

Suhu dan Waktu Inkubasi untuk Optimasi Kandungan Eksopolisakarida dan Fitohormon Inokulan Cair *Azotobacter* sp. LKM6

Reginawanti Hindersah^{*}, dan Rija Sudirja

Jurusan Ilmu Tanah, Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran,
Jalan Raya Jatinangor Km 21 Bandung 40600

Diterima 30-12-2009

Disetujui 23-09-2010

ABSTRACT

Azotobacter inoculation could play an important role to enhance the effectiveness of bioremediation since bacterial exopolysachharides form a complex with heavy metal. So that metal mobility in soil and its uptake by plants increased. *Azotobacter* also produce phytohormone which induce roots growth and subsequently the uptake of nutrients. The objective of this research was to obtain optimal incubation temperature and time in *Azotobacter* sp. LKM6 liquid inoculants production in the fermentor to maximize the synthesis of exopolysachharides and phytohormones. The experiment arranged in Completely Randomized Design consisted of two incubation temperature (room temperature and 30°C). At 24, 36, and 48 hours incubation, the concentration of EPS and phytohormone cytokinin and giberelin were occurred. The experimental results were 1) the best temperature and incubation time to produce *Azotobacter* sp. LKM6 liquid for bioremediation of heavy metal-contaminated soil was 30°C and 48 hours, and 2) inoculants production at 30°C for 48 jam produce liquid inoculants containing 2.87 mg L⁻¹ exopolysachharides, 81.0 mg L⁻¹ cytokinins and 18.7 mg L⁻¹ giberelin, and 13.12 x 10⁸ cell ml⁻¹.

Keywords: *azotobacter*, bioremediation, cadmium, exopolysachharides, phytohormones

PENDAHULUAN

Introduksi kadmium (Cd) ke dalam tanah yang terus menerus melalui pupuk organik (Alloway, 1995), pupuk fosfat anorganik (Chien *et al.*, 2003) atau limbah cair industri akan meningkatkan konsentrasi Cd tanah. Akibatnya adalah terjadi peningkatan akumulasi Cd di jaringan tanaman yang akan ditransfer ke manusia melalui jejaring makanan.

Bioremediasi tanah terkontaminasi logam menawarkan metode yang murah dan mudah. Selain itu, logam yang terakumulasi di material biologis seperti tanaman dapat diekstraksi dan didaurulang. Sejumlah tanaman akumulator logam berat dapat digunakan untuk mengakumulasi logam berat tetapi efektivitasnya sering terhambat oleh rendahnya mobilitas logam berat di tanah. Penambahan bahan organik yang berperan sebagai pengkelat logam, seperti EDTA, dapat mengintensifkan pergerakan logam berat ke permukaan akar. Salah satu bahan organik yang berperan sebagai ligan adalah eksopolisakarida (EPS) yang diproduksi beberapa bakteri (Chen *et al.*, 1995).

Azotobacter adalah salah satu bakteri tanah yang relatif resisten terhadap Cd (Hindersah *et al.*, 2008a) dan menghasilkan EPS (Vermani *et al.*, 1997; Emtiazi *et al.*, 2004; Hindersah *et al.*, 2006). Eksopolisakarida *Azotobacter* dapat mengadsorpsi Fe, Cr, Zn (Emtiazi *et al.*, 2004) dan Cd (Hindersah, 2008). Menurut Chen *et al.* (1995), EPS berperan sebagai ligan pengkelat logam berat Kompleks Ligan-logam berat bersifat mobil (Czajka *et al.*, 1997) sehingga ketersediaan hayati logam meningkat. Selain itu, *Azotobacter* menghasilkan fitohormon yang meningkatkan pertumbuhan perakaran (Hindersah *et al.*, 2003). Dengan demikian, inokulasi *Azotobacter* berpotensi meningkatkan serapan logam. Aplikasi inokulan *Azotobacter* di tanah dengan konsentrasi Cd relatif tinggi dapat meningkatkan Cd yang diserap tanaman akumulator seperti selada dan pakcoy (Hindersah *et al.*, 2007) baik di tanah steril maupun tidak steril (Hindersah *et al.*, 2008).

Untuk mengoptimalkan peran *Azotobacter* dalam bioremediasi logam berat terutama Cd perlu dilakukan optimasi produksi inokulan. Produksi EPS *Azotobacter* tergantung dari isolat atau strain (Hindersah *et al.*, 2006; Emtiazi *et al.*, 2004) serta sumber dan kuantitas

*Telp: +62811221834

Email: reginawanti@yahoo.com

karbon dan nitrogen (Vermani *et al.*, 1997; Vargas-Garcia *et al.*, 2003; Suhardiyani, 2007). Hasil penelitian dengan mikroorganisme lain menunjukkan bahwa sintesis EPS juga dipengaruhi oleh fase pertumbuhan (Petry *et al.*, 2000; Lupi *et al.*, 1994). Informasi mengenai pengaruh fase pertumbuhan yang berkaitan dengan lamanya proses produksi inokulan maupun suhu terhadap produksi EPS maupun fitohormon oleh *Azotobacter* masih sangat terbatas. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk Mendapatkan waktu dan suhu inkubasi optimal dalam produksi inokulan *Azotobacter* sp. LKM6 untuk memaksimalkan sintesis eksopolisakarida dan fitohormon.

BAHAN DAN METODE

Bakteri yang digunakan adalah pemfiksasi N₂ *Azotobacter* sp. LKM6 yang diisolasi dari rizosfer kubis merah yang tumbuh di Andisols Lembang dan telah diinduksi untuk menghasilkan lebih banyak eksopolisakarida di media Vermani dengan N. Optimasi produksi inokulan dilakukan di dalam fermentor kaca yang tidak dapat disterilkan. Dengan demikian sterilisasi dilakukan dengan Etanol 70%. Kapasitas maksimum fermentor adalah 2 liter dengan ukuran tabung 2,5 L yang dilengkapi dengan aerator dan pengaduk elektrik.

Produksi inokulan untuk menguji suhu dan waktu inkubasi terhadap produksi EPS dan fitohormon bakteri dilakukan di dalam fermentor dengan mengatur 1) suhu inkubasi yaitu kamar dan 30°C dan 2) waktu inkubasi yaitu 24, 36 dan 48 jam. Percobaan ini dilakukan pada media cair Vermani (Vermani *et al.*, 1997) yang direkomendasikan untuk menginduksi sintesis EPS *Azotobacter*. Sebanyak 10% kultur cair biakan murni *Azotobacter* sp. LKM6 dengan kepadatan sel 10⁹ cfu mL⁻¹ diinokulasikan ke dalam 1 L media Vermani cair di dalam fermentor steril. Fermentor untuk pengujian pada suhu kamar akan diletakkan di ruangan dengan suhu 24°C – 27°C sedangkan untuk pengujian pada 30°C fermentor akan diletakkan di dalam inkubator 30°C. Setiap fermentor diberi aerasi dari sistem aerator steril.

Pada jam ke 24, 36, dan 48 dilakukan pengambilan sampel untuk penentuan 1) konsentrasi sel dengan metode pengenceran plat (Schinner *et al.*, 1995), 2) konsentrasi EPS dengan metode Vermani *et al.*, (1997) yang dimodifikasi, 3) konsentrasi hormon sitokinin dan giberelin menurut Chen *et al.*, (1986) yang

dimodifikasi. Di akhir inkubasi, keasaman kultur dan kandungan diukur dengan metode potensiometri.

Optimasi dilakukan melalui suatu percobaan laboratorium yang dirancang dalam Rancangan Acak Lengkap dengan tiga ulangan. Data akan dianalisis dengan Analisis Ragam dan dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil pada taraf 5% menggunakan SigmaStat ver. 2.01. Dari percobaan ini akan didapatkan waktu dan suhu inkubasi optimal berdasarkan produksi EPS dengan memperhatikan konsentrasi fitohormon dan pertumbuhan bakteri.

Analisis Eksopolisakarida. Penentuan konsentrasi eksopolisakarida di dalam kultur cair diawali dengan menstrifugasi 20 mL kultur bakteri pada 7000 rpm (*Centrifuge medium* Hitachi Himac CF 7D2) pada 4°C selama 20 menit. Sebanyak 10 mL supernatan ditambah dengan 20 mL aseton teknis dingin dan dibiarkan semalam pada suhu 4°C sebelum disentrifugasi 7000 rpm pada 4°C selama 20 menit. Supernatan dibuang dan eksopolisakarida (EPS) di dasar tabung dipindahkan ke kertas Whatman no. 1 yang telah ditimbang setelah pemanasan 35°C selama 1 jam. Kertas berisi EPS dipanaskan 35°C selama 1 jam dan dimasukkan ke dalam desikator selama 20 menit sebelum ditimbang. Berat EPS adalah berat kertas saring dengan EPS dikurangi berat kertas saring tanpa EPS.

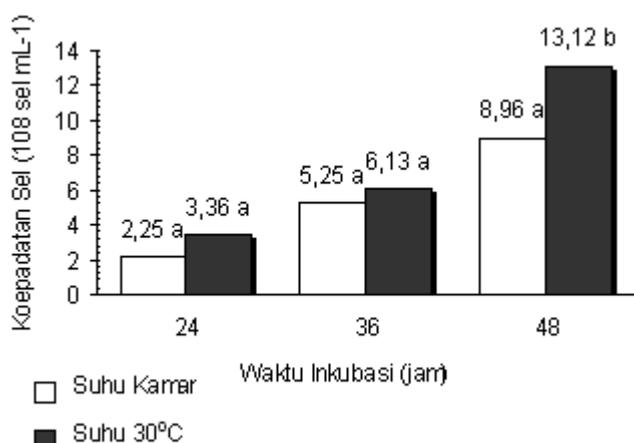
Analisis Fitohormon. Analisis kuantitatif fitohormon yang terdapat di dalam inokulan cair dilakukan dengan cara mengekstraksi sitokinin tersebut dengan pelarut metanol. Sebanyak 50 ml larutan hara ditambah dengan metanol (85:15), kemudian diblender pada kecepatan 2000 rpm selama beberapa menit. Setelah itu, larutan disaring dengan kertas saring Whatman No. 40 dan diliofilisasi (*Freeze-drying*) sampai mencapai volume 50 ml. Sebanyak 1 mL ekstrak dikromatografi kolom dengan menggunakan kolom kontinyu yang terdiri atas PVP (Polivinil Prolidon), kolom Sepak C₁₈ dan kolom penukar kation SCX dengan pengelusi metanol. Tinggi dan diameter kolom masing-masing 2 cm dan 1 cm. Fraksi (1 ml) dikoleksi setelah 1 jam. Selanjutnya, 1 µl fraksi di atas dianalisis dengan HPLC fasa terbalik dengan menggunakan kolom µ-Bondapak C₁₈/280 nm, pelarut asetonitril (60:40) pada laju alir 1,0 mL per menit yang dioperasikan pada suhu kamar (Chen, 1987). Adanya sitokinin dan giberelin dideteksi dengan detektor UV-VIS Spektrofotometer pada panjang gelombang 254 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, suhu kamar tempat produksi inokulan di gunakan berkisar antara 23-27°C , yaitu 23-24°C pada malam hari dan 24-27°C di siang hari. Perlakuan suhu 30°C dilakukan di dalam inkubator dengan suhu $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Untuk kedua perlakuan, pencahayaan ruangan berasal dari lampu neon dari jam 7,00 – 16,00. Selanjutnya ruangan dibiarkan tanpa cahaya. Produksi inokulan dilakukan pada fermentor beraerasi dan berpengaduk sehingga oksigenasi dan homogenitas media terjaga.

Pengambilan sampel dilakukan dengan membuka kran di dasar fermentor. Sampel sebanyak 100 ml diambil setiap waktu pengambilan sampel. Hasil analisis terhadap parameter uji menunjukkan bahwa suhu inkubasi membedakan kualitas inokulan baik kepadatan sel *Azotobacter*, konsentrasi ekopolisakarida, maupun konsentrasi fitohormon sitokinin dan giberelin di dalam inokulan, baik pada waktu inkubasi 24, 36, maupun 48 jam.

Kepadatan sel. Pada Gambar 1 terlihat bahwa suhu 30°C lebih meningkatkan proliferasi sel *Azotobacter* dibandingkan suhu kamar. Pada jam ke 24 dan 36, perbedaan ini belum nyata tetapi menjadi lebih jelas pada saat pengukuran sampel yang diambil pada jam ke 48. Pada saat itu, populasi bakteri *Azotobacter* di dalam inokulan yang diproduksi pada suhu 30°C mencapai $1,31 \times 10^9$ sel mL^{-1} sedangkan pada suhu kamar adalah $8,96 \times 10^8$ sel mL^{-1} . *Azotobacter* adalah bakteri tanah mesofil dengan suhu optimum sekitar 35°C (Holt *et al.*, 1994). Dengan demikian peningkatan proliferasi pada suhu 30°C sesuai dengan karakteristik fisiologinya. Produksi inokulan pada suhu 30°C tidak mengalami fluktuasi suhu yang



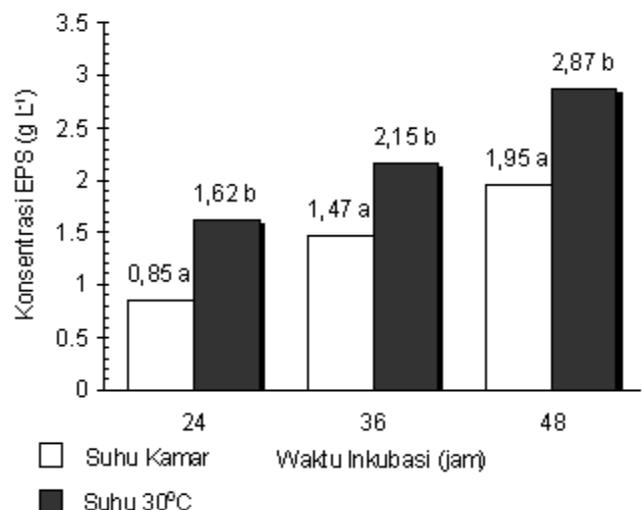
Gambar 1. Pengaruh waktu inkubasi terhadap kepadatan sel inokulan cair *Azotobacter* sp. LKM6 pada dua suhu inkubasi yang berbeda.

tinggi dibandingkan dengan suhu kamar sehingga bakteri dapat melangsungkan seluruh proses fisiologis lebih baik.

Konsentrasi Eksopolisakarida (EPS). Produksi EPS oleh sejumlah bakteri tergantung dari nutrisi terutama sumber karbon, pH, dan fase pertumbuhan (Petry *et al.*, 2000; Emtiazi *et al.*, 2004). Untuk *Azotobacter*, produksi optimum EPS dicapai pada fase logaritmik akhir (Emtiazi *et al.*, 2004). Penelitian Hindersah (2008) memperlihatkan bahwa produksi EPS bakteri *Azotobacter* sp. LKM6 mencapai fase akselerasi antara jam ke 40 dan 48.

Pada penelitian ini, produksi EPS tertinggi dicapai pada saat 48 jam setelah inkubasi (Gambar 2). Produksi inokulan meningkat sejak jam ke 24 sampai jam ke 48 inkubasi. Namun, peningkatan ini melambat dari jam ke 36 ke 48. Hasil ini berbeda dengan penelitian sebelumnya (Hindersah, 2008), dimana produksi EPS meningkat dengan signifikan dari jam ke 40 ke 60. Sebaliknya, produksi EPS relatif konstan di antara jam ke 20 dan 40. Perbedaan ini dapat disebabkan karena kondisi inkubasi. Pada penelitian sebelumnya, bakteri ditumbuhkan di media yang sama tetapi di dalam tabung Erlenmeyer 100 mL di suhu kamar tanpa aerasi.

Produksi EPS *Azotobacter* lebih tinggi pada suhu 30°C daripada suhu kamar baik pada 24, 36 maupun 48 jam inkubasi (Gambar 2). Pada kedua perlakuan suhu, produksi EPS *Azotobacter* mencapai lebih dari 1 g per liter. Pada media yang mengandung asam hidrofenoat atau glukosa, produksi EPS *Azotobacter vinelandii* mencapai 0,9 dan 1,3 g L^{-1} setelah 48 jam inkubasi (Moreno *et al.*, 1999). Pada penelitian kami,

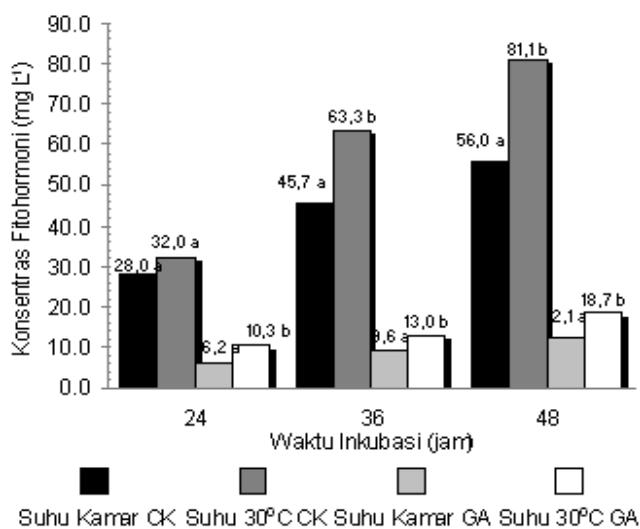


Gambar 2. Pengaruh waktu inkubasi terhadap konsentrasi EPS di dalam inokulan cair *Azotobacter* sp. LKM6 pada dua suhu inkubasi yang berbeda.

digunakan sukrosa sebagai sumber karbon sesuai saran Vermani *et al.*, (1997) yang menjelaskan pentingnya sukrosa sebagai sumber gula dalam pembentukan EPS.

Konsentrasi EPS ini jauh lebih tinggi daripada EPS yang terdapat di dalam kultur yang diinkubasi pada tabung Erlenmeyer tanpa aerasi dan pengadukan. Pada kondisi tersebut, bakteri yang sama hanya menghasilkan sekitar 600 mg eksopolisakarida per liter kultur (Hindersah, 2008). Dengan demikian jelas bahwa suhu yang kosntan, ruang fermentor yang lebih besar, serta aerasi dan pengadukan dapat lebih menjamin produksi EPS oleh *Azotobacter*.

Konsentrasi Fitohormon. Telah dipastikan bahwa *Azotobacter* memproduksi fitohormon sitokinin, giberelin, dan auksin (Taller & Wong, 1989; Abbass & Okon, 1993; Hindersah *et al.*, 2000). Dijelaskan pula bahwa produksi hormon terjadi pada fase logaritmik akhir (Taller & Wong, 1989). Pada penelitian ini, *Azotobacter sp.* LKM6 mensintesis sitokinin jauh lebih banyak daripada GA baik pada suhu kamar maupun 30°C (Gambar 3). Produksi fitohormon *Azotobacter sp.*



Gambar 3. Pengaruh waktu inkubasi terhadap konsentrasi fitohormon Giberelin (GA) dan sitokinin (CK) di dalam inokulan cair *Azotobacter sp.* LKM6 pada dua suhu inkubasi yang berbeda

Tabel 1. Kemasaman (pH) inokulan cair *Azotobacter sp.* LKM6 pada suhu dan waktu inkubasi yang berbeda

Kondisi inkubasi	Kemasaman inokulan
Suhu kamar, 24 jam	6,3 d
Suhu kamar, 36 jam	5,9 c
Suhu kamar, 48 jam	5,7 c
30°C, 24 jam	5,8 c
30°C, 36 jam	5,5 b
30°C, 48 jam	5,1 a

LKM6 selain ditentukan oleh suhu inkubasi juga ditentukan oleh waktu inkubasi dengan produksi tertinggi dicapai setelah 48 jam inkubasi, pada suhu 30°C, yaitu sitokinin sebanyak 81,0 mg kg⁻¹ dan giberelin sebanyak 18,7 mg kg⁻¹.

Produksi inokulan ini dilakukan pada media Vermani yang mengandung nitrogen. Keberadaan N di dalam media, menurut Taller dan Wong (1989) menghambat produksi fitohormon. Namun pada penelitian ini, kedua fitohormon tetap terbentuk meskipun di akhir inkubasi terdapat 0,20 % N di dalam supernatan inokulan yang telah dibebaskan dari sel. Penelitian Hindersah *et al.*, (2000) pada media bebas N hanya menghasilkan kultur cair *Azotobacter chroococcum* yang mengandung sitokinin dan giberelin dengan konsentrasi yang relatif kecil. Meskipun terdapat perbedaan metode ekstraksi dengan penelitian sebelumnya, keberadaan fitohormon di dalam kultur dengan N menandakan bahwa *Azotobacter* tetap memproduksi fitohormon terutama sitokinin pada kondisi inkubasi dengan N.

Di akhir penelitian, pH inokulan bakteri pada suhu kamar adalah 5,7 yang lebih tinggi daripada pH inokulan cair pada suhu 30°C (Tabel 1). Di awal penelitian, pH inokulan cair adalah 7,0 dan telah terjadi peningkatan kemasaman sejak 24 jam inkubasi. Penurunan pH disebabkan oleh terbentuknya asam organik yang konsentrasinya diduga semakin meningkat dengan peningkatan waktu inkubasi. Pada suhu 30°C EPS yang terbentuk lebih banyak daripada suhu kamar (Gambar 2) sehingga konsentrasi asam organik diyakini meningkat mengingat salah satu komponen EPS adalah asam organik seperti asam piruvat (Omar *et al.*, 2005) dan asam manuronat serta guluronat (Likhosherstov *et al.*, 1991). *Azotobacter* adalah rizobakteri yang hidup optimal pada pH sekitar netral (Holt *et al.*, 1994) meskipun Isminarni *et al.*, (2007) dan Martyniuk & Martyniuk (2003) telah membuktikan keberadaan *Azotobacter* di tanah masam. Penurunan pH inokulan sampai 5, mungkin dapat mempengaruhi daya hidup sel bakteri selama penyimpanan inokulan. Namun pendapat ini perlu dibuktikan lebih lanjut.

KESIMPULAN

Suhu dan waktu inkubasi terbaik untuk produksi inokulan cair *Azotobacter sp.* LKM6 untuk tujuan bioremediasi tanah tercemar logam berat kadmium adalah 30°C dan 48 jam. Produksi inokulan pada suhu

30°C selama 48 jam menghasikan inokulan dengan konsentrasi eksopolisakarida 2,87 mg L⁻¹, sitokinin 81,0 mg kg⁻¹ dan giberelin 18,7 mg kg⁻¹ dengan kepadatan sel 13,12 x 10⁸ sel mL⁻¹.

UCAPAN TERIMAKASIH

Kami berterimakasih kepada DP2M Ditjen DIKTI No. 1159/H6.1/Kep/HK/2009 Atas nama Reginawanti Hendersah yang telah membiayai penelitian ini. Terimakasih pula kepada Kepala Balai Pengawasan dan Sertifikasi Benih Tanaman Pangan dan Hortikultura Jabar yang berkenan memfasilitasi sebagian peralatan.

DAFTAR PUSTAKA

- Alloway, B.J.** 1995. Cadmium. Di dalam: Alloway, B.J (ed). *Heavy Metals in Soils*. Glasgow: Blackie Academic and Professional.
- Chen, C.M.** 1987. Characterization of cytokinins and related compounds by HPLC. Di dalam: Linskens, H.F. and Jackson, J.F. (eds.). *High performance liquid Chromatography in Plant Sciences*. Berlin: Springer-Verlag.
- Chen, J.H., Czajka, D. R., Lion, L.W., Shuler, M. L. & Ghiorse, W. C.** 1995. Trace metal mobilization in soil by bacterial polymers. *Environ. Health Perspect* **103**: 53-58.
- Chien, S.H., Carmona, G., Prochnow, L.L. & Austin, E.R.** 2003. Cadmium availability from granulated and bulk-blended phosphate-potassium fertilizers. *J. Environ. Qual* **32**: 1911-1914.
- Czajka, D.R., Lion, L.W., Shuler, M. L. & Ghiorse, W. C.** 1997. Evaluation of the utility of bacterial extracellular polymers for treatment of metal-contaminated soils. *Polymer persistence, mobility, and the influence of lead. Water Res* **31**: 2827-2839.
- Emtiazi, G., Ethemadifar, Z. & Habibi, M.H.** 2004. Production of extracellular polymer in *Azotobacter* and biosorption of metal by exopolymer. *Afr. J. Biotech* **3**: 330-333.
- Hindersah, R., Arief, D.H. & Sumarni, Y.** 2000. Kontribusi hormonal *Azotobacter chroococcum* pada pertumbuhan kecambah jagung dalam kultur cair. *Prosiding Seminar Nasional Bioteknologi Pertanian*, Yogyakarta 6-7 November 2000.
- Hindersah, R., Arief, D.H., Sumarni, Y. & Totowarsa.** 2003. Produksi hormon sitokinin oleh *Azotobacter*. *Prosiding Kongres dan Seminar Nasional Himpunan Ilmu Tanah Indonesia*. Padang, 5-7 Juli 2003.
- Hindersah, R., Arief, D. H., Soemitro, S. & Gunarto, L.** 2006. Exopolysaccharide extraction from rhizobacteria *Azotobacter* sp. *Proc. International Seminar IMTGT*. Medan, 22-23 Juni 2006.
- Hindersah, R., Sudirja, R. & Setiawati, M.R.** 2007. *Akumulasi kadmium pada tajuk tanaman selada dan pakcoy setelah inokulasi Azotobacter* sp. Ckl-5. *Makalah dipresentasikan pada Seminar Kebudayaan Indonesia Malaysia*. Kuala Lumpur 29-31 Mei 2007.
- Hindersah, R., Arief, D. H., Soemitro, S. & Gunarto, L.** 2008. Peningkatan konsentrasi kadmium pupus selada setelah inokulasi *Azotobacter* dan aplikasi CdCl₂ di Andisols steril dan tidak steril. *Prosiding Seminar Nasional dan Dialog sumberdaya Lahan Pertanian*, Bogor 18-20 November 2008.
- Hindersah, R., Arief, D. H., Soemitro, S. & Gunarto, L.** 2008a. Pengaruh CdCl₂ terhadap produksi eksopolisakarida *Azotobacter*. *Jurnal Natur Indonesia* **12(1)**: 34-37.
- Hindersah, R.** 2008. Transportasi kadmium dari tanah ke pupus selada oleh eksopolisakarida *Azotobacter*. *Disertasi Pascasarjana*, Bandung: Universitas Padjadjaran.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Shaley, J.T. & William, S.T.** 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore: William and Wilkins.
- Isminari, F., Wedhastri, S., Widada, J. & Purwanto, B.H.** 2007. Penambatan nitrogen dan penghasilan indol asam asetat oleh isolat-isolat *Azotobacter* pada pH rendah dan aluminium tinggi. *Jurnal Ilmu Tanah dan Lingkungan* **7**: 23-30.
- Likhoshesterov, L.M., Senchenkova, S.N., Shashkov, A.S., Derevitskaya, V.A., Danilova, I.V. & Botvinko, I.V.** 1991. Structure of the major exopolysaccharide produced by *Azotobacter beijerinckii* B-1615. *Carbohydr. Res.* **222**: 233-238.
- Lupi, F. M., Fernandes, H.M.L., Tome, M.M., Sa-Correia, I. & Novais, J.M.** 1994. Influence of nitrogen source and photoperiod on exopolysaccharide synthesis by the microalga *Botryococcus braunii* UC 58. *Enzyme and Microbial Technology* **16**: 546-550.
- Martyniuk, S. & Martyniuk, M.** 2003. Occurance of *Azotobacter* spp. in some Polish soils. *Polish J. Environ. Study* **12**: 371-374.
- Moreno, J., Vargas-García, C., Lopez, M.J. & Sanchez-Serrano, G.** 1999. Growth and exopolysaccharide production by *Azotobacter vinelandii* in media containing phenolic acids. *Journal of Applied Microbiology* **86**: 439-445.
- Omar, M.N.A., Hanaa, A., Thabet, S.M. & El-Beltagy, E.** 2005. Exopolysaccharides produced by rhizobia isolated from the rhizosphere of different plants. <http://www.arc.sci.eg/InzstsLabs> (15 Oktober 2005).
- Petry, S., Furlan, S., Crepeau, M.J., Cerning, J. & Desmazeaud, M.** 2000. Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium. *Appl. Environ. Microbiol* **66**: 3427-3431.
- Suhardiyan, M.** 2007. Pengaruh sumber dan konsentrasi nitrogen terhadap konsentrasi eksopolisakarida dan jumlah sel inokulan *Azotobacter* sp. *Skripsi Fakultas Pertanian*. Bandung: Universitas Padjadjaran.
- Vargas-Garcia, M.C., Lopez, M.J., Elorrieta, M.A., Suarez, F & Moreno, J.** 2003. Properties of polysaccharides produced by *Azotobacter vinelandii* cultured on 4-hydroxybenzoic acid. *J. Appl. Microbiol* **94**: 389-395.
- Vermani, M.V., Kelkarand, S.M. & Kamat, M.Y.** 1997. Studies in polysaccharide production and growth of *Azotobacter vinelandii* MTCC 2459, a plant rhizosphere isolate. *Lett. Appl. Microbiol* **24**: 379-383.