

4.2 Pembahasan .....	18
5. KESIMPULAN .....	20
5.1 Kesimpulan.....	20
5.2 Saran .....	20
DAFTAR PUSTAKA .....	21
LAMPIRAN A .....	24
LAMPIRAN B .....	25
LAMPIRAN C .....	30

## DAFTAR TABEL

1.	Kadungan nutrisi setiap bahan media IPB RI-1.....	4
2.	Komposisi Bahan untuk Membuat 1 Liter NB Himedia .....	8
3.	Komposisi Bahan untuk Membuat 1 Liter Media Labiota 1 .....	8
4.	Komposisi Bahan untuk Membuat 1 Liter Media Labiota 2 .....	8
5.	Komposisi Bahan untuk Membuat 1 Liter Media Labiota 3 .....	9
6.	Komposisi Bahan untuk Membuat 1 Liter Media IPB RI-1 .....	9
7.	Komposisi Bahan untuk Membuat 1 Liter Media IPB RI-2.....	9
8.	pH bakteri <i>Azotobacter</i> sp. pada setiap perlakuan media selama 17 hari penyimpanan	15
9.	pH bakteri <i>P. fluorescens</i> pada setiap perlakuan media selama 17 hari penyimpanan ..	15
10.	Biaya Bahan untuk Membuat 1 Liter Media Labiota 1 .....	16
11.	Biaya Bahan untuk Membuat 1 Liter Media Labiota 2 .....	16
12.	Biaya Bahan untuk Membuat 1 Liter Media Labiota 3 .....	17
13.	Biaya Bahan untuk Membuat 1 Liter Media IPB RI-1 .....	17
14.	Biaya Bahan untuk Membuat 1 Liter Media IPB RI-2.....	17
15.	Biaya Bahan untuk Membuat 1 Liter NB Himedia .....	18

## DAFTAR GAMBAR

1. Skema sistem pengenceran  $10^{-1}$  hingga  $10^{-8}$  ..... 12
2. Pertumbuhan populasi bakteri *Azotobacter* sp. pada media NB Himedia, IPB RI-1, IPB RI-2, Labiota 1, Labiota 2, dan Labiota 3 ..... 13
3. Pertumbuhan populasi bakteri *Pseudomonas fluorescens* pada media NB Himedia, IPB RI-1, IPB RI-2, Labiota 1, Labiota 2, dan Labiota 3 ..... 14

## DAFTAR LAMPIRAN

1. Tabel data kepadatan populasi bakteri *Azotobacter* sp. dan *Pseudomonas fluorescens*. 24
2. Daftar gambar pelaksanaan penelitian ..... 25
3. Daftar gambar pertumbuhan koloni ..... 30

# 1. PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Pupuk hayati (*biofertilizer*) adalah formulasi yang mengandung mikroba hidup atau sel hidup yang dapat berperan sebagai penyedia nutrisi yang dapat memacu pertumbuhan tanaman dan juga sebagai pengendali patogen tanaman, contoh bakteri yang biasa digunakan dalam pembuatan *biofertilizer* yaitu bakteri *Azotobacter* sp. dan *Pseudomonas fluorescens*. Salah satu contoh pupuk hayati yang mengandung bakteri *Azotobacter* sp. dan *Pseudomonas fluorescens* yaitu pupuk mikrobat. Mikrobat merupakan kombinasi pupuk hayati dan fungisida hayati yang diformulasikan dalam bentuk cair dan diproduksi melalui bioteknologi untuk mendukung kebutuhan pertanian organik. Mikrobat mengandung konsorsium bakteri yang terdiri dari bakteri *Azotobacter* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Lactobacillus* sp., *Paenibacillus polymixa*, dan *Streptomyces* sp. (Baharuddin et al., 2019).

Ada berbagai cara yang dapat dilakukan untuk memperbanyak atau memproduksi inokulum bakteri *Azotobacter* sp. dan *Pseudomonas fluorescens* salah satunya dengan menggunakan *Nutrient Broth*. Penggunaan *Nutrient Broth* sangat efektif sebagai media tumbuh mikroba. Namun, *Nutrient Broth* memiliki harga yang relatif mahal.

*Nutrient Broth* (NB) adalah salah satu media yang berbentuk cair yang biasanya digunakan untuk menumbuhkan suatu bakteri. *Nutrient Broth* disubstansikan dari sumber karbon dan nitrogen sehingga kesediaan nutrisi untuk pertumbuhan bakteri dapat terpenuhi. *Nutrient Broth* yang tersusun dari *beef extract* sebagai sumber karbon serta pepton yang digunakan sebagai sumber nitrogen (Wahyuningsih dan Zulaika, 2018).

Media pertumbuhan yang digunakan harus mengandung nutrisi sesuai kebutuhan mikroba. Nutrisi yang diperlukan oleh mikroba dapat berupa unsur makro dan unsur mikro. Media tumbuh umumnya terdiri dari unsur makro antara lain unsur karbon (C), hidrogen (H), oksigen (O), nitrogen (N), dan fosfor (P). Selain unsur makro, media harus mengandung unsur mikro seperti besi (Fe), dan magnesium (Mg) (Yusmaniar et al., 2017).

*Nutrient Broth* yang sering digunakan untuk menumbuhkan bakteri merupakan media instan. Mahalnya media instan menyebabkan kultur bakteri *Azotobacter* sp. dan *Pseudomonas fluorescens* tidak bisa diproduksi pada skala massal. Contoh media instan yang sering dimanfaatkan sebagai media tumbuh yaitu *Nutrient Broth* produksi Himedia.

Selama ini perbanyak inokulum bakteri *Azotobacter* sp. dan *Pseudomonas fluorescens* pada skala laboratorium menggunakan media cair sintetik dan membutuhkan biaya yang mahal pada perbanyak inokulum pada skala komersil. Oleh karena itu, penelitian ini diarahkan untuk mencari media alternatif yang bahan bakunya mudah didapatkan dan murah, sehingga efisien dalam sistem produksi.

Terdapat beberapa faktor yang menjadi bahan pertimbangan dilakukannya penelitian ini, salah satunya adalah biaya untuk membeli media instan sangat mahal dan juga melimpahnya sumber daya alam yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan dalam pembuatan media. Peneliti dapat menggunakan bahan yang ada di alam dalam pembuatan media dengan memperhatikan kandungan nutrisinya. Bahan yang digunakan untuk membuat media alternatif harus diperhatikan kandungan nutrisinya yang sesuai dengan kebutuhan bakteri seperti dari bahan-bahan yang mengandung karbohidrat dan protein (Anisah dan Rahayu, 2015).

Berdasarkan uraian di atas maka peneliti bermaksud untuk mengkaji berbagai macam media alternatif untuk pertumbuhan bakteri *Azotobacter* sp. dan *Pseudomonas fluorescens* dengan menggunakan bahan-bahan murah dan mudah didapatkan sebagai sumber protein dan karbohidrat yang dibutuhkan oleh bakteri.

## **1.2 Tujuan dan Manfaat**

Penelitian ini bertujuan untuk menemukan media tumbuh mikroba yang dapat mendukung pertumbuhan bakteri *Azotobacter* sp. dan *Pseudomonas fluorescens* dengan cepat jumlah koloni banyak, mudah untuk didapatkan dan harganya yang murah.

Manfaat dari penelitian ini yaitu sebagai bahan informasi bagi peneliti lainnya yang ingin menumbuhkan atau memperbanyak inokulum bakteri dengan menggunakan media alternatif yang dapat mendukung pertumbuhan mikroba dengan baik, dengan biaya yang murah, dan dapat dibuat dengan menggunakan bahan-bahan yang mudah didapatkan.

## **1.3 Hipotesis**

Salah satu media alternatif yang digunakan diduga dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri *Azotobacter* sp. dan *Pseudomonas fluorescens* dengan cepat, lebih baik, dan jumlah koloni yang banyak dibandingkan dengan media instan.

## **2. TINJAUAN PUSTAKA**

### **2.1 Media**

Media adalah bahan yang mengandung beberapa nutrisi yang dapat digunakan sebagai media tumbuh mikroba, seperti bakteri, cendawan, dan mikroba lain. Media yang baik harus memenuhi syarat seperti kelembaban yang baik, derajat keasaman yang sesuai, kandungan oksigen yang cukup, steril, dan nutrisi yang dibutuhkan oleh mikroba tersedia. Nutrisi yang dibutuhkan mikroba seperti unsur karbon, nitrogen, unsur nonlogam seperti sulfur dan fosfor, serta unsur logam yang terdiri dari kalsium, seng, natrium, kalium, tembaga, mangan, magnesium, dan unsur besi (Putra et al., 2019).

Nutrisi yang terkandung di dalam media digunakan oleh mikroorganisme untuk menyusun komponen-komponen selnya. Nutrisi yang dibutuhkan mikroba umumnya merupakan senyawa sederhana yang dihasilkan dari proses pemecahan atau sudah tersedia langsung. Oleh karena itu, harus memperhatikan nutrisi media yang digunakan untuk menumbuhkan mikroba dan lingkungan yang sesuai sehingga dapat tumbuh maksimal. Media tumbuh tersebut biasanya digunakan untuk mengisolasi mikroorganisme agar mendapatkan biaka murni, menghitung umlah koloni, dan menguji sifat fisik dan kimia bakteri. Jenis media ada yang berbentuk cair, padat, dan semi padat (Thawil, 2020).

Berdasarkan karakteristiknya media pertumbuhan mikroorganisme digolongkan menjadi 3 yaitu media umum, media selektif, dan media diperkaya. Media umum merupakan media tumbuh untuk semua mikroba. Media selektif yaitu media tumbuh untuk menyeleksi mikroba tertentu. Media diperkaya yaitu media tumbuh mikroba yang mengandung nutrisi tertentu sesuai dengan kebutuhan nutrisi yang ditumbuhkan (Toy dan Puspita, 2019).

#### **2.1.1 Media Alternatif**

Media alternatif merupakan media tumbuh mikroba yang menggunakan bahan-bahan yang berasal dari alam. Media alternatif dapat digunakan sebagai media tumbuh untuk bakteri dengan menggunakan bahan-bahan murah dan mudah untuk didapatkan. Selain itu, media alternatif yang dibuat harus mempertimbangkan nutrisi yang terkandung di dalamnya. Bahan-bahan media alternatif yang digunakan yaitu tepung kedelai, ikan teri, dedak padi, dan lain-lain. Media alternatif yang digunakan yaitu IPB RI-1, IPB RI-2, Labiota 1, Labiota 2, dan Labiota 3.

##### **2.1.1.1 Media IPB RI-1 dan IPB RI-2**

Media IPB RI-1 dan IPB RI-2 merupakan media alternatif yang dibuat dan diteliti oleh Gunawa pada tahun 2010 yang merupakan seorang mahasiswa Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Bahan yang digunakan dalam pembuatan media IPB RI-1 disajikan pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Kadungan nutrisi setiap bahan media IPB RI-1

<b>Bahan</b>	<b>Kandungan nutrisi</b>
<b>Pupuk urea</b>	Terdiri dari unsur nitrogen yang tinggi sekitar 45-46%.
<b>Pupuk SP-36</b>	Mengandung 36% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> larut, asam sinitrat 34%, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> larut dalam air 30%, kadar air 5%, asam bebas sebagai H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 6%. Selain itu, pupuk SP-36 mengandung fosfor yang dapat larut dalam air (Suratman dan Rosmawaty, 2022).
<b>Terasi</b>	Mengandung nutrisi seperti protein yang baik, mineral, serta asam lemak tak jenuh ganda (Pongsetkul et al., 2023).
<b>MSG</b>	Monosodium glutamat terdiri dari 78% glutamat, 12% natrium, dan 10% air (Pujiansyah et al., 2018).
<b>Ikan teri</b>	Mengandung protein 42 g/100 g, lemak 0,1 g, kalsium 500 mg, zat besi 110 mg, vitamin A 47 mg dan vitamin B1 0,1 mg (Novitasari et al., 2019).
<b>Dedak padi</b>	Dedak padi mengandung 50% karbohidrat, 20% lemak, 15% protein, dan 15% serat, terutama serat tidak larut (Sapwarobol et al., 2021).
<b>Gula merah</b>	Gula merah mengandung sukrosa 70-79%, glukosa dan fruktosa 35%. Selain itu, juga mengandung unsur Fe, Zn, dan Cu (Maryani et al., 2021).

Bahan utama dalam pembuatan media IPB RI-2 yaitu molase. Molase merupakan residu dari ekstraksi pembuatan gula yang berbentuk cair kental dan berwarna coklat. Molase disebut juga sebagai produk sampingan pada produksi gula. Komponen utama dari molase yaitu sukrosa 30-35%, fruktosa dan glukosa 10-25%, senyawa nongula 2-3%, mineral dan kadar air sekitar 45-55% dari total gula yang terfermentasi (Jamir et al., 2021).

### **2.1.1.2 Media Labiota 1, Labiota 2, dan Labiota 3**

Media labiota merupakan media alternatif yang dibuat di Laboratorium Bioteknologi Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin. Ketiga media ini mengandung bahan dengan sumber protein yang berbeda. Media labiota 1 mengandung ekstrak daging sapi sebagai sumber protein hewani dan tepung kedelai sebagai protein nabati. Media Labiota 2 menggunakan tepung keong sebagai sumber protein, sedangkan labiota 3 komposisi bahan sama dengan labiota 1, tetapi menggunakan tepung keong sebagai pengganti ekstrak daging sapi.

Daging sapi adalah produk ternak yang dapat digunakan sebagai media untuk pertumbuhan bakteri karena nutrisi yang dikandungnya. Daging sapi termasuk bahan dengan kandungan nutrisi yang cukup lengkap antara lain protein, karbohidrat, lemak, vitamin, dan mineral. Umumnya kandungan daging sapi sekitar 75% air, 18% protein, 3% lemak, 1,5% senyawa nitrogen bukan protein, serta vitamin dan mineral. Nutrisi tersebut diperlukan mikroorganisme untuk tumbuh dan memperbanyak diri (Tamal dan Aryanto, 2020).

Tepung kedelai merupakan salah satu produk dari kacang kedelai yang bisa digunakan sebagai salah satu bahan media karena mengandung protein yang tinggi. Kedelai mengandung protein sekitar 40-43%, lemak, dan vitamin (Nurhidayanti 2022). Jenis vitamin yang terkandung dalam kedelai seperti vitamin A, E, K, dan B, serta mineral seperti K, Fe, Zn, dan P. Kadar protein dalam produk kedelai sangat beragam, misalnya untuk tepung kedelai sendiri mengandung protein sekitar 50% (Danela et al., 2019).

Keong mas adalah salah satu jenis hewan yang sering terlihat di daerah persawahan. Keong mas memiliki manfaat yang banyak salah satunya dapat dimanfaatkan sebagai bahan media karena mengandung nutrisi yang tinggi. Keong mas mengandung asam lemak tak jenuh yang tinggi, misalnya asam oleat 20,37%, asam linoleat 20-26%, asam linoleat 12,85%, dan protein kasar sekitar 48,5%, serta proporsi asam amino esensial yaitu 39,7% (Sumiati et al., 2020). Selain itu, keong mas mengandung protein yang tinggi, baik daging maupun cangkangnya. Daging dan cangkang keong mas mengandung protein, lemak, karbohidrat, natrium, kalium, riboflavin, mangan, karbon, seng, dan kalsium. Keong mas juga mengandung berbagai jenis asam amino seperti histidin 2,8%, arginin 18,9%, leusin 10%, lysine 17,5%, phenilalamin 7,6%, threonin 8,8%, triptofan 1,2%, dan valin 8,7% (Madusari et al., 2021).

## **2.2 Bakteri**

Bakteri merupakan organisme yang berukuran sangat kecil yang tidak bisa dilihat secara langsung, tetapi harus menggunakan mikroskop. Bakteri termasuk kedalam kelompok prokariotik dan bersel tunggal (uniseluler). Berdasarkan klasifikasinya bakteri dibedakan menjadi 2 yaitu bakteri gram negatif dan bakteri gram positif. Karakter morfologi dari koloni bakteri yaitu berbentuk bulat, tidak beraturan, permukaan yang datar, cembung atau cekung, tepian koloni rata, bergerigi atau bergelombang, warna jenis bakteri berbeda-beda tergantung pada spesiesnya yaitu bening, putih, kuning, dan merah (Holderman et al., 2017).

Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri yaitu media, nutrisi, suhu, oksigen, pH, dan lingkungan sekitar. Nutrisi makanan untuk pertumbuhan bakteri harus mengandung unsur seperti karbon, nitrogen, asam amino, dan vitamin. Bakteri dapat terbagi menjadi 3 golongan berdasarkan kategori suhu yaitu bakteri psikofil, mesofil, dan termofil. Bakteri psikofil adalah bakteri yang dapat tumbuh dengan suhu sekitar 0°C-30°C dengan suhu optimum 15°C, bakteri mesofil yaitu bakteri yang tumbuh pada suhu sekitar 15°C-55°C dengan suhu optimum 25°C-45°C, dan bakteri termofil merupakan bakteri yang tumbuh pada suhu yang relatif tinggi sekitar 40°C-75°C dengan suhu optimum 50°C-65°C (Wardhani et al., 2020).

Pertumbuhan bakteri terdiri dari 4 fase yaitu fase lag (tidak terjadi replikasi), fase eksponensial (terjadi replikasi), fase stasioner (berhentinya replikasi), dan fase kematian (penurunan jumlah sel) (Bentrand, 2019). Fase lag adalah fase bakteri beradaptasi atau menyesuaikan diri pada kondisi lingkungan yang baru. Setiap bakteri memiliki kemampuan beradaptasi yang berbeda, karena dipengaruhi oleh faktor seperti media, jumlah inokulum awal, pH, dan Suhu. Fase eksponensial merupakan fase yang berlangsung dengan cepat dipengaruhi oleh suhu, pH, nutrisi di dalam media, dan sifat genetik bakteri. Pada fase ini bakteri melakukan pembelahan sel. Fase stasioner merupakan fase yang menunjukkan antara laju pertumbuhan dan kematian berada pada jumlah yang sama. Sedangkan fase kematian adalah fase dengan laju kematian lebih tinggi dibandingkan dengan laju pertumbuhan (Risna et al., 2022).

### **2.2.1 *Azotobacter* sp.**

*Azotobacter* sp. merupakan salah satu bakteri gram negatif nonsimbiotik yang hidup bebas di alam sebagai bakteri saprofit. *Azotobacter* sp. mampu memfiksasi nitrogen (N) bebas di udara rata-rata 20 kg N/ha/pertahun. Bakteri ini juga bersifat heterotrof menggunakan senyawa organik sebagai sumber energinya dan berkembang pada kondisi aerob (Lihiang, 2022).

Karakteristik bakteri *Azotobacter* sp. pertama kali yaitu *A. beijerinckii* pada tahun 1901. Penentuan karakteristik tersebut dilakukan dengan menggunakan analisis filogenetik melalui gen 16S rRNA yang telah berhasil menunjukkan bahwa genus dari *Azotobacter* terdiri dari 7 spesies yang ditemukan pada lahan kering ataupun lahan basah. Ketujuh spesies tersebut antara lain *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. paspali*, *A. armeniacus*, *A. nigricans*, dan *A. salinetrus* (Zhentao et al., 2019).

Koloni bakteri *Azotobacter* berdiameter 3-8 mm dengan permukaan yang datar, tidak beraturan atau *irregular*, bulat, berbentuk lonjong, bening, transparan, serta berkilau tanpa warna dan terdapat beberapa spesies yang mampu membentuk warna seperti warna putih buram, coklat, hitam kecoklatan, hitam, dan kuning kehijauan. Beberapa spesies dari *Azotobacter* yang dapat bergerak melalui flagella dan terdapat beberapa spesies yang tidak dapat bergerak. Karakteristik morfologi *Azotobacter* tergantung pada spesies bakteri dan komposisi dari media tumbuh yang digunakan (Hindersah et al., 2020).

*Azotobacter* sp. hidup dan berkembang di rizosfer dan filosfer tanaman. di dalam tanah, *Azotobacter* ditemukan pada kondisi sedikit asam, netral, atau sedikit basa dengan tingkat keasaman sekitar 4,8-8,5. Selain itu, bakteri ini dapat tumbuh pada tanah dengan pH antara 7,0-7,5. Namun, *A. vinelandii* dapat tumbuh pada pH antara 5-9 sehingga menunjukkan pertumbuhan maksimum *Azotobacter* yaitu pada pH 8. Suhu optimal pertumbuhan *Azotobacter* yaitu 30°C, tetapi dapat tumbuh pada suhu sekitar 25°C-40°C (Mukhtar et al., 2018).

*Azotobacter* sp. memiliki peranan penting bagi pertumbuhan tanaman dan perlindungan tanaman. Selain mampu memfiksasi nitrogen, bakteri ini mampu mempengaruhi pertumbuhan tanaman dengan menghasilkan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) seperti *Indole Acetic Acid* (IAA), sitokinin, dan giberelin. Selain itu, *Azotobacter* mampu menghasilkan siderofor dengan cara mengikat unsur  $Fe^{3+}$  yang tersedia di rizosfer menjadi tidak tersedia bagi fitopatogen. *Azotobacter* mampu melindungi tanaman dari serangan patogen dengan menghasilkan antifungi, misalnya dari cendawan *Fusarium oxysporum* (Sagar et al., 2022).

Berbagai penelitian juga telah menunjukkan bahwa bakteri *Azotobacter* termasuk kedalam kelompok bakteri *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR), dengan mekanisme langsung maupun tidak langsung. Mekanisme secara langsung yaitu bakteri *Azotobacter* bertindak sebagai pupuk hayati, biostimulan, dan mekanisme tidak langsung bertindak sebagai bioprotektan (Hindersah et al., 2020).

### **2.2.2 *Pseudomonas fluorescens***

*Pseudomonas fluorescens* adalah bakteri antagonis yang dapat dimanfaatkan sebagai agen pengendali hayati baik patogen cendawan maupun patogen bakteri. *P. fluorescens* merupakan bakteri yang mampu mengkolonisasi akar dengan menghasilkan senyawa asam salisilat dan fitoaleksin sehingga dapat menginduksi ketahanan tanaman (Nasrun dan Nurmansyah, 2016). Selain itu, *P. fluorescens* salah satu spesies bakteri yang mampu menghasilkan suatu *Volatile Organic Compounds* (VOC) yang dapat mempengaruhi pertumbuhan tanaman serta berperan dalam ketahanan tanaman (Basmal et al., 2019).

Karakteristik dari bakteri *P. fluorescens* koloni berbentuk bulat, batang, berukuran kecil, berwarna putih atau transparan, dan elevasi konveks. Selain itu, Zunairoh et al. (2019) menyatakan bahwa karakter makroskopis dan mikroskopis dari *P. fluorescens* yaitu memiliki koloni yang berwarna kuning, berbentuk bulat, sel berbentuk batang, dan bersifat gram negatif

(berwarna merah). *P. fluorescens* merupakan bakteri mesofilik, dengan suhu optimal untuk pertumbuhannya antara 25°C-32°C. Bakteri ini juga tergolong bakteri neutrofil artinya dapat tumbuh pada kisaran pH 4-8. Selain itu, *P. fluorescens* memiliki pH optimal untuk pertumbuhannya antara 7-8 (Soesanto et al., 2022).

*Pseudomonas fluorescens* termasuk kelompok *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) yang tumbuh di daerah rizosfer pada tanaman tertentu. Bakteri ini memiliki peranan penting sebagai pelarut fosfat, dapat merangsang pertumbuhan dan melindungi tanaman dari serangan patogen, serta dapat meningkatkan produksi panen. Selain itu, *P. fluorescens* dapat bertindak sebagai bioremediasi melalui bioakumulasi dan degradasi senyawa yang bersifat toksik bagi tanaman seperti unsur logam (Kahli et al., 2022).