

Kestabilan Inokulan *Azotobacter* selama Penyimpanan pada Dua Suhu

Reginawanti Hindersah^{*)} dan Rijia Sudirja

Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran, Bandung 40600

Diterima 30-12-2009

Disetujui 12-03-2011

ABSTRACT

Azotobacter might be used as biological agents in bioremediation of heavy metal-contaminated soil since this rhizobacteria produce exopolysaccharides (EPS) that mobilize soil heavy metals, and phytohormones that regulate root growth. So that heavy metal uptake by the roots could be increased. The objective of this research was to verify the stability of EPS and phytohormones in *Azotobacter* liquid inoculants during four months in different temperature storage. Liquid inoculants has been produced in EPS-induced media and stored in 20°C and room temperature (24-27°C) during four months. The results showed that the better temperature storage was room temperature instead of 20°C since pH, total N, and EPS and phytohormones content was relatively stable during storage.

Keywords: azotobacter, exopolysaccharide, inoculant quality, phytohormones, temperature storage

PENDAHULUAN

Di lahan pertanian, kontaminan logam berat dapat berasal dari pupuk organik dan pupuk anorganik terutama pupuk fosfat berbahan dasar batuan fosfat (Alloway 1995; Chien *et al.* 2003; Chen *et al.* 2008). Bioremediasi tanah terkontaminasi logam berat merupakan metode yang relatif mudah dan efektif terutama jika dilakukan bersamaan dengan fitoremediasi oleh tanaman akumulator logam berat. *Azotobacter* adalah rizobakteri yang berpotensi dimanfaatkan sebagai agen hayati untuk remediasi logam berat. Selama ini *Azotobacter* telah digunakan sebagai pupuk hayati karena memfiksasi nitrogen dan memproduksi fitohormon.

Azotobacter juga menghasilkan eksopolisakarida (EPS) yang telah diketahui dapat membentuk kompleks dengan logam berat (LB) sehingga terbentuk kompleks EPS-LB yang stabil dan mobil (Chen *et al.* 1995). Dengan demikian, mobilitas logam berat di dalam tanah akan meningkat dan selanjutnya serapannya oleh akar tanaman meningkat pula. Fitohormon sitokinin dan giberelin yang dihasilkan *Azotobacter* berperan penting dalam remediasi logam berat. Kontribusi *Azotobacter* untuk meningkatkan perakaran melalui produksi fitohormon telah diperlihatkan pada tanaman jagung (Hindersah *et al.* 2003). Perakaran yang intensif akan meningkatkan zone eksplorasi tanah sehingga serapan suatu unsur hara di dalam tanah akan meningkat.

Untuk mengoptimalkan peran *Azotobacter* dalam bioremediasi logam berat perlu dilakukan optimasi produksi inokulan sehingga inokulan yang dihasilkan menghasilkan

EPS dan fitohormon. Kestabilan kadar EPS dan fitohormon di dalam inokulan cair dapat berubah selama penyimpanan. Kondisi penyimpanan terutama suhu akan berperan penting dalam kestabilan kualitas tersebut karena *Azotobacter* adalah bakteri mesofil pertumbuhan sel dan metabolisme optimal pada suhu 30-35°C (Holt *et al.* 1994). Dengan demikian, seharusnya inokulan disimpan pada suhu di bawah suhu optimum tersebut untuk menurunkan aktivitas bakteri. Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan informasi tentang kestabilan kadar EPS dan fitohormon selama empat bulan penyimpanan pada suhu 20°C dan suhu ruang.

BAHANDAN METODE

Inokulan *Azotobacter* sp LKM6 diproduksi pada fermentor kapasitas 2 l pada suhu 30°C selama 48 jam. Media produksi adalah media cair Vermani dengan N (Vermani *et al.* 1997), yang dapat menginduksi produksi eksopolisakarida. 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. Selanjutnya 250 ml inokulan dipindahkan ke dalam wadah plastik komersial putih tidak transparan yang disimpan pada suhu 20°C dan suhu kamar selama 4 bulan.

Pengujian stabilitas dilakukan melalui suatu percobaan laboratorium yang dirancang dalam Rancangan Acak Lengkap dengan empat ulangan. Faktor yang diuji adalah suhu penyimpanan yaitu 20°C dan suhu kamar (24-27°C).

*Telp: +62811221834
Email: reginawanti@yahoo.com

Stabilitas inokulan selama empat bulan penyimpanan ditentukan berdasarkan perubahan 1) konsentrasi nitrogen dengan metode Kjeldahl, 2) pH dengan metode potensiometri, 3) populasi sel dengan metode langsung menggunakan bilik hitung, 4) konsentrasi EPS, dan 5) konsentrasi fitohormon sitokinin dan giberelin di dalam inokulan. Variabel di atas ditentukan setiap bulan dari lima sampel. Data akan dianalisis dengan Analisis Ragam dan dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil pada taraf 5% menggunakan SigmaStat ver. 2.01.

Analisis pH dan N total. Pengukuran pH dilakukan dengan mencampur kultur dengan H₂O (1:2,5; v:v) dan dibiarkan selama 15 menit, kemudian pH diukur dengan pH meter yang menggunakan elektroda gelas (Van Reeuwijk 1992).

N total ditentukan dengan metoda Kjeldahl (Van Reeuwijk 1992). Nitrogen di dalam kultur dimineralisasi dalam bentuk amoniak pada kondisi asam (H₂SO₄) dengan bantuan katalisator. Total nitrogen ditentukan melalui destilasi. Amoniak dibebaskan dengan penambahan NaOH menjadi amonium sulfat. Amoniak dititrasi dengan asam klorida dengan bantuan indikator untuk menentukan kadar N.

Analisis Eksopolisakarida. Penentuan konsentrasi eksopolisakarida di dalam kultur cair diawali dengan mensentrifugasi 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 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/menit yang dioperasikan pada suhu kamar (Chen 1987). Adanya sitokinin dan giberelin deteksi dengan detektor UV-VIS Spektrofotometer pada panjang gelombang 254.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Suhu rendah yang relatif konstan akan berpengaruh terhadap kerja enzim organisme mesofil seperti *Azotobacter*. Suhu penyimpanan 20 ± 1°C di ruangan tertutup berpendingin ternyata tidak menyebabkan perbedaan pH, kandungan N total dan kepadatan sel inokulan cair *Azotobacter* sp. LKM6. Demikian pula tidak ada perbedaan yang besar dari nilai konsentrasi EPS dan fitohormon selama 4 bulan penyimpanan

Kemasaman, konsentrasi N dan kepadatan sel inokulan cair. Suhu penyimpanan tidak berpengaruh terhadap kemasaman, konsentrasi N dan kepadatan sel inokulan cair *Azotobacter* sp. LKM6 selama penyimpanan 3 bulan (Gambar 1) dan bahkan 4 bulan. Jika dibandingkan dengan pH inokulan cair sebelum inkubasi yaitu 5.9, maka di bulan pertama terjadi penurunan pH yang dapat disebabkan masih terbentuknya asam organik oleh *Azotobacter*. Menurut penelitian Kurniawati *et al.* (2006), *Azotobacter* sp UT1 yang diisolasi dari Andisols Ungaran menghasilkan asam-asam organik. Hindersah (2008), telah pula membuktikan bahwa selama masa inkubasi, *Azotobacter* sp. LKM6 menghasilkan asam organik seperti laktat, piruvat, manuronat, glukuronat dan galakturonat. Kemasaman inokulan menurun setelah penyimpanan dua bulan dan kembali menurun pada saat mencapai 3 bulan (Gambar 1a). Namun penurunan ini berhenti pada bulan ke 4. Peningkatan pH dapat disebabkan terbentuk CO₂ hasil degradasi sempurna bahan organik oleh *Azotobacter* yang

Tabel 1 Kemasaman, N total, populasi bakteri, konsentrasi eksopolisakarida dan fitohormon inokulan *Azotobacter* sp. LKM6 setelah empat bulan penyimpanan pada suhu 20°C dan 25-27°C

Variabel	Suhu penyimpanan (°C)	
	20	25-27
Keasaman	6,38 a	6,87 a
N total (%)	0,18 a	0,19 a
Populasi (10 ⁸ sel ml ⁻¹)	8,67 a	7,24 a
EPS (g l ⁻¹)	2,10 a	2,63 a
Sitokinin (mg l ⁻¹)	42,00 a	59,32 b
Giberelin (mg l ⁻¹)	17,80 a	17,01 a

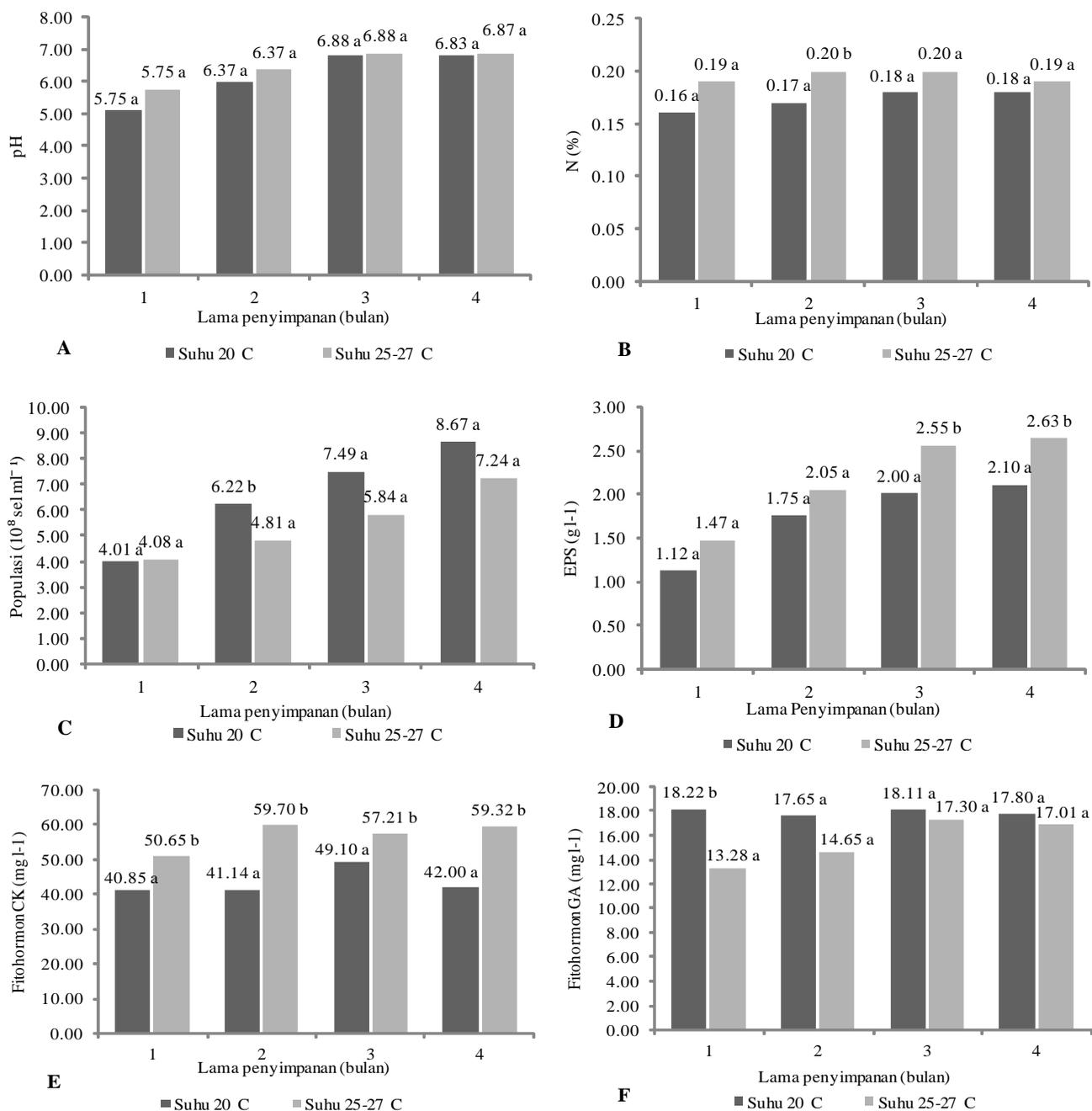
Keterangan: Angka yang diikuti dengan huruf yang sama di dalam satu baris tidak berbeda nyata menurut Uji Beda Nyata Terkecil pada taraf 5%

heterotrof (Holt *et al.* 1994). Penyimpanan dalam botol tidak tembus cahaya dengan volume 1 l (diisi inokulan 750 ml) selama 3 bulan berikutnya kelihatannya menjamin suplai oksigen untuk bakteri. Dengan demikian, degradasi bahan organik tidak parsial dan tidak terjadi fermentasi yang menghasilkan asam.

Konsentrasi N total di kultur ini tidak dipengaruhi oleh suhu. Selain itu, waktu penyimpanan tidak banyak mengubah nilai N. Inokulan diproduksi pada kondisi dengan nitrogen sehingga Azotobacter tidak memfiksasi N (Abbass & Okon 1993). Di dalam inokulan, N berasal dari sisa HNO₃ di dalam media dan dari sel bakteri. Namun pada penelitian

ini, kepadatan sel sedikit menurun pada bulan pertama. Pada bulan selanjutnya konsentrasi N meningkat kembali dan relatif konstan memasuki bulan ke 3 dan 4 (Gambar 1b). Fenomena ini menunjukkan bahwa nutrisi di dalam media Vermani masih cukup untuk metabolisme bakteri.

Konsentrasi Ekspolisakarida dan Fitohormon inokulan cair. Selama pengamatan 4 bulan, suhu penyimpanan memberikan pengaruh yang variatif terhadap konsentrasi EPS dan fitohormon. Selama disimpan satu bulan, konsentrasi EPS terlihat menurun jika dibandingkan dengan sesaat setelah inokulan diproduksi. Sebelum disimpan inokulan mengandung 2.61 g l⁻¹ EPS. Namun



Gambar 1 Pengaruh suhu dan lama penyimpanan inokulan Azotobacter sp. LKM6 terhadap pH, N total, populasi bakteri, konsentrasi Ekspolisakarida, fitohormon sitokinin (CK) dan fitohormon giberelin (GA)
 Keterangan : Angka yang diikuti dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut Uji Beda Nyata Terkecil pada taraf 5% eksopolisakarida, fitohormon sitokinin (CK) dan fitohormon giberelin (GA)

penyimpanan sampai 3 bulan meningkatkan konsentrasi EPS tetapi pada bulan ke empat, konsentrasi EPS tidak berubah banyak (Gambar 1c). Fenomena yang menarik adalah pada inokulan yang disimpan di suhu kamar, konsentrasi EPS di bulan ke 2-4 lebih besar daripada di suhu 20°C.

Peningkatan konsentrasi EPS di dalam kultur cair dapat disebabkan oleh jumlah EPS yang diproduksi per satu satuan sel *Azotobacter* sp. LKM6 seperti yang telah dibuktikan oleh Hindersah (2008). Pada penelitian ini peningkatan suhu menginduksi pembentukan EPS.

Konsentrasi fitohormon dipengaruhi oleh lama penyimpanan (Gambar 1d dan 1f). Sebelum inkubasi, konsentrasi sitokinin dan giberelin adalah masing-masing 60,34 dan 20,07 mg l⁻¹. Secara umum, kandungan fitohormon di dalam inokulan menurun selama penyimpanan. Namun penurunan ini tidak terlalu banyak mengingat ada kemungkinan fitohormon didegradasi selama penyimpanan atau digunakan mikroba untuk proliferasi.

Pengaruh yang nyata terhadap fitohormon adalah suhu penyimpanan. Suhu kamar lebih menjaga konsentrasi fitohormon sitokinin tetapi tidak untuk giberelin. Di bulan pertama penyimpanan di suhu 20°C menurunkan konsentrasi sitokinin yang lebih besar dibandingkan dengan penurunan di inokulan yang disimpan di suhu kamar. Gambar 1e dan 1f terlihat bahwa konsentrasi sitokinin maupun giberelin di akhir inkubasi relatif konstan di dalam inokulan yang disimpan pada suhu kamar.

Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa penyimpanan pada suhu rendah berpotensi menurunkan kualitas inokulan cair *Azotobacter* yang dibuat untuk tujuan produksi EPS dan Fitohormon untuk bioremediasi yang disertai fitoremediasi tanah terkontaminasi logam berat. Dalam bioremediasi logam berat, EPS berperan dalam pembentukan kompleks EPS-logam berat yang memobilisasi logam berat sehingga dapat diserap oleh tanaman akumulator (Hindersah *et al.* 2007). Di lain pihak, fitohormon, terutama sitokinin, berperan penting dalam pembelahan dan pembesaran sel (Coenen & Lomax 1998). Keberadaan sitokinin di dalam inokulan memberikan asupan sitokinin untuk tanaman jika inokulan diberikan melalui perakaran. Fitohormon ini diharapkan meningkatkan pertumbuhan akar tanaman remediasi. Peningkatan biomassa akar akan meningkatkan zone eksplorasi akar sehingga akar menyerap lebih banyak logam berat dan mentransportasikannya ke tajuk.

Pengujian penyimpanan ini membuktikan bahwa inokulan ini tidak perlu disimpan di suhu rendah, cukup di

suhu ruang. Namun mungkin yang terpenting adalah bahwa pada penelitian ini, ruangan dan tempat penyimpanan inokulan *Azotobacter* sp. LKM6 tidak terpapar sinar matahari langsung.

SIMPULAN

Penyimpanan inokulan terbaik adalah pada suhu kamar daripada suhu 20°C karena lebih menjamin kestabilan pH, N total, konsentrasi eksopolisakarida dan fitohormon, selama empat bulan penyimpanan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami berterimakasih kepada Kepala Balai Pengawasan dan Sertifikasi Benih Tanaman Pangan dan Hortikultura Pemda Jawa Barat di Bandung untuk dapat menggunakan fasilitas sehingga penelitian ini dapat berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbass, Z. & Okon, Y.** 1993. Plant Growth Promotion by *Azotobacter paspali* in The Rhizosphere. *Soil Biol. Biochem* **8**: 1075-1083.
- Alloway, B.J.** 1995. Cadmium. Di dalam: Alloway, B.J (ed). *Heavy Metals in Soils*. Blackie Academic & Professional. Glasgow.
- Coenen, C. & Lomax, T.L.** 1998. The *Diageotropica* Gene Differentially Affects Auxin and Cytokinin Responses Throughout Development in Tomato. *Plant Physiol* **117**: 63-72.
- Chen, C-M.** 1987. Characterization of Cytokinins and Related Compounds by HPLC. Di dalam: Linskens, H.F. and J.F. Jackson (ed.). *High Performance Liquid Chromatography in Plant Sciences*. Springer-Verlag. Berlin.
- 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.
- Chen, W., Krage, N., Wu, L., Pan, G., Khosrivafard, M. & Chang, A.C.** 2008. Arsenic, cadmium, and lead in california cropland soils: role of phosphate and micronutrient fertilizers. *J. Environ. Qual* **37**: 689-95.
- 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.
- Hindersah, R, Arief, D.H., Sumarni, Y. & Totowarsa.** 2003. Produksi hormon sitokinin oleh *Azotobacter*. *Prosiding Kongres dan Seminar Nasional HITI*. Padang Juli 2003. 549-555.
- Hindersah, R.** 2008. Transportasi Kadmium Dari Tanah Ke Pupus Tanaman Selada (*Lactuca Sativa*) Oleh Eksopolisakarida *Azotobacter* Sp. *Disertasi*. Universitas Padjadjaran. Bandung.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Shaley, J.T. & William, S.T.** 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. William and Wilkins. Baltimore.
- Kurniawati, F., Hindersah, R. & Joy, B.** 2006. Pengaruh aplikasi kadmium (Cd), inokulan dan eksopolisakarida *Azotobacter* sp UT1 terhadap Cd tanah, dan akumulasi Cd pada tajuk bibit selada (*Lactuca sativa*) . *J. Pertanian Tropika*. **9**: 52-59.
- Van Reeuwijk, L.P.** 1992. *Procedure for Soil Analysis*. Fourth Edition. ISRIC. Wageningen. The Netherland.
- 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**: 379383.