⁻¹; FeSO₄ 0,1 g L⁻¹; Na₂MoO₄ 10 mg L⁻¹. Enam perlakuan percobaan yang masing-masing diulang empat kali adalah sebagai berikut:

- a: media anorganik (kontrol) tanpa asam amino
- b: molase 1% + NH₄Cl 0,05%
- c: b + sisteina 0,25% + serina 1%
- d: b + sisteina 0,25% + serina 0,1%
- e: b + sisteina 0,025% + serina 1%
- f: b + sisteina 0,025% + serina 0,1%

Media cair selain asam amino disterilisasi pada otoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit dan didinginkan sampai suhu 40-45°C di dalam *water bath*. Sisteina dan serina berbentuk serbuk ditambahkan dan media dihomogenasi di atas *gyratory shaker* selama 10 menit. Sebanyak 1 L media pertumbuhan ditempatkan di dalam fermentor ukuran 2 L. Biakan murni *Azotobacter* sp. diinokulasikan sebanyak 1% dengan kepadatan 10⁷ CFU mL⁻¹ di dalam media bebas N. Kultur di dalam fermentor diinkubasi selama 7 hari pada suhu kamar dengan pengadukan 115 rpm.

Pengambilan sampel dilakukan pada hari ke-3 dan ke-7 untuk penetapan kepadatan sel, kadar EPS, total N, dan tingkat kemasaman (pH) kultur. Penghitungan populasi menggunakan metode pengenceran plat (Sanders 2012) pada media menurut Vermani *et al.* (1997). Penetapan konsentrasi EPS dilakukan dengan menambahkan aseton dingin (1:2, v:v) ke dalam supernatan kultur, kemudian disentrifugasi 10.000 rpm pada temperatur 4°C selama 15 menit (Hindersah 2015). Bobot EPS yang terkonsentrasi di dasar tabung sentrifus ditetapkan dengan metode gravimetri setelah pemanasan 35°C selama 30 menit. Kadar N total dianalisis dari supernatan dengan metode Kjeldahl (Sulaeman *et al.* 2005) setelah sentrifugasi 10.000 rpm pada 4°C, sedangkan kemasaman kultur tanpa sentrifugasi diukur dengan pH meter. Pada hari ke-7, sebanyak 100 mL inokulan cair disimpan selama dua bulan di dalam labu Erlenmeyer 250 mL untuk pengamatan parameter yang sama. Data dianalisis dengan analisis ragam (Uji F p<0,05) dan dilanjutkan dengan Beda Nyata Terkecil (BNT) pada p<0,05.

Hasil dan Pembahasan

Berdasarkan analisis statistik, komposisi media berpengaruh nyata terhadap populasi *Azotobacter*, kadar EPS, kadar N maupun pH inokulan cair *Azotobacter*. Perbedaan yang nyata dari perlakuan diperlihatkan dengan nilai p = 0,00 untuk semua parameter. Koefisien keragaman parameter yang diamati umumnya di bawah 10

kecuali kadar N total bulan ke-2, sebesar 10,53; dan kadar EPS hari ke-7 sebesar 15,72 (Tabel 1).

Tabel 1. Kuadrat tengah (KT) galat dan koefisien keragaman (KK) setiap set data parameter percobaan

Table 1. Mean square error and coefficient of variation of each data set of experimental traits

Parameter Percobaan	KT Galat	KK
N total hari ke-3	0,00138	6,18
N total hari ke-7	0,00078	5,33
N total bulan ke-2	0,00177	10,53
pH hari ke-3	0,00040	0,47
pH hari ke-7	0,00023	0,32
pH bulan ke-2	0,00038	0,34
<i>Azotobacter</i> hari ke-3	0,00350	0,70
<i>Azotobacter</i> hari ke-7	0,00385	0,72
<i>Azotobacter</i> bulan ke-2	0,00690	1,07
EPS hari ke-3	0,06764	8,54
EPS hari ke-7	0,26470	15,72
EPS bulan ke-2	0,00102	1,08

Populasi *Azotobacter*, Kadar EPS, Kadar N, dan pH Hari ke-3 dan ke-7

Populasi *Azotobacter* sp. tertinggi pada hari ke-3 dan ke-7, serta kadar EPS tertinggi pada hari ke-3 diperoleh pada media anorganik (kontrol). Pada hari ke-7 hanya media tanpa asam amino yang menghasilkan EPS lebih rendah daripada media anorganik (Tabel 2). Populasi *Azotobacter* di seluruh media meningkat pada hari ke-7 dibandingkan hari ke-3; peningkatan ≥ 50% terjadi pada media dengan sisteina 0,25% + serina 1% dan sisteina 0,025% + serina 0,1%. Seluruh komposisi media mendukung pertumbuhan bakteri sampai 10⁸ CFU mL⁻¹ dengan metode pengenceran berseri, sesuai dengan batas minimal yang ditetapkan oleh Keputusan Menteri Pertanian No. 261/KPTS/SR.310/M/4/2019. Pada setiap komposisi media, produksi EPS hari ke-7 tidak menurun dibandingkan hari ke-3; terdapat sedikit peningkatan produksi EPS pada media anorganik dan media dengan sisteina 0,25% + serina 1% dan sisteina 0,025% + serina 1% (Tabel 2).

Nitrogen adalah unsur hara esensial untuk pembentukan sel. Media kontrol yang mengandung 0,1 g NaNO₃ diformulasi untuk mendukung pertumbuhan sel dan produksi EPS *Azotobacter* (Vermani *et al.* 1997). Molase mengandung semua unsur hara yang terdapat di dalam media kontrol tetapi tentu saja komposisi kurang tepat untuk pertumbuhan *Azotobacter* dibandingkan media

anorganik. Dengan demikian *Azotobacter* dapat lebih cepat membelah diri dan mensintesis EPS di media Vermani. Hasil percobaan ini sejalan dengan produksi biomassa *A. vinelandii* NRRL-14641 dan *Azotobacter* A.IIB-3 yang lebih tinggi pada media anorganik dibandingkan dengan media organik (Mukhtar *et al.* 2018).

Pada hari ke-7 kadar EPS di media molase yang diperkaya asam amino sama dengan di media kontrol. Media berbasis molase mengandung gula glukosa (Xu *et al.* 2015) yang merupakan substansi utama untuk produksi EPS (Remminghorst dan Rehm 2006), sedangkan media kontrol mengandung sukrosa dengan komposisi unsur hara yang ditetapkan untuk produksi EPS *Azotobacter*. Namun pada percobaan ini penambahan NH₄Cl dan asam amino ke dalam media molase mendukung produksi EPS pada hari ke-7. Sejumlah hasil penelitian telah menjelaskan bahwa produksi EPS ditentukan oleh keberadaan N ionik di dalam media (Khanafari dan Sepahei 2007; Hindersah *et al.* 2017). Lintasan produksi EPS ditentukan oleh

sejumlah enzim (Gauri *et al.* 2012) yang pembentukannya tergantung dari kecukupan N sehingga N di dalam media dapat menjamin produksi EPS. Berbeda dengan nitrogenase, penghambatan enzim yang mengkatalis pembentukan EPS oleh N ionik belum pernah dilaporkan.

Berdasarkan uji BNT, kadar N total inokulan cair pada hari ke-3 dan ke-7 bervariasi, dan kultur menjadi masam setelah inkubasi selama 7 hari (Tabel 3). Nilai kedua parameter tersebut umumnya sedikit menurun pada hari ke-7. Pada hari ke-3 media molase yang diperkaya dengan sisteina 0,025% + serina 0,1% (media f) mengandung lebih banyak N total daripada kontrol dan media lainnya (Tabel 3). Namun pada hari ke-7 kadar N total media tersebut menurun, lebih rendah daripada media kontrol dan media tanpa asam amino. Nitrogen total yang terdeteksi di dalam inokulan cair berasal dari N anorganik dan N organik (biomassa *Azotobacter* dan residu asam amino). Kadar N yang sama pada media kontrol dan media diperkaya sisteina 0,25% + serina 1% dapat disebabkan

Tabel 2. Kepadatan sel dan kadar eksopolisakarida (EPS) *Azotobacter* pada 3 dan 7 hari setelah inkubasi (HSI) pada berbagai komposisi media cair berbasis molase dan asam amino

Table 2. Cell density and exopolysaccharide (EPS) of *Azotobacter* at 3 and 7 days after incubation (HSI) in various composition of molasses- and amino acids-based liquid media

Komposisi Media Cair	Populasi <i>Azotobacter</i>		EPS	
	3 HSI	7 HSI	3 HSI	7 HSI
log ₁₀ CFU mL ⁻¹g L ⁻¹	
a: Media Anorganik (Kontrol)	8,77 a	9,00 a	3,3 b	3,6 b
b: Molase 1% + NH ₄ Cl 0,05%	8,26 d	8,32 c	1,9 d	2,0 a
c: b + sisteina 0,25% + serina 1%	8,55 b	8,79 b	3,2 b	3,4 b
d: b + sisteina 0,25% + serina 0,1%	8,15 e	8,34 c	3,3 b	3,3 b
e: b + sisteina 0,025% + serina 1%	8,23 de	8,36 c	2,7 c	3,4 b
f: b + sisteina 0,025% + serina 0,1%	8,36 c	8,74 b	3,7 a	3,7 b

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama, tidak berbeda nyata menurut Uj BNT (p<0,05)

Tabel 3. Kadar nitrogen total dan kemasaman kultur *Azotobacter* pada 3 dan 7 hari setelah inkubasi (HSI) pada berbagai komposisi media berbasis molase dan asam amino

Table 3. Total nitrogen content and acidity of *Azotobacter* at 3 and 7 days after incubation (HSI) in various composition of molasses- and amino acids-based liquid media

Komposisi Media Cair	Nitrogen total (%)		Kemasaman (pH)	
	3 HSI	7 HSI	3 HSI	7 HSI
%.....			
a: Media Anorganik (Kontrol)	0,57 c	0,55 ab	5,63 a	5,72 a
b: Molase 1% + NH ₄ Cl 0,05%	0,64 b	0,59 a	4,17 f	4,25 e
c: b + sisteina 0,25% + serina 1%	0,57 c	0,57 a	4,93 c	3,36 f
d: b + sisteina 0,25% + serina 0,1%	0,51 d	0,46 c	4,56 e	4,39 d
e: b + sisteina 0,025% + serina 1%	0,57 c	0,51 b	4,83 d	4,89 c
f: b + sisteina 0,025% + serina 0,1%	0,76 a	0,47 c	5,15 b	5,27 b

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama, tidak berbeda nyata menurut Uji BNT (p<0,05)

oleh tingginya populasi sel. Selain itu keberadaan sisteina dan serina dosis tinggi dapat menginduksi aktivitas protein Fe pada nitrogenase untuk memfiksasi N_2 .

Kemasaman atau pH awal media sebelum inokulasi adalah netral, tetapi pH media pada hari ke-3 dan ke-7 menjadi agak masam sampai masam. Media berbasis molase lebih masam daripada media kontrol (Tabel 3). Media molase dengan NH_4Cl yang diperkaya sisteina dan serina dosis tinggi (perlakuan c) memiliki pH terendah pada hari ke-7 dibandingkan dengan media kontrol dan lainnya. Penurunan pH dapat disebabkan oleh sekresi asam organik dan respirasi yang lebih intensif di media molase dengan kualitas nutrisi lebih lengkap daripada media anorganik. *Azotobacter* mensintesis EPS serupa alginat yang terdiri atas asam organik dan gula sederhana, terutama jika ada sumber C dan N (Gauri *et al.* 2012; Hindersah 2015). Eksopolisakarida terikat lemah di dinding sel sehingga mudah terlepas (Sabra *et al.* 2000) dan berpotensi mengasamkan kultur. Penurunan pH juga dapat disebabkan respirasi mikroba menghasilkan CO_2 yang larut di dalam air dan membentuk $H_2CO_3^*$ dan selanjutnya membentuk HCO_3^- dan melepaskan ion H^+ (Boyd 2000).

Populasi *Azotobacter*, Kadar EPS, Kadar N, dan pH Setelah Dua Bulan Penyimpanan

Penyimpanan selama dua bulan umumnya menurunkan populasi *Azotobacter*, kadar EPS, dan total N (Tabel 4) dibandingkan penyimpanan pada hari ke-7 (Tabel 2 dan Tabel 3). Pada percobaan ini populasi *Azotobacter* di media kontrol lebih rendah daripada di sebagian besar media berbasis molase, dan tidak sesuai dengan persyaratan minimal Keputusan Menteri Pertanian No. 261/KPTS/SR.310/M/4/2019. Hanya pada media b (molase tanpa asam amino) dan media d (molase dengan NH_4Cl , sisteina 0,25% dan serina 0,1%) yang mengandung *Azotobacter* $>10^8$ CFU mL^{-1} . Penurunan ini terkait dengan fase pertumbuhan bakteri di lingkungan terbatas, bakteri

sudah sampai di fase kematian dimana nutrisi berkurang dan metabolit toksik meningkat. Selama penyimpanan dua bulan, kandungan N anorganik menurun setelah dikonsumsi oleh *Azotobacter* untuk sintesis N organik. Keterbatasan N anorganik mendorong sel untuk melakukan fiksasi N_2 . Komposisi sisteina dan serina yang cukup tepat untuk menyusun nitrogenase selama dua bulan masa simpan setelah N habis kemungkinan besar adalah sisteina 0,25% dan serina 0,1%.

Penurunan kadar EPS setelah 2 bulan penyimpanan dibandingkan hari ke-7 terdapat di hampir semua komposisi media. Namun media dengan sisteina 0,25% dan serina 0,1% mengandung EPS 2,6 kali lebih banyak daripada media kontrol dan lebih banyak daripada hari ke-7. Media kontrol dan lainnya hanya mengandung EPS sekitar 62-83% lebih rendah daripada EPS di media tersebut. Kadar N anorganik di seluruh media uji juga menurun setelah penyimpanan dua bulan, padahal sintesis EPS merupakan lintasan metabolik yang dikatalis sejumlah enzim (Gauri *et al.* 2012). Pada kondisi tersebut *Azotobacter* perlu memfiksasi N_2 yang menyediakan N untuk metabolisme, termasuk produksi EPS. Telah diketahui bahwa sisteina dan serina adalah komponen protein Fe pada nitrogenase (Li 2002; Seefeldt dan Mortenson 1993). Komposisi sisteina 0,25% dan serina 0,1% di dalam media molase mungkin tepat untuk mempertahankan proliferasi sel dan fungsi protein Fe sehingga meningkatkan viabilitas dan produksi EPS.

Peningkatan pH sampai sekitar 7 terdapat pada media yang diberi sisteina 0,25% dan serina 1% atau serina 0,1%. Peningkatan pH di media tersebut dapat disebabkan oleh respirasi sel yang menurun karena memasuki fase lag, sehingga kadar HCO_3^- dan $H_2CO_3^*$ meningkat (Boyd 2000). *Azotobacter* tumbuh optimal pada pH netral dan sensitif terhadap kondisi masam dan alkalin (Revillas *et al.* 2000). Pada media dengan pH sekitar 7,39 dan 7,01 (Tabel 4) kemungkinan proliferasi tidak akan terhambat pada penyimpanan selanjutnya.

Tabel 4. Karakteristik inokulan cair *Azotobacter* pada berbagai komposisi media setelah dua bulan penyimpanan pada berbagai komposisi media berbasis molase dan asam amino

Table 4. Properties of various liquid inoculant composition of *Azotobacter* after two-month storage

Perlakuan	Populasi <i>Azotobacter</i> \log_{10} CFU mL^{-1}	EPS $g L^{-1}$	N total %	pH
a: Media Anorganik (Kontrol)	7,07 c	2,67 b	0,25 c	4,58 b
b: Molase 1% + NH_4Cl 0,05%	8,18 a	1,61 e	0,38 b	3,49 a
c: b + sisteina 0,25% + serina 1%	7,72 b	2,39 d	0,51 a	7,39 f
d: b + sisteina 0,25% + serina 0,1%	8,25 a	7,17 a	0,38 b	7,01 e
e: b + sisteina 0,025% + serina 1%	7,63 b	2,49 c	0,51 a	4,84 c
f: b + sisteina 0,025% + serina 0,1%	7,07 c	1,21 f	0,38 b	6,37 d

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama, tidak berbeda nyata menurut Uji BNT ($p < 0,05$)

Secara umum media molase dengan sisteina 0,25% dan serina 0,1% mempertahankan populasi 10^8 CFU mL⁻¹ dan meningkatkan pH dari masam menjadi netral pada 2 bulan penyimpanan dibandingkan dengan 7 hari setelah inkubasi. Produksi EPS *Azotobacter* di media tersebut lebih tinggi daripada media kontrol. Media dengan komposisi molase 1%, NH₄Cl 0,05%, sisteina 0,25% dan serina 0,1 % dapat menyangga kebutuhan nutrisi *Azotobacter* untuk mempertahankan viabilitas dan produksi EPS sampai bulan ke-2. Pada komposisi tersebut kemungkinan *Azotobacter* membentuk sista yang dorman selama masa penyimpanan, dan akan bergerminasi saat penetapan populasi pada media Ashby.

Proses produksi inokulan pupuk hayati memerlukan media pembawa yang resisten terhadap lingkungan, ekonomis, mudah tersedia dan dapat didegradasi secara alami. Formulasi pupuk hayati harus menjamin viabilitas dan lama hidup bakteri serta memiliki kapasitas penyangga (Leo Daniel *et al.* 2013; Garcia-Fraile *et al.* 2015). Penambahan bahan organik bukan hanya sebagai sumber karbon bakteri heterotrof, tetapi juga berperan sebagai pelindung sel. Molase pada percobaan ini adalah salah satu dari protektan sel yang sering digunakan selain glukosa, sukrosa, maltosa, trehalosa dan gliserol (Garcia-Fraile *et al.* 2015). Protektan sel mengurangi renjatan tekanan osmotik bakteri setelah dipindahkan dari media kimia ke media pertumbuhan organik, dan mempercepat adaptasi fisiologis bakteri (Segarra *et al.* 2015).

Penelitian ini menjelaskan bahwa penambahan penggunaan molase diperkaya N anorganik serta sisteina dan serina berpotensi menggantikan media anorganik untuk produksi inokulan dari *Azotobacter* penghasil EPS. Namun kualitas inokulan cair sampai penyimpanan enam bulan perlu dipastikan. Selain itu komposisi media masih kurang optimal untuk penyimpanan inokulan selama lebih dari dua bulan karena ada potensi penurunan populasi dan EPS dan pH sehingga reformulasi diperlukan. Keberadaan EPS di dalam inokulan cair pupuk hayati *Azotobacter* akan berperan untuk menjaga kualitas tanah meskipun EPS tidak menjadi persyaratan pupuk hayati cair yang beredar di Indonesia.

Kesimpulan

Pada hari ke-3 dan ke-7, populasi *Azotobacter* di media anorganik Vermani sepuluh kali lebih tinggi daripada di media berbasis molase dengan NH₄Cl, baik tanpa atau dengan sisteina dan serina. Pada hari ke-7 kadar EPS di dalam media molase dengan sisteina dan serina menyamai kadar EPS di media kontrol. Sampai dua bulan

penyimpanan, media molase yang diperkaya sisteina 0,25% dan serina 0,1% memiliki kemasaman netral dan populasi *Azotobacter* 10^8 CFU mL⁻¹ yang lebih tinggi daripada media kontrol dan media lainnya. Komposisi media tersebut juga meningkatkan kadar EPS sampai 2,6 kali lebih banyak daripada kontrol selama dua bulan penyimpanan pada suhu kamar. Penggunaan molase dengan NH₄Cl diperkaya sisteina dan serina dapat menggantikan media anorganik Vermani untuk memproduksi EPS, menjaga pH tetap netral, dan juga mempertahankan viabilitas sampai dua bulan penyimpanan. Populasi *Azotobacter* di akhir bulan ke-2 inkubasi sesuai dengan persyaratan minimal Keputusan Menteri Pertanian No. 261/KPTS/SR.310/M/4/2019.

Ucapan Terimakasih

Penulis berterimakasih kepada Kepala Laboratorium Biokimia FMIPA Unpad untuk penggunaan sentrifus suhu rendah. Penelitian mandiri ini didukung oleh Laboratorium Biologi Tanah Fakultas Pertanian Unpad.

Daftar Pustaka

- Abd El-Ghany MF, Attia M. 2020. Effect of exopolysaccharide-producing bacteria and melatonin on faba bean production in saline and non-saline soil. *Agronomy*. 10:316.
- Alami Y, Achouak W, Moral C, Heulin T. 2000. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. *Appl Environ Microbiol*. 66:3393-3398.
- Alami NH, Duhita CK, Muslihatin W, Kuswyasari ND, Zulaika E, Shovitri M. 2018. Effect of yeast carrier media with *Azotobacter* addition as biofertilizer against growth and productivity of mustard (*Brassica juncea* L.). *IOP Conf Ser.: Earth Environ Sci*. 197:012001.
- Ayuni N, Othman R, Naher UA, Panhwar QA, Saud HM. 2015. Effect of nitrogen on nitrogenase activity of diazotrophs and total bacterial population in rice soil. *J Anim Plant Sci*. 25(5):1358-1364.
- Boyd CE. 2000. pH, carbon dioxide, and alkalinity. p 105-122. *In* Boyd CE (Ed) *Water Quality*. Springer. Boston (MA), USA.
- Cheng C, Hipkin R, Gallon JR. 1999. Effects of inorganic nitrogen compounds on the activity and synthesis of nitrogenase in *Gloeotheca* (Nägeli) sp. ATCC 27152. *New Phytol*. 141:61-70.
- Costa OYA, Raaijmakers JM, Kuramae EE. 2018. Microbial extracellular polymeric substances: ecological function and impact on soil aggregation. *Front Microbiol*. 9:1636.

- da Silva AN, Garcia-Cruz CH. 2010. Biopolymers by *Azotobacter Vinelandii*. p 413-438. In Elnashar M (Ed) Biopolymers. inTech, Rijeka, Slovakia. <https://www.intechopen.com/books/biopolymers/biopolymers-by-azotobacter-vinelandii>.
- Devianto LA, Latunussa CEL, Helmy Q, Kardena E. 2020. Biosurfactants production using glucose and molasses as carbon sources by *Azotobacter vinelandii* and soil washing application in hydrocarbon-contaminated soil. IOP Conf Ser.: Earth Environ Sci. 475:012075.
- Garcia-Fraile P, Menendez E, Rivas R. 2015. Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. AIMS Bioeng. 2(3):183-205.
- Gauri SS, Mandal SM, Pati BR. 2012. Impact of *Azotobacter* exopolysaccharides on sustainable agriculture. Appl Microbiol Biotechnol. 95(2):331-338.
- Hashizume T, Higa S, Sasaki Y, Yamazaki H, Iwamura H, Matsuda H. 1966. Constituents of cane molasses: Part 1. Separation and identification of the nucleic acid derivatives. Agr Biol Chern. 30(4):319-329.
- Hindersah R. 2015. Pertumbuhan dan komposisi eksopolisakarida bakteri pemfiksasi nitrogen *Azotobacter* spp. pada media yang mengandung kadmium. Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon. 1(7):1644-1648.
- Hindersah R, Rostini N, Harsono A, Nuryani. 2017. Peningkatan populasi, pertumbuhan dan serapan nitrogen tanaman kedelai dengan pemberian *Azotobacter* penghasil eksopolisakarida. J Agron Indon. 45(1):30-35.
- Hindersah R, Rostini N, Kalay N, Harsono A. 2019. Peran eksopolisakarida *Azotobacter* dan bahan organik untuk meningkatkan nodulasi dan biomassa kedelai pada dua ordo tanah. J Agron Indon. 47(2):156-162.
- Khanafari A, Sepahei A. 2007. Alginate biopolymer production by *Azotobacter chroococcum* from whey degradation. Int J Sci Environ Technol 4(4):427-432.
- Leo Daniel AE, Venkateswarlu B, Suseelendra D, Kumar GP, Mir Hassan ASK, Meenakshi T, Uzma S, Sravani P, Narasu ML. 2013. Effect of polymeric additives, adjuvants, surfactants on survival, stability and plant growth promoting ability of liquid bioinoculants. J Plant Physiol Pathol. 1(2):1-5.
- Li H. 2002. *Azotobacter vinelandii* Nitrogenase: Multiple Substrate-Reduction Sites and Effects of pH on Substrate Reduction and CO Inhibition. PhD Thesis. Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, USA. 215pp.
- Mee JML, Brooks CC, Stanley RW. 1979. Amino acid and fatty acid composition of cane molasses. J Sci Food Agric. 30(4): 429-432.
- Mordenti AL, Giaretta E, Campidonico L, Parazza P, Formigoni A. 2021. A review regarding the use of molasses in animal nutrition. Animals. 11:115.
- Mukhtar H, Bashir H, Nawaz A, Mahdi S. 2018. Optimization of growth conditions for *Azotobacter* species and their use as biofertilizer. J Bacteriol Mycol Open Access. 6(5):274-278.
- Naseem H, Ahsan M, Shahid MA, Khan N. 2018. Exopolysaccharides producing rhizobacteria and their role in plant growth and drought tolerance. J Basic Microbiol. 58(12):1009-1022.
- Neneng L. 2020. Formulation of liquid biofertilizer for enhance of soil nutrients in peatland. BirEx J. 2(3):314-322.
- Rao S. 1977. Soil Microorganisms and Plant Growth. Oxford and IBH Publishing Co., India.
- Remminghorst U, Rehm BHA. 2006. Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. Biotechnol Lett. 28:1701-1712.
- Revillas JJ, Rodelas B, Pozo C, Martínez-Toledo MV, González-López J. 2000. Production of B-group vitamins by two *Azotobacter* strains with phenolic compounds as sole carbon source under diazotrophic and adiazotrophic conditions. J Appl Microbiol. 89(3):486-493.
- Revin VV, Kostina EG, Revina NV, Shutova VV. 2018. Effect of nutrient sources on the alginate accumulation in the culture liquid of *Azotobacter vinelandii* D-05 and obtaining biocomposite materials. Braz Arch Biol Technol. 61(2018):e18160406.
- Sabra W, Zeng AP, Lunsdorf H, Deckwer WD. 2000. Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase. Appl Environ Microbiol. 66:4037-4044.
- Sanders ER. 2012. Aseptic laboratory techniques: plating methods. J Visual Exp. 63:e3064.
- Sandhya V, Ali SZ. 2015. The production of exopolysaccharide by *Pseudomonas putida* GAP-P45 under various abiotic stress conditions and its role in soil aggregation. Microbiol. 84:512-519.
- Sardar S, Ilyas SU, Malik SR, Javaid K. 2013. Compost fertilizer production from sugar press mud (SPM). Int J Microbiol Res. 1(2):20-27.
- Seefeldt LC, Mortensen LE. 1993. Increasing nitrogenase catalytic efficiency for MgATP by changing serine 16 of its Fe protein to threonine: use of Mn²⁺ to show interaction of serine 16 with Mg²⁺. Protein Sci. 2(1):93-102.

- Segarra G, Puopolo G, Giovannini O, Pertot I. 2015. Stepwise flow diagram for the development of formulations of non spore-forming bacteria against foliar pathogens: the case of *Lysobacter capsici* AZ78. *J Biotechnol.* 216:56-64.
- Sulaeman, Suparto, Eviati. 2005. Petunjuk Teknis Analisis Kimia Tanah, Tanaman, Air, dan Pupuk. Balai Penelitian Tanah. Bogor. 136 hal.
- Vermani MV, Kelkar SM, Kamat MY. 1997. Studies in polysaccharide production and growth of *Azotobacter vinelandii* MTCC 2459, a plant rhizosphere isolate. *Lett Appl Microbiol.* 24:379-383.
- Xu W, Liang L, Zhu M. 2015. Determination of sugars in molasses by HPLC following solid-phase extraction, *Int J Food Prop.* 18:3:547-557.