

# Pertumbuhan dan komposisi eksopolisakarida bakteri pemfiksasi nitrogen *Azotobacter* spp. pada media yang mengandung kadmium

## Growth and Exopolysachharide composition of nitrogen fixing bacteria *Azotobacter* spp. in the presence of cadmium

REGINAWANTI HINDERSAH

Departemen Ilmu Tanah, Fakultas Pertanian, Universitas, Padjadjaran. Jl. Raya Bandung Sumedang Km. 21 Jatinangor, Sumedang 45363, Jawa Barat.  
Tel./Fax. +62-022-7796316, email: reginawanti@gmail.com.

Manuskrip diterima: 29 Mei 2015. Revisi disetujui: 13 Agustus 2015.

Hindersah R. 2015. *Pertumbuhan dan komposisi eksopolisakarida bakteri pemfiksasi nitrogen Azotobacter spp. pada media yang mengandung kadmium. Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1: 1644-1648.* Penggunaan pupuk fosfat yang intensif di lahan pertanian sayuran menyisakan kontaminan kadmium (Cd) karena secara alami batuan fosfat mengandung Cd dalam konsentrasi yang lebih tinggi daripada tanah. Produktivitas sayuran di tanah dengan ketersediaan P rendah mengandalkan pupuk fosfat sebagai sumber nutrisi tanaman sehingga tanah berpotensi terkontaminasi Cd. Saat ini pupuk hayati yang mulai digunakan pada pertanaman sayuran antara lain *Azotobacter* pemfiksasi dinitrogen (N<sub>2</sub>). Salah satu mekanisme *Azotobacter* untuk menghindari keracunan oleh Cd adalah melalui produksi eksopolisakarida (EPS). Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh informasi perbedaan pertumbuhan dan komposisi EPS beberapa isolat *Azotobacter* dengan keberadaan kadmium pada media cair. Tiga isolat *Azotobacter* penghasil EPS diisolasi dari rizosfer tanaman yang tumbuh di dataran tinggi Lembang dengan menggunakan media Ashby bebas nitrogen. Setiap isolat *Azotobacter* ditumbuhkan di dalam kultur cair dengan dan tanpa Cd pada suhu kamar selama 84 jam. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa pertumbuhan ketiga isolat *Azotobacter* dihambat oleh 1 mM dan 10 mM kadmium kloride. Namun pertumbuhan isolat LKM6 pada 0,1 mM kadmium kloride lebih baik dibandingkan kedua isolat lainnya. Pada 0,01 mM kadmium kloride, pertumbuhan ketiga isolat tidak terhambat. Eksopolisakarida yang dihasilkan oleh ketiga isolat mengandung polisakarida dan asam organik dengan konsentrasi yang berbeda untuk setiap isolat; keberadaan Cd di dalam kultur cair mengubah komposisi EPS. Hasil ini menjelaskan bahwa untuk lahan pertanian terkontaminasi ringan oleh Cd, penggunaan pupuk hayati *Azotobacter* resisten Cd dapat disarankan.

**Kata kunci:** *Azotobacter*, eksopolisakarida, kadmium, pupuk hayati

**Singkatan:** Cd: Cadmium; Dinitrogen (N<sub>2</sub>); EPS: Exopolysachharide

Hindersah R. 2015. *Growth and Exopolysachharide composition of nitrogen fixing bacteria Azotobacter spp. in the presence of cadmium. Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1: 1644-1648.* Intensive and long-term application of phosphate (P) fertilizer can increase Cd concentration in the soil since they contain higher level Cadmium (Cd) as impurity than that present in the soil. Vegetable production in soil contains low available P rely on P fertilizer so that Cd accumulate in the soil. Nowadays, nitrogen-fixing *Azotobacter* is already being used in vegetable production. In the presence of Cd, one of resistance mechanism of *Azotobacter* to avoid Cd toxicity is by exopolysaccharides (EPS) synthesis. The objective of this experiment was to study the difference of growth and EPS composition of some *Azotobacter* isolates in the presence of Cd in liquid media. Three EPS-producing *Azotobacter* has been isolated from the rhizosphere of vegetation grown in Lembang Highland by using nitrogen-free media. Each *Azotobacter* isolate was grown in media containing a particular concentration of Cd for 84 hours at room temperature. Results showed that growth of all *Azotobacter* isolates was inhibited by 1 mM and 10 mM Cadmium chloride. However, the growth of isolate LKM6 in the presence of 0.1 mM cadmium chloride was better than that of another isolate. In the presence of 0.01 mM cadmium chloride, the growth of all isolates was not inhibited. Exopolysaccharides produced by the three isolates contained polysaccharide and organic acid but the concentration differed; the presence of Cd in liquid culture change EPS composition. These results suggest that for slightly Cd-contaminated soil, using Cd-resistance biofertilizer *Azotobacter* might be recommended.

**Keywords:** *Azotobacter*, biofertilizer, cadmium, exopolysaccharides

### PENDAHULUAN

Secara alami tanah mengandung kadmium (Cd) dengan konsentrasi yang tergantung pada batuan induk, cara terbentuknya tanah, dan translokasi logam berat di tanah (Bradl 2005). Namun kegiatan antropogenik menyebabkan konsentrasi Cd meningkat. Kontaminasi Cd di lahan

pertanian, bersumber antara lain dari pupuk fosfat dan pupuk kandang (Bradl 2005; Grant 2011). Batuan fosfat mengandung Cd 0.15 to 507 mg kg<sup>-1</sup> (Mar dan Okazaki 2012), lebih besar daripada rata-rata Cd di tanah, dan menjadikannya sebagai sumber kontaminan Cd di tanah. Di tanah Cd adalah logam berat yang paling larut mudah dan dipertukarkan dibandingkan dengan Mo, Zn, Cd, Cu, Pb,

Ni, and Cr (Bradl 2005) sehingga Cd relatif lebih tersedia untuk tanaman. Kadmium dapat terakumulasi di jaringan tanaman, menghambat pembentukan akar lateral; dan akar utama menjadi coklat, kaku dan terpilin (Yadav 2010). Pada tanaman jagung (Popova et al. 2008), kacang-kacangan (Popova et al. 2008; Wahid et al. 2008) dan gandum (Moussa dan El-Gamal 2010). Paparan Cd dilaporkan pula menurunkan kandungan klorofil-a and klorofil-b, kecepatan fotosintesis (Chen et al. 2011; Xue et al. 2013; )

Kadmium adalah element toksik untuk mikroba tanah pemfiksasi N<sub>2</sub> simbiotik maupun nonsimbiotik. Paparan Cd dapat mempengaruhi pembentukan sistem symbiosis legum-Bradyrhizobium, nodulasi dan fiksasi nitrogen, dengan derajat hambatan tergantung konsentrasi Cd (Bianucci et al. 2013). Populasi rizobakteri pemfiksasi N<sub>2</sub> nonsimbiotik *Azotobacter* menurun pada tanah terpapar Cd daripada di tanah normal (Rathaur et al. 2012; Prasad et al. 2012). *Azotobacter* sudah dimanfaatkan sebagai pupuk hayati karena mampu memfiksasi nitrogen (Kizilkaya 2009) dan memproduksi fitohormon (Wani et al. 2013; Vikhe 2014). Bakteri ini mengembangkan mekanisme proteksi terhadap keracunan logam berat melalui biosorpsi oleh eksopolisakarida (Rasulov et al. 2013; Gauri et al. 2011). EPS berperan dalam imobilisasi logam berat karena langsung mengikat logam berat seperti Cd dan Cr di tanah terkontaminasi (Joshi dan Juwarkar 2009). Kapasitas ini membantu menghilangkan logam berat dari lingkungan dan dapat mempercepat pertumbuhan tanaman yang normal.

Sejalan dengan pertanian yang memperhatikan keamanan lingkungan dan pangan, antisipasi terhadap kemungkinan peningkatan Cd tanah akibat pemupukan atau kegiatan antropogeni sehingga diperlukan informasi ketahanan pupuk hayati terhadap logam berat Cd. Kajian kontaminasi Cd di lahan pertanian dataran tinggi belum banyak dilakukan. Potensi cemaran Cd terlihat di beberapa lokasi lahan pertanian di Cikole lembang, sudah mencapai 10 kali lipat dari lahan alami di sekitarnya (Sudirja dan Hindersah 2007).

Produksi EPS *Azotobacter* telah banyak diteliti (Emtiazi et al. 2004; Hindersah et al. 2006; Rasulov et al. 2013). Komposisi EPS *Azotobacter* masih perlu diteliti, lebih dari dua dekade yang lalu, Likhosherstov et al. (1991) memperlihatkan bahwa *Azotobacter beijerinckii* B-1615 terutama mengandung D-galaktosa, K-ramnosa dan asam piruvat serta asam manuronat dan guluronat penyusun alginat. Eksopolisakarida *Azotobacter* berupa alginat yang terdiri atas asam manuronat dan guluronat dengan komposisi dan viskositas yang berbeda dengan alginat komersial dari ganggang laut (Vargas-Garcia et al. 2003). Namun perubahan komposisi EPS yang disintesis *Azotobacter* di dalam kultur yang dikontaminasi Cd masih perlu diteliti. Resistensi sel *Azotobacter* dalam kondisi terpapar Cd akan memberikan informasi kelayakan penggunaan *Azotobacter* sebagai pupuk hayati pada tanah pertanian dengan kadar Cd meningkat. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh informasi perbedaan pertumbuhan dan komposisi EPS tiga isolat *Azotobacter* yang diisolasi dari tanah terkontaminasi ringan Cd dengan keberadaan kadmium pada media cair.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan biologis

Tiga isolat *Azotobacter*, yaitu isolat BS3, LKM6 dan LH15, yang diisolasi dari rizosfer tanaman di Desa Cikole Kecamatan Lembang, Kabupaten Bandung Barat, Jawa Barat. Bakteri diisolasi dengan metode pengayaan dan dilanjutkan dengan metode gores pada media Ashby bebas N (10 g manitol; 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,2 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,2 g NaCl; 0,1 g CaCO<sub>3</sub>; 10 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>). Biakan murni dipelihara pada media Ashby bebas N. Induksi produksi EPS dilakukan pada media Vermani (Hindersah et al. 2006). *Azotobacter* isolat BS3, LKM6 dan LH15 memfiksasi nitrogen dengan kapasitas reduksi asetilen 0,016, 0,014, dan 0,020 μmol jam<sup>-1</sup>.

### Penetapan pertumbuhan *Azotobacter* pada media cair dengan Cd

Ke dalam 10 mL media Vermani (10 g Sukrosa; 1,0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,0 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,5 g NaCl; 0,1 g CaCO<sub>3</sub>; 0,1 g NaNO<sub>3</sub>; 0,1 g FeSO<sub>4</sub>; 10 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>) di dalam tabung erlen meyer 50 mL) tanpa dan dengan 0,01; 0,1; 1 dan 10 mM CdCl<sub>2</sub>; ditambahkan 10 % biakan murni *Azotobacter* dengan kepadatan sel 10<sup>8</sup> cfu mL<sup>-1</sup>. Kultur diinkubasi pada suhu kamar (25-27°C) dengan pengocokan 115 rpm selama 84 jam. Pertumbuhan ketiga isolat ditentukan dengan mengukur kepadatan sel di dalam kultur cair setiap 12 jam dari setiap tabung berbeda dengan metode pengenceran plat pada media Vermani (Hindersah et al. 2006).

### Penentuan Komposisi EPS *Azotobacter*

Eksopolisakarida *Azotobacter* isolat BS3, LKM6 dan LH15 diekstraksi dari kultur cair Vermani umur 60 jam dengan metode ekstraksi menurut Vermani et al., (1997) yang dimodifikasi oleh Hindersah et al. (2006). Ke dalam 10 mL media Vermani (10 g Sukrosa; 1,0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,0 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,5 g NaCl; 0,1 g CaCO<sub>3</sub>; 0,1 g NaNO<sub>3</sub>; 0,1 g FeSO<sub>4</sub>; 10 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>) di dalam tabung erlen meyer 50 mL) tanpa dan dengan 0,1mM CdCl<sub>2</sub>; ditambahkan 10 % biakan murni *Azotobacter* dengan kepadatan sel 10<sup>8</sup> cfu mL<sup>-1</sup>.

Eksopolisakarida diekstraksi menurut metode Vermani et al. (1997) yang dimodifikasi oleh Hindersah et al. (2006). Kultur disentrifugasi 7.000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit, supernatan dikoleksi sedangkan endapan dibuang. Ke dalam 10 mL supernatan ditambahkan 20 mL aseton teknis dingin dan dibiarkan semalam pada suhu 4°C. Eksopolisakarida dikoleksi pada kertas saring Whatman no 1 setelah sentrifugasi 7.000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit. Bobot EPS ditentukan setelah kertas saring berisi EPS dikeringkan pada suhu 35°C.

Untuk menentukan konsentrasi dan jenis polisakarida, ke dalam tabung mikro berisi EPS basah ditambahkan 1 mL campuran etanol dan air (6: 4). Campuran diaduk selama 10 detik menggunakan pengaduk. Jenis dan konsentrasi polisakarida ditentukan dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi fasa terbalik menggunakan kolom C<sub>8</sub>. Penentuan konsentrasi dan jenis asam organik di dalam EPS dilakukan dengan menambahkan 1 mL campuran asetonitril dan air (6: 4) ke dalam tabung mikro berisi EPS.

Campuran diaduk selama 10 detik. Jenis dan konsentrasi asam organik ditentukan dengan KCKT fasa terbalik menggunakan kolom C<sub>8</sub>.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kepadatan sel *Azotobacter* spp.

Pertumbuhan ketiga isolat *Azotobacter* di dalam media cair Vermani dengan berbagai konsentrasi CdCl<sub>2</sub> terlihat pada Gambar 1. Secara umum, pertumbuhan sel bakteri dipengaruhi oleh konsentrasi CdCl<sub>2</sub> di dalam media. Peningkatan konsentrasi CdCl<sub>2</sub> menurunkan kemampuan sel bakteri untuk memperbanyak diri.

Dibandingkan dengan di dalam media tanpa CdCl<sub>2</sub> (kontrol), pertumbuhan ketiga isolat pada konsentrasi 1 dan 10 mM CdCl<sub>2</sub> tertekan. Bahkan kepadatan sel di dalam media terpapar 10 mM CdCl<sub>2</sub> di akhir inkubasi menurun sampai 10<sup>-5</sup> cfu mL<sup>-1</sup>. Pada konsentrasi 0,1 mM CdCl<sub>2</sub>, kepadatan sel isolat BS3 dan LH15 lebih rendah daripada LKM6. rKetiga isolat memperlihatkan resistensi terhadap 0,01 mM CdCl<sub>2</sub> yang diperlihatkan oleh hampir berimpitnya kurva pertumbuhan dengan kontrol.

Mikroorganisme sanggup mengembangkan mekanisme toleransi untuk bertahan hidup pada lingkungan yang mengandung logam berat (Martin-Laurent et al. 2004). *Azotobacter* A5 dan *Azotobacter* A9 yang diisolasi dari lahan terkontaminasi Ni-Cd memperlihatkan toleransi terhadap 25 mg L<sup>-1</sup> Cd (Rathaur et al. 2012). Pada percobaan ini, isolat BS3 dan LKM6 masing-masing diisolasi dari lahan berkadar Cd 4,73 mg kg<sup>-1</sup> dan 0,48 mg kg<sup>-1</sup>; sedangkan LH15 diisolasi dari lahan alami dengan Cd 0,117 mg kg<sup>-1</sup>. Dari penelitian ini terlihat bahwa isolat BS3 yang diambil dari lahan terpapar Cd relatif tinggi (4,75 mg kg<sup>-1</sup>) tidak kehilangan resistensinya terhadap paparan Cd secara *in vitro*. Di tanah, penurunan diversitas *Azotobacter* spp. baru terlihat pada konsentrasi Cd<sup>2+</sup> relatif tinggi yaitu 5 mg kg<sup>-1</sup> (Prasad et al. 2012).

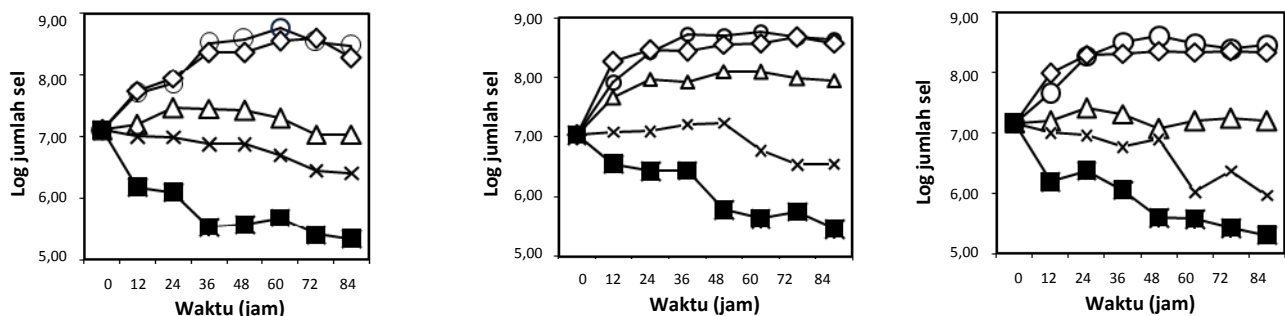
Setiap mikroba memiliki toleransi terhadap logam berat pada kisaran konsentrasi tertentu. Umumnya penelitian *in vitro* memperlihatkan efek negatif Cd terhadap pertumbuhan bakteri. Namun Stuczynski et al. (2003)

menjelaskan efek ganda Cd terhadap tanah, yaitu dapat membatasi atau menstimulasi aktivitas enzim tanah yaitu dehidrogenase, fosfatase asam dan alkalin, arilsulfatase, urease dan potensi nitrifikasi. Berdasarkan Gambar 1 dapat dijelaskan bahwa *Azotobacter* sp. isolat BS3, LKM6, dan LH15 relatif resisten terhadap konsentrasi 0,01-0,1 mM CdCl<sub>2</sub> di dalam kultur cair.

### Komposisi EPS *Azotobacter* spp.

Eksopolisakarida, secara alami bersifat masam, terutama terdiri atas polisakarida, asam uronat dan protein (Chen et al. 1995). Pada penelitian ini, telah berhasil diidentifikasi keberadaan sejumlah gula sederhana dan asam organik yang menyusun EPS *Azotobacter* (Tabel 1 dan Tabel 2). Eksopolisakarida yang dihasilkan oleh ketiga isolat mengandung polisakarida fruktosa, glukosa, manosa, ramnosa, galaktosa dan stakiosa (Tabel 7) dan asam organik berupa asam asetat, laktat, piruvat, manuronat, glukuronat dan galakturonat (Tabel 8) dengan konsentrasi yang berbeda.

Komposisi EPS *Azotobacter* pertama kali dijelaskan oleh Likhoshesterov et al. (1991) untuk EPS dari *Azotobacter beijerinckii* dan memperlihatkan bahwa polisakarida utama terdapat mengandung D-galaktose, L-ramnosa, and asam piruvat in the ratios of 2: 1: 1, sedangkan fraksi minornya mengandung asam manuronat dan asam and guluronat acids in the ratio 2,3: 1. Komponen tersebut terdapat pada EPS *Azotobacter* ketiga isolat yang diteliti (Tabel 1 dan Tabel. 2). Species *Pseudomonas* and *Azotobacter* adalah satu-satunya sumber prokariotik untuk alginat polisakarida ekstrasel (Auhim dan Odaa 2013). Keberadaan asam manuronat dan glukuronat di EPS *Azotobacter* isolat BS3, LKM6 maupun LH15 menunjukkan bahwa mungkin EPS ini mirip dengan alginat seperti dijelaskan oleh Vargas-Garcia et al (2003). Penelitian ini sesuai dengan penjelasan bahwa EPS yang disintesis oleh *Azotobacter* sp. adalah keluarga eksopolisakarida tidak bercabang yang terdiri atas are characterized by a sejumlah (1-4)-linked β-D asam manuronat dan and C5-epimer α-L-asam guluronat (Gauri et al. 2012).



**Gambar 1.** Kurva pertumbuhan *Azotobacter* isolat BS3 (a), LKM6 (b) dan LH15 (c) pada media Vermani tanpa dan dengan CdCl<sub>2</sub>. Catatan: Data berasal dari dua ulangan; -○-kontrol (tanpa CdCl<sub>2</sub>); -◇-0,01 mM CdCl<sub>2</sub>; -△-0,1 mM CdCl<sub>2</sub>; -x-1 mM CdCl<sub>2</sub>; -■-10 mM CdCl<sub>2</sub>.

**Tabel 1.** Komposisi polisakarida penyusun EPS yang dihasilkan isolat BS3, LKM6, dan LH15 dalam kultur cair tanpa dan dengan 0,1 mM CdCl<sub>2</sub> setelah diinkubasi 60 jam

Polisakarida (mg L <sup>-1</sup> )	Isolat BS3		Isolat LKM6		Isolat LH15	
	-CdCl <sub>2</sub>	+ CdCl <sub>2</sub>	-CdCl <sub>2</sub>	+ CdCl <sub>2</sub>	-CdCl <sub>2</sub>	+ CdCl <sub>2</sub>
Fruktosa	21,2	110,1	36,0	96,3	39,2	123,4
Glukosa	46,5	75,4	70,1	47,7	81,2	119,4
Manosa	18,4	5,5	21,8	30,5	29,6	56,3
Ramnosa	27,7	25,3	29,3	21,8	24,7	45,0
Galaktosa	11,2	12,3	10,6	10,5	2,1	14,6
Stakiosa	10,0	12,2	14,3	9,0	17,2	12,8

**Tabel 2.** Komposisi asam organik penyusun EPS yang dihasilkan isolat BS3, LKM6, dan LH15 dalam kultur cair tanpa dan dengan 0,1 mM CdCl<sub>2</sub> setelah diinkubasi 60 jam

Asam organik (mg L <sup>-1</sup> )	Isolat BS3		Isolat LKM6		Isolat LH15	
	-CdCl <sub>2</sub>	+ CdCl <sub>2</sub>	-CdCl <sub>2</sub>	+ CdCl <sub>2</sub>	-CdCl <sub>2</sub>	+ CdCl <sub>2</sub>
Asam asetat	1,0	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0
Asam laktat	26,1	1,5	27,2	0,0	29,1	0,0
Asam piruvat	39,1	10,4	40,5	3,5	49,4	14,0
Asam manuronat	40,0	22,5	19,5	16,0	39,4	25,5
Asam guluronat	15,8	25,4	11,4	15,0	20,9	31,0
Asam galakturonat	17,3	12,1	18,9	6,5	21,7	16,5

Keterangan: Data berasal dari dua ulangan

Penelitian ini menjelaskan terdapat perbedaan antara kuantitas polisakarida dan asam organik di dalam EPS *Azotobacter* sp. isolat BS3, LKM6 dan LH15 yang diproduksi di media tanpa dan dengan CdCl<sub>2</sub> (Tabel 1 dan Tabel 2). Konsentrasi masing-masing polisakarida berubah dengan penambahan CdCl<sub>2</sub> dengan pola perubahan yang tidak spesifik untuk setiap isolat. Konsentrasi fruktosa dan manosa meningkat setelah penambahan Cd, terutama pada isolat BS3. Pada isolat ini, penambahan 0,1 mM CdCl<sub>2</sub> meningkatkan fruktosa dan manosa sampai lima dan 2,4 kali. Dengan penambahan Cd, konsentrasi glukosa pada EPS yang dihasilkan oleh isolat BS3 dan LH15 meningkat, tetapi menurun pada isolat LKM6. Kadmium juga meningkatkan konsentrasi ramnosa dan galaktosa di EPS isolat LH15.

Konsentrasi asam asetat relatif kecil dan tidak terdeteksi pada kultur terpapar Cd. Untuk ketiga isolat, konsentrasi asam glukuronat meningkat sedangkan konsentrasi asam organik lainnya menurun pada media yang mengandung CdCl<sub>2</sub>. Secara umum penurunan konsentrasi asam laktat dan piruvat relatif lebih besar dibandingkan dengan penurunan konsentrasi asam manuronat, glukuronat dan galakturonat. Bahkan pada isolat LKM6 dan LH15, tidak terdapat asam piruvat pada EPS yang diproduksi di dalam media terpapar 0,1 mM CdCl<sub>2</sub>.

Pertumbuhan ketiga isolat *Azotobacter* dihambat oleh 1 dan 10 mM kadmium chloride. Namun populasi isolat LKM6 pada 0,1 dan 0,01 mM CdCl<sub>2</sub> lebih baik dibandingkan kedua isolat lainnya. Eksopolisakarida yang dihasilkan oleh ketiga isolat mengandung polisakarida dan asam organik dengan konsentrasi yang berbeda untuk setiap isolat; keberadaan Cd di dalam kultur cair mengubah komposisi EPS. Hasil ini menjelaskan bahwa untuk lahan pertanian terkontaminasi ringan oleh Cd, penggunaan pupuk hayati *Azotobacter* resisten Cd dapat disarankan.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis berterimakasih kepada Lalu Sukarno untuk bantuannya dalam menganalisis polisakarida dan asam organik dari EPS.

## DAFTAR PUSTAKA

- Auhim HS, Odaa NH. 2013. Optimization of flocculation conditions of exopolysaccharide bioflocculant from *Azotobacter chroococcum* and its potential for river water treatment. *J Microbiol Biotech Res* 3: 93-99.
- Bianucci E, Furlan A, Rivadeneira J, Sobrino-Plata J, Carpena-Ruiz RO, Tordable MDC. 2013. Influence of cadmium on the symbiotic interaction established between peanut (*Arachis hypogaea* L.) and sensitive or tolerant bradyrhizobial strains. *J Environ Manag* 130: 126-134.
- Bradl HB. 2005. Heavy Metal in The Environment. Elsevier Academic Press. Oxford.
- Chen JH, Czajka DR, Lion LW, Shuler ML, Ghiorse WC. 1995. Trace metal mobilization in soil by bacterial polymers. *Environ Health Perspect* 103: 53-58.
- Chen X, Wang J, Shi Y, Zhao MQ, Chi GY. 2011. Effects of cadmium on growth and photosynthetic activities in pakchoi and mustard. *Bot Stud* 52: 41-46.
- Emtiazi G, Ethemadifar Z, Habibi MH. 2004. Production of extracellular polymer in *Azotobacter* and biosorption of metal by exopolymer. *Afr J Biotech* 3: 330-333.
- Gauri SS, Archana S, Mondal KC, Pati BR, Mandal SM, Dey S. 2011. Removal of arsenic from aqueous solution using pottery granules coated with cyst of *Azotobacter* and portland cement: characterization, kinetics and modeling. *Bioresour Technol* 102: 6308-6312.
- Gauri SS, Mandal MS, Pati BR. 2012. Impact of *Azotobacter* exopolysaccharides on sustainable agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol*. DOI 10.1007/s00253-012-4159-0.
- Grant CA. 2011. Influence of phosphate fertilizer on cadmium in agricultural soils and crops. *Pedologist* (2011): 143-155.

- Hindersah R, Arief DH, Soemitro S, Gunarto L. 2006. Exopolysaccharide extraction from Rhizobacteria *Azotobacter* sp. Proc Intl Seminar IMTGT. Medan, Indonesia 22-23 Juni 2006.
- Joshi P, Juwarkar A. 2009. In vivo studies to elucidate the role of extracellular polymeric substances from *Azotobacter* in immobilization of heavy metals. Environ Sci Technol 43: 5884-5889.
- Kizilkaya R. 2009. Nitrogen fixation capacity of *Azotobacter* spp. strains isolated from soils in different ecosystems and relationship between them and the microbiological properties of soils. J Environ Biol 30: 73-82.
- Likhoshesterov LM, Senchenkov SN, Shashkov AS, Derevitskaya VA, Danilova IV, Botvinko IV. 1991. Structure of the major exopolysaccharide produced by *Azotobacter beijerinckii* B-1615. Carbohydr Res 222: 233-238.
- Mar SS, Okazaki M. 2012. Investigation of Cd contents in several phosphate rocks used for the production of fertilizer. Microchem J 104: 17-21.
- Martin-Laurent F, Ranjard L, Lopez-Gutierrez J, Philpott L. 2004. Estimation of atrazine degrading genetic potential and activity in three French agricultural soil. FEMS Microbiol Ecol 48: 425-435.
- Moussa H, El-Gamal S. 2010. Effect of salicylic acid pretreatment on cadmium toxicity in wheat. Biologia Plantarum 54: 315-320.
- Popova L, Maslenkova L, Yordanova R, Krantev A, Szalai G, Janda T. 2008. Salicylic acid protects photosynthesis against cadmium toxicity in pea plants. Gen Appl Pl Physiol 34: 133-144.
- Prasad D, Subrahmanyam G, Bolla K. 2012. Effect of cadmium on abundance and diversity of free living nitrogen fixing *Azotobacter* spp. J Environ Sci Technol 5: 184-191
- Rasulov BA, Yili A, Aisa HA. 2013. Biosorption of metal ions by exopolysaccharide produced by *Azotobacter chroococcum* XU1. J Environ Protect 4: 989-993.
- Sudirja R, Hindersah R. 2007. Konsentrasi kadmium di lahan pertanian tanaman sayuran di Lembang, Bandung. J Pengembangan Wilayah 3: 6-10.
- Vargas-Garcia MC, Lopez MJ, Elorrieta MA, Suarez F, Moreno J. 2003. Properties of polysaccharides produced by *Azotobacter vinelandii* cultured on 4-hydroxybenzoic acid. J Appl Microbiol 94: 389-395.
- Vikhe PS. 2014. *Azotobacter* species as a natural plant hormone synthesizer. Res J Recent Sci 3: 59-63.
- Wahid A, Ghani A, Javed F. 2008. Effect of cadmium on photosynthesis, nutrition and growth of mungbean. Agron Sustain Dev 28: 273-280.
- Wani SA, Chand S, Ali T. 2013. Potential use of *Azotobacter chroococcum* in crop production: An overview. Curr Agric Res 1: 35-38.
- Xue ZC, Gao HY, Zhang LT. 2013. Effects of cadmium on growth, photosynthetic rate and chlorophyll content in leaves of soybean seedlings. 57: 587-590.
- Yadav SK. 2010. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. S A J Bot 76: 167-179.