



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGUKURAN LAJU FIKSASI NITROGEN STRAIN-STRAIN
Nostoc [Vaucher 1803] Bornet *et* Flahault 1886 DENGAN
METODE *Acetylene Reduction Assay* (ARA)**

SKRIPSI

**WIDIASTUTI
0606070390**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JANUARI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGUKURAN LAJU FIKSASI NITROGEN STRAIN-STRAIN
Nostoc [Vaucher 1803] Bornet *et* Flahault 1886 DENGAN
METODE *Acetylene Reduction Assay* (ARA)**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**WIDIASTUTI
0606070390**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JANUARI 2012**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Skripsi ini adalah hasil karya penulis sendiri,
dan semua sumber yang dikutip maupun dirujuk
telah penulis nyatakan dengan benar**

Nama : WIDIASTUTI

NPM : 0606070390

Tanda Tangan : 

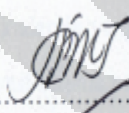
Tanggal : 12 Januari 2012

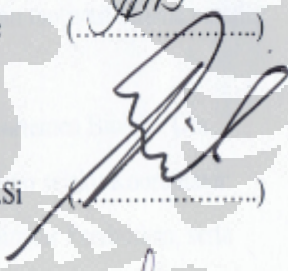
HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : WIDIASTUTI
NPM : 0606070390
Program Studi : Biologi
Judul Skripsi : Pengukuran Laju Fiksasi Nitrogen Strain-Strain
Nostoc [Vaucher 1803] Bornet et Flahault 1886
dengan Metode *Acetylene Reduction Assay* (ARA)

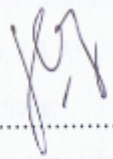
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dra. Dian Hendrayanti, M.Sc (.....)

Pembimbing II : Drs. Dondy A. Setyabudi, M.Si (.....)

Penguji I : Dra. Lestari Rahayu K, M.Sc (.....)

Penguji II : Dra. Nining B. Prihantini, M.Sc (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 12 Januari 2012

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah rabbil alamin, segala puji dan syukur Penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala nikmat dan karunia yang telah diberikan, sehingga Penulis mendapatkan kekuatan, kesabaran, dan pembelajaran dalam menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan dan bimbingan berbagai pihak. Oleh karena itu, Penulis mengucapkan terima kasih kepada:

- (1) Dian Hendrayanti, M.Sc dan Drs. Dondy A. Setyabudi, M.Si selaku Pembimbing 1 dan Pembimbing 2 yang telah dengan sabar membimbing, memberi saran, masukan, dan fasilitas selama penelitian hingga penulisan skripsi;
- (2) Dra. Nining B. Prihantini, M. Sc dan Dra. Lestari Rahayu K, M. Sc selaku Penguji 1 dan Penguji 2 yang telah memberi banyak saran dan pengalaman kepada Penulis;
- (3) Dr. rer. nat. Yasman, S. Si., M. Sc selaku Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan, saran, ilmu, perhatian dan motivasi selama penulis menjadi mahasiswa di Departemen Biologi;
- (4) Dr. rer. nat. Mufti Petala Patria selaku ketua Departemen Biologi, Dra. Setiorini, M. Kes dan Dr. Wibowo Mangunwardoyo selaku Koordinator Seminar, Dra. Titi Soedjiarti, S. U. selaku Koordinator Pendidikan, serta seluruh staf pengajar Departemen Biologi FMIPA UI yang telah mengajarkan banyak hal kepada Penulis selama masa perkuliahan; Tidak lupa kepada seluruh staf Departemen Biologi (Ahmad Supriyadi, S. Ip, Asri Martini, S. Si, Ir. Rusmalina, Ibu Ida, Pak Dedi, Pak Taryana, Pak Taryono, Pak Arif, Bu Siti, dan Mba Aam) yang telah memberikan bantuan bagi penulis;
- (5) Pak Yudi dari Balai Pasca Panen Pertanian, Cimanggu Bogor, yang telah membantu Penulis dalam pengambilan data;
- (6) Mama dan Bapak, dan Suami (Pupus Suryokoco) atas kesabaran dan dukungan yang luar biasa serta do'a yang tak pernah putus untuk Penulis;
- (7) ketiga adik Penulis (Wahyu, Novi, dan Jodi) yang telah memberi keceriaan dalam hari-hari Penulis;

- (8) sahabat-sahabatku di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan (Maulida, Anggi, Asma, Qumil), teman-teman kosan (Indah P.U, Adisty, Aulia, Sela, Nana, Mita, Siti), Penulis ucapkan terima kasih atas segala persahabatan, kasih sayang, semangat, perhatian, dan persaudaraan yang terjalin indah selama ini;
- (9) Kepada Pratiwi Yuliana, S.Si., Devri Ari Sinaga, S.Si., Raesti Wulan, S.Si., dan Wanda Anggi, S.Si atas bimbingan, semangat, dan pengetahuan yang diberikan kepada Penulis;
- (10) rekan-rekan Felix (terutama Vita, Vinda, Rika, Rani, Eka) dan teman-teman yang tidak dapat Penulis sebutkan satu persatu atas segala semangat juang dan perhatian kepada Penulis;

Penulis berharap Allah SWT berkenan membalas segala bentuk kebaikan dari semua pihak yang telah membantu. Kritik dan saran sangat Penulis harapkan, karena skripsi ini masih memiliki banyak kekurangan. Akhir kata, semoga skripsi ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Penulis

2011

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : WIDIASTUTI
NPM : 0606070390
Program Studi : S-1 Reguler
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah penulis yang berjudul :

Pengukuran Laju Fiksasi Nitrogen Strain-Strain *Nostoc* [Vaucher 1803] Bornet *et* Flahault 1886 dengan Metode *Acetylene Reduction Assay* (ARA)

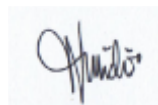
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir penulis tanpa meminta izin dari penulis selama tetap mencantumkan nama penulis sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini penulis buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 12 Januari 2012

Yang menyatakan



(Widiastuti)

ABSTRAK

Nama : Widiastuti
Program Studi : S-1 Biologi Reguler
Judul Skripsi : Pengukuran Laju Fiksasi Nitrogen Strain-Strain *Nostoc* [Vaucher 1803] Bornet *et* Flahault 1886 dengan Metode *Acetylene Reduction Assay* (ARA)

Telah dilakukan penelitian untuk mengetahui laju fiksasi nitrogen strain-strain *Nostoc* [Vaucher 1803] Bornet *et* Flahault 1886. Penelitian menggunakan 8 strain *Nostoc* koleksi Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Departemen Biologi, FMIPA UI. Penelitian menggunakan metode *Acetylene Reduction Assay* (ARA) dengan 2 ulangan untuk setiap strain *Nostoc*. Pengujian dilakukan pada strain yang telah berumur 21 hari. Biomassa berat basah strain *Nostoc* yang digunakan adalah 0,1 gram. Masing-masing strain diinkubasi selama 30, 60, dan 90 menit dengan menambahkan 1 ml gas asetilen. Hasil penelitian menunjukkan data yang bervariasi untuk masing-masing strain *Nostoc* pada masing-masing waktu inkubasi. Sebanyak 6 strain *Nostoc* menunjukkan nilai laju fiksasi nitrogen tertinggi pada waktu inkubasi 30 menit. Sebanyak 2 strain *Nostoc* menunjukkan nilai laju fiksasi nitrogen tertinggi pada waktu inkubasi 60 menit. Strain *Nostoc* BTM6-02 menunjukkan nilai laju fiksasi nitrogen yang paling tinggi yaitu 3892,5 μmol (dicapai pada inkubasi 60 menit). Strain *Nostoc* CPG24 menunjukkan nilai laju fiksasi nitrogen yang paling rendah, yaitu 292,44 μmol (dicapai pada inkubasi 90 menit).

Kata Kunci : ARA, asetilen, fiksasi nitrogen, *Nostoc*
xii + 68 halaman : 17 gambar, 6 tabel, 3 rumus, 21 lampiran
Bibliografi : 67 (1967--2010)

ABSTRACT

Name : Widiastuti
Program Study : S-1 Department of Biology - Regular
Title : Nitrogen Fixation Rate Measurement of *Nostoc* strains [Vaucher 1803] Bornet *et* Flahault 1886 with *Acetylene Reduction Assay* (ARA) method

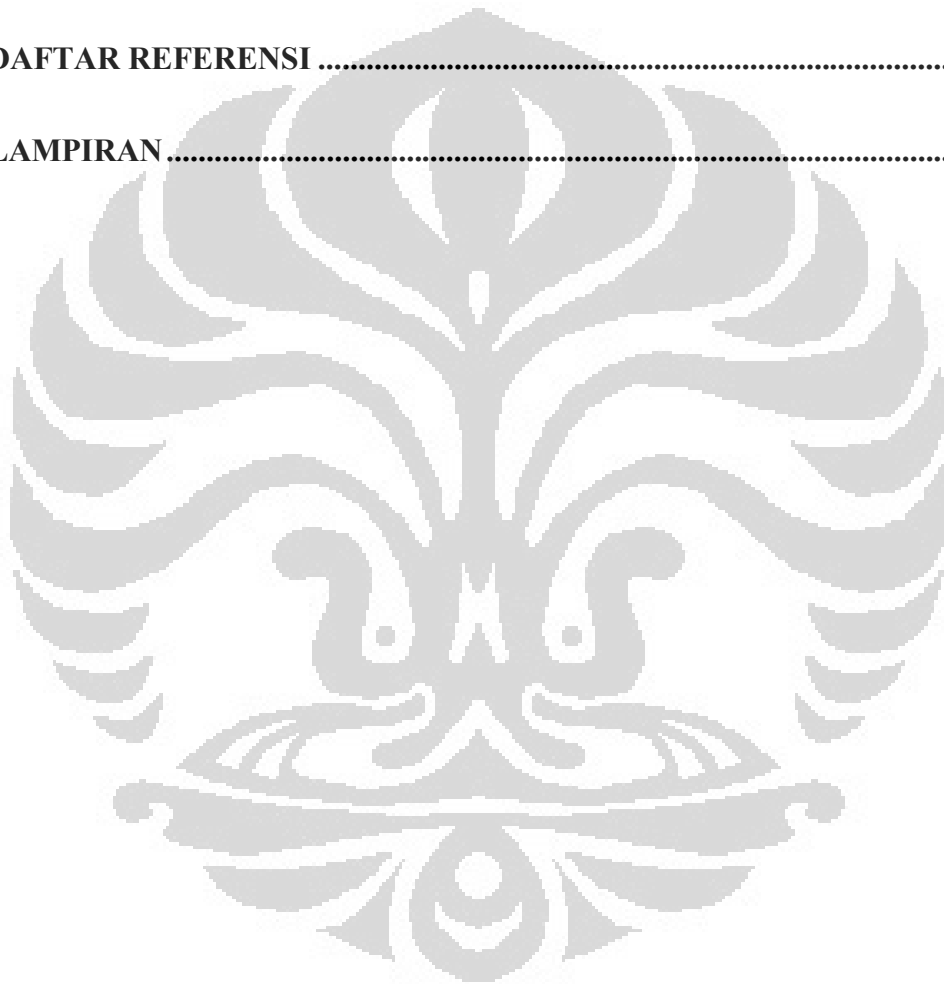
The research of nitrogen fixation rate of *Nostoc* [Vaucher 1803] Bornet *et* Flahault 1886 have been done. Eight strains of *Nostoc* from Plant Taxonomy Culture Collection, Department of Biology, Faculty of Mathematics & Natural Sciences, University of Indonesia, were used. The measurement of nitrogen fixation used *Acetylene Reduction Assay* (ARA) method with 2 samples for each strain. Experiments were conducted using strains at 21st day age. Wet weight of each strain was 0.1 gram. Then, each *Nostoc* strain was incubated with addition of 1 ml acetylene for 30, 60, and 90 minutes. The experiment result showed a different value for each *Nostoc* strain in every incubation times. Six *Nostoc* strains showed the highest value of nitrogen fixation after incubated for 30 minutes. Two *Nostoc* strains showed the highest value of nitrogen fixation after incubated for 60 minutes. Nitrogen fixation rate of BTM6-02 reached the highest value of 3892.5 μmol after incubated for 60 minutes. Nitrogen fixation rate of CPG24 was the lowest ones (292.44 μmol) after incubated for 90 minutes.

Key Words : ARA, acetylene, nitrogen fixation, *Nostoc*
xii + 68 pages : 17 pictures, 6 tables, 3 formulas, 21 appendixs
Bibliography : 67 (1967--2010)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS.....	vi
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
1. PENDAHULUAN.....	1
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 <i>Nostoc</i> sp.....	4
2.2 Fiksasi Nitrogen.....	8
2.3 Metode Pengukuran Laju Fiksasi Nitrogen.....	12
2.3.1 Analisis Kjeldahl.....	12
2.3.2 Analisis isotop ¹⁵ N ₂ dengan spektrofotometri.....	13
2.3.3 <i>Acetylene Reduction Assay</i> (ARA).....	13
2.4 Kromatografi Gas.....	15
3. METODOLOGI PENELITIAN.....	16
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	16
3.2 Alat dan Bahan.....	16
3.2.1 Alat.....	16
3.2.2 Bahan.....	17
3.2.2.1 Mikroorganisme.....	17
3.2.2.2 Bahan Kimia.....	17
3.2.2.3 Bahan Habis Pakai.....	17
3.3 Cara Kerja.....	17
3.3.1 Sterilisasi Alat.....	18
3.3.2 Pembuatan Medium Padat BG 11 Bebas Unsur Nitrogen....	18
3.3.3 Pemurnian Strain, Pembuatan <i>Stock</i> dan <i>Working Culture</i> ...	20
3.3.4 Pengamatan Makroskopis dan Mikroskopis.....	20
3.3.5 <i>Acetylene Reduction Assay</i>	22
3.3.5.1 Persiapan Alat.....	22
3.3.5.2 Persiapan Sampel.....	22
3.3.5.3 Pengambilan Udara Untuk Pengukuran Kadar Etilen.....	23
3.4 Penyusunan, Pengolahan, dan Analisis Data.....	24

4. HASIL DAN PEMBAHASAN	25
4.1 Hasil Pengamatan Morfologi Makroskopis dan Mikroskopis	25
4.2 Hasil Pengukuran Laju Reduksi Asetilen menjadi Etilen dengan Metode ARA	30
4.3 Konversi Hasil Laju Reduksi Asetilen menjadi Laju Fiksasi Nitrogen	36
5. KESIMPULAN DAN SARAN	41
5.1 Kesimpulan	41
5.2 Saran.....	41
DAFTAR REFERENSI	42
LAMPIRAN.....	48



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Sel Vegetatif, Sel Akinet, dan Sel Heterokis pada strain <i>Nostoc</i> CPG24	4
Gambar 2.2.	Struktur Selubung Sel Heterokis	5
Gambar 2.3.	Filamen <i>Nostoc linckia</i>	6
Gambar 2.4.	Reaksi Fiksasi Nitrogen	9
Gambar 2.5.	Reaksi Kimia Perubahan Molekul Amonium menjadi Glutamin ..	10
Gambar 2.6.	Reaksi Reduksi Asetilen Menjadi Etilen	13
Gambar 3.1.	Skema Kerja Pembuatan Medium BG 11 Padat Bebas Unsur Nitrogen	19
Gambar 3.2.	Skema Kerja Pembuatan <i>stock</i> dan <i>working culture</i>	21
Gambar 3.3.	Kromatografi gas Hitachi 263-50	22
Gambar 3.4.	Skema Kerja Persiapan Sampel	23
Gambar 3.5.	Skema Kerja Pengambilan Udara untuk Pengukuran Etilen	24
Gambar 4.1.	Morfologi Makroskopis strain <i>Nostoc</i> CIM7 dan BTM6-02	27
Gambar 4.2.	Morfologi Mikroskopis 8 strain <i>Nostoc</i> umur 21 hari dalam medium BG 11 padat bebas unsur nitrogen	29
Gambar 4.3.	Hasil ARA strain <i>Nostoc</i> CPG24, TAB7d, dan GIA13a	32
Gambar 4.4.	Hasil ARA strain <i>Nostoc</i> BAD5 dan CPG8	33
Gambar 4.5.	Hasil ARA strain <i>Nostoc</i> CIM7, BTM6-02, dan GIA12-02	33
Gambar 4.6.	Diagram Batang Persentase Penurunan Nilai ARA dari inkubasi 30 ke 90 menit dari 7 strain <i>Nostoc</i>	36

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1.	Komposisi Bahan Kimia Medium BG 11 Bebas Unsur Nitrogen	18
Tabel 4.1.	Hasil Pengamatan Morfologi Makroskopis 8 Strain <i>Nostoc</i> Umur 21 hari dalam Medium BG 11 Bebas Unsur Nitrogen pada Suhu 23° C	26
Tabel 4.2.	Hasil Pengamatan Morfologi Mikroskopis 8 Strain <i>Nostoc</i> Umur 21 hari dalam Medium BG 11 Bebas Unsur Nitrogen pada Suhu 23° C	28
Tabel 4.3.	Hasil Pengukuran Laju Reduksi Asetilen menjadi etilen dengan metode ARA	31
Tabel 4.4.	Persentase Penurunan Nilai Laju Reduksi Asetilen menjadi Etilen dengan Metode ARA	35
Tabel 4.5.	Laju Fiksasi Nitrogen Hasil Konversi	38

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Skema Kerja Penelitian	48
Lampiran 2.	Panduan Warna Castell-Polychromos No.9216	49
Lampiran 3.	Cara Pembacaan Kromatogram dan Hasil Rekapitulasi Kromatogram..	50
Lampiran 4.	Kromatogram Gas Etilen Sebagai Standar	51
Lampiran 5.	Kromatogram strain <i>Nostoc</i> TAB7d	52
Lampiran 6.	Kromatogram strain <i>Nostoc</i> TAB7d	53
Lampiran 7.	Kromatogram strain <i>Nostoc</i> GIA13a.....	54
Lampiran 8.	Kromatogram strain <i>Nostoc</i> GIA13a.....	55
Lampiran 9.	Kromatogram strain <i>Nostoc</i> GIA12-02	56
Lampiran 10.	Kromatogram strain <i>Nostoc</i> GIA12-02	57
Lampiran 11.	Kromatogram strain <i>Nostoc</i> BTM6-02	58
Lampiran 12.	Kromatogram strain <i>Nostoc</i> BTM6-02	59
Lampiran 13.	Kromatogram strain <i>Nostoc</i> CPG24.....	60
Lampiran 14.	Kromatogram strain <i>Nostoc</i> CPG24.....	61
Lampiran 15.	Kromatogram strain <i>Nostoc</i> CIM7	62
Lampiran 16.	Kromatogram strain <i>Nostoc</i> CIM7	63
Lampiran 17.	Kromatogram strain <i>Nostoc</i> CPG8.....	64
Lampiran 18.	Kromatogram strain <i>Nostoc</i> CPG8.....	65
Lampiran 19.	Kromatogram strain <i>Nostoc</i> BAD5	66
Lampiran 20.	Kromatogram strain <i>Nostoc</i> BAD5	67
Lampiran 21.	Contoh Perhitungan Nilai Laju Reduksi Asetilen menjadi Etilen	68

BAB 1 PENDAHULUAN

Cyanobacteria atau alga hijau biru (*blue green algae*) merupakan mikroorganisme prokariotik yang dapat ditemukan pada hampir semua jenis lingkungan (Boonkerd *dkk.* 2002: 673). Cyanobacteria memiliki kemampuan untuk tumbuh di habitat ekstrem dengan cahaya dan suhu tinggi, seperti gurun pasir, sumber air panas, dan lahan persawahan saat kondisi kering setelah panen (Adhikary & Pattanaik 2006: 434). Ekosistem lahan persawahan menyediakan lingkungan yang mendukung bagi pertumbuhan Cyanobacteria, baik dari segi cahaya, air, pH, suhu, hingga kebutuhan nutrisi. Hal tersebut menjadi salah satu alasan melimpahnya Cyanobacteria pada lahan persawahan dibandingkan pada dataran tinggi (Roger 1982: 99).

Peran penting Cyanobacteria dalam memenuhi kebutuhan nitrogen pada lahan persawahan telah lama diketahui. Penggunaan Cyanobacteria penambat nitrogen sebagai agen penyubur alami (*biofertilizer*) pada lahan persawahan kini makin sering dijumpai (Nilsson *dkk.* 2002: 517). Penelitian yang dilakukan di beberapa negara seperti Chili (Pereira *dkk.* 2009), Nepal (Gurung & Prasad 2005), Iran (Saadatinia & Riahi 2009), dan India (Banerjee *dkk.* 1997) menunjukkan bahwa penambahan Cyanobacteria dapat meningkatkan pertumbuhan dan hasil panen padi.

Potensi Cyanobacteria sebagai agen penyubur alami terutama didasarkan pada kemampuan fiksasi nitrogen (Prosperi 2006: 459). Selain itu, Cyanobacteria juga menghasilkan zat kimia yang berperan dalam meningkatkan pertumbuhan akar. Penelitian menunjukkan bahwa Cyanobacteria juga mengeluarkan polisakarida yang berperan meningkatkan perlekatan partikel tanah, menstimulasi pertumbuhan mikroorganisme tanah yang bermanfaat, meningkatkan kandungan air dalam tanah, serta meningkatkan kandungan zat organik pada tanah (Adhikary & Pattanaik 2006: 439).

Besarnya peranan Cyanobacteria dalam memenuhi kebutuhan nitrogen pada tanaman padi ditentukan oleh beberapa faktor, diantaranya laju fiksasi nitrogen per unit area, *turnover* (perubahan) dari nitrogen yang telah ditambah, dan

besarnya nitrogen yang dilepaskan serta dapat digunakan oleh tanaman (Whitton & Roger 1989: 2). Sebagai langkah awal untuk mengetahui laju fiksasi nitrogen per unit area, perlu diketahui terlebih dahulu laju fiksasi nitrogen dari tiap mikroorganisme yang ada di area tersebut.

Fiksasi nitrogen adalah suatu proses reduksi nitrogen (N_2) bebas di udara menjadi amonia (NH_3) oleh enzim nitrogenase. Proses fiksasi nitrogen menggunakan ATP (*Adenosine Tri Phosphate*) sebagai sumber energi (Lee 2008: 49). Fiksasi nitrogen merupakan salah satu proses metabolik yang memerlukan energi dalam jumlah besar karena membutuhkan 16 ATP untuk tiap molekul N_2 yang diikat (Fay 1992: 342). Cyanobacteria yang hidup bebas maupun membentuk simbiosis dengan paku air *Azolla*, kemudian akan menguraikan komponen nitrogen hasil penambatan tersebut (Prosperi 2006: 459).

Laju fiksasi nitrogen oleh organisme hidup dalam laboratorium dapat ditentukan dengan beberapa cara diantaranya analisis Kjeldahl, pengukuran ^{15}N dengan spektrofotometri, pengukuran isotop ^{13}N dengan radioaktif, dan ARA (*Acetylene Reduction Assay*). Dari beberapa metode di atas, analisis Kjeldahl adalah metode yang telah banyak digunakan dan dapat dipercaya. Meskipun demikian, metode tersebut kurang sensitif dan memerlukan banyak waktu (Hardy *dkk.* 1968: 1185). Metode pengukuran fiksasi nitrogen yang mudah dan telah banyak digunakan adalah metode ARA (*Acetylene Reduction Assay*). Metode ARA didasarkan pada fakta bahwa enzim nitrogenase juga mereduksi asetilen menjadi etilen (Seitzinger & Garber 1987: 65). Penggunaan metode ARA pada penelitian-penelitian terdahulu mengindikasikan bahwa metode tersebut merupakan salah satu metode pengukuran yang cepat dan sensitif (Roger & Kulasooriya 1980: 39).

Beberapa penelitian terdahulu menggunakan metode ARA menunjukkan adanya pengaruh waktu inkubasi terhadap laju reduksi asetilen menjadi etilen. Penelitian pada *Anabaena* dan *Nostoc* membuktikan waktu 30 menit secara umum cukup untuk menghasilkan sejumlah etilen yang kemudian dideteksi dengan kromatografi gas (Hellebust & Craigie 1978: 371). Penelitian lain pada *Anabaena cylindrica*, *Anabaenopsis circularis*, *Rhodospirillum rubrum*, dan *Azotobacter vinelandii* menunjukkan bahwa waktu inkubasi yang terlalu lama (2-6 jam)

menyebabkan peningkatan berlipat pada nilai ARA yang diperoleh. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa inkubasi dengan waktu yang terlalu lama dapat mengacaukan nilai ARA yang diperoleh dalam pengukuran (Roger & Kulasooriya 1980:40).

Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Departemen Biologi FMIPA UI, memiliki delapan strain *Nostoc* yang diisolasi dari beberapa lahan pertanian di wilayah Jawa Barat, Bali, dan Sulawesi Selatan. Strain *Nostoc* koleksi tersebut dapat dimanfaatkan sebagai agen penyubur alami (*biofertilizer*), sehingga penting untuk mengetahui terlebih dahulu laju fiksasi nitrogen dari tiap strain *Nostoc* yang dimiliki. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui laju fiksasi nitrogen 8 strain *Nostoc* koleksi tersebut.

Prapenelitian menggunakan strain *Nostoc* CPG24, BAD5, dan CPG8 dengan waktu inkubasi 30 dan 60 menit telah dilakukan. Nilai ARA yang didapat oleh 3 strain tersebut pada waktu inkubasi 30 menit masing-masing adalah 33,42; 122,39; dan 201 μmol . Adapun nilai ARA yang didapat pada inkubasi 60 menit cenderung menurun. Laju reduksi asetilen pada waktu inkubasi 60 menit untuk 3 strain *Nostoc* tersebut secara berurutan, yaitu 18,09; 95,70; dan 98,06 μmol .

Data prapenelitian tersebut secara umum membuktikan bahwa waktu inkubasi 30 dan 60 menit cukup untuk strain *Nostoc* yang diujikan. Data prapenelitian juga menunjukkan bahwa nilai laju reduksi asetilen pada waktu inkubasi 30 menit lebih tinggi dibandingkan inkubasi 60 menit. Penelitian akan dilakukan dengan menggunakan 3 waktu inkubasi, yaitu 30, 60, dan 90 menit. Penambahan waktu inkubasi bertujuan mengetahui apakah nilai laju fiksasi nitrogen pada waktu inkubasi 30 menit lebih tinggi dibandingkan nilai laju fiksasi nitrogen pada waktu inkubasi 60 dan 90 menit.

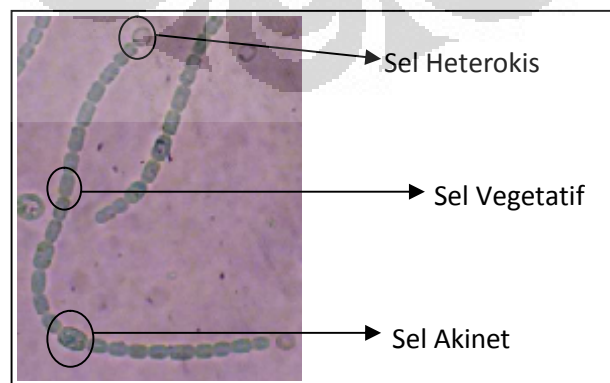
Penelitian bertujuan untuk mengetahui laju fiksasi nitrogen dari 8 strain *Nostoc* koleksi laboratorium Taksonomi Tumbuhan pada waktu inkubasi 30, 60, dan 90 menit. Hipotesis yang diajukan adalah laju fiksasi nitrogen untuk masing-masing strain *Nostoc* pada waktu inkubasi 30 menit lebih tinggi dibandingkan dengan waktu inkubasi 60 dan 90 menit.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Nostoc* sp.

Genus *Nostoc* merupakan Cyanobacteria penambat nitrogen yang termasuk ke dalam famili Nostocaceae dan ordo Nostocales (Dembitsky & Rezanka 2005: 363). Sel *Nostoc* berbentuk bulat atau oval yang berderetan sehingga membentuk filamen lurus tidak bercabang (Whitton 2000: 471). Satu filamen *Nostoc* terdiri atas satu trikom yang diselubungi oleh selaput gelatin. Warna selaput gelatin *Nostoc* bervariasi dari hijau, hijau biru, coklat, coklat kekuningan hingga hitam (Lund & Lund 1995: 237). Spesies *Nostoc* membentuk koloni dengan karakteristik bentuk, ukuran, bau, tekstur, dan warna yang bervariasi (Whitton 2000: 469).

Anggota dari Cyanobacteria ordo Nostocales, termasuk *Nostoc*, memiliki 3 tipe sel yang berbeda, yaitu sel vegetatif, sel akinet, dan sel heterokis (Kumar *dkk.* 2010: 1). Masing-masing sel tersebut memiliki karakteristik morfologi dan fungsi yang berbeda (Pandey & Trivedi 1977: 62). Sel akinet dicirikan dengan ukuran yang lebih besar dan memiliki dinding sel yang lebih tebal dibandingkan sel vegetatif. Sel akinet berperan melindungi sel *Nostoc* saat kondisi lingkungan kurang baik, seperti kekeringan atau suhu yang tidak sesuai untuk pertumbuhan (Vashishta 1999: 40).

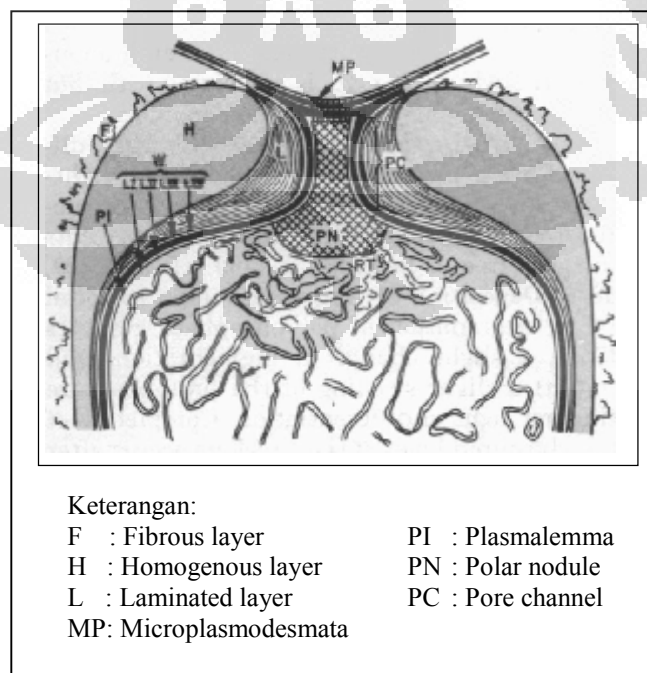


Gambar 2.1. Sel Vegetatif, Sel Akinet, dan Sel Heterokis pada strain *Nostoc* CPG24 [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Sel heterokis terbentuk sebagai respon sel terhadap kekurangan nitrogen di lingkungan (Dembitsky & Rezanka 2005: 363). Keberadaan sel heterokis dalam filamen merupakan penanda visual bahwa mikroorganisme tersebut memiliki kemampuan untuk melakukan fiksasi nitrogen (Stewart 1980: 591). Fungsi utama dari sel heterokis adalah mereduksi dinitrogen (N_2) bebas dari udara menjadi amonia (NH_3), biasa disebut dengan fiksasi nitrogen (Kumar 1985: 27).

Beberapa ciri pembeda antara sel heterokis dengan sel vegetatif yaitu sel heterokis berukuran lebih besar dibandingkan sel vegetatif. Sel vegetatif tidak memiliki selubung sel, sedangkan sel heterokis memiliki selubung sel yang terbentuk di luar dinding sel. Selubung sel heterokis berperan membatasi pemasukan oksigen, sehingga sel heterokis menyediakan lingkungan anaerob yang dibutuhkan oleh *Nostoc* dalam proses fiksasi nitrogen (Graham & Wilcox 2000: 118).

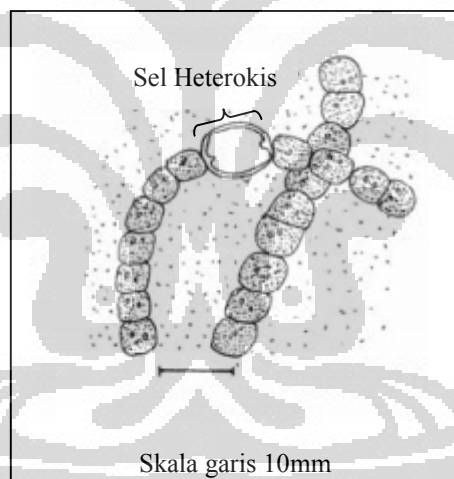
Selubung sel heterokis tersusun atas tiga lapisan, yaitu lapisan luar, lapisan tengah, dan lapisan dalam (Gambar 2.2). Lapisan luar sel heterokis adalah lapisan *fibrous* yang tersusun atas polisakarida (*heterocyst envelope polysaccharides/* Hep). Lapisan tengah adalah lapisan *homogenous*, terdiri atas oligosakarida dan polisakarida.



Gambar 2.2. Struktur Selubung Sel Heterokis
[Sumber: Wolk 1973: 71.]

Lapisan dalam adalah lapisan berlamina (*lamellated*) yang tersusun atas glikolipid dengan gula hidrofilik yang saling berikatan melalui ikatan glikosida. Interaksi antar ikatan hidrofobik menghasilkan lapisan lemak monolayer dengan permeabilitas yang rendah terhadap gas dan zat terlarut (Pandey & Trivedi 1977: 62--63; Maldener & Pastor 2010: 2). Lapisan glikolipid berfungsi sebagai barrier permeabilitas yang mencegah masuknya oksigen dan memungkinkan nitrogen untuk dapat masuk ke dalam sel. Adapun fungsi dari lapisan polisakarida adalah untuk mencegah degradasi dari lapisan glikolipid (Pandey & Trivedi 1977: 62--63).

Sel heterokis memiliki kandungan pigmen fikosianin dalam jumlah yang lebih sedikit dibandingkan dengan sel vegetatif (Kumar 1985: 28). Oleh karena itu, apabila diamati di bawah mikroskop cahaya, sel heterokis nampak kosong (Gambar 2.3) (Lee 2008: 47).



Gambar 2.3. Filamen *Nostoc linckia*
[Sumber: Modifikasi dari Lee 2008: 72.]

Sel heterokis memiliki polar nodul yang tidak dimiliki oleh sel vegetatif (Darley 1982: 64). Polar nodul berperan sebagai tempat pertukaran zat antara sel vegetatif dengan sel heterokis (Vashishta 1999: 39). Sel heterokis tidak menambat karbondioksida (CO_2) serta tidak menghasilkan oksigen (O_2). Sel heterokis kehilangan kemampuan untuk menghasilkan oksigen, karena tidak memiliki pigmen aksesori fotosistem II (Stewart 1980: 591). Oleh karena itu, sel heterokis bergantung pada masukan karbon hasil fotosintesis dari sel vegetatif

(Lee 2008: 47--49). Letak sel heterokis dalam filamen dapat berada di terminal/ujung (*Gloeotrichia*) atau interkalar/ditengah (*Nostoc*). Sel heterokis yang berada di terminal memiliki 1 polar nodul, sedangkan sel heterokis pada interkalar memiliki 2 polar nodul (Vashishta 1999: 20--21).

Spesies *Nostoc* ditemukan dalam kisaran habitat yang luas, baik darat maupun perairan (Whitton 2000: 466). Meskipun demikian, *Nostoc* lebih banyak ditemukan pada habitat darat, seperti tanah persawahan (Graham & Wilcox 2000: 128). Tanah persawahan di Indonesia merupakan salah satu habitat yang baik bagi pertumbuhan berbagai jenis mikroalga tanah, termasuk *Nostoc*. Akan tetapi penelitian tentang keragaman jenis dan pemanfaatan *Nostoc* di Indonesia belum banyak dilakukan (Simanungkalit *dkk.* 2006 :115).

Penelitian pada tanah persawahan di daerah Yogyakarta oleh Jutono (1973) menunjukkan bahwa kelimpahan anggota-anggota dari famili Nostocaceae (7 genus dan 12 spesies) dan Oscillatoriaceae (8 genus dan 18 spesies) umumnya lebih tinggi dibandingkan famili-famili lain (Simanungkalit *dkk.* 2006 :115). Penelitian De (1939: 136) menunjukkan bahwa keberadaan Cyanobacteria pada tanah persawahan memberi kontribusi penting dalam menjaga kesuburan tanah. Peran penting Cyanobacteria tersebut berkaitan langsung dengan kemampuan fiksasi nitrogen. Oleh karena itu, banyak penelitian dilakukan untuk mengetahui spesies Cyanobacteria yang memiliki kemampuan dalam proses fiksasi nitrogen (Whitton & Roger 1989: 1).

Sumber nitrogen untuk pertumbuhan *Nostoc* dapat diperoleh dalam bentuk ion nitrat (NO_3^-), nitrit (NO_2^-) atau amonium (NH_4^+) (Whitton 2000: 176). *Nostoc* akan lebih memilih menggunakan nitrogen dalam bentuk nitrat atau amonium dibandingkan nitrit, karena nitrit menimbulkan efek toksik pada konsentrasi tinggi (Morris 1974: 584). Apabila amonium tersedia di dalam medium, maka *Nostoc* tidak akan menggunakan sumber nitrogen dalam bentuk lain. Nitrogen anorganik akan diasimilasi melalui beberapa tahap bergantung pada sumber N yang digunakan. Nitrat akan direduksi menjadi nitrit dengan adanya enzim nitrat reduktase. Kemudian nitrit direduksi kembali menjadi amonium oleh enzim nitrit reduktase (Whitton 2000: 176). Adapun asimilasi amonium dilakukan terutama

melalui sistem enzim glutamin synthetase-glutamin synthase (GS_GOGAT) (Whitton 2000: 176).

Berbeda dengan mikroalga eukariotik, *Nostoc* memiliki kemampuan untuk menyimpan sejumlah nitrogen hasil penambatan. Nitrogen disimpan dalam komponen berupa cyanophycin dan phycocyanin. Cyanophycin merupakan kopolimer dari aspartat dan arginin dan memiliki fungsi tunggal, yaitu untuk menyimpan nitrogen. Sementara itu, phycocyanin merupakan komponen pigmen utama dari antena penangkap cahaya. Phycocyanin berperan sebagai cadangan nitrogen hanya saat sel berada dalam keadaan kekurangan nitrogen. Baik cyanophycin maupun phycocyanin berada dalam konsentrasi rendah saat sel *Nostoc* kekurangan nitrogen. Cyanophycin akan mengalami degradasi terlebih dahulu sebagai respon sel terhadap kekurangan nitrogen. Sel *Nostoc* selanjutnya akan mengalami perubahan warna akibat degradasi phycocyanin (Whitton 2000: 178).

2.2. FIKSASI NITROGEN

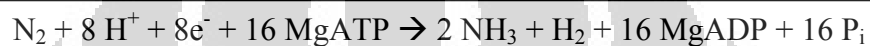
Nitrogen memiliki banyak bentuk kimia, baik organik maupun anorganik. Nitrogen organik berasosiasi dengan karbon, sedangkan nitrogen anorganik berasosiasi dengan elemen lain selain karbon. Beberapa nitrogen anorganik diantaranya, yaitu nitrat (NO_3^-), nitrit (NO_2^-), amonium (NH_4^+), dan amonia (NH_3) (Barsanti & Gualtieri 2006: 164).

Nitrogen dapat ditemukan dalam 4 lapisan berbeda di bumi, yaitu atmosfer, biosfer, hidrosfer, dan litosfer. Lapisan atmosfer mengandung $\pm 80\%$ nitrogen (N_2) (Hubbell & Kidder 2003: 1). Nitrogen (N_2) bebas di udara memiliki ikatan rangkap 3, sehingga molekul tersebut bersifat sangat stabil. Hanya sejumlah kecil (5--8%) nitrogen yang dapat ditambah secara alami oleh alam melalui temperatur dan tekanan tinggi saat terjadi petir (Barsanti & Gualtieri 2006: 164).

Pertumbuhan organisme bergantung pada ketersediaan nutrisi. Nitrogen merupakan salah satu nutrisi penting yang dibutuhkan dalam jumlah besar sebagai penyusun dari peptida, protein enzim, klorofil, molekul transfer-energi

(ATP, ADP), dan materi genetik (RNA, DNA) (Barsanti & Gualtieri 2006: 164). Nitrogen harus direduksi terlebih dahulu menjadi amonia agar dapat digunakan oleh organisme dalam proses metabolisme (Frank *dkk.* 2003: 157).

Fiksasi nitrogen (Gambar 2.4) merupakan suatu proses reduksi dinitrogen (N₂) menjadi amonia (NH₃) yang dikatalis oleh enzim nitrogenase. Fiksasi nitrogen hanya dapat dilakukan oleh organisme prokariot, karena enzim nitrogenase hanya dikode pada genome prokariot (Fay 1992: 342). Fiksasi nitrogen pada *Nostoc* terjadi pada sel khusus yang disebut heterokis (Kumar 1985: 27).



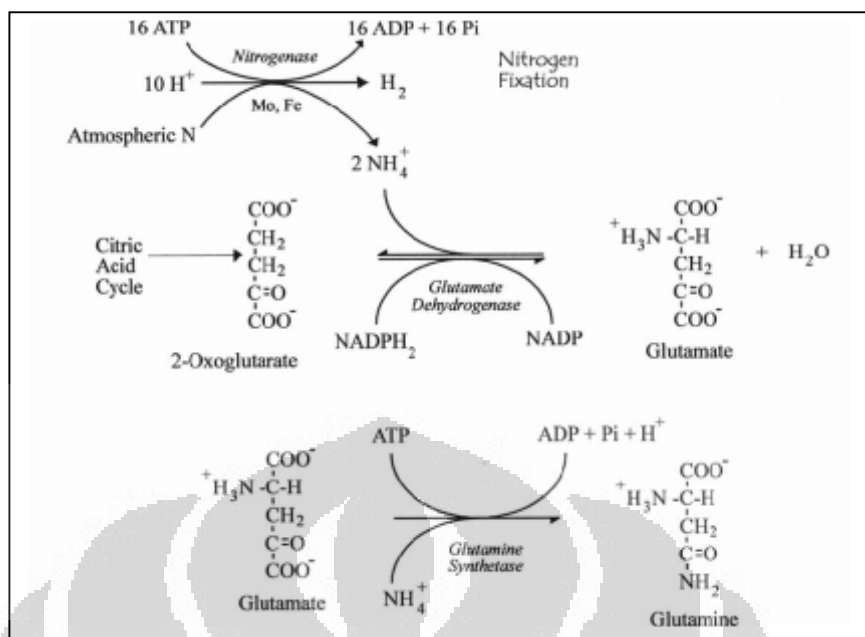
Gambar 2.4. Reaksi fiksasi nitrogen
[Sumber: Barney *dkk.* 2007: 6785.]

Amonia (NH₃) hasil fiksasi nitrogen akan bergabung dengan 2-oxoglutarat (hasil siklus Asam sitrat) dan membentuk glutamat. Proses perubahan tersebut dilakukan dengan bantuan enzim glutamate dehidrogenase. Penambahan amonium kedua pada glutamat akan menghasilkan glutamin. Molekul glutamin inilah yang kemudian ditransfer dari sel heterokis ke sel vegetatif yang berada di sebelah sel heterokis (Sah 2008: 32) (Gambar 2.5).

Cyanobacteria adalah mikroorganisme prokariot yang memperoleh energi melalui proses fotosintesis. Reaksi fotosintesis pada Cyanobacteria terjadi melalui fotosistem yang sama seperti pada tumbuhan tingkat tinggi.

Cyanobacteria merupakan satu-satunya mikroorganisme yang mampu melakukan fotosintesis (yang melibatkan oksigen) sekaligus fiksasi nitrogen (Thiel 2004: 73).

Fotosintesis meliputi proses yang terjadi pada 2 fotosistem berbeda, yaitu fotosistem I dan fotosistem II. Kedua fotosistem tersebut terhubung dalam suatu untaian dan berinteraksi melalui rantai transpor elektron (Fay 1992: 341). Sebagian besar Cyanobacteria memiliki kemampuan untuk melakukan fotosintesis pada kondisi aerob maupun anaerob. Ketika kondisi aerob, elektron yang dibutuhkan fotosistem I berasal dari fotosistem II. Ketika kondisi anaerob dengan keberadaan sulfur, maka elektron didapat dari reduksi sulfur (Lee 2008: 43--44).



Gambar 2.5. Reaksi Kimia Perubahan Molekul Amonium menjadi Glutamin
[Sumber: Lee 2008:49.]

Reaksi fotosintesis pada sebagian besar Cyanobacteria terinduksi oleh konsentrasi oksigen yang rendah. Fenomena tersebut menggambarkan adaptasi Cyanobacteria terhadap ketiadaan oksigen di atmosfer pada era Precambrian (Lee 2008: 44). Cyanobacteria diduga merupakan organisme fotosintetik pertama yang melibatkan oksigen dan berperan dalam mengubah atmosfer bumi dari keadaan tanpa oksigen menjadi kondisi atmosfer yang sekarang (Boonkerd *dkk.* 2002: 673).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa mungkin terdapat hubungan antara frekuensi sel heterokis dengan aktivitas enzim nitrogenase pada strain Cyanobacteria aerob (Stewart 1980: 591). Meskipun demikian, hubungan yang terbentuk sangat bervariasi tergantung pada keadaan metabolisme strain (Stewart 1980: 591).

Penelitian Moghadam & Nowruzi (2008: 147--151) pada strain *Nostoc ellipsosporum* dan *Nostoc muscorum* menunjukkan bahwa mungkin terdapat hubungan antara ukuran sel heterokis dengan laju fiksasi nitrogen. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *N. ellipsosporum* memiliki ukuran sel heterokis yang lebih besar dan laju fiksasi nitrogen yang lebih tinggi dibandingkan *N. muscorum*. Meskipun demikian, perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk

memastikan bahwa memang terdapat hubungan antara ukuran sel heterokis dalam filamen dengan laju fiksasi nitrogen (Moghadam & Nowruzi 2008: 150).

Fiksasi nitrogen bergantung pada fotosintesis dalam menyediakan ATP sebagai sumber energi dan komponen karbon sebagai donor elektron. Durasi dan laju fiksasi nitrogen bergantung pada kondisi yang memengaruhi keseimbangan karbon, seperti kelembapan, suhu, dan intensitas cahaya. Sel *Nostoc* aktif secara fisiologis hanya dalam keadaan lembap. Tingkat kelembapan yang diperlukan sel *Nostoc* dalam proses inisiasi dan optimalisasi fiksasi nitrogen bervariasi untuk setiap spesies dan habitat. Sebagian besar Cyanobacteria dapat melakukan fiksasi nitrogen pada suhu antara (-5)--30° C. Suhu optimum fiksasi nitrogen pada *Nostoc* adalah 28° C, sedangkan suhu minimum berkisar antara (-7,6)--0° C pada *Nostoc* yang hidup bebas maupun berasosiasi dengan lichen (Belnap 2001: 247)

Fiksasi nitrogen dikatalis oleh enzim nitrogenase yang terdapat di dalam sel heterokis. Enzim nitrogenase adalah kompleks enzim yang berfungsi mengkatalis reduksi dinitrogen bebas di udara menjadi amonia dalam proses fiksasi nitrogen (Barney *dkk.* 2007: 6784). Enzim nitrogenase mampu mengikat dan mereduksi substrat lain selain dinitrogen (N₂) bebas di udara, diantaranya asetilen (C₂H₂) (Hellebust & Craigie 1978: 364).

Enzim nitrogenase sangat sensitif terhadap oksigen. Enzim nitrogenase akan dengan cepat mengalami inaktivasi yang bersifat permanen ketika terpapar oleh oksigen. Penelitian terhadap semua mikroorganisme penambat nitrogen menunjukkan terdapat kesamaan karakteristik biokimia dan sifat sensitif enzim nitrogenase terhadap oksigen (Fay 1992: 341).

Nostoc tidak membentuk sel heterokis maupun enzim nitrogenase apabila ditumbuhkan pada medium dengan kandungan nitrogen (Stewart 1980: 591). Keberadaan sumber nitrogen, seperti amonium atau nitrat, akan menghambat diferensiasi sel heterokis (Kumar *dkk.* 2010: 5). Penelitian Kumar *dkk.* (2010: 2) pada *Anabaena* PCC 7120 yang ditumbuhkan pada medium yang mengandung amonium atau nitrat menunjukkan bahwa spesies tersebut tumbuh membentuk filamen panjang berupa ratusan sel vegetatif tanpa adanya sel heterokis. Apabila *Anabaena* ditumbuhkan pada medium tanpa nitrogen, akan terbentuk satu sel heterokis pada setiap 10--20 sel vegetatif sepanjang filamen.

Struktur enzim nitrogenase pada *Nostoc* sama dengan struktur enzim nitrogenase pada bakteri. Enzim nitrogenase tersusun atas 2 komponen, yaitu dinitrogenase reductase (protein besi) dan dinitrogenase (protein molybdenum-besi) yang dikode oleh operon *nif*HDK (Lee 2008: 49). Dinitrogenase reductase berbentuk dimer tersusun atas 2 subunit identik dengan gugus (4Fe-4S) tunggal dan memiliki berat molekul sebesar 64 kDa. Adapun dinitrogenase berbentuk tetramer dengan 2 pasang subunit yang berbeda, terdiri dari 4 gugus (4Fe-4S) dan 2 molekul kofaktor Mo-Fe (Frank *dkk.* 2003: 158). Mo-Fe kofaktor merupakan komponen penting dari dinitrogenase, tersusun atas 8 atom Fe dan 6 atom S per atom Mo. Berat molekul dari dinitrogenase adalah sebesar 245 kDa (Bohme 1998: 347).

2.3. Metode Pengukuran Laju Fiksasi Nitrogen

Pengukuran aktivitas enzim nitrogenase atau laju fiksasi nitrogen dapat dilakukan secara langsung maupun tidak langsung. Pengukuran langsung diantaranya dengan mengukur peningkatan kandungan nitrogen total dalam suatu sistem menggunakan analisis Kjeldahl dan dengan mengukur perubahan komposisi dari isotop nitrogen ($^{15}\text{N}_2$ atau $^{13}\text{N}_2$). Pengukuran laju fiksasi nitrogen secara tidak langsung adalah dengan metode *acetylene reduction assay* (ARA) (Hardy *dkk.* 1968: 1186).

2.3.1. Analisis Kjeldahl

Analisis kjeldahl merupakan salah satu teknik pengukuran laju fiksasi nitrogen yang pertama berkembang dan digunakan untuk menentukan kandungan total nitrogen dalam suatu sistem (Stewart 1980: 606). Pinsip dasar dalam analisis kjeldahl adalah mengukur kandungan amonium dalam sampel dengan distilasi alkalin (Venkataraman 1981: 13). Metode kjeldahl mulai ditinggalkan karena beberapa alasan. Beberapa kelemahan analisis kjeldahl diantaranya memerlukan banyak waktu dalam proses analisis dan memerlukan sampel dalam jumlah besar untuk menghasilkan data yang baik (George & Delfino 1982: 1324). Sebagai

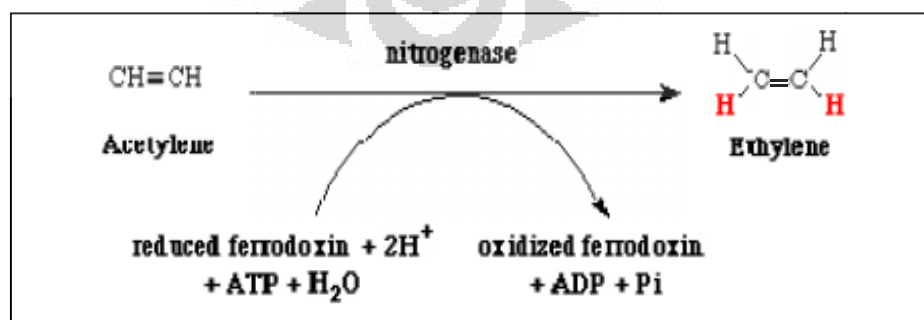
contoh, penelitian dengan 10 perlakuan membutuhkan 2.650 analisis kjeldahl untuk mendapatkan data yang akurat (Roger & Kulasoorya 1980: 38).

2.3.2. Analisis isotop $^{15}\text{N}_2$ dengan spektrofotometri

Analisis isotop $^{15}\text{N}_2$ dengan spektrofotometri dahulu telah banyak dilakukan untuk pengukuran laju fiksai nitrogen *in situ* karena lebih sensitif dibandingkan pengukuran nitrogen dengan analisis Kjeldahl (Hellebust & Craigie 1978: 366). Pengujian dengan isotop $^{15}\text{N}_2$ melibatkan 3 prosedur analisis, yaitu konversi isotop nitrogen dalam sampel menjadi amonium, konversi amonium menjadi nitrogen melalui oksidasi dengan penambahan alkaline sodium hypobromida, dan perhitungan komposisi isotop nitrogen dengan spektrometer (Venkataraman 1981: 13). Kerumitan proses analisis dan tingginya biaya menjadi salah satu kendala yang membatasi meluasnya penggunaan metode analisis isotop $^{15}\text{N}_2$ dengan spektrofotometri (Hardy *dkk.* 1968: 1186).

2.3.3. *Acetylene Reduction Assay* (ARA)

Pengukuran dengan reduksi asetilen didasarkan pada kemampuan enzim nitrogenase untuk mereduksi beberapa komponen dengan ikatan rangkap 3 selain dinitrogen, yaitu asetilen (Reporter 1985: 159). Gas etilen yang terbentuk sebagai hasil reduksi asetilen dapat dideteksi dengan kromatografi gas. Pembentukan gas etilen dari asetilen merupakan suatu proses yang bersifat spesifik, karena tidak ada sistem biologi lain yang melakukan reaksi tersebut (Gambar 2.6) (Postgate 1982: 41).



Gambar 2.6. Reaksi Reduksi Asetilen Menjadi Etilen
[Sumber: Feng 2005: 1.]

Prinsip dari metode ARA adalah memisahkan gas etilen dengan kromatografi, kemudian mengukur konsentrasi gas etilen tersebut dengan ionisasi api hidrogen (Hellebust & Craigie 1978: 369). Gas asetilen dan etilen dapat menembus membran sel heterokis, sehingga aktivitas enzim nitrogenase dapat diukur secara *in vivo* maupun *in vitro* dengan metode ARA (Halbleib & Ludden 2000: 1081). Metode ARA dipilih karena telah banyak digunakan dalam penelitian-penelitian terdahulu serta merupakan prosedur pengujian yang relatif lebih mudah dan murah dibandingkan analisis dengan spektrofotometri (Marschener 1995: 204).

Penelitian Hellebust & Craigie (1978: 371) pada sampel Cyanobacteria membuktikan bahwa waktu inkubasi 30 menit secara umum cukup untuk pengujian dengan metode ARA. Sebagai contoh, spesies *Anabaena* dan *Nostoc* dapat menghasilkan 0,5--5 nmol C₂H₄ min⁻¹ mg⁻¹ protein atau 15--150 nmol C₂H₄ per botol uji dalam 30 menit. Penelitian Matsuguchi *dkk.* (1977: 333) menyimpulkan bahwa waktu inkubasi yang lebih pendek menghasilkan data yang lebih baik, karena waktu inkubasi yang terlalu lama (lebih dari 3 jam) dapat memengaruhi pertumbuhan bakteri penambat nitrogen. Selain itu, etilen yang dihasilkan dapat terurai kembali jika inkubasi dilakukan terlalu lama.

Waktu inkubasi dihitung setelah penambahan 1 ml (10%) gas asetilen pada tabung reaksi 10 ml (tabung inkubasi) (Prosperi 2006: 463). Penggunaan 10% asetilen untuk inkubasi telah banyak digunakan dalam penelitian ARA terdahulu, diantaranya penelitian Pereira *dkk.* (2009: 138) pada Cyanobacteria dan Hardy *dkk.* (1968) pada bakteri *Azotobacter* dan *Clostridium*.

Secara teori, reduksi 3 mol asetilen menjadi etilen setara dengan transfer 1 mol nitrogen menjadi ammonia. Rasio 3:1 telah secara luas digunakan untuk mengartikan kecepatan reduksi asetilen dalam suatu area atau volume berdasarkan kecepatan fiksasi nitrogen (Reporter 1985: 161; Seitzinger & Garber 1987: 66). Faktor konversi sebesar 3 didasarkan pada fakta bahwa reaksi reduksi asetilen menjadi etilen membutuhkan 2 elektron, sedangkan reduksi nitrogen menjadi amonia membutuhkan 6 elektron (Jensen & Cox 1983: 1331).

2.4. Kromatografi Gas

Kromatografi adalah salah satu metode yang dapat digunakan untuk memisahkan dan menganalisis komponen dalam suatu campuran. Berdasarkan jenis fase diam yang digunakan, kromatografi gas terbagi menjadi 2, yaitu kromatografi gas padat dan kromatografi gas cair (Mc Nair & Bonelli 1968: 1--2). Prinsip kerja kromatografi gas didasarkan pada perbedaan daya tarik atau interaksi antara zat yang ada di dalam komponen dengan fase bergerak dan fase diam yang digunakan dalam sistem kromatografi (Mc Nair & Miller 1998: 3).

Perbedaan interaksi tersebut menyebabkan perbedaan laju untuk masing-masing zat. Laju didefinisikan sebagai waktu yang dibutuhkan bagi sejumlah materi untuk melewati jarak tertentu (Parker 1997: 158). Masing-masing zat yang telah terpisah akan mencapai bagian akhir kolom kromatografi pada waktu yang berbeda. Waktu retensi (*retention time*) didefinisikan sebagai banyaknya waktu yang dibutuhkan oleh suatu komponen untuk melewati kolom. Waktu retensi untuk zat tertentu yang belum diketahui jenisnya diukur dengan cara membandingkan kromatogram sampel dengan kromatogram standar berupa zat yang telah diketahui (Wade 1997: 2).

Zat yang telah terpisah akan menghasilkan sinyal-sinyal elektrik tertentu untuk kemudian ditangkap oleh detektor (Wade 1997: 2). Laju dan konsentrasi masing-masing zat yang terekam oleh detektor akan dicetak dalam bentuk kromatogram. Kromatogram adalah rekaman tertulis yang diperoleh dari analisis kromatografi. Kromatogram menggambarkan suatu kurva hubungan antara waktu retensi dengan konsentrasi masing-masing zat yang telah terpisah (Mc Nair & Bonelli 1968: 3).

BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan dan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian. Perbanyakan biomassa, pengamatan makroskopis dan mikroskopis dari 8 strain *Nostoc* dilakukan di ruang kultur Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Departemen Biologi, FMIPA UI, Depok. Pengukuran laju fiksasi nitrogen dengan metode ARA (*Acetylene Reduction Assay*) dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian, Cimanggu, Bogor. Penelitian dilakukan selama 6 bulan, mulai dari bulan Juni hingga November 2010.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Peralatan yang digunakan selama penelitian terdiri atas peralatan gelas dan peralatan nongelas. Alat-alat gelas yang digunakan adalah labu erlenmeyer volume 500 ml dan 1000 ml [Schott Duran], cawan petri [Iwaki], tabung reaksi 10 ml [Iwaki], gelas ukur, corong, pipet pasteur, pipet volumetrik, gelas objek, dan kaca penutup. Peralatan nongelas yang digunakan dalam penelitian yaitu *magnetic stirrer*, spatula, timbangan analitik [Precisa], autoklaf [Hirayama HA 240 MIV], oven [Heraeus Instruments], spatula, transfer box, jarum tanam tajam, jarum tanam bulat, baki [Lion Star], mikroskop [Nicon & Olympus], termometer [Corona], hygrometer [Corona], luxmeter, *gas chromatography* [Hitachi 263-50], kromatopak [Shimadzu C-R6A], *syringe* 5 ml [Terumo], sumbat karet [Venoject Tube Terumo Europe NV], tas es (*ice bag*) [Wall's], kamera [Sony & Fuji Film], buku catatan, spidol [Snowman], marker, dan jas laboratorium.

3.2.2. Bahan

3.2.2.1. Mikroorganisme

Strain *Nostoc* yang digunakan pada penelitian merupakan koleksi kultur alga Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Departemen Biologi FMIPA UI, Depok. Strain-strain *Nostoc* tersebut berasal dari beberapa tanah persawahan daerah di Indonesia, yaitu BAD5, CIM7, CPG8, dan CPG24 dari Jawa Barat, TAB7, GIA12-02, GIA13a dari Bali, dan BTM6-02 dari Sulawesi Selatan.

3.2.2.2. Bahan Kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan untuk membuat medium BG11 padat bebas unsur nitrogen 2% adalah $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, asam sitrat, ferric ammonium sitrat, EDTA, Na_2CO_3 , H_3BO_3 , $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (Tabel 3.1). Bahan kimia lain yang menunjang penelitian diantaranya agar, akuades, alkohol 70%, larutan NaOH 1 M, gas asetilen (*pure grade*), gas etilen 80 ppm, dan pembakar spiritus.

3.2.2.3. Bahan Habis Pakai

Bahan habis pakai yang diperlukan dalam penelitian adalah *aluminium foil* [Klin Park], label tempel [Tom & Jerry], korek api, parafilm [Novix II], kertas indikator pH dengan skala 5,2--7,2 [Merck], tisu, plastik buah, dan es batu.

3.3. Cara Kerja

Skema kerja penelitian dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.3.1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Seluruh peralatan gelas yang digunakan dalam penelitian dicuci, dikeringkan dan dibungkus dengan kertas pembungkus. Khusus untuk pipet pasteur dan pipet volumetrik, bagian pangkal ditutup dengan kapas terlebih dahulu sebelum dibungkus. Adapun untuk labu erlenmeyer dan gelas ukur, bagian mulut dibungkus dengan kertas *aluminium foil* lalu dibungkus dengan kertas pembungkus. Sterilisasi kering dilakukan dengan menggunakan oven pada suhu 110° C selama 2 jam.

3.3.2. Pembuatan Medium Padat BG 11 Bebas Unsur Nitrogen

Pembuatan 1 liter medium padat BG 11 bebas unsur nitrogen dilakukan dengan cara memasukkan sejumlah zat kimia yang telah ditimbang (Tabel 3.1) ke dalam sejumlah aquades saring sambil diaduk agar homogen (Kim & Lee 2005: 241).

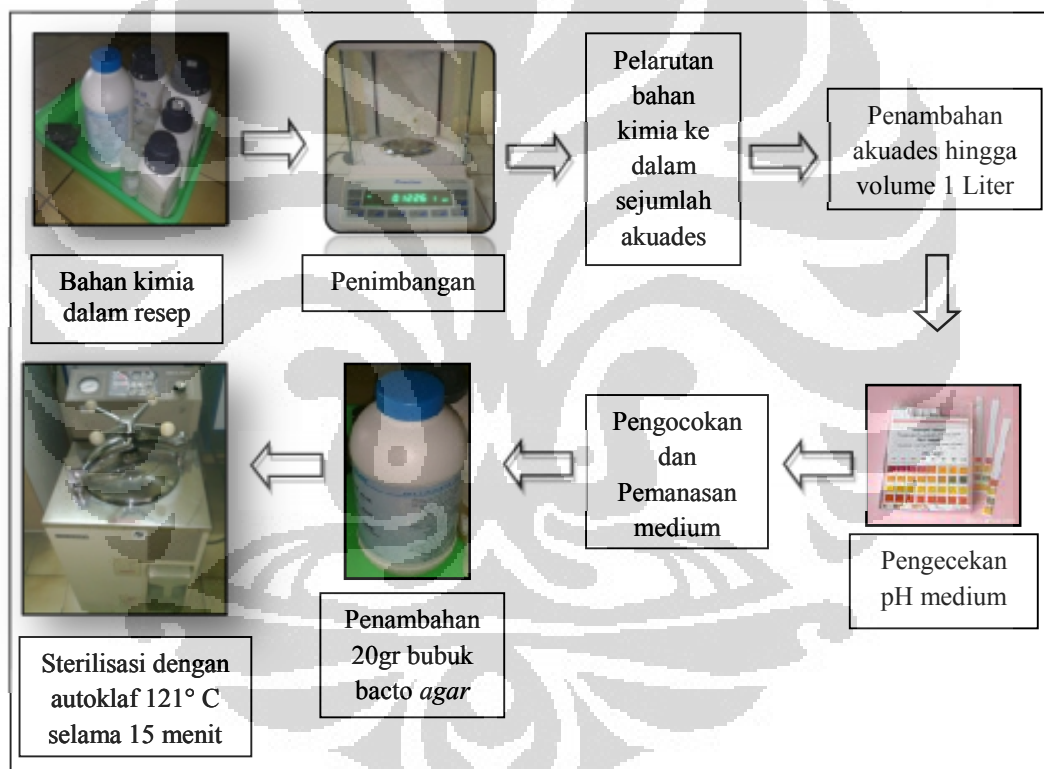
Tabel 3.1. Komposisi medium BG 11 *N free* per liter

Zat kimia	Komposisi (g)
K ₂ HPO ₄	0,040
MgSO ₄	0,075
CaCl ₂	0,036
Asam sitrat	0,006
Ferric Ammonium Sitrat	0,006
EDTA	0,001
Na ₂ CO ₃	0,020
Larutan A ₅ (dalam 100 ml terdiri dari:)	1 ml
H ₃ BO ₃	0,286
MnCl ₂	0,181
ZnSO ₄	0,022
NaMoO ₄	0,039
CuSO ₄	0,0079
Co(NO ₃) ₂	0.00494
Akuades	
*Agar (medium agar)	20

[Sumber: Kim & Lee 2005: 241.]

pH medium di ukur hingga 7,2 dengan menggunakan kertas indikator pH skala 5,2--7,4. Jika pH medium masih dibawah 7,2 ditambahkan larutan NaOH 1 M

hingga mencapai pH 7,2. Sebanyak 20 gram bubuk *bacto agar* (Watanabe 2005: 19) ditambahkan ke dalam medium sambil terus diaduk dan dipanaskan hingga mendidih. Setelah semua bahan kimia dilarutkan ke dalam sejumlah akuades, volume akuades ditambahkan hingga volume akhir 1L. Medium kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit. Medium yang telah steril didinginkan hingga mencapai suhu 50--60° C. Sebanyak 20 ml medium dituang ke dalam cawan petri steril secara aseptis dan medium dibiarkan mengeras (Hoshaw & Rosowski 1979: 58). Cawan yang telah berisi medium dibalik dan disterilisasi dengan UV selama ±10 menit. Cawan petri yang telah berisi medium dapat digunakan apabila sudah dingin (Gambar 3.1).



Gambar 3.1. Skema kerja pembuatan medium BG 11 padat bebas unsur nitrogen

3.3.3. Pemurnian strain, Pembuatan *Stock Culture* dan *Working Culture*

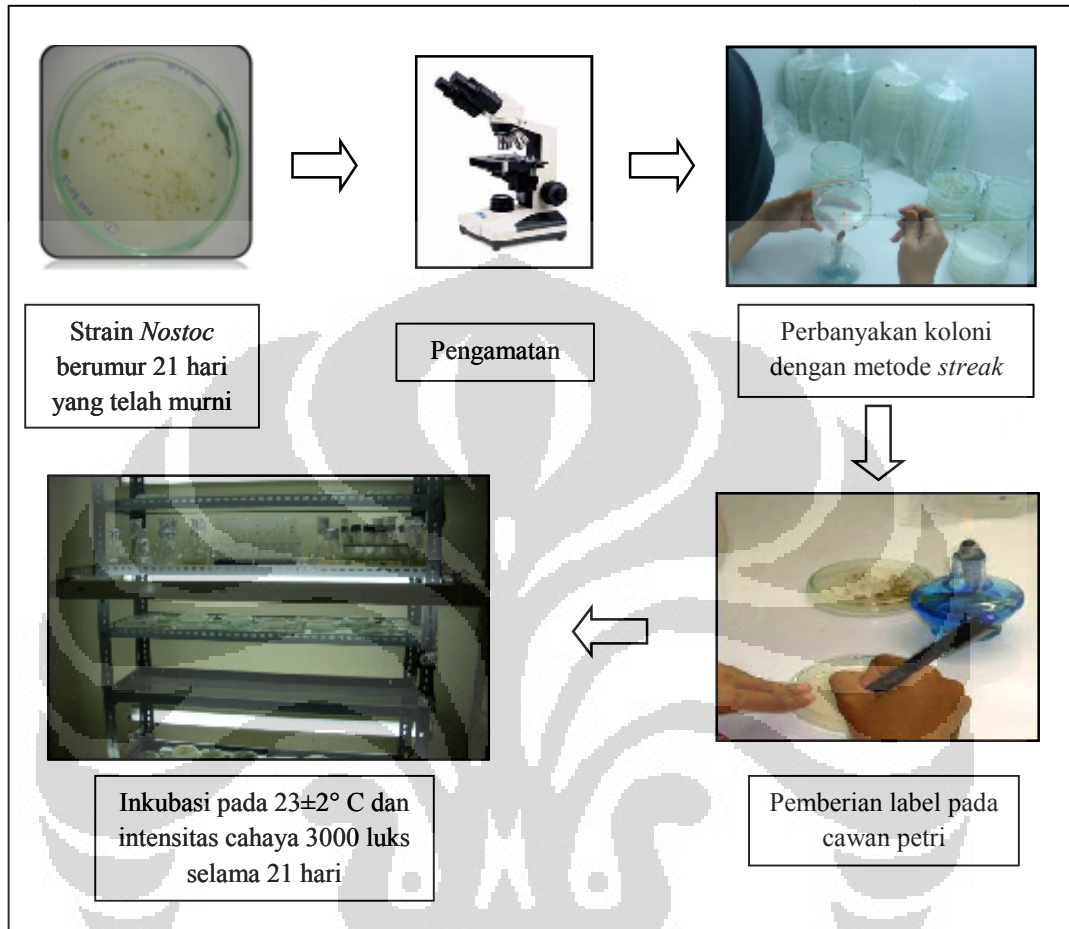
Pemurnian strain dilakukan dengan metode *streak* dan tanam (Hoshaw & Rosowski 1979: 58--59). Pemurnian dengan metode tanam dilakukan dengan mengambil koloni yang ada dalam medium padat menggunakan jarum tanam tajam lalu dipindahkan pada permukaan medium padat baru. Sebanyak 10 koloni dengan diameter ± 1 --1,5 mm ditanam pada 1 cawan petri. Selain itu, strain juga dimurnikan dengan metode *streak* atau gores (1 koloni untuk 1 cawan petri). Sebelum digunakan, jarum tanam bulat dan jarum tanam tajam dibakar terlebih dahulu dan didinginkan sebelum menyentuh strain.

Pembuatan *stock culture* dilakukan dengan metode *streak*. Strain diamati dengan mikroskop binokuler lalu pilih satu koloni yang bebas dari kontaminan untuk disubkultur. Kontaminan yang sering ditemukan berupa bakteri dan jamur. Strain yang terkontaminasi oleh bakteri dibedakan dengan adanya bintik-bintik berwarna putih atau pink di sekitar koloni. Sedangkan pertumbuhan jamur dalam cawan petri ditandai dengan adanya struktur hifa. Satu koloni dari masing-masing strain digores pada satu cawan petri. Bagian tepi cawan petri ditutup dengan parafilm lalu bagian atas cawan diberi label dengan spidol sebagai *stock culture*. Pembuatan *working culture* juga dilakukan dengan metode gores. Masing-masing strain disubkultur ke dalam 4 cawan petri dan dilabel sebagai *working culture*. Cawan petri berisi strain *Nostoc*, baik *stock* maupun *working culture*, diinkubasi di ruang kultur alga pada suhu $23 \pm 2^\circ \text{C}$ dan penyinaran sebesar 3000 lux ($600 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$) dengan fotoperiodisitas 14T/10G (Gambar 3.2).

3.3.4. Pengamatan Makroskopis dan Mikroskopis

Strain *Nostoc* yang telah berumur 21 hari diamati secara makroskopis dan mikroskopis. Karakter morfologi yang diamati secara makroskopis disesuaikan dengan Yuliana (2009: 24), yaitu meliputi warna koloni, bentuk koloni, tekstur permukaan koloni dan pola pertumbuhan koloni. Pengamatan mikroskopis meliputi pengukuran jumlah sel vegetatif dalam filamen, panjang dan lebar sel

vegetatif, jumlah sel heterokis dalam filamen, letak sel heterokis dalam filamen serta panjang dan lebar sel heterokis.



Gambar 3.2. Skema kerja pembuatan *stock* dan *working culture*

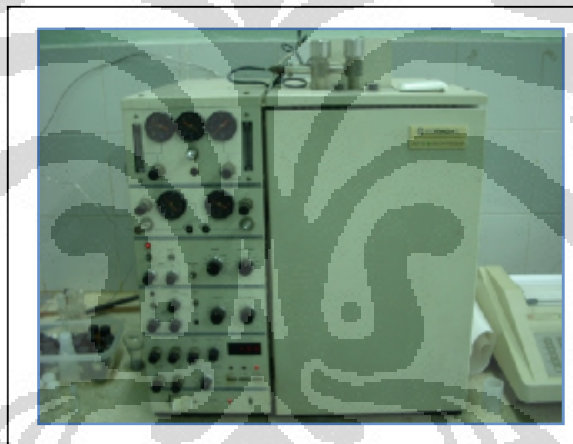
Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan membuat sepuluh preparat apusan dari tiap strain Cyanobacteria ordo Nostocales yang digunakan. Sepuluh preparat apusan yang dibuat berasal dari satu cawan petri. Sebanyak tiga filamen yang tidak bertumpuk dipilih secara acak dari tiap preparat apusan. Sehingga diperoleh sebanyak tiga puluh filamen untuk tiap strain yang diamati. Strain Cyanobacteria berheterokis yang tumbuh pada medium padat BG 11 bebas unsur nitrogen dicuplik dengan tusuk gigi dan diletakkan di atas gelas objek. Koloni tersebut kemudian diurai dengan menggunakan tusuk gigi. Sebanyak 1--2 tetes akuades lalu ditambahkan pada gelas objek. Preparat kemudian ditutup dengan gelas penutup dan diamati dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x.

Tiga filamen strain Cyanobacteria yang terpisah dan tidak bertumbuh diamati dan diukur dengan mikrometer. Hasil pengamatan dicatat dalam tabel pengamatan.

3.3.5. *Acetylene Reduction Assay* (ARA)

3.3.5.1. Persiapan Alat

Kromatografi gas yang digunakan adalah merk Hitachi model 263-50 (Gambar 3.3) dengan detektor pengion nyala atau FID (*Flame Ionization Detector*). Alat kromatografi gas dikondisikan terlebih dahulu selama ± 3 jam sebelum penyuntikan sampel. Kromatografi gas diatur sesuai literatur (Hawkes 2001: 1), yaitu suhu injektor sebesar 40°C , suhu kolom 35°C , dan suhu detektor 200°C . Gas pembawa berikut kecepatan aliran gas yang digunakan adalah nitrogen (40 psi), hidrogen ($1,5\text{ kgf/cm}^2$), dan udara ($0,5\text{ kgf/cm}^2$).

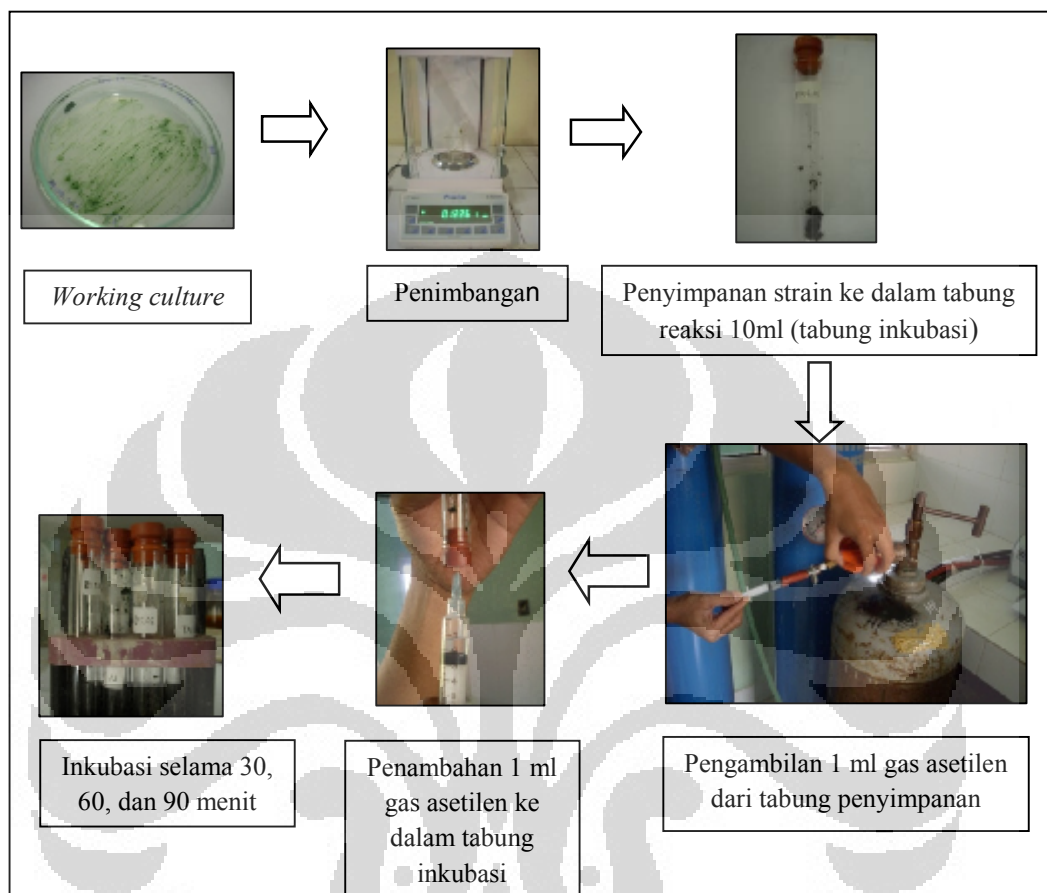


Gambar 3.3. Kromatografi gas Hitachi 263-50

3.3.5.2. Persiapan sampel

Sampel yang digunakan berasal dari *working culture* yang telah disiapkan sebelumnya. Biomassa dari masing-masing strain yang telah berumur 21 hari ditimbang hingga mencapai biomassa sebesar 0,1 gram. Masing-masing strain yang telah ditimbang lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi 10 ml (tabung inkubasi). Tabung tersebut kemudian ditutup dengan sumbat karet dan diberi label. Selanjutnya, sebanyak 1 ml (10% (v/v)) gas asetilen dimasukkan ke dalam tabung dengan menggunakan *syringe*. Bagian tutup tabung dilapisi dengan

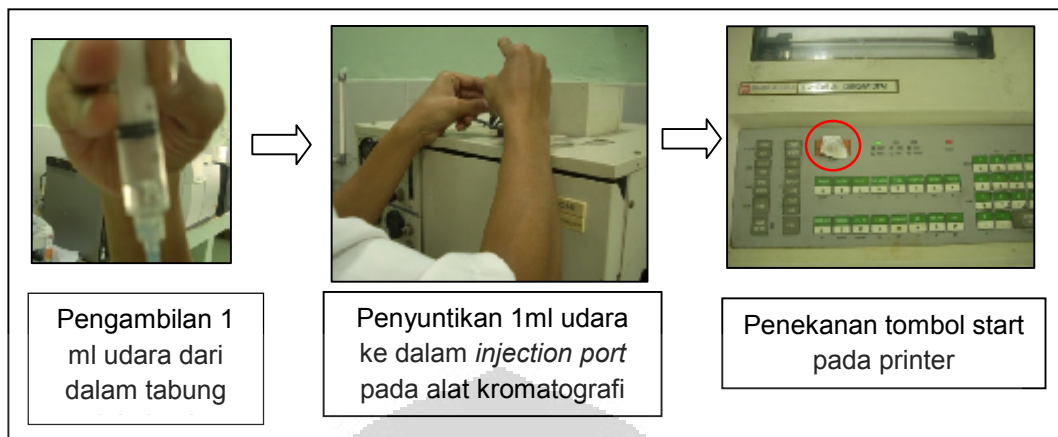
parafilm segera setelah penambahan gas asetilen. Tabung kemudian diinkubasi dengan pencahayaan ruang selama 30, 60, dan 90 menit.



Gambar 3.4. Skema Kerja Persiapan Sampel

3.3.5.3. Pengambilan udara untuk pengukuran kadar etilen

Sebanyak 1 ml udara yang terdapat di dalam tabung inkubasi diambil dengan *syringe* ukuran 5 ml yang telah diisi dengan air terlebih dahulu. Air dalam *syringe* berfungsi menjaga agar udara yang berada dalam *syringe* tidak keluar sebelum disuntikkan ke dalam kromatografi gas. Sebelumnya, dilakukan homogenisasi sampel dengan pengocokan manual (dengan tangan) selama ± 30 detik. Udara di dalam *syringe* disuntikkan ke dalam injektor lalu segera tekan tombol start pada printer kromatografi gas agar zat yang terdeteksi dapat tercetak pada kromatogram.



Gambar 3.5. Skema Kerja Pengambilan Udara untuk Pengukuran Etilen

3.4. Penyusunan, Pengolahan, dan Analisis Data

Data yang diperoleh disusun dalam bentuk tabel dan gambar. Analisis data dilakukan secara kuantitatif meliputi perhitungan laju reduksi asetilen menjadi etilen dan konversi hasil perhitungan laju reduksi asetilen menjadi laju fiksasi nitrogen, melalui rumus berikut:

$$\text{Laju Reduksi Asetilen menjadi Etilen } (\mu\text{mol ml}^{-1} \text{ g}^{-1}) = \frac{\left\{ \frac{\text{luas puncak sampel}}{\text{luas puncak standar}} \times \text{konsentrasi standar yang digunakan} \right\}}{\text{Berat molekul etilen}} \times \frac{1}{\text{Berat sampel (gram)}} \quad (3.1)$$

[Hawkes 2001: 3.]

$$\text{Laju Fiksasi Nitrogen } (\mu\text{mol ml}^{-1} \text{ g}^{-1}) = \text{Laju reduksi asetilen menjadi etilen } (\mu\text{mol ml}^{-1} \text{ g}^{-1}) \times 3 \quad (3.2)$$

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Pengamatan Morfologi Makroskopis dan Mikroskopis

Cyanobacteria ordo Nostocales yang digunakan dalam penelitian merupakan koleksi Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Departemen Biologi FMIPA UI. Cyanobacteria koleksi tersebut diisolasi dari beberapa lahan persawahan di wilayah Jawa Barat, Bali, dan Sulawesi Selatan. Cyanobacteria ordo Nostocales yang digunakan berjumlah 8 strain, yaitu BAD5, CIM7, CPG8, CPG24, GIA12-02, GIA13a, TAB7d, dan BTM6-02. Hasil karakterisasi molekuler melalui data sekuen parsial gen 16S rRNA dengan panjang 700 pb menunjukkan bahwa 8 strain yang digunakan dalam penelitian merupakan genus *Nostoc* (Hendrayanti, komunikasi pribadi).

Pengamatan morfologi makroskopis dan mikroskopis dilakukan pada strain *Nostoc* berumur 21 hari dalam medium BG 11 padat bebas unsur nitrogen yang diinkubasi pada suhu $23 \pm 2^\circ \text{C}$ dengan intensitas cahaya 3000 luks ($600 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). Hasil prapenelitian menunjukkan strain *Nostoc* berumur 21 hari telah memiliki biomassa yang cukup untuk pengujian.

Hasil pengamatan menunjukkan 8 strain *Nostoc* tersebut memiliki karakter morfologi makroskopis maupun mikroskopis yang bervariasi. Perbedaan karakteristik makroskopis tersebut menjadi salah satu alasan pemilihan strain. Selain itu, strain-strain *Nostoc* yang diujikan menunjukkan pertumbuhan yang baik dan bebas dari kontaminasi. Pertumbuhan yang baik dicirikan dengan adanya penambahan berat biomassa dan diameter koloni seiring dengan penambahan umur strain *Nostoc*. Menurut Timotius (1982: 120) arti pertumbuhan dari segi populasi dapat ditunjukkan dengan adanya penambahan jumlah atau massa sel yang tumbuh.

Berdasarkan hasil pengamatan morfologi makroskopis, masing-masing strain *Nostoc* tampak tergabung dalam koloni yang kompak (*firm*) dan diselubungi oleh selaput lendir. Data pengamatan makroskopis yang meliputi warna koloni, tekstur permukaan, dan profil koloni dapat dilihat pada Tabel 4.1. Panduan warna

Castell-Polychromos No.9216 (Lampiran 2) digunakan sebagai panduan dalam menentukan warna koloni strain *Nostoc*.

Tabel 4.1. Hasil Pengamatan Morfologi Makroskopis 8 Strain *Nostoc* Umur 21 hari dalam Medium BG 11 Bebas Unsur Nitrogen pada Suhu 23° C

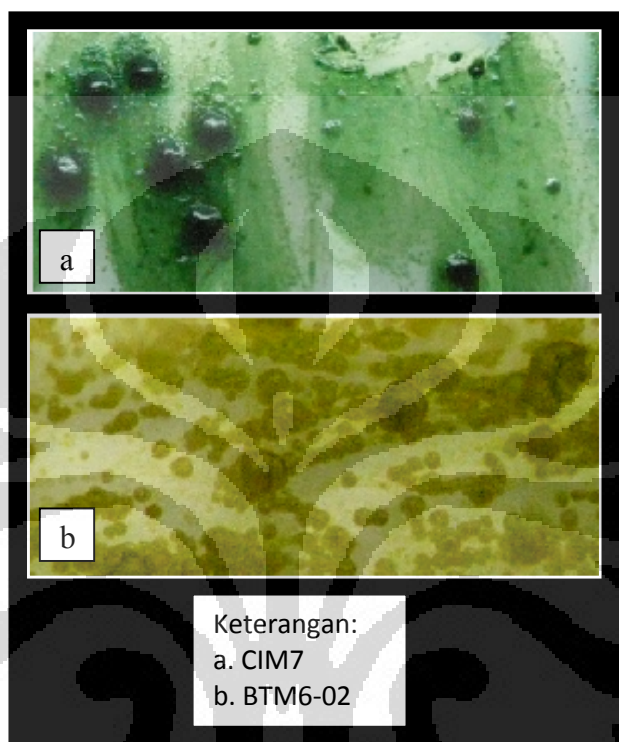
No	Kode Strain	Warna Koloni	Tekstur Permukaan	Profil Koloni
1	CIM7	Hijau rumput	Mengilap	Menyebar
2	CPG24	Hijau rumput	Mengilap	Menyebar
3	CPG8	Hijau zaitun	Kasar, bergranul	Menggunung
4	BAD5	Hijau zaitun	Kasar, bergranul	Menggunung
5	GIA12-02	Hijau zaitun	Kasar, bergranul	Menggunung
6	GIA13a	Hijau zaitun	Mengilap	Menggunung
7	TAB7d	Hijau zaitun	Mengilap	Menggunung
8	BTM6-02	Hijau zaitun	Kasar, bergranul	Menggunung

Delapan strain *Nostoc* yang digunakan dalam penelitian memperlihatkan 2 jenis warna koloni, yaitu hijau rumput dan hijau zaitun (Gambar 4.1). Strain *Nostoc* CIM7 dan CPG24 menunjukkan warna koloni hijau rumput. Enam strain *Nostoc* yang lain, yaitu CPG8, BAD5, GIA12-02, GIA13a, BTM6-02 dan TAB7d memiliki warna koloni hijau zaitun.

Variasi juga terlihat pada hasil pengamatan tekstur permukaan koloni strain *Nostoc*. Tekstur permukaan mengilap ditunjukkan oleh strain *Nostoc* CPG24, CIM7, TAB7d, dan GIA13a. Tekstur permukaan kasar dan bergranul ditunjukkan oleh strain *Nostoc* CPG8, BAD5, GIA12-02, dan BTM6-02. Hasil pengamatan profil koloni memperlihatkan 2 pola, yaitu menyebar dan menggunung. Strain *Nostoc* CPG24 dan CIM7 menunjukkan profil koloni menyebar. Keenam strain *Nostoc* yang lain, yaitu CPG8, BAD5, GIA12-02, GIA13a, BTM6-02 dan TAB7d, menunjukkan profil koloni menggunung.

Karakter morfologi makroskopis strain-strain *Nostoc* tersebut, secara umum sesuai dengan deskripsi dalam penelitian Yuliana (2009: 41--59), kecuali strain *Nostoc* GIA13a dan TAB7d. Karakter morfologi makroskopis 2 strain tersebut sedikit berbeda dengan karakter morfologi makroskopis strain *Nostoc* GIA13a dan TAB7d yang digunakan dalam penelitian Yuliana (2009: 41--59). Tekstur permukaan strain *Nostoc* GIA13a dan TAB7d yang digunakan dalam penelitian adalah mengilap, sedangkan tekstur permukaan strain *Nostoc* GIA13a dan TAB7d dalam penelitian Yuliana (2009: 41--59) adalah kasar dan bergranul. Proses

subkultur yang berulang kali dan terus menerus diduga menjadi penyebab perubahan karakter morfologi makroskopis strain *Nostoc* GIA13a dan TAB7d. Carr (*lihat* Whitton & Potts 2000: 9) melaporkan bahwa proses subkultur yang dilakukan berulang kali dan terus menerus dapat mengakibatkan perubahan karakter morfologi dari organisme yang bersangkutan.



Gambar 4.1. Morfologi Makroskopis strain *Nostoc* CIM7 dan BTM6-02 [Dokumentasi pribadi, 2011.]

Pengamatan morfologi mikroskopis yang dilakukan meliputi jumlah, letak, dan ukuran sel heterokis serta ukuran sel vegetatif. Pengamatan morfologi mikroskopis strain-strain *Nostoc* dilakukan pada setiap 3 filamen per satuan bidang pandang mikroskop. Pengamatan dilakukan pada 10 bidang pandang yang berbeda dengan perbesaran 400x. Sehingga, diperoleh data dari 30 filamen untuk setiap strain *Nostoc* yang diujikan. Data hasil pengamatan karakter morfologi strain *Nostoc* secara mikroskopis tertulis dalam Tabel 4.2.

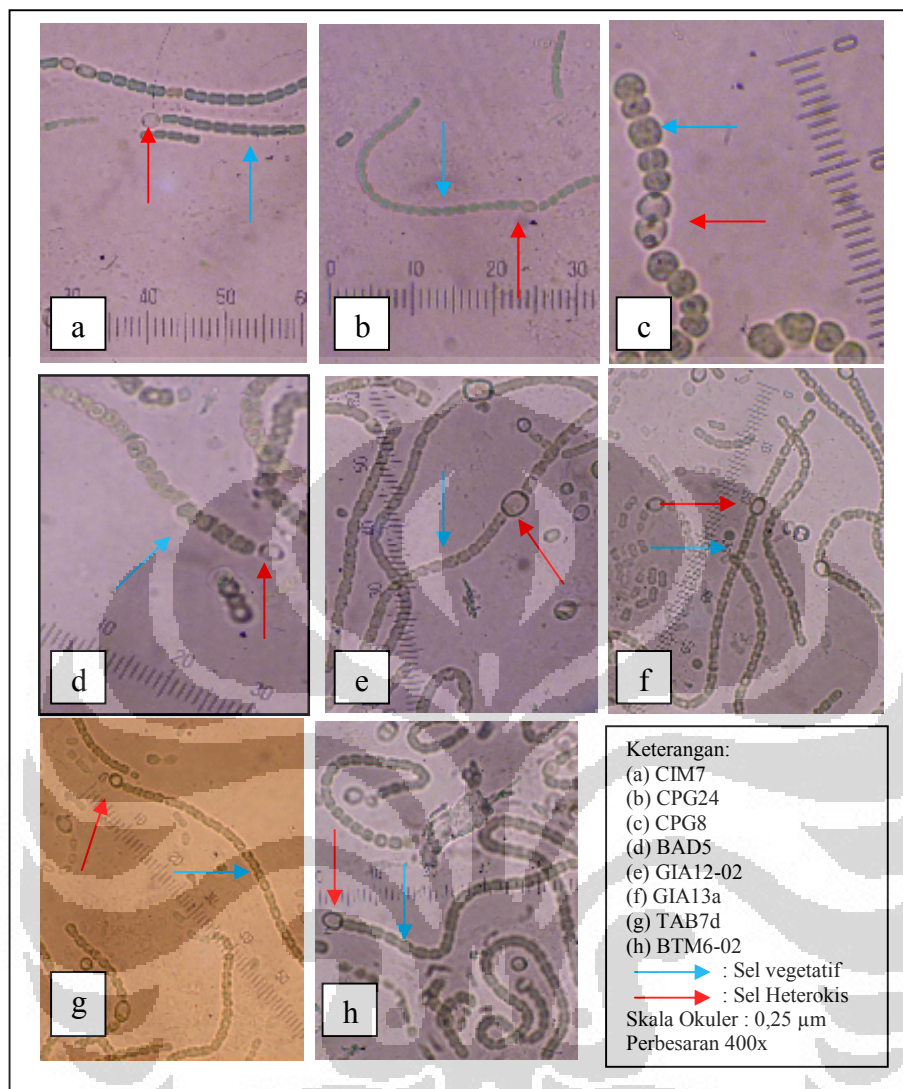
Tabel 4.2. Hasil Pengamatan Morfologi Mikroskopis 8 Strain *Nostoc* Umur 21 hari dalam Medium BG 11 Bebas Unsur Nitrogen pada Suhu 23° C

No	Kode Strain	Sel vegetatif		Sel Heterokis		
		Panjang (µm)	Lebar (µm)	Panjang (µm)	Lebar (µm)	Jumlah (per 30 filamen)
1	CIM7	2,5-3,75	1,25-2,5	5-6,25	3,75	33
2	CPG24	2,5-5	2,5-3,75	3,75-7,5	2,5-5	79
3	CPG8	2,5-6,25	2,5-5	5-6,25	3,75-6,25	40
4	BAD5	3,75-6,25	3,75-5	5-7,5	5	44
5	GIA12-02	3,75-6,25	2,5-3,75	10-12,5	3,75-6,25	32
6	GIA13a	3,75-5	2,5	5-6,25	3,75-5	36
7	TAB7d	3,75-5	2,5-3,75	5-7,5	5-6,25	44
8	BTM6-02	3,75-7,5	2,5-5	5-10	3,75-6,25	34

Hasil pengamatan mikroskopis memperlihatkan perbedaan ukuran antara sel vegetatif dengan sel heterokis pada tiap strain *Nostoc* (Gambar 4.2). Hasil tersebut sesuai dengan literatur yang menyatakan bahwa sel heterokis memiliki ukuran yang lebih besar dibandingkan sel vegetatif (Graham & Wilcox 2000: 118).

Ukuran sel heterokis maupun sel vegetatif pada tiap strain *Nostoc* cukup bervariasi. Sebagai contoh, ukuran sel heterokis *Nostoc carneum* berkisar antara 5,5--6,5 µm. Sedangkan ukuran sel vegetatif *Nostoc carneum* berkisar antara 3--4 µm (Whitton 2000: 105). Pereira *dkk.* (2005: 30) melaporkan bahwa ukuran sel heterokis pada *Nostoc ellipsosporum* adalah 5,6--6,4 x 7,2--10 µm dengan ukuran sel vegetatif sebesar 5,6--6,4 µm.

Perbedaan ukuran sel vegetatif dengan sel heterokis pada penelitian terutama ditunjukkan oleh strain *Nostoc* GIA12-02, CIM7, BTM6-02, GIA13a, dan TAB7d. Ukuran sel heterokis pada strain *Nostoc* GIA12-02 merupakan ukuran paling besar jika dibandingkan dengan 7 strain *Nostoc* lain. Beberapa sel heterokis yang teramati pada strain *Nostoc* GIA12-02 bahkan memiliki ukuran dua kali lebih besar dibandingkan sel vegetatif. Panjang sel heterokis pada strain *Nostoc* GIA12-02 berkisar antara 10--12,5 µm dengan lebar 3,75--6,25 µm.



Gambar 4.2. Morfologi Mikroskopis 8 strain *Nostoc* umur 21 hari dalam medium BG 11 padat bebas unsur nitrogen [Dokumentasi pribadi, 2011.]

Ukuran panjang sel vegetatif dari strain *Nostoc* GIA12-02 adalah 3,75--6,25 μm dengan lebar 2,5--3,75 μm . Strain *Nostoc* BTM6-02 juga memiliki ukuran sel heterokis yang cukup besar, yakni panjang 5--10 μm dan lebar 3,75--6,25 μm . Sel vegetatif strain *Nostoc* BTM6-02 memiliki ukuran panjang 3,75--7,5 μm dan lebar 2,5--5 μm .

Hasil pengamatan menunjukkan strain *Nostoc* CPG24 memiliki jumlah sel heterokis terbanyak, yaitu 79 sel heterokis. Ditemukan rata-rata sebanyak 2--3 sel heterokis pada setiap filamen. Tujuh strain lain menunjukkan jumlah sel heterokis

yang berbeda-beda. Jumlah sel heterokis yang ditemukan dalam 30 filamen untuk setiap strain *Nostoc* berkisar antara 32--44 buah. Strain *Nostoc* GIA12-02 memiliki jumlah sel heterokis terkecil yaitu 32 buah, sedangkan pada strain *Nostoc* BAD5 dan TAB7d ditemukan sel heterokis sebanyak 44 buah. Hasil pengamatan pada 4 strain *Nostoc* lain, yaitu CIM7, BTM6-02, GIA13a, dan CPG8 memperlihatkan jumlah sel heterokis yang relatif sama, yaitu 33, 34, 36, dan 40 buah.

Jumlah sel heterokis dalam tiap filamen diduga menjadi salah satu faktor yang memengaruhi nilai laju reduksi asetilen pada suatu strain. Selain itu, ukuran sel heterokis yang relatif besar pada 8 strain *Nostoc* diduga juga menjadi salah satu faktor yang memengaruhi laju reduksi asetilen menjadi etilen.

4.2. Hasil Pengukuran Laju Reduksi Asetilen dengan Metode ARA

Berat biomassa basah strain *Nostoc* yang digunakan dalam pengukuran ARA adalah 0,1 gram (Tabel 4.3). Tabel 4.3 menunjukkan rerata nilai laju reduksi asetilen menjadi etilen tanpa penambahan asetilen dan dengan penambahan asetilen ke dalam tabung inkubasi. Konsentrasi etilen yang terukur pada tabung tanpa penambahan asetilen menunjukkan nilai yang lebih rendah dibandingkan dengan konsentrasi etilen yang terukur pada tabung dengan penambahan asetilen.

Konsentrasi etilen yang terukur pada tabung tanpa penambahan asetilen berkisar antara 0--0,42 μmol . Konsentrasi etilen terendah ditunjukkan oleh strain *Nostoc* CIM7, sedangkan konsentrasi etilen tertinggi ditunjukkan oleh strain *Nostoc* BAD5. Tabung inkubasi berisi strain *Nostoc* CIM7 bahkan menunjukkan tidak ada etilen yang terdeteksi. Hardy *dkk.* (1968: 1188) melaporkan bahwa pengujian ARA dengan kromatografi gas dapat mendeteksi sampel hingga konsentrasi 0,001 μmol . Konsentrasi etilen pada tabung inkubasi berisi strain *Nostoc* CIM7 diduga kurang dari 0,001 μmol , sehingga tidak dapat dideteksi dengan kromatografi gas.

Tabel 4.3. Hasil Pengukuran Laju Reduksi Asetilen menjadi Etilen dengan Metode ARA

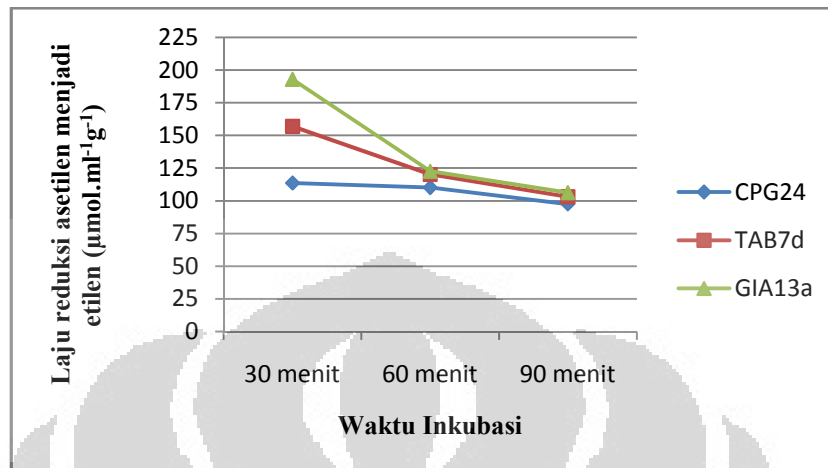
No	Kode Strain	Biomassa (gram)	Laju reduksi asetilen menjadi etilen ($\mu\text{mol.ml}^{-1}\text{g}^{-1}$) pada waktu inkubasi			
			Tanpa penambahan asetilen		Dengan penambahan asetilen	
			30 menit	30 menit	60 menit	90 menit
1	CPG24	0,1	0,25	113.62	110.14	97.48
2	TAB7d	0,1	0,33	156.89	120.13	103.10
3	GIA13a	0,1	0,16	192.84	122.58	106.20
4	BAD5	0,1	0,42	374.15	390.43	341.41
5	CPG8	0,1	0,19	426.76	408.49	391.34
6	CIM7	0,1	0	957.35	930.25	868.78
7	BTM6-02	0,1	0,07	1059.13	1297.50	1208.08
8	GIA12-02	0,1	0,10	1289.97	729.74	1108

Pengukuran konsentrasi etilen pada tabung inkubasi berisi sampel tanpa penambahan asetilen dilakukan guna memastikan bahwa tidak ada etilen dalam tabung sebelum waktu inkubasi. Konsentrasi etilen pada tabung inkubasi tanpa penambahan asetilen dapat digunakan sebagai pembanding terhadap nilai laju reduksi asetilen menjadi etilen pada pada tabung setelah 3 waktu inkubasi. Nilai laju reduksi asetilen menjadi etilen yang terukur pada waktu inkubasi 30, 60 maupun 90 menit tidak dipengaruhi oleh konsentrasi etilen pada tabung tanpa penambahan asetilen. Hasil tersebut membuktikan bahwa terjadi reaksi reduksi asetilen menjadi etilen setelah penambahan gas asetilen pada tabung inkubasi.

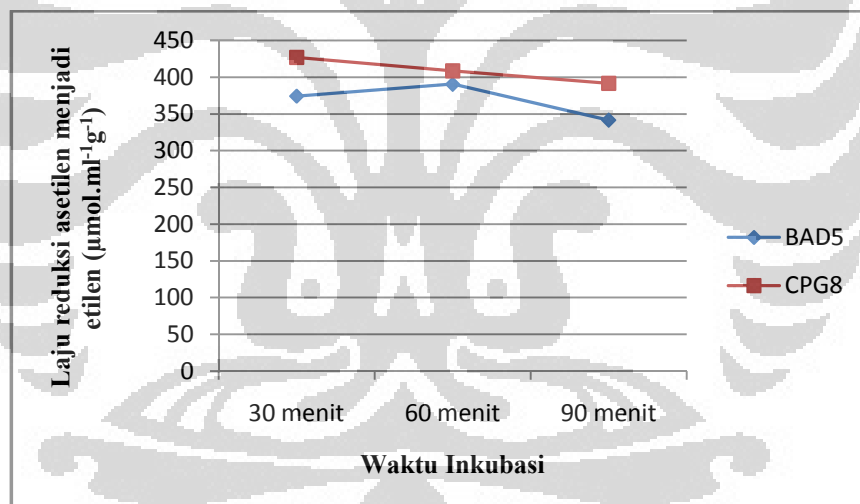
Berdasarkan hasil penelitian, laju reduksi asetilen pada tabung dengan penambahan asetilen yang diinkubasi pada 3 waktu berbeda memperlihatkan nilai yang bervariasi. Rerata nilai laju reduksi asetilen menjadi etilen dengan penambahan asetilen pada waktu inkubasi 30, 60, dan 90 menit dapat dilihat pada Tabel 4.3. Nilai laju reduksi asetilen yang terukur pada 3 waktu inkubasi berkisar antara 97,48--1297,50 μmol . Berdasarkan nilai tersebut, 8 strain *Nostoc* dikelompokkan menjadi 3 kelompok data.

Kelompok data pertama (Tabel 4.3 & Gambar 4.3) terdiri atas data dengan nilai laju reduksi asetilen berkisar antara 90--200 μmol . Kelompok data kedua (Tabel 4.3 & Gambar 4.4) terdiri atas data dengan nilai laju reduksi asetilen antara 340--450 μmol . Adapun kelompok data ketiga (Tabel 4.3 & Gambar 4.5) terdiri

atas data dengan nilai laju reduksi asetilen yang tinggi, yaitu antara 720--1300 μmol .



Gambar 4.3. Laju Reduksi Asetilen strain *Nostoc* CPG24, TAB7d, dan GIA13a



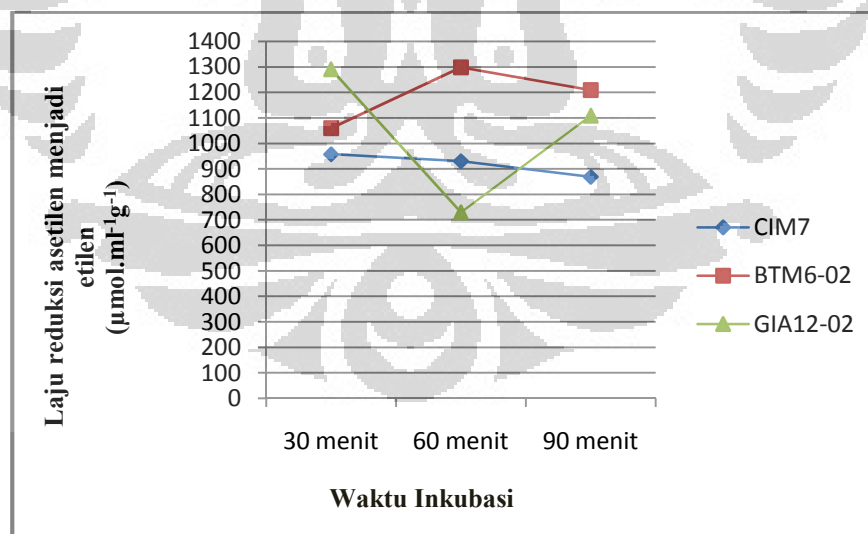
Gambar 4.4. Laju Reduksi Asetilen strain *Nostoc* BAD5 dan CPG8

Tiga strain *Nostoc* yang termasuk dalam kelompok data pertama adalah CPG24, TAB7d, dan GIA13a. Ketiga strain pada kelompok data pertama memperlihatkan pola reduksi asetilen yang sama, yaitu nilai tertinggi diperoleh pada inkubasi 30 menit dan terus menurun pada waktu inkubasi 60 dan 90 menit. Nilai laju reduksi asetilen strain *Nostoc* CPG24, TAB7d, dan GIA13a pada inkubasi 30 menit secara berurutan adalah 113,62; 156,89; dan 192,84 μmol . Nilai laju reduksi asetilen pada waktu inkubasi 60 menit untuk masing-masing

strain tersebut adalah 110,14; 120,13; dan 122,58 μmol . Adapun nilai laju reduksi asetilen pada waktu inkubasi 90 menit untuk masing-masing strain *Nostoc* tersebut adalah 97,48; 103,10; dan 106,20 μmol .

Kelompok data kedua terdiri atas 2 strain *Nostoc*, yaitu BAD5 dan CPG8. Kelompok data kedua menunjukkan 2 pola reduksi asetilen. Pola pertama ditunjukkan oleh strain *Nostoc* CPG8, yaitu nilai tertinggi pada waktu inkubasi 30 menit dan terus menurun untuk waktu inkubasi 60 dan 90 menit. Pola strain *Nostoc* CPG8 tersebut sama dengan pola dari 3 strain *Nostoc* pada kelompok data pertama. Pola kedua ditunjukkan oleh strain *Nostoc* BAD5, yaitu nilai tertinggi diperoleh pada inkubasi 60 menit dan nilai terendah diperoleh pada inkubasi 90 menit.

Nilai laju reduksi asetilen strain *Nostoc* BAD5 dan CPG8 pada waktu inkubasi 30 menit adalah sebesar 374,15 dan 426,76 μmol . Nilai laju reduksi asetilen kedua strain *Nostoc* tersebut pada waktu inkubasi 60 menit secara berurutan adalah 390,43 dan 408,49 μmol . Nilai laju reduksi asetilen untuk masing-masing strain *Nostoc* tersebut pada waktu inkubasi 90 menit adalah 341,41 dan 391,34 μmol .



Gambar 4.5. Laju Reduksi Asetilen strain *Nostoc* CIM7, BTM6-02, dan GIA12-02

Kelompok data ketiga terdiri atas 3 strain *Nostoc*, yaitu CIM7, BTM6-02, dan GIA12-02. Kelompok data ketiga menunjukkan 3 pola laju reduksi asetilen yang berbeda. Strain *Nostoc* CIM7 menunjukkan pola reduksi asetilen yang sama dengan 3 strain pada kelompok data pertama. Strain *Nostoc* BTM6-02 menunjukkan laju reduksi asetilen tertinggi pada waktu inkubasi 60 menit dan nilai terendah pada inkubasi 30 menit. Pola reduksi asetilen pada strain *Nostoc* BTM6-02 selanjutnya disebut pola ketiga. Adapun pola reduksi keempat ditunjukkan oleh strain *Nostoc* GIA12-02. Hasil ARA tertinggi pada strain GIA12-02 didapat pada waktu inkubasi 30 menit dengan nilai terendah pada waktu inkubasi 60 menit.

Rerata laju reduksi asetilen menjadi etilen tertinggi pada waktu inkubasi 30 menit didapat oleh strain *Nostoc* GIA12-02 dengan nilai sebesar 1289,97 μmol . Urutan kedua tertinggi ditempati oleh strain *Nostoc* BTM6-02 dengan rerata nilai sebesar 1059,13 μmol . Strain *Nostoc* CIM7 dengan nilai laju reduksi asetilen sebesar 957,35 μmol berada pada urutan ketiga tertinggi. Nilai laju reduksi asetilen strain *Nostoc* GIA12-02, CIM7, dan BTM6-02 pada waktu inkubasi 60 menit masing-masing adalah sebesar 729,74; 930,25; dan 1297,50 μmol . Nilai laju reduksi asetilen strain *Nostoc* CIM7, GIA12-02, dan BTM6-02 pada waktu inkubasi 90 menit secara berurutan adalah 868,78; 1108; dan 1208,08 μmol .

Hasil pengukuran ARA pada waktu inkubasi 60 dan 90 menit secara umum menunjukkan nilai laju reduksi asetilen menjadi etilen yang lebih rendah dibandingkan pada waktu inkubasi 30 menit. Persentase penurunan nilai yang terjadi pada 7 strain *Nostoc* cukup bervariasi (Tabel 4.4). Persentase penurunan nilai ARA untuk waktu inkubasi 30 ke 60 menit berkisar antara 2,83% hingga 43,43%. Strain *Nostoc* CIM7 memperlihatkan persentase penurunan nilai terkecil yaitu 2,83% (27,10 μmol). Sebaliknya, strain *Nostoc* GIA12-02 memperlihatkan persentase penurunan nilai terbesar yaitu 43,43% (560,23 μmol).

Data persentase penurunan nilai ARA untuk waktu inkubasi 30 ke 90 menit secara umum memperlihatkan nilai yang lebih besar dibandingkan data persentase penurunan nilai ARA untuk waktu inkubasi 30 ke 60 menit. Persentase penurunan nilai ARA untuk inkubasi 30 ke 90 menit berbeda-beda pada 7 strain *Nostoc* yang diujikan (Gambar 4.6). Persentase penurunan berkisar antara 8,30%

hingga 44,93%. Strain *Nostoc* CPG8, BAD5 dan CIM7 mengalami penurunan nilai dibawah 10%, yaitu masing-masing sebesar 8,30; 8,75; dan 9,25%. Strain *Nostoc* GIA12-02 dan CPG24 mengalami penurunan sebesar 14,11 dan 14,20%. Sedangkan 2 strain *Nostoc* lain, yaitu TAB7d dan GIA13a mengalami penurunan yang paling tinggi yaitu 34,28 dan 44,93%.

Tabel 4.4. Persentase Penurunan Nilai Laju Reduksi Asetilen menjadi Etilen dengan Metode ARA

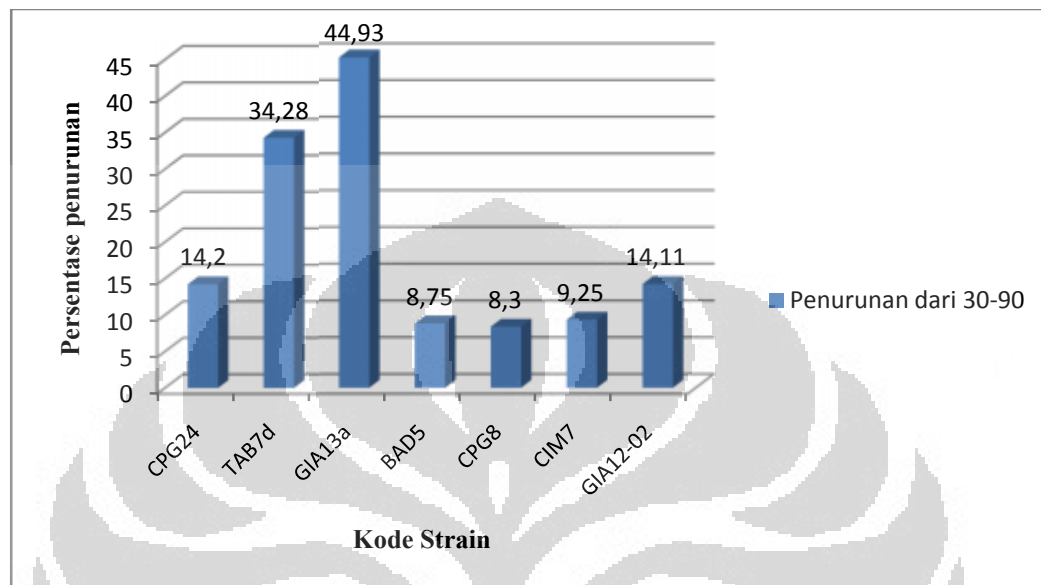
No	Kode Strain	Penurunan Nilai Laju Reduksi Asetilen			
		Dari 30 ke 60 menit		Dari 30 ke 90 menit	
		Selisih Penurunan (μmol)	Persentase (%)	Selisih Penurunan (μmol)	Persentase (%)
1	CPG24	3,48	3,06	16,14	14,20
2	TAB7d	36,76	23,43	53,79	34,28
3	GIA13a	70,26	36,43	86,64	44,93
4	BAD5	-*	-*	32,74	8,75
5	CPG8	18,27	4,28	35,42	8,30
6	CIM7	27,10	2,83	88,57	9,25
7	GIA12-02	560,23	43,43	181,97	14,11

Ket : * : mengalami kenaikan

Persentase penurunan nilai ARA secara umum dapat digunakan untuk menggambarkan stabilitas laju reduksi asetilen pada strain *Nostoc* yang diujikan. Lima strain *Nostoc* dengan persentase penurunan yang rendah (<15%) diduga memiliki laju reduksi asetilen yang lebih stabil dibandingkan dengan 2 strain *Nostoc* lain. Strain *Nostoc* CIM7 dan GIA12-02 menunjukkan nilai laju reduksi asetilen yang tinggi dengan persentase penurunan kurang dari 15%, sehingga 2 strain tersebut diduga lebih unggul dibandingkan strain *Nostoc* lain yang diujikan. Meskipun demikian, perlu ditekankan kembali bahwa hasil tersebut berlaku dalam sebuah sistem tertutup (dalam tabung). Penelitian yang dilakukan pada sebuah sistem terbuka (di lapangan) mungkin mendapatkan hasil yang berbeda.

Penelitian yang dilakukan dalam sebuah sistem terbuka melibatkan beberapa faktor, diantaranya faktor biotik dan abiotik. Kompetisi yang terjadi antara sampel penelitian dengan kedua faktor tersebut mungkin dapat menyebabkan perbedaan pada hasil penelitian. Sebagai contoh, telah dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh pemberian strain *Nostoc* TAB7d, BAD5,

GIA13a, CPG24, CIM7, dan CPG8 pada tanaman padi varietas Ciherang (Septiani 2011: 38--41; Amanina 2011: 60). Penelitian dilakukan dalam pot berdiameter 25cm yang disimpan dalam rumah kaca selama 4 bulan.



Gambar 4.6. Diagram Batang Persentase Penurunan Nilai ARA dari inkubasi 30 ke 90 menit pada 7 strain *Nostoc*

Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa penambahan strain *Nostoc* TAB7d, BAD5, dan GIA13a berpengaruh meningkatkan panjang akar dan jumlah buah isi, serta menurunkan jumlah buah kosong. Pemberian strain *Nostoc* GIA13a memberi pengaruh paling baik dibandingkan pemberian strain *Nostoc* BAD5 dan TAB7d (Septiani 2011: 38--41). Penelitian Amanina (2011: 60) membuktikan bahwa pemberian strain *Nostoc* CPG24 dan CIM7 berpengaruh meningkatkan tinggi tanaman. Pemberian strain *Nostoc* CPG24 dan CPG8 berpengaruh menurunkan jumlah buah kosong. Penelitian Amanina menyimpulkan bahwa strain *Nostoc* CPG24 lebih potensial dibandingkan strain *Nostoc* CPG8 dan CIM7.

Hasil penelitian Septiani dan Amanina secara umum menggambarkan bahwa strain *Nostoc* GIA13a dan CPG24 memiliki kemampuan adaptasi yang lebih baik dibandingkan 4 strain *Nostoc* lain yang digunakan dalam penelitian. Kemampuan adaptasi strain *Nostoc* GIA13a dan CPG24 menyebabkan strain *Nostoc* tersebut mampu melakukan laju fiksasi nitrogen dengan optimal, sehingga

menunjukkan pengaruh pada pertumbuhan tanaman padi. Empat strain *Nostoc* lain diduga tidak mampu beradaptasi dengan baik di lingkungan rumah kaca, sehingga laju fiksasi nitrogen pada keempat strain *Nostoc* tersebut menjadi lebih rendah.

Laju reduksi asetilen menjadi etilen mencapai nilai tertinggi pada waktu inkubasi yang berbeda untuk tiap spesies yang diujikan. Penelitian Hardy *dkk.* (1968: 1189) pada *Azotobacter* menunjukkan kurva hubungan antara laju reduksi asetilen dan waktu inkubasi membentuk garis linier selama 45 menit, kemudian perlahan menurun hingga akhirnya berhenti ketika ATP sebagai sumber energi sudah tidak tersedia. Penelitian laju reduksi asetilen pada bintil akar kacang-kacangan mencapai nilai tertinggi pada inkubasi 60 menit, kemudian mengalami penurunan (Hardy *dkk.* 1968: 1198).

Adapun hasil penelitian ini menunjukkan 6 strain *Nostoc* memiliki laju reduksi asetilen tertinggi pada inkubasi 30 menit. Hasil penelitian ini menggambarkan bahwa produk hasil fiksasi berupa amonia akan diperoleh dalam jumlah maksimum ketika dipanen setelah waktu inkubasi 30 menit, karena ketika diinkubasi pada waktu yang lebih lama akan terjadi penurunan laju fiksasi nitrogen.

4.3. Konversi Hasil Laju Reduksi Asetilen menjadi Laju Fiksasi Nitrogen

Hasil pengukuran laju reduksi asetilen menjadi etilen dengan metode ARA harus dikonversi terlebih dahulu sehingga dapat dinyatakan sebagai laju fiksasi nitrogen. Reduksi 3 mol asetilen menjadi etilen setara dengan transfer 1 mol nitrogen menjadi amonia (Reporter 1985: 161). Oleh karena itu, nilai laju reduksi asetilen menjadi etilen yang diperoleh dalam penelitian dikonversi menjadi nilai laju fiksasi nitrogen melalui rumus 3.2.

Nilai laju fiksasi nitrogen untuk masing-masing strain *Nostoc* tercantum pada Tabel 4.5. Sesuai dengan hasil pengukuran ARA, laju fiksasi nitrogen hasil konversi menunjukkan nilai tertinggi pada inkubasi 30 menit untuk masing-masing strain *Nostoc* yang diujikan. Meskipun demikian, terdapat pengecualian untuk strain *Nostoc* BAD5 dan BTM6-02. Kedua strain *Nostoc* tersebut menunjukkan nilai laju fiksasi nitrogen tertinggi pada inkubasi 60 menit.

Tabel 4.5. Laju Fiksasi Nitrogen Hasil Konversi

No	Kode Strain	Laju Fiksasi Nitrogen ($\mu\text{mol.ml}^{-1}\text{g}^{-1}$) pada Waktu Inkubasi		
		30 menit	60 menit	90 menit
1	CPG24	340,86	330,42	292,44
2	TAB7d	470,67	360,39	309,30
3	GIA13a	578,52	367,74	318,60
4	BAD5	1122,45	1171,29	1024,23
5	CPG8	1280,28	1225,47	1174,02
6	CIM7	2872,05	2790,75	2606,34
7	BTM6-02	3177,39	3892,50	3624,24
8	GIA12-02	3869,91	2189,22	3324

Nilai laju fiksasi nitrogen yang diperoleh masing-masing strain *Nostoc* pada 3 waktu inkubasi berkisar antara 292,44 hingga 3892,50 μmol . Penelitian Gao (1998: 45) pada *Nostoc flagelliforme* di Cina menunjukkan nilai laju fiksasi nitrogen sebesar 1000--3000 $\mu\text{mol N}_2$ per gram berat kering per jam. Penelitian pada *Nostoc commune* dari Artic Tundra menunjukkan nilai laju fiksasi nitrogen sebesar 220--23.700 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ (Liengen & Olsen 1997: 470). Nilai laju fiksasi nitrogen yang diperoleh dalam penelitian ini secara umum sesuai dengan beberapa penelitian terdahulu.

Delapan strain yang diuji menunjukkan nilai laju fiksasi nitrogen yang berbeda. Beberapa faktor yang dapat memengaruhi pertumbuhan strain *Nostoc* adalah medium, suhu, dan intensitas cahaya (Becker 1994: 9). Strain-strain *Nostoc* yang digunakan dalam penelitian ditumbuhkan pada medium BG 11 padat bebas unsur nitrogen. Strain *Nostoc* ditumbuhkan dalam cawan petri dan diinkubasi dalam ruang kultur pada suhu $23 \pm 2^\circ \text{C}$ dan intensitas cahaya sebesar ± 3000 luks selama 21 hari. Faktor-faktor yang memengaruhi pertumbuhan strain *Nostoc* telah dikondisikan sama. Dengan demikian, perbedaan nilai laju fiksasi nitrogen pada masing-masing strain *Nostoc* bukan disebabkan oleh perbedaan pertumbuhan strain.

Hasil pengamatan mikroskopik menempatkan strain *Nostoc* CPG24 sebagai strain dengan jumlah sel heterokis terbanyak. Meskipun demikian, strain *Nostoc* CPG24 menunjukkan nilai laju fiksasi nitrogen yang terendah pada 3 waktu inkubasi yang digunakan. Strain *Nostoc* BAD5 dan TAB7d memiliki jumlah sel heterokis yang sama, tetapi menunjukkan nilai laju fiksasi nitrogen yang berbeda.

Nilai laju fiksasi nitrogen tertinggi untuk strain *Nostoc* BAD5 adalah 1171,29 μmol , sedangkan nilai laju fiksasi nitrogen tertinggi untuk strain *Nostoc* TAB7d adalah 470,67 μmol . Strain *Nostoc* GIA12-02 dengan jumlah sel heterokis terkecil (32 buah) menunjukkan nilai laju fiksasi nitrogen yang tinggi, yaitu 3869,91 μmol . Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa jumlah sel heterokis pada masing-masing filamen strain *Nostoc* tidak memengaruhi laju fiksasi nitrogen pada strain *Nostoc* yang diteliti.

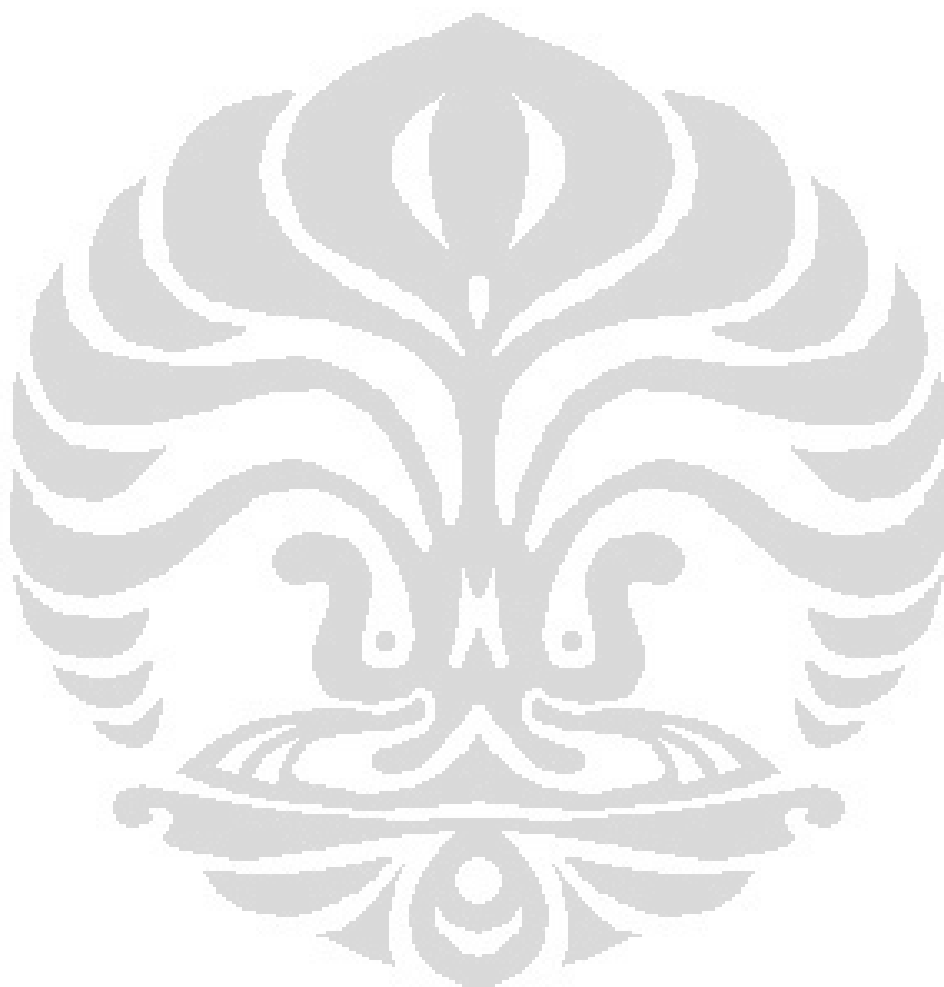
Hasil pengamatan mikroskopik menunjukkan bahwa ukuran sel heterokis lebih besar dibandingkan dengan ukuran sel vegetatif pada masing-masing strain *Nostoc* yang diteliti. Ukuran sel heterokis strain *Nostoc* GIA12-02 dan BTM6-02 lebih besar dibandingkan 6 strain *Nostoc* yang lain. Nilai laju fiksasi nitrogen kedua strain *Nostoc* tersebut juga lebih besar dibandingkan 6 strain yang lain.

Ukuran sel heterokis pada strain *Nostoc* CIM7 dan CPG8 relatif sama, bahkan pada beberapa filamen strain *Nostoc* CPG8 ditemukan sel heterokis dengan ukuran lebih besar. Nilai laju fiksasi nitrogen pada strain *Nostoc* CIM7 lebih tinggi dibandingkan laju fiksasi nitrogen strain *Nostoc* CPG8. Nilai laju fiksasi nitrogen strain *Nostoc* CIM7 dua kali lipat lebih besar dibandingkan nilai laju fiksasi nitrogen strain *Nostoc* CPG8 untuk masing-masing waktu inkubasi. Berdasarkan hasil pengamatan dapat disimpulkan bahwa ukuran sel heterokis pada masing-masing strain *Nostoc* yang diteliti tidak memengaruhi nilai laju fiksasi nitrogen yang diperoleh.

Fiksasi nitrogen bergantung pada fotosintesis dalam menyediakan ATP sebagai sumber energi dan komponen karbon sebagai donor elektron. Oleh karena itu, durasi dan laju fiksasi nitrogen bergantung pada kondisi yang memengaruhi fotosintesis dan ketersediaan karbon dalam sel, seperti kelembapan, suhu, dan intensitas cahaya (Belnap 2001: 243).

Barsanti & Gualtieri (2006: 165) melaporkan bahwa laju fiksasi nitrogen oleh mikroorganisme penambat nitrogen bergantung pada ketersediaan ATP dan aktivitas enzim nitrogenase. Penelitian lain oleh Hardy *dkk.* (1968: 1189) pada *Azotobacter* mengungkapkan hubungan antara laju reduksi asetilen dengan konsentrasi enzim nitrogenase. Penelitian tersebut menunjukkan terdapat hubungan linier antara laju reduksi asetilen dengan konsentrasi enzim nitrogenase

pada spesies yang diujikan. Berdasarkan penelitian tersebut, ada kemungkinan perbedaan laju fiksasi nitrogen masing-masing strain *Nostoc* yang diujikan pada penelitian ini dipengaruhi oleh konsentrasi enzim nitrogenase.



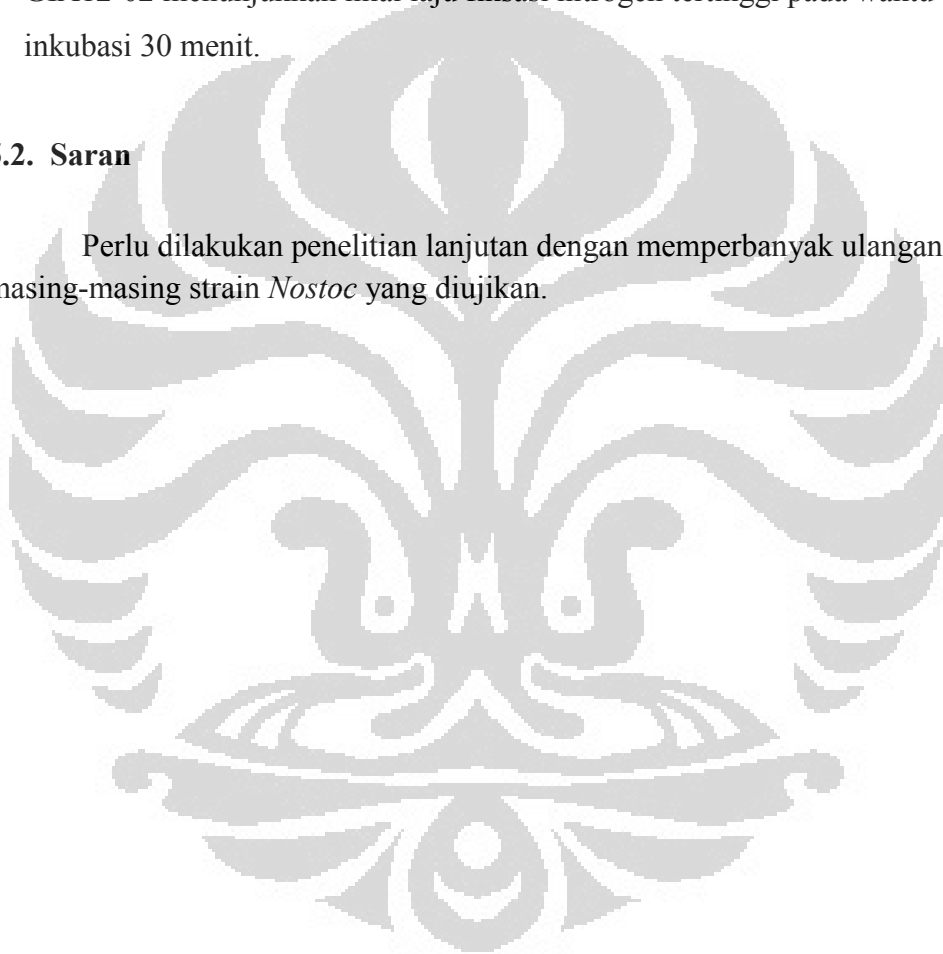
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

1. Strain *Nostoc* yang diujikan menunjukkan nilai laju fiksasi nitrogen bervariasi.
2. Enam strain *Nostoc* (75%) yaitu, CPG24, TAB7d, GIA13a, CPG8, CIM7, dan GIA12-02 menunjukkan nilai laju fiksasi nitrogen tertinggi pada waktu inkubasi 30 menit.

5.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan memperbanyak ulangan untuk masing-masing strain *Nostoc* yang diujikan.



DAFTAR REFERENSI

- Adhikary, S. P. & B. Pattanaik. 2006. Cyanobacterial biofertilizers for rice: present and future prospects. *Dalam: Rai, M.K (ed.). 2006. Handbook of microbial biofertilizers*. The Haworth Press, Inc. New York: 433--450.
- Banerjee, M., A. Sharma & T. Thomas. 1997. Short communication: Potential use of lake Cyanobacterial biomass as fertilizer for the cultivation of food crops. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **13**: 595--596.
- Barney, B. M., J. McClead., D. Lukoyanov., M. Laryukhin., T. C. Yang., D. R. Dean., B. M. Hoffman & L. C. Seefeldt. 2007. Diazene (HN=NH) is a substrate for nitrogenase:insight into the pathway of N₂ reduction. *Biochemistry*. **23**(46): 6784--6794.
- Barsanti, L. & P. Gualtieri. 2006. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. Taylor & Francis Group, USA: 301 hlm.
- Becker, E. W. 1994. *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press, United States: vii + 293 hlm.
- Belnap, J. 2001. 19 Factors influencing nitrogen fixation and nitrogen release in biological soil crusts. *Dalam: Belnap, J. & O. L. Lange (eds.). 2001. Biological soil crusts: structure, function, and management*. Ecological studies **150**: 241--261.
- Bohme, H. 1998. Regulation of nitrogen fixation in heterocyst-forming cyanobacteria. *Elsevier Science Ltd*. **3**(9): 346--351.
- Boonkerd, N., N. Teaumroong., S. Innok & S. Chunleuchanon. 2002. Diversity of nitrogen-fixing cyanobacteria under various ecosystems of Thailand: I.Morphology, physiology and genetic diversity. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **18**: 673--682.
- Darley, W. M. 1982. *Algal biology: a physiological approach*. Blackwell Scientific Publications, London: viii + 168 hlm.
- Dembitsky, V. M & T. Rezanka. 2005. Metabolites produced by nitrogen-fixing *Nostoc* species. *Folia Microbiol.* **50**(5): 363--391.
- Fay, P. 1992. Oxygen relations of nitrogen fixation in Cyanobacteria. *Microbiological Reviews* **56**: 340--373.

- Feng, J. 2005. *From acetylene to ethylene*. 1 hlm.
<http://umbbd.ethz.ch/servlets/pageservlet?ptype=r&reacID=r0592>, 29
 September 2011, pk. 13.35.
- Fogg, G. E., W. D. P. Stewart., P. Fay., A. E. Walsby. 1973. *The blue-green algae*. Academic Press, New York: vii + 459 hlm.
- Gao, K. 1998. Chinese studies on edible blue-green algae, *Nostoc flagelliforme*: a review. *Journal of Applied Phycology*. **10**: 37--49.
- George, T. B. & J. J. Delfino. 1982. *Determination of total kjeldahl nitrogen and total phosphorus in surface waters and wastewaters*. **54**(9): 1324--1330
- Graham, L. E. & L. W. Wilcox. 2000. *Algae*. Prentice-Hall, Inc., New York: xvi + 640 hlm.
- Gurung, S & B. N. Prasad. 2005. Azolla and Cyanobacteria (BGA): Potential biofertilizer for rice. *Scientific World*. **3**(3): 85--89.
- Halbleib, C. M & P. W. Ludden. 2000. Regulation of biological nitrogen fixation. *The Journal of Nutrition*. ?.1081--1084.
- Hardy, R. W. F., R. D. Holsten., E. K. Jackson & R. C. Burns. 1968. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant physiol*. **43**: 1185--1207.
- Hawkes, C. 2001. Acetylene reduction method for measuring nitrogenase activity tested by Christine Hawkes 2001. ?: 3 hlm.
http://www.biosci.utexas.edu/IB/faculty/hawkes/lab/protocols/acetylene_reduction.pdf, 14 Juli 2010, pk. 14.10.
- Hellebust, J. A & J. S. Craigie. 1978. *Handbook of phycological methods: physiological and biochemical methods*. Cambridge University Press, Australia: xiv + 512 hlm.
- Hoshaw, R. W. & R. Rosowski. 1979. Methods for microscopic algae. *Dalam*: Stein, J. R. (ed.). 1979. *Handbook of phycological methods: Culture methods and growth measurement*. Cambridge University Press, Cambridge: 160--167.
- Hubbell, D. H & G. Kidder. 2003. Biological nitrogen fixation. University of Florida: 1--4.

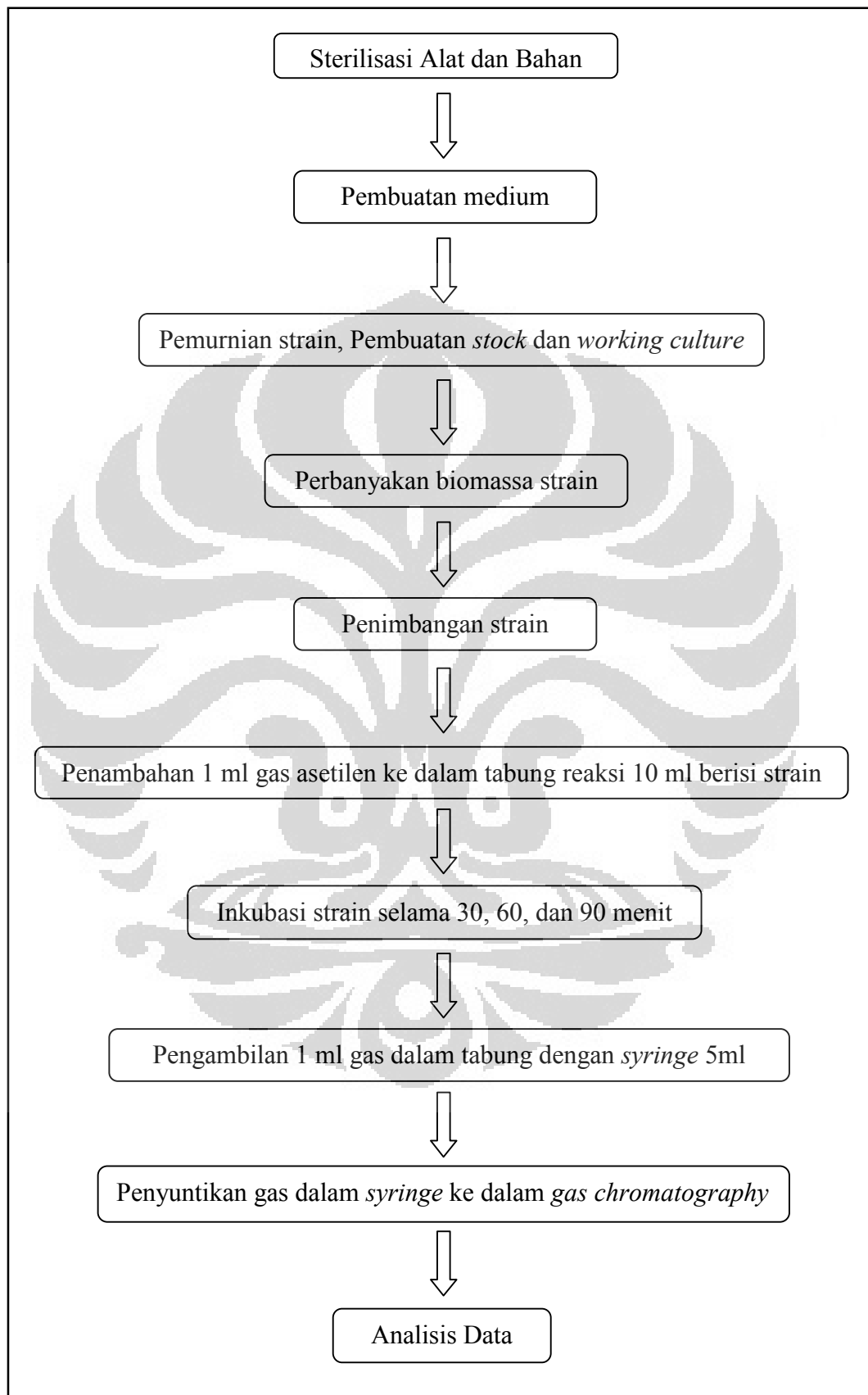
- Irrisari, P. 2006. Role of cyanobacteria as biofertilizer: potentials and limitations. *Dalam: Rai, M. K. (ed.). 2006. Handbook of microbial biofertilizers*. The Haworth Press, Inc. New York: 417--429.
- Jensen, B. B & R. P. Cox. 1983. Direct measurement of steady-state kinetics of cyanobacterial N₂ uptake by membrane-leak mass spectrometry and comparisons between nitrogen fixation and acetylene reduction. *Applied and environmental microbiology*. **45**(4): 1331--1337.
- Kim, J. D. & C. G. Lee. 2005. Diversity of heterocystous filamentous Cyanobacteria (Blue-green algae) from rice paddy fields and their differential susceptibility to ten fungicides used in Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **16**(2): 240--246.
- Kumar, H. D. 1985. *Algal Cell Biology*. Affiliated East-West Press Pvt Ltd., New Delhi: viii + 201 hlm.
- Kumar, K., R. A. M. Herrera & J. W. Golden. 2010. Cyanobacterial heterocysts. *Cold spring harbor perspectives in biology*: 1--14.
- Lee, R. E. 2008. *Phycology*. 4th ed. Cambridge University Press, USA: xi + 547 hlm.
- Liengen, T & R. A. Olsen. 1997. Nitrogen fixation by free-living Cyanobacteria from different coastal sites in a high arctic tundra, Spitsbergen. *Arctic and Alpine Research*. **29**(4): 470--477.
- Lindblad, P., C. A. Atkins. & J. S. Pate. 1991. N₂-fixation by freshly isolated *Nostoc* from coralloid roots of the Cycad *Macrozamia riedlei* (Fisch. Ex Gaud.) Gardn. *Plant physiol.* **95**: 753--759.
- Lund, H. C & J. W. Lund. 1995. *Freshwater algae: their microscopic world explored*. Biopress Ltd, Hongkong: xv + 360 hlm.
- Maldener, I & A. M. M. Pastor. 2010. Cyanobacterial heterocysts. *Encyclopedia of life sciences*: 1--10.
- Marschner, H. 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. 2nd ed. Academic Press Limited: xv + 862 hlm.
- Matsuguchi, T., T. Shimomura & S. K. Lee. 1977. Factor regulating acetylene reduction assay for measuring heterotrophic nitrogen fixation in water-logged soils. *Society of Soil Science and Plant Nutrition*, **25**(3): 323--336.

- Moghadam, A. A & B. Nowruzi. 2008. A new report of N fixation by two species of cyanobacteria. *Iranian Journal of Science & Technology*, **32**(A2): 147--151.
- Morris, I. 1974. Nitrogen assimilation and protein synthesis. *Dalam: Stewart, W.D.P. 1974. Botanical monograph: Algal physiology and biochemistry. Volume 10. University of California Press, London: 583--603.*
- Mc Nair, H. M & E. J. Bonelli. 1988. *Basic gas chromatography*. 5th ed. John Wiley & Sons. Inc. Kanada: 13a + 249 hlm.
- Mc Nair, H. M & J. M. Miller. 1998. *Basic gas chromatography*. John Wiley & Sons. Inc. Kanada: xii + 193 hlm.
- Nilsson, M., J. Bhattacharya, A. N. Rai & B. Bergman. 2002. Colonization of roots of rice (*Oryza sativa*) by symbiotic *Nostoc* strains. *New Phytologist*. **156**(3): 517--525.
- Pandey, S. N & P. S. Trivedi. 1977. *A textbook of botany: algae, fungi, bacteria, mycoplasmas, viruses, lichens and elementary plant pathology*. 10th ed. Vikas publishing house Pvt Ltd, New Delhi: 1--613.
- Parker, S.P. 1997. *Mc Graw Hill dictionary of physics*. 2nd ed. McGraw Hill Book Company, USA: xiii + 498 hlm.
- Pereira, I., M. Moya., G. Reyes & V. Kramm. 2005. A survey of heterocystous nitrogen-fixing cyanobacteria in Chilean rice fields. *Gayana Bot.* **61**(2): 26--32.
- Pereira, I., R. Ortega., L. Barrientos., M. Moya., G. Reyes. & V. Kramm. 2009. Development of a biofertilizer based on filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria for rice crops in Chile. *Journal Applied Phycology* **21**: 135--144.
- Postgate, J. R. 1982. *The fundamentals of nitrogen fixation*. Cambridge University Press, London: x + 252 hlm.
- Potts, M. 2000. *Nostoc*. *Dalam: Whitton, B. A & M. Potts (eds.). 2000. The ecology of Cyanobacteria: their diversity in time and space. Kluwer Academic Publishers, Netherland: 465--498.*
- Prosperi, C. H. 2006. A comparative study on nitrogen-fixing cyanobacteria in south American and European rice fields. *Dalam: Rai, M.K (ed.). 2006.*

- Handbook of microbial biofertilizers*. The Haworth Press, Inc. New York: xxv + 579 hlm.
- Reporter, M. 1985. Nitrogen Fixation. *Dalam*: J. Coombs., D. O. Hall., S. P. Long., J. M. O. Scurlock. 1985. *Techniques in bioproductivity and photosynthesis*. 2nd ed. Pergamon Press: 158--187.
- Roger, P. A. 1982. Blue-green algae in rice fields: their ecology and their use as inoculant. *International Atomic Energy Agency*: 99--117.
- Roger, P. A & S. A. Kulasooriya. 1980. *Blue green algae and rice*. The International Rice Research Institute, Filipina: 108 hlm.
- Saadatnia, H & H. Riahi. 2009. Cyanobacteria from paddy fields in Iran as a biofertilizer in rice plants. *Plant Soil Environment*. **55**(5): 207--212.
- Sah, P. 2008. Understanding the physiology of heterocyst and nitrogen fixation in cyanobacteria or blue-green algae. *Nature and Science*. **6**(1): 28--33.
- Seitzinger, S. P. & J. H. Garber. 1987. Nitrogen fixation and $^{15}\text{N}_2$ calibration of the acetylene reduction assay in coastal marine sediments. *Marine Ecology-Progress Series*. **37**: 65--73.
- Simanungkalit, R. D. M., D. A. Suriadikarta, R. Saraswati, D. Setyorini & W. Hartatik. 2006. *Pupuk Anorganik dan Pupuk Hayati*. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Sumberdaya Lahan Pertanian, Bogor: iii + 283 hlm.
- Stewart, W. D. P., G. P. Fitzgerald & R. H. Burris. 1967. In situ studies on N_2 fixation using acetylene reduction technique. *Proc. N. A. S.* **58**: 2071--2078.
- Stewart, W. D. P. 1969. Biological and ecological aspect of nitrogen fixation by free-living microorganism. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. **172**: 367--388.
- Stewart, W. D. P. 1980. Systems involving blue green algae (Cyanobacteria). *Dalam*: Bergersen, F. J. (ed.). 1980. *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*. John & Wiley Sons, Ltd., New York: 583--635.
- Thiel, T. 2004. Nitrogen fixation in heterocyst-forming cyanobacteria. *Dalam*: W. Klipp, B. Masepohl, J. R. Gallon and W. E. Newton (eds.). *Genetics and Regulation of Nitrogen Fixation in Free-Living Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands: 73--110.

- Vaishampayan, A., R. P. Sinha., D. P. Hader., T. Dey., A. K. Gupta., U. Bhan., & A. L. Rao. 2001. Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture. *The Botanical Review* **67**(4): 453--516.
- Vashishta, B. R. 1999. *Botany for degree students: algae*. S. Chand & Company Ltd. New Delhi: viii + 456 hlm.
- Wade, L. G. Jr. 1997. Separating and identifying mixtures by gas chromatography. *Chemical Education Resources*: 10--12.
- Watanabe, M. M. 2005. Cultures as a means of protecting biological resources: Ex situ conservation of threatened algal species. *Dalam*: Andersen, R. A. (ed.). 2005. *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press, Amsterdam: 419--428.
- Whitton, B. A., & P. A. Roger. 1989. Use of blue green algae and *Azolla* in rice culture. *Society for General Microbiology* **25**: 1--11.
- Whitton, B. A. 2000. Soils and rice fields. *Dalam*: Whitton, B. A & M. Potts (eds.). 2000. *The ecology of Cyanobacteria: their diversity in time and space*. Kluwer Academic Publishers, Netherland: 233--255.
- Whitton, B. A. 2002. Phylum Cyanophyta (Cyanobacteria). *Dalam*: John, D. M., B. A. Whitton & A. J. Brook. (eds.). 2002. *The freshwater algal flora of British Isles: Identification guide to freshwater and terrestrial algae*. Cambridge University Press, New York: 105--109.
- Wolk, C. P. 1973. Physiology and cytological chemistry of blue green algae. *Bacteriological Reviews* **37**: 32--101.
- Yuliana, P. 2009. Karakterisasi morfologi dan molekuler isolat-isolat *Nostoc* [Vaucher 1803] Bornet *et* Flauhalt 1886 dari tanah persawahan di Indonesia berdasarkan sekuen parsial gen 16S rRNA. Skripsi S1. Jurusan Biologi FMIPA UI, Depok: xiii + 119 hlm.

Lampiran 1. Skema Kerja Penelitian

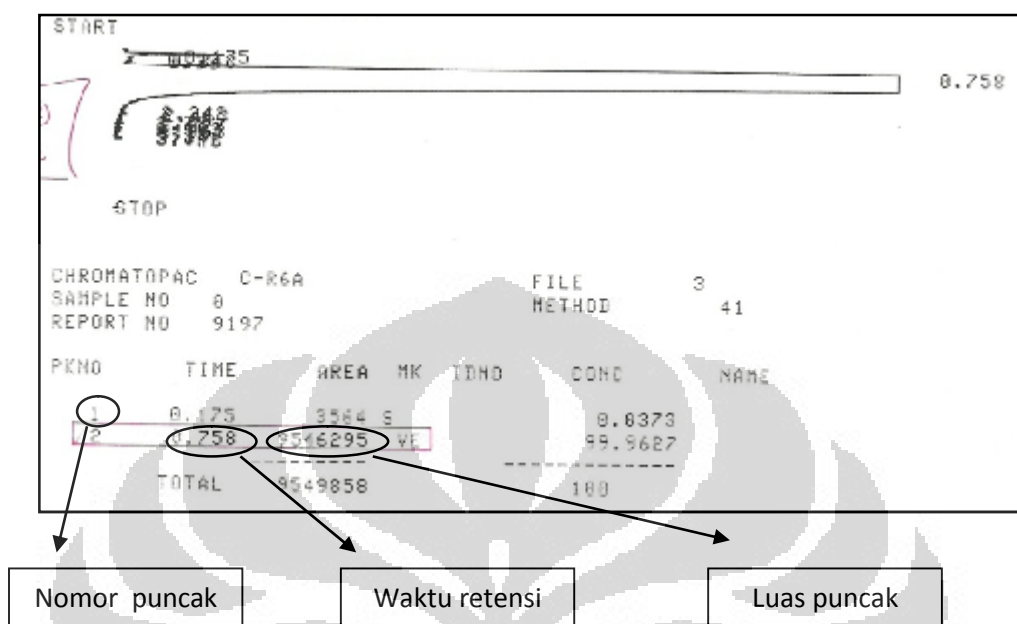


Lampiran 2. Panduan Warna Castell-Polychromos No.9216

PANDUAN WARNA CASTELL-POLYCHROMOS NO. 9216		
 101 Putih	 136 Ungu loh	 171 Hijau muda
 104 Kuning	 137 Ungu terung	 173 Hijau zaitun
 105 Kuning langsung	 139 Ungu muda	 174 Hijau cemara
 106 Kuning kunyit	 141 Biru Delft	 175 Sepia
 107 Kuning limau	 144 Biru kobalt muda	 176 Coklat
 108 Kuning kepndang	 146 Biru langit	 180 Coklat jangat
 109 Kuning jenar	 147 Biru muda	 182 Hartal coklat
 113 Jingga muda	 148 Biru jelah	 183 Hartal emas
 115 Jingga tua	 149 Biru Cina	 184 Hartal
 117 Merah merona	 150 Biru Berlin	 187 Hartal rentung
 118 Merah marak	 151 Biru Prusia	 189 Kayu manis
 121 Merah dadu	 153 Biru merak	 190 Merah Venesia
 124 Merah serah mawar	 155 Batu	 191 Merah Pompei
 126 Merah serah tua	 159 Hijau rumput	 192 Merah Indian
 127 Merah serah muda	 161 Hijau tembaga	 194 Lembayung
 128 Merah mengkudu mawar	 162 Hijau jelah	 195 Abu-abu muda
 129 Merah mengkudu jambon	 163 Hijau zamrud	 196 Abu-abu perak
 131 Merah daging medium	 157 Hijau gelah	 197 Nilajada
 133 Merah anggur	 158 Hijau lumut	 198 Hitam sabak
 134 Merah lembayung	 170 Hijau apel	 199 hitam

Lampiran 3

Cara Pembacaan Kromatogram dan Hasil Rekapitulasi Kromatogram



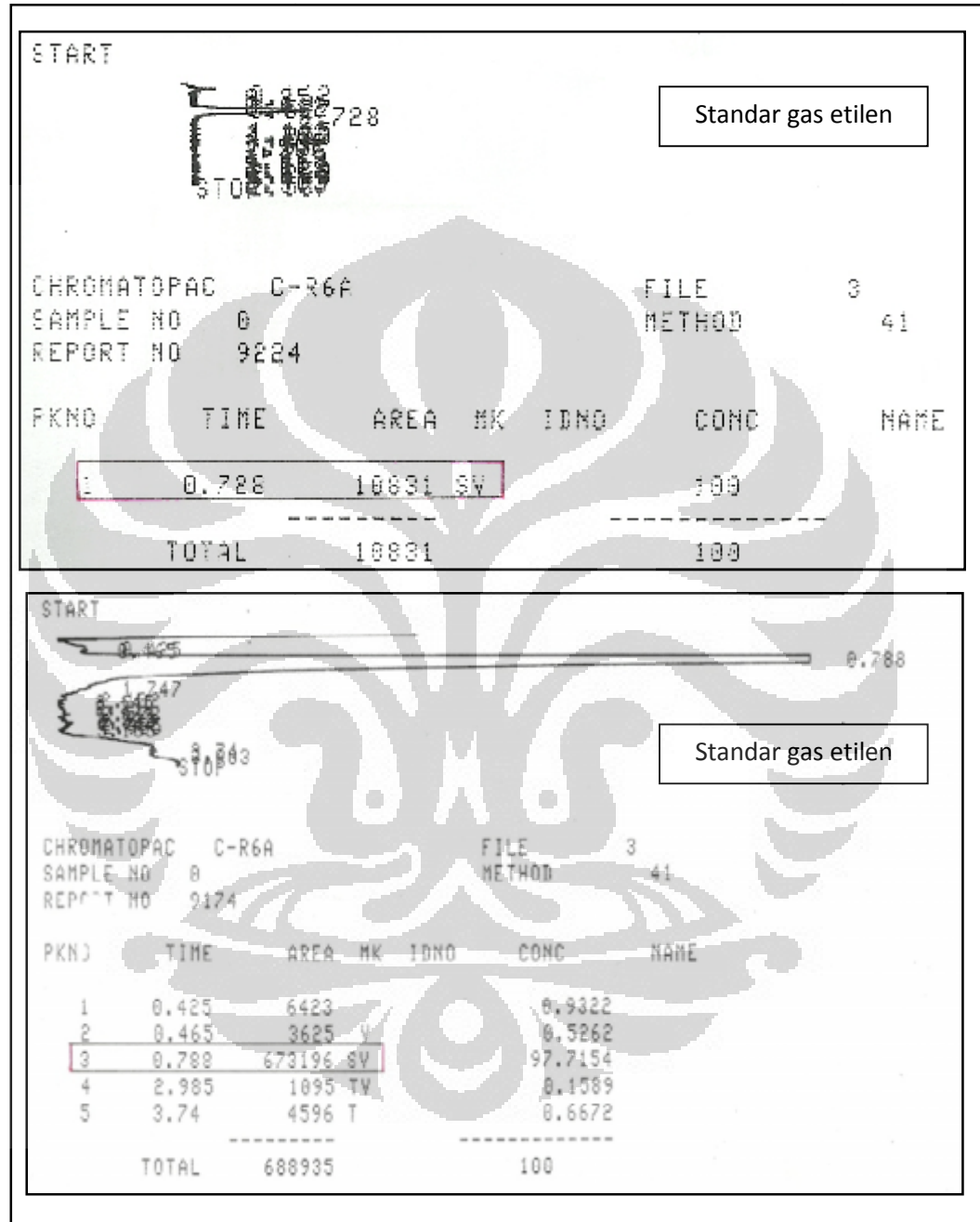
Luas puncak standar yang digunakan: 10.831

No	Isolat	Ulangan	Biomassa (gram)	Luas puncak pada waktu inkubasi		
				30 menit	60 menit	90 menit
1	TAB7	1	0,1087	69.992	42.873	30.615
2		2	0,1053	57.446	54.371	52.652
3	GIA13a	1	0,0745	51.096	27.045	26.009
4		2	0,0743	57.674	42.078	33.887
5	GIA12.02	1	0,0689	263.025	91.339	160.895
6		2	0,0699	416.789	294.069	423.980
7	BTM6.02	1	0,1042	164.426	293.909	258.897
8		2	0,1023	660.044	717.798	682.821

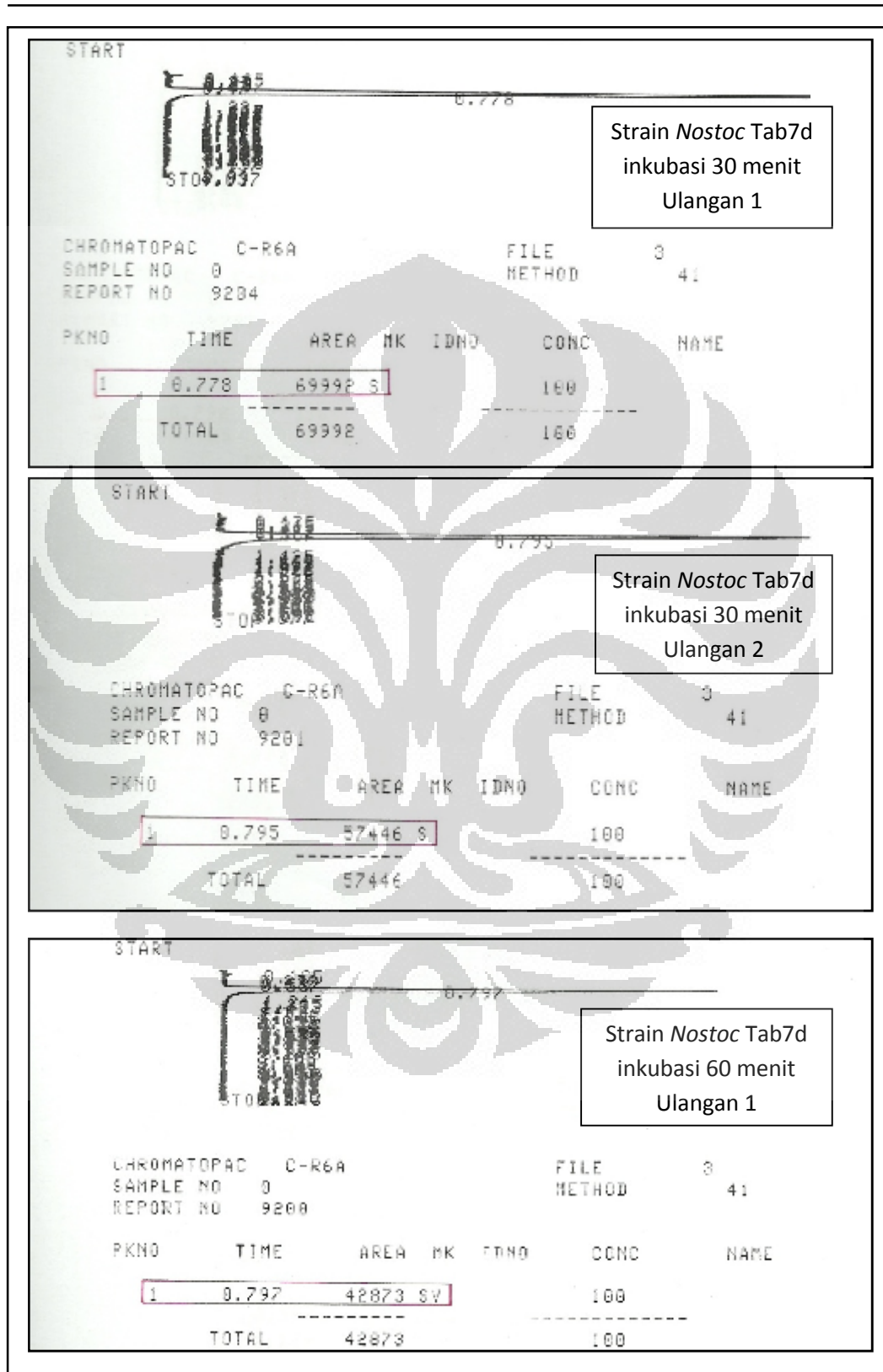
Luas puncak standar yang digunakan: 673.196

No	Isolat	Ulangan	Biomassa (gram)	Luas puncak pada waktu inkubasi		
				30 menit	60 menit	90 menit
1	CPG24	1	0,0558	15.496.460	14.924.273	13.632.827
2		2	0,0561	14.457.366	14.111.468	12.063.231
3	CIM7	1	0,0578	12.552.468	12.019.480	11.638.772
4		2	0,0553	12.938.444	12.741.948	11.504.641
5	CPG8	1	0,1064	10.291.104	10.177.342	9.714.709
6		2	0,1035	10.803.810	10.023.021	9.636.616
7	BAD5	1	0,1084	9.158.667	9.152.678	7.920.006
8		2	0,1087	9.980.871	10.821.107	9.546.295

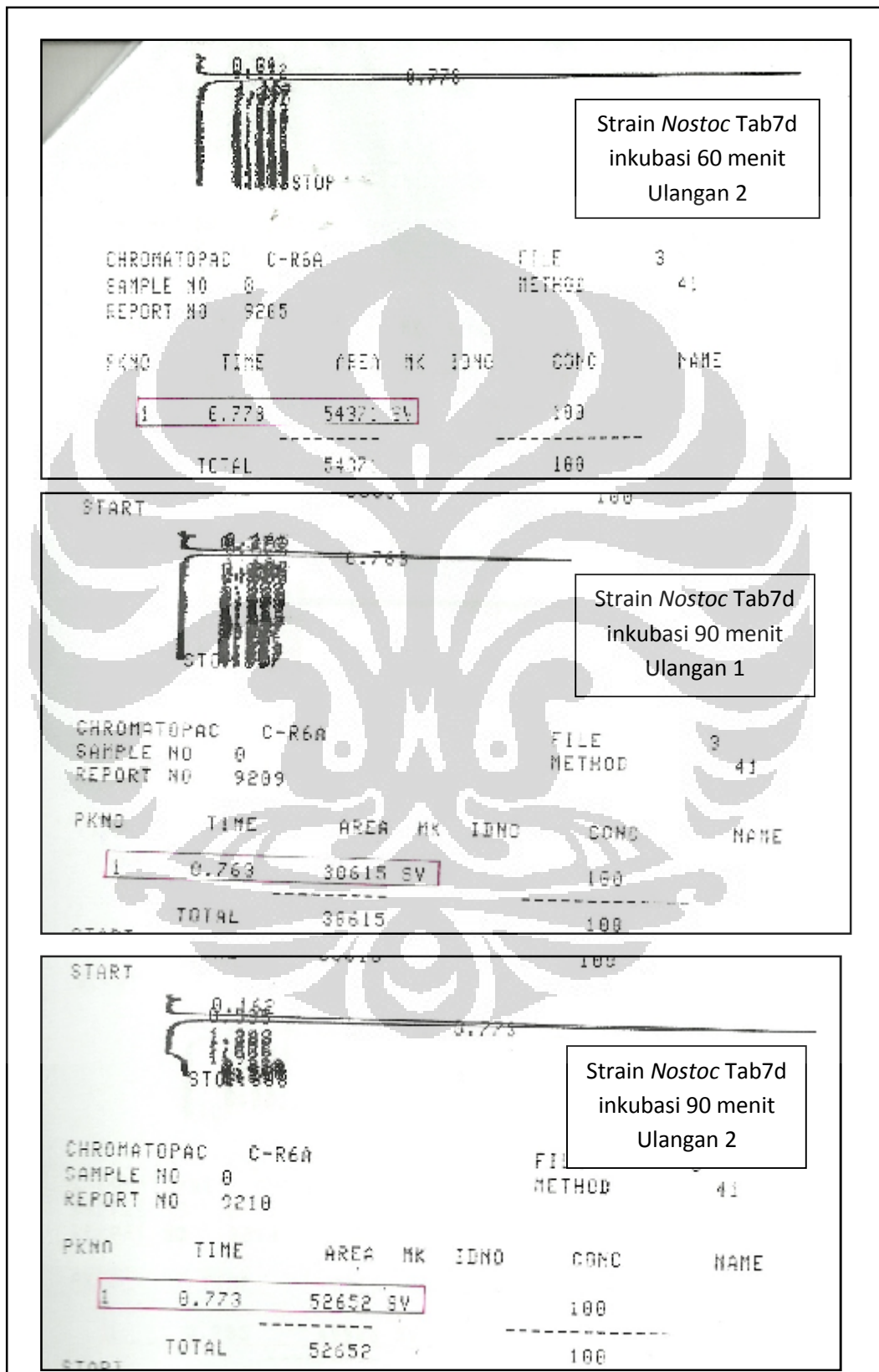
Lampiran 4
Kromatogram Gas Etilen Sebagai Standar



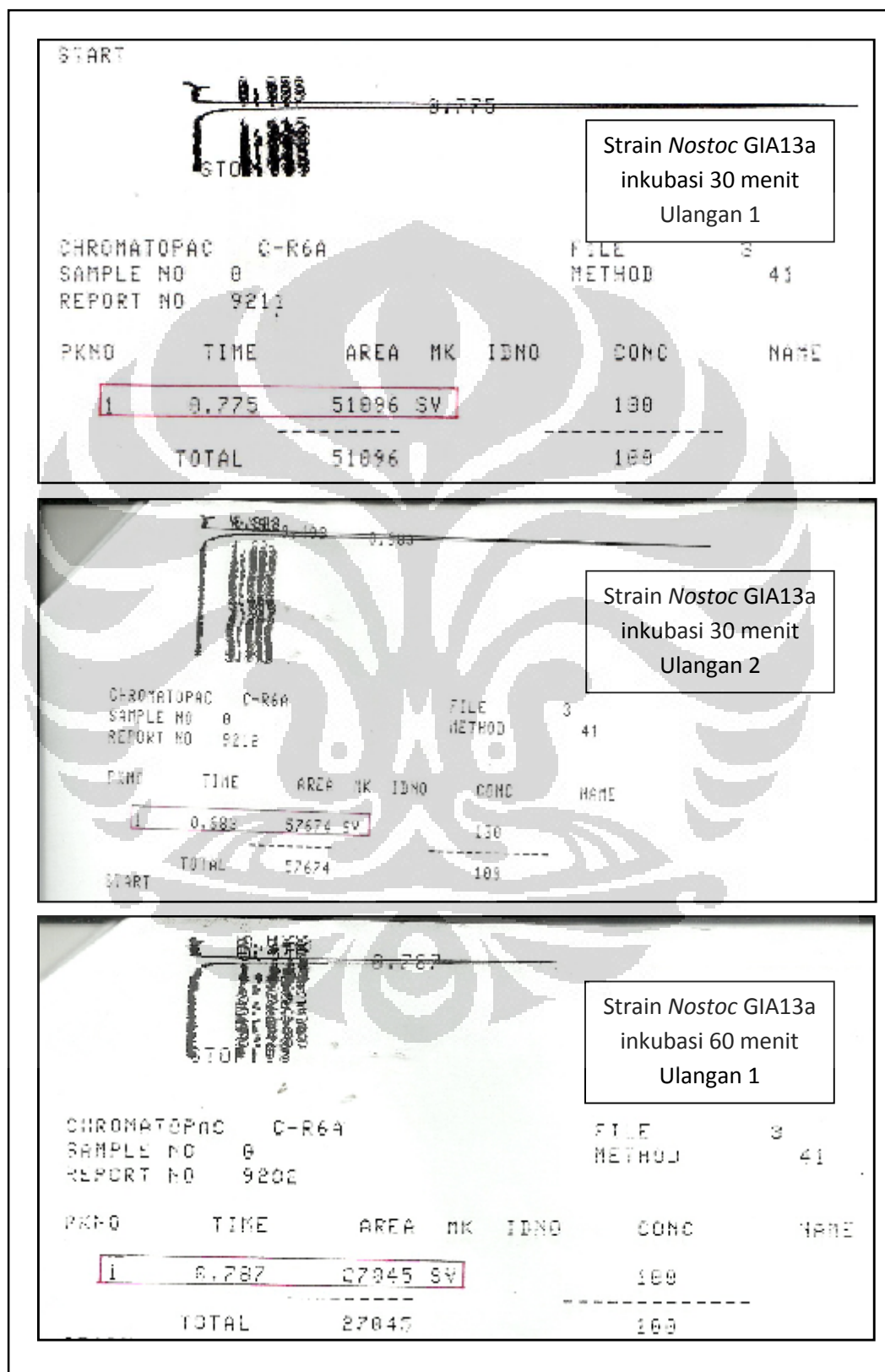
Lampiran 5
Kromatogram strain *Nostoc* TAB7d



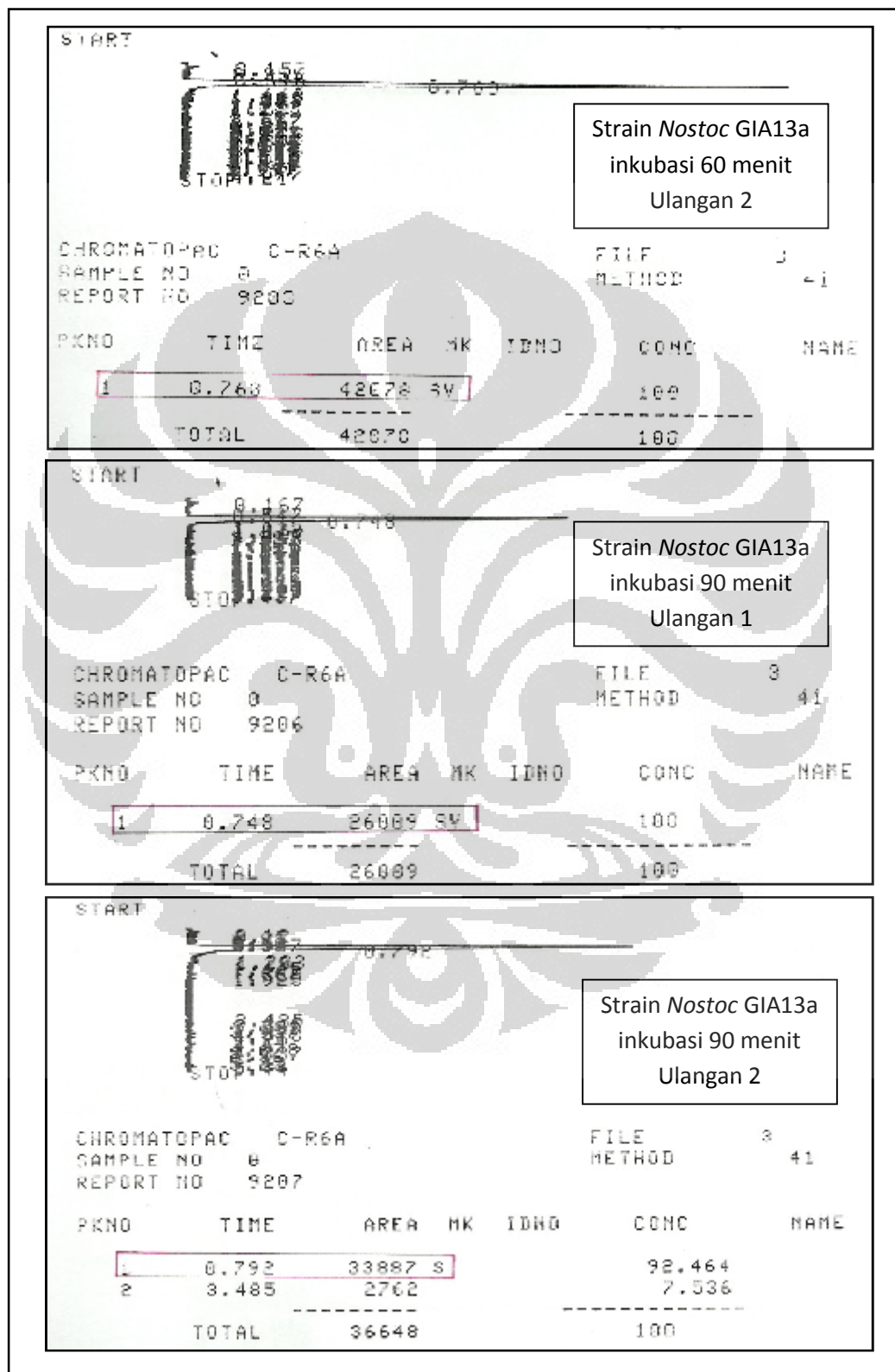
Lampiran 6
Kromatogram strain *Nostoc* TAB7d



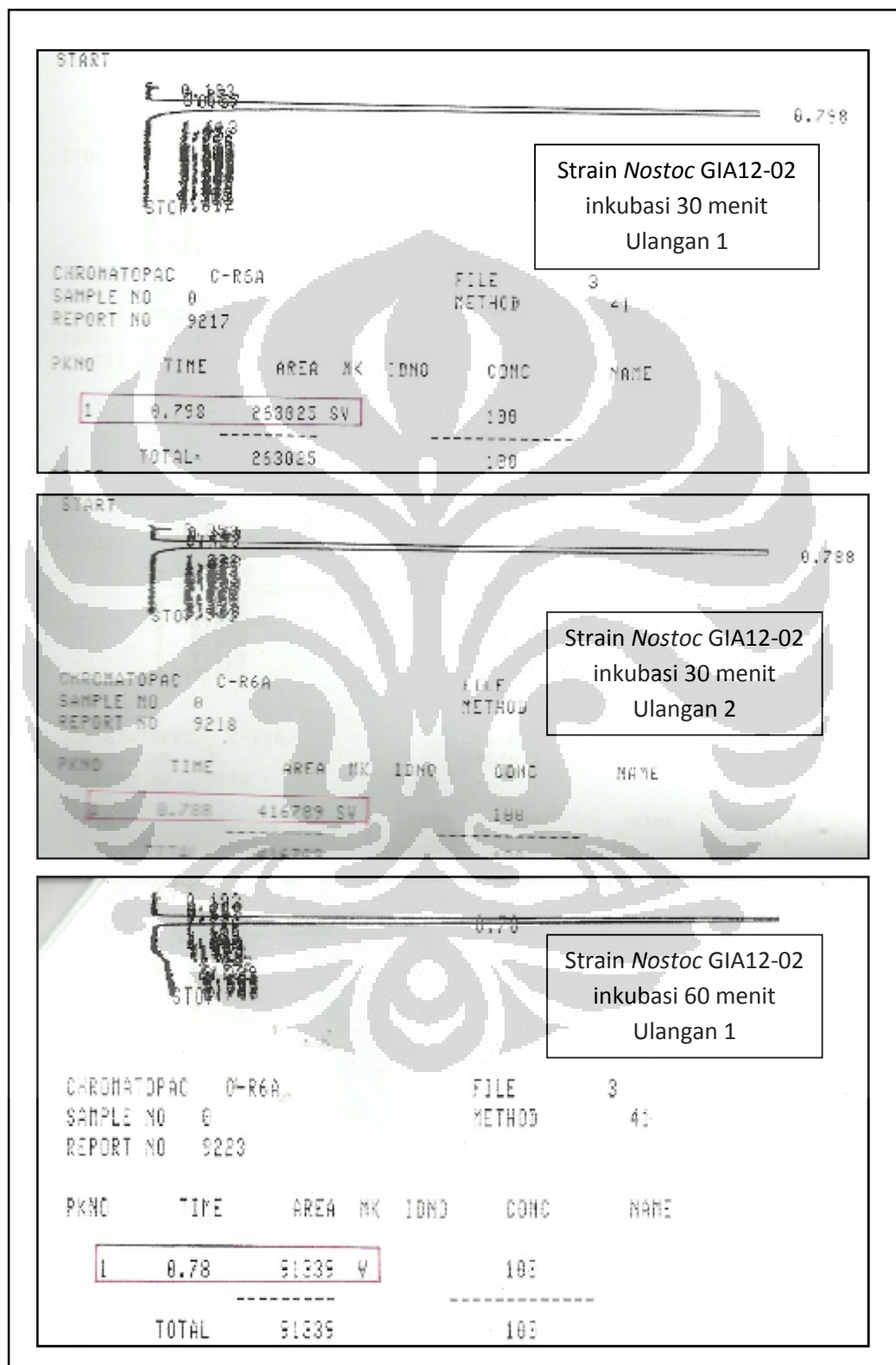
Lampiran 7
Kromatogram strain *Nostoc* GIA13a



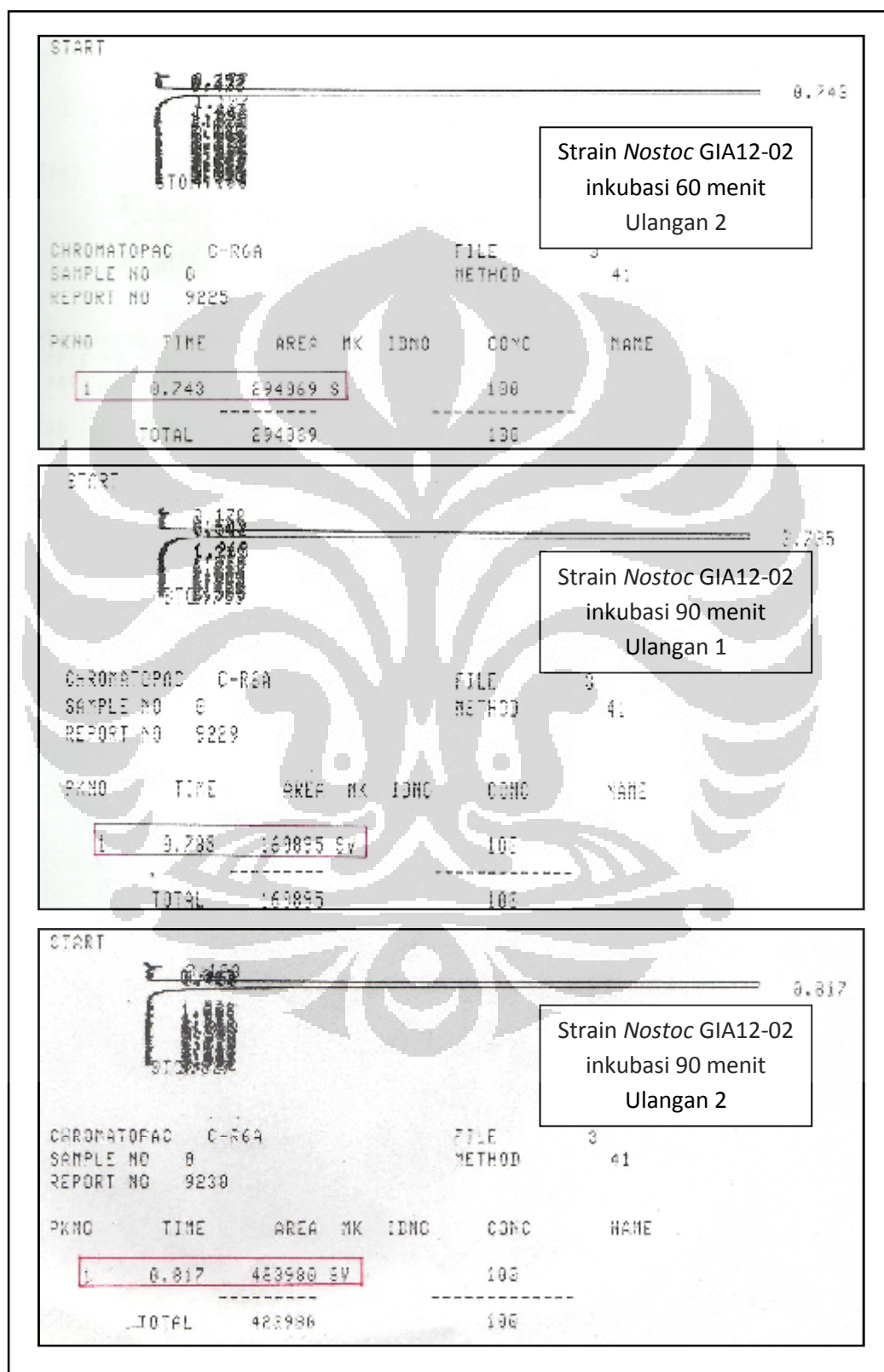
Lampiran 8
Kromatogram strain *Nostoc* GIA13a



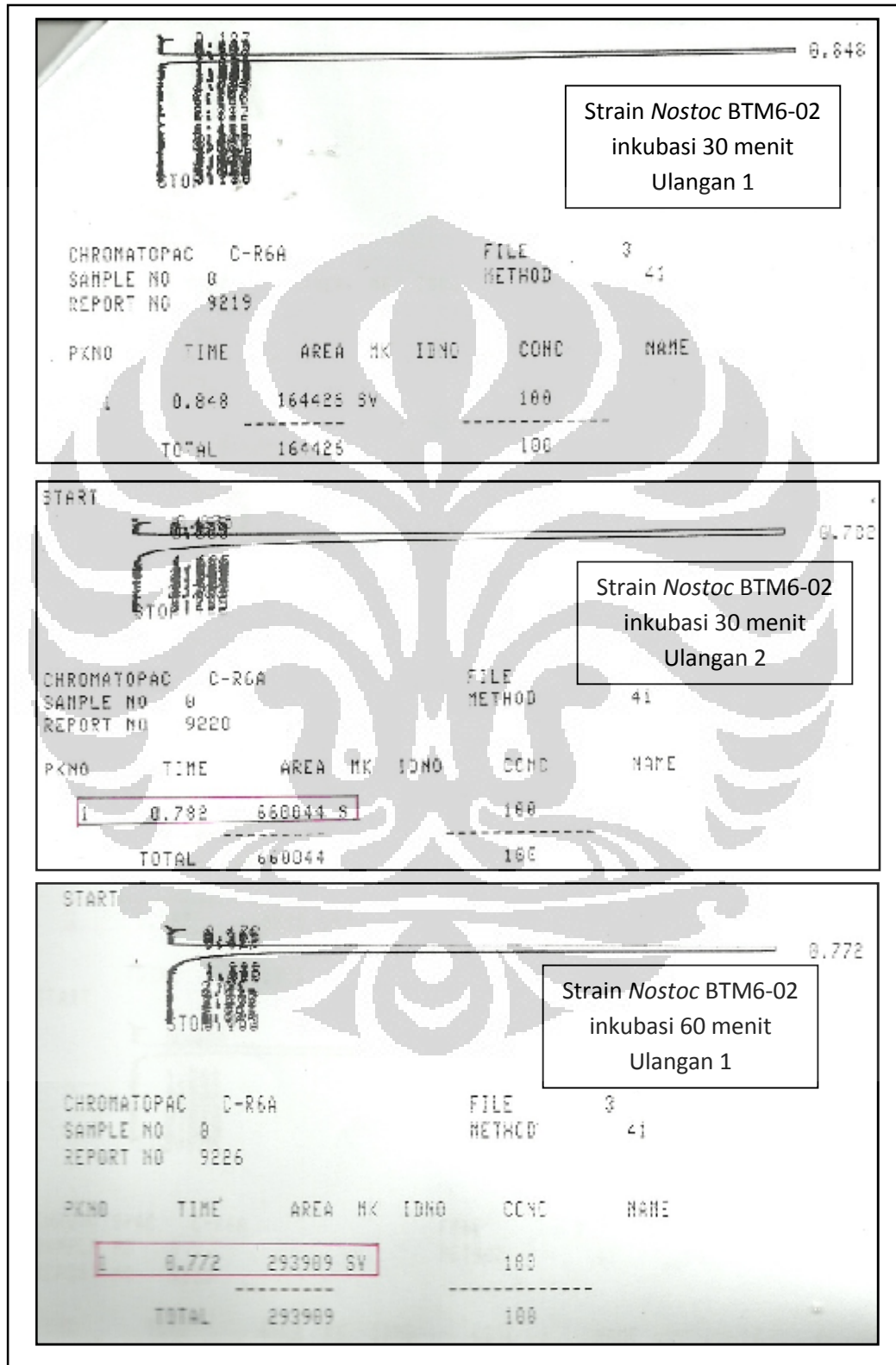
Lampiran 9
Kromatogram strain *Nostoc* GIA12-02



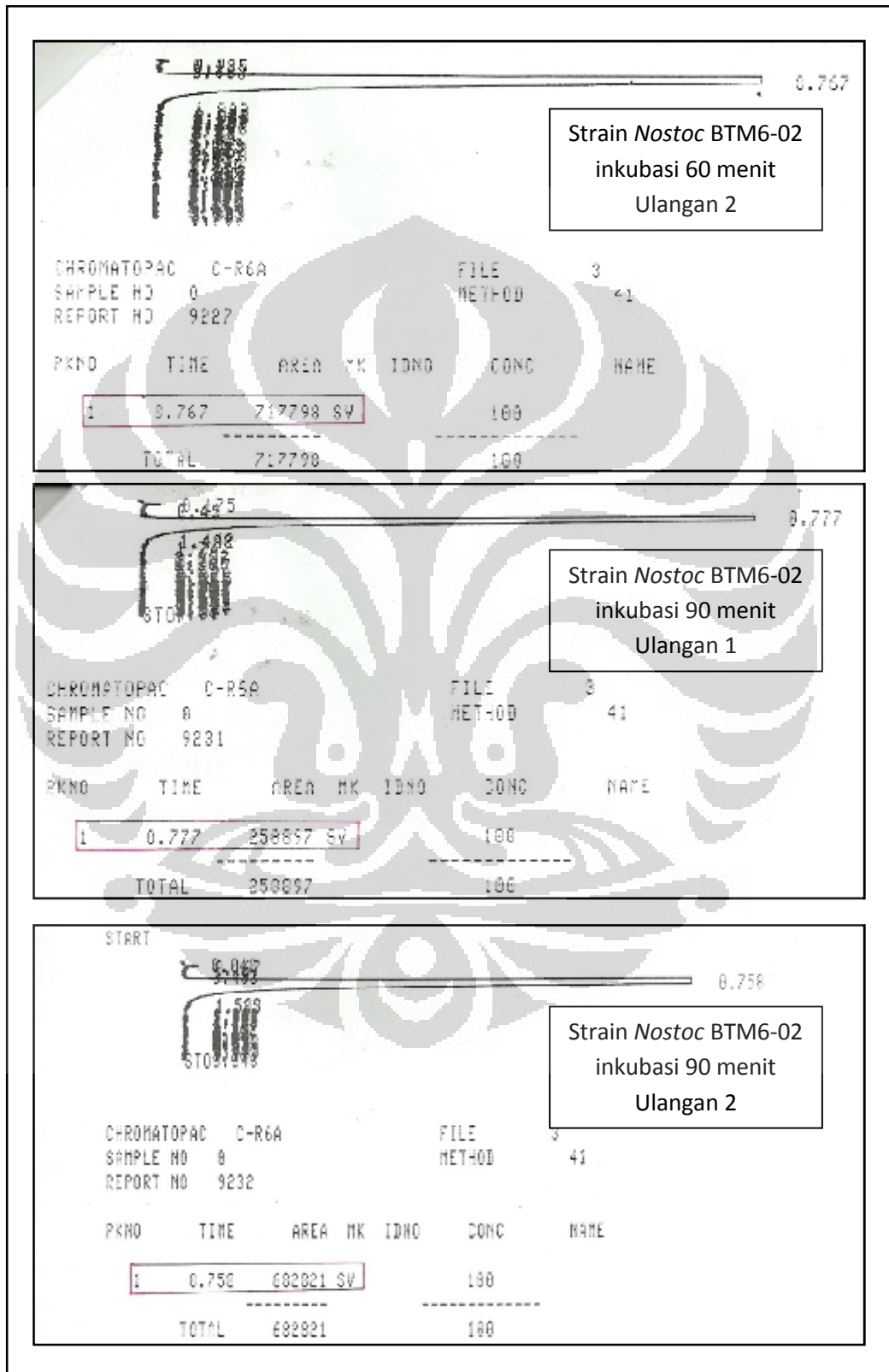
Lampiran 10
Kromatogram strain *Nostoc* GIA12-02



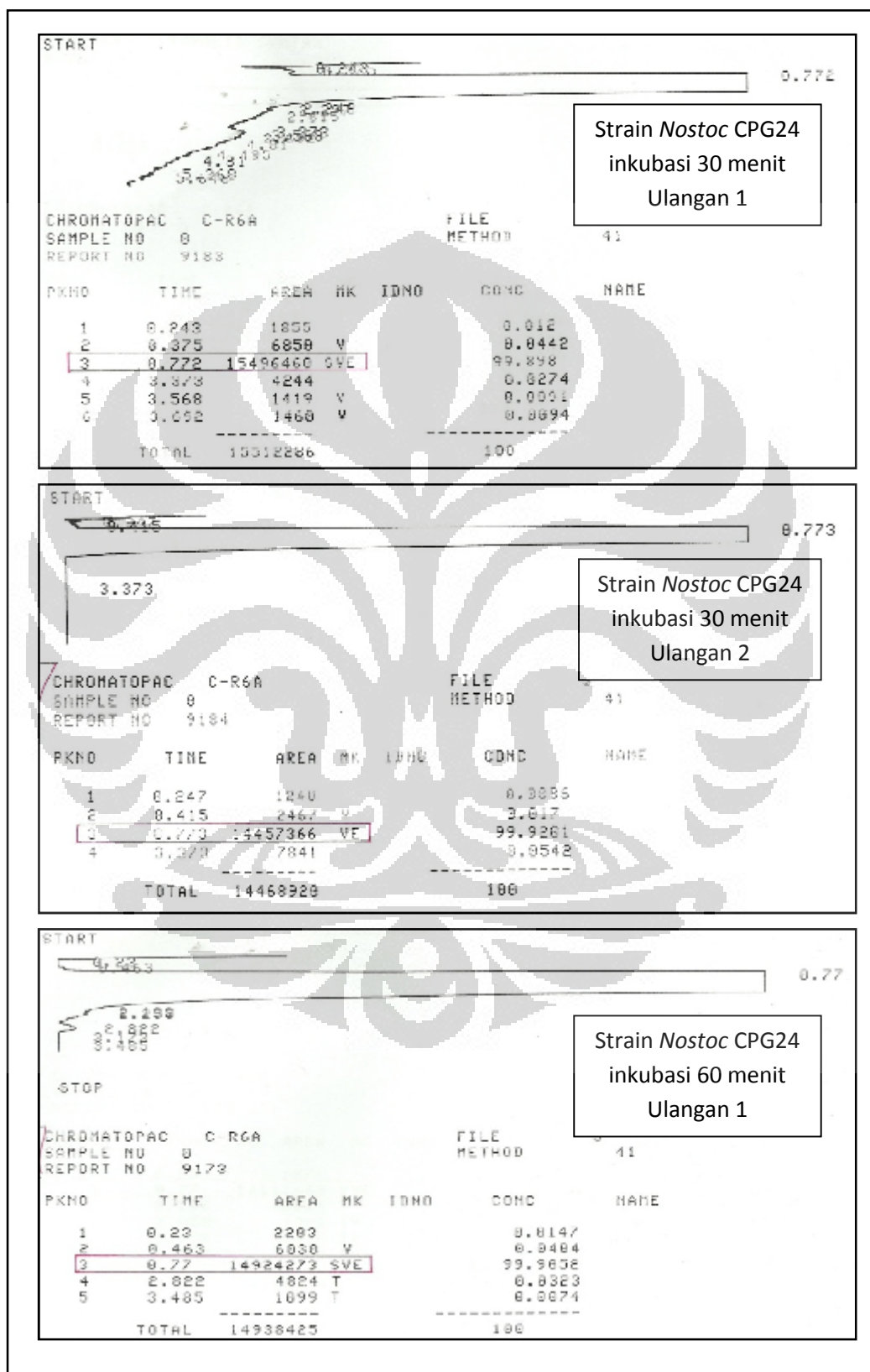
Lampiran 11
Kromatogram strain *Nostoc* BTM6-02



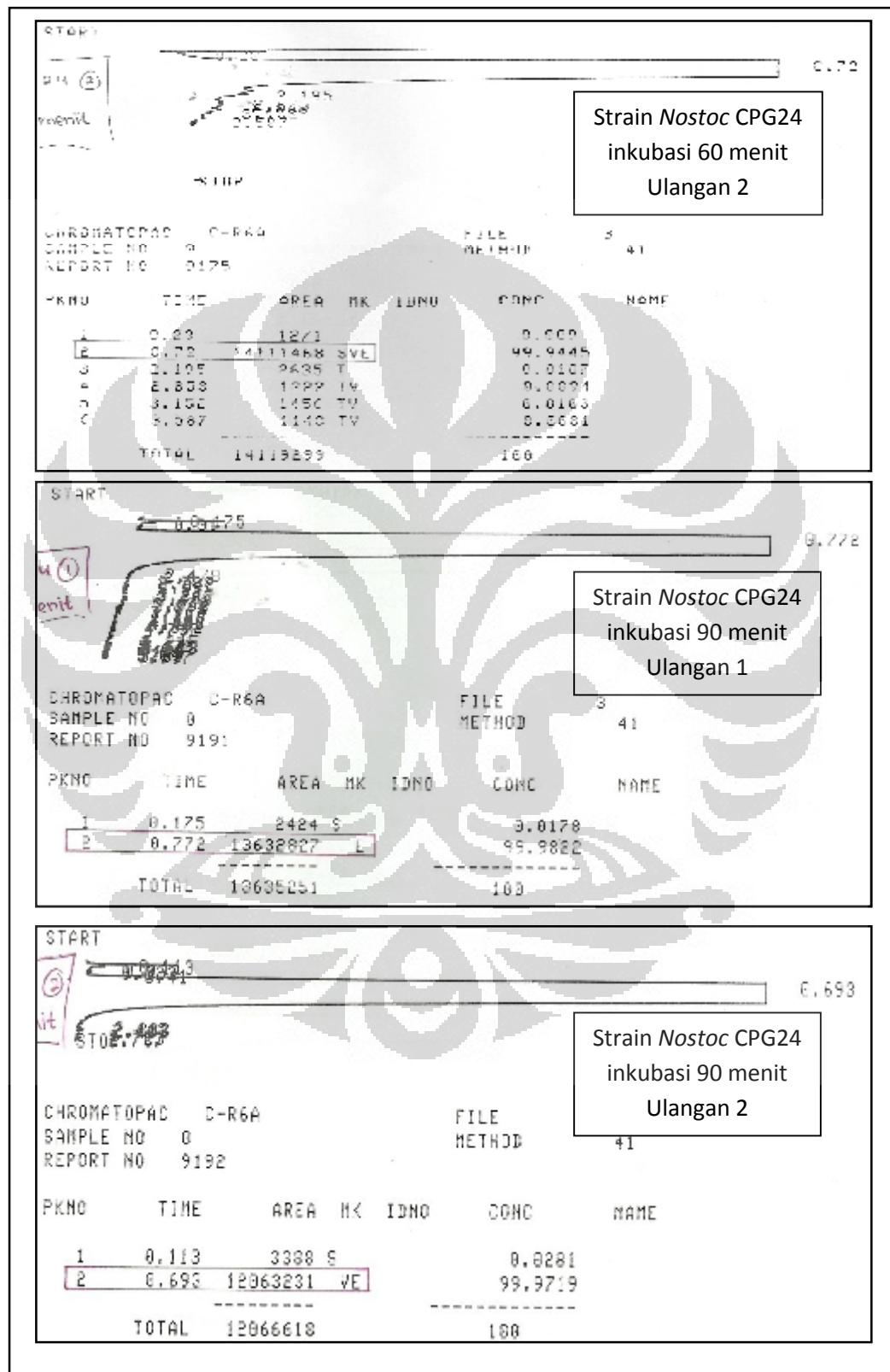
Lampiran 12
Kromatogram strain *Nostoc* BTM6-02



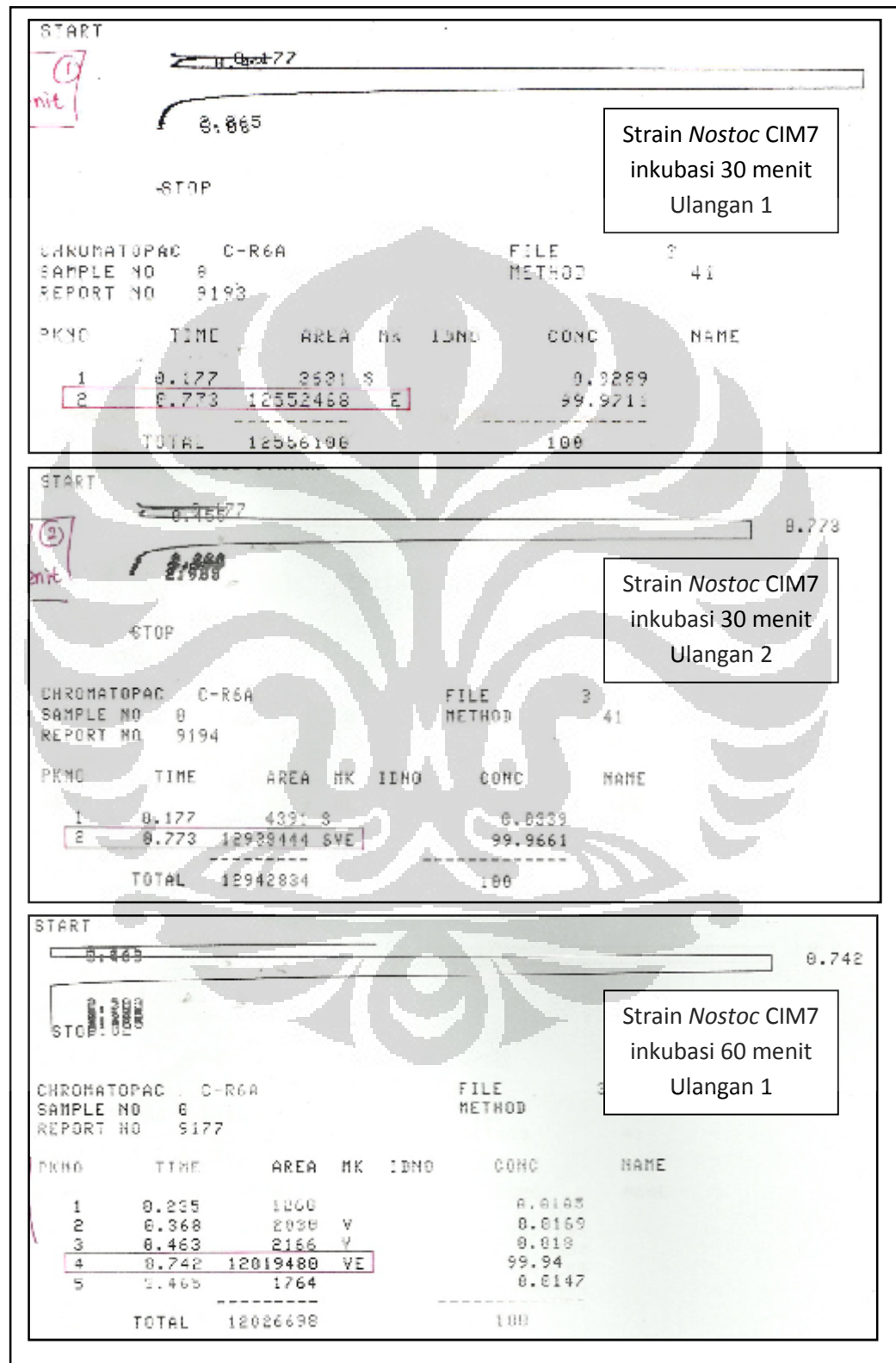
Lampiran 13
Kromatogram strain *Nostoc* CPG24



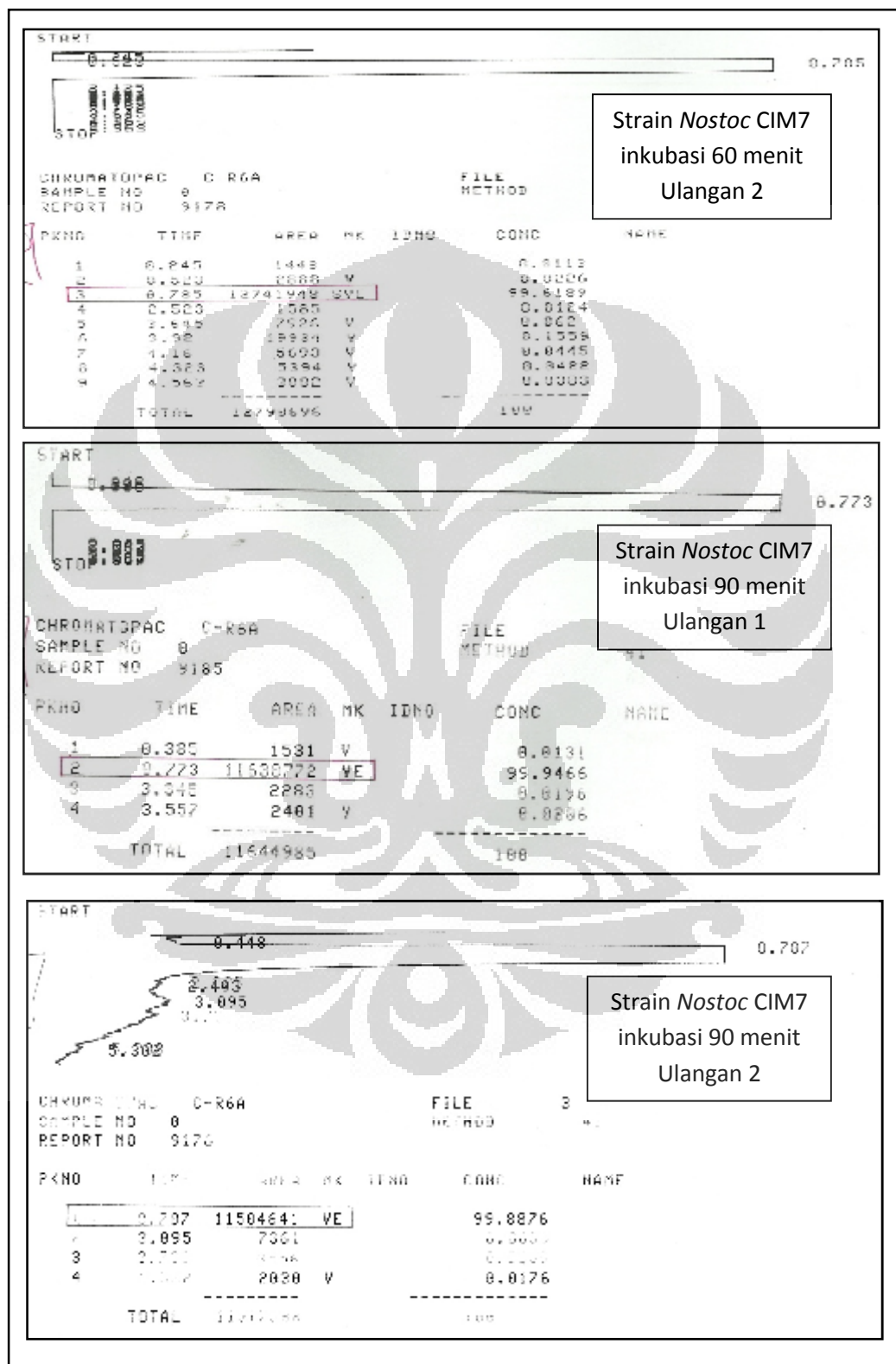
Lampiran 14
Kromatogram strain *Nostoc* CPG24



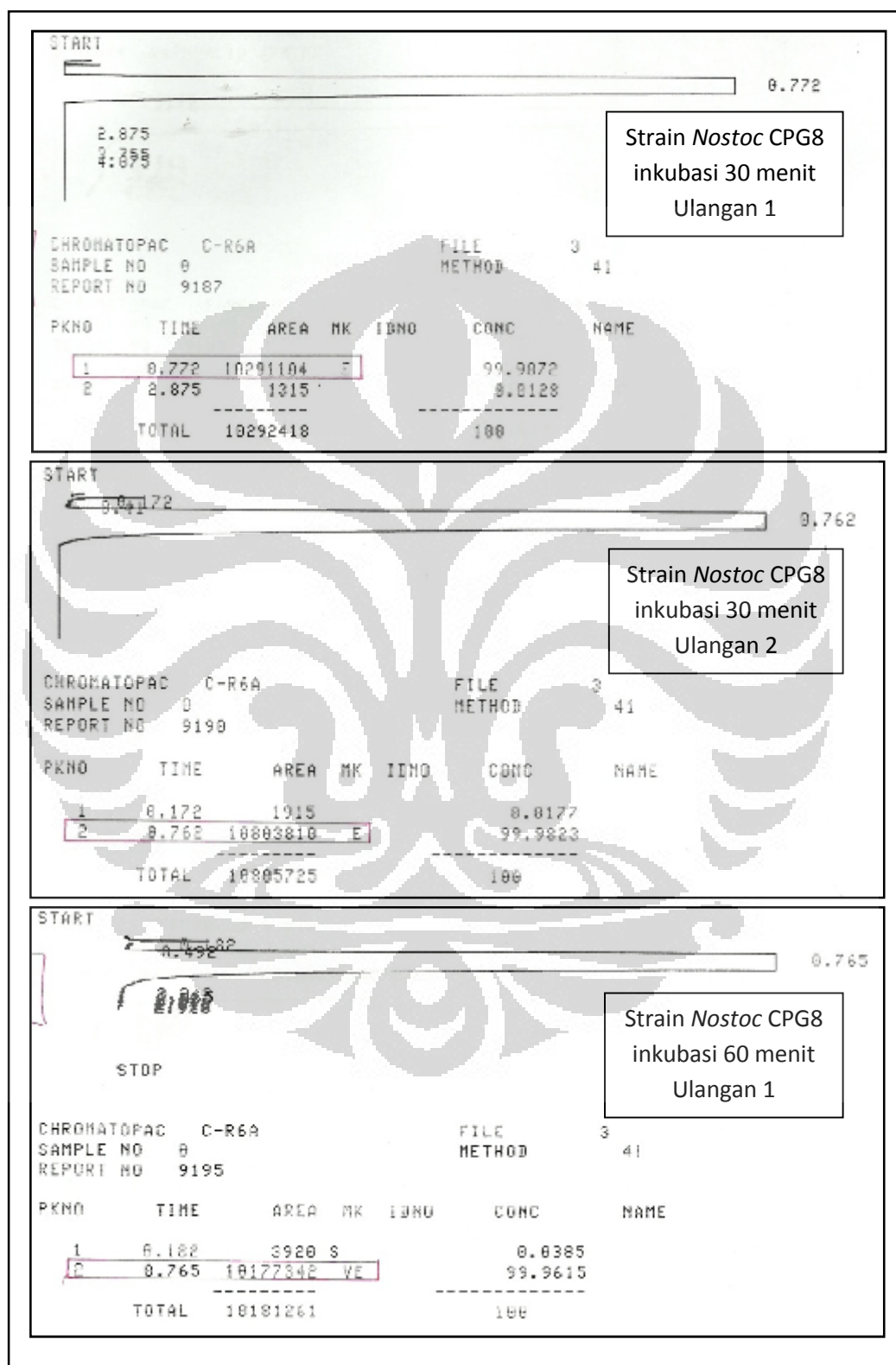
Lampiran 15
Kromatogram strain *Nostoc* CIM7



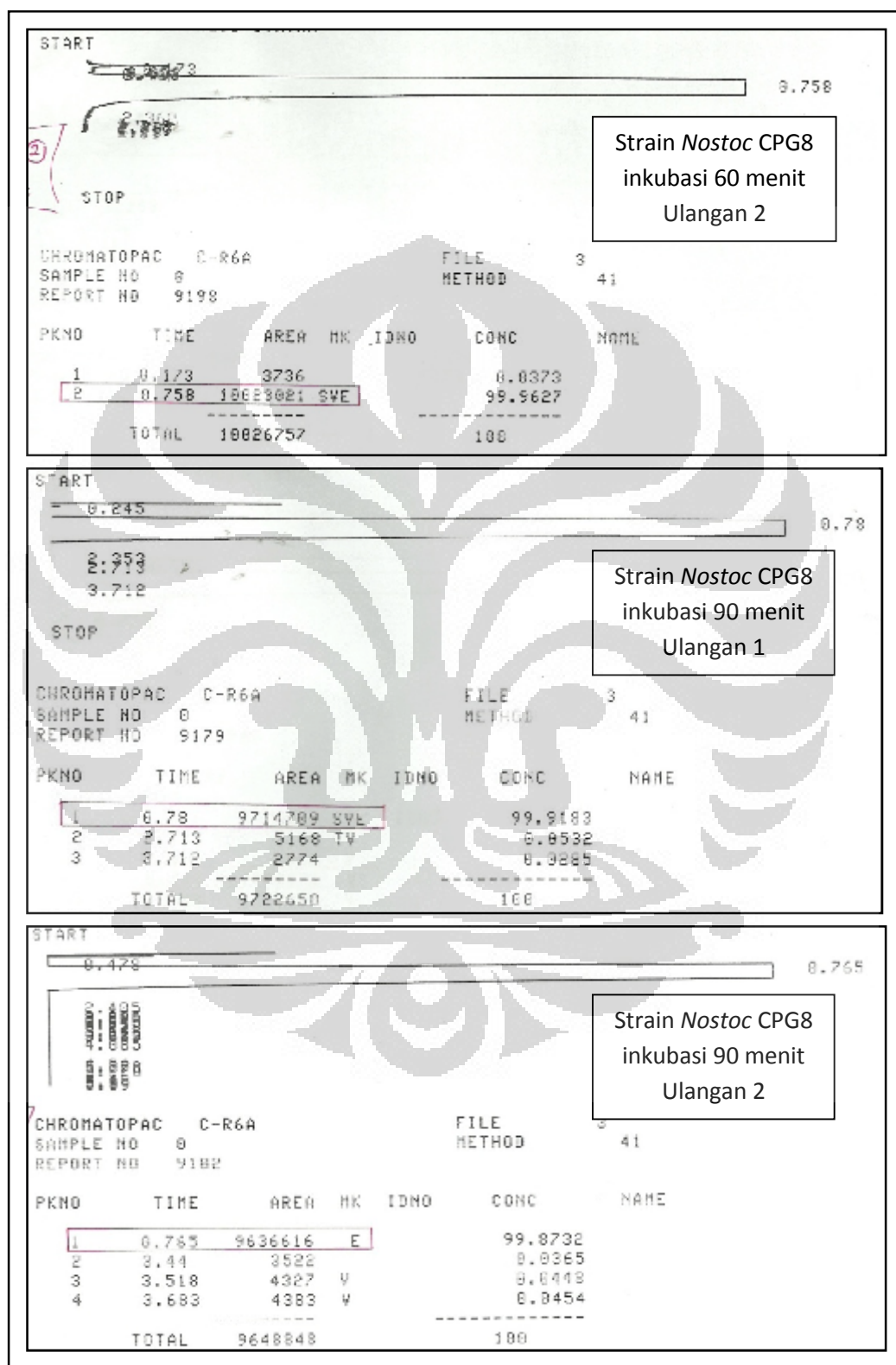
Lampiran 16
Kromatogram strain *Nostoc* CIM7



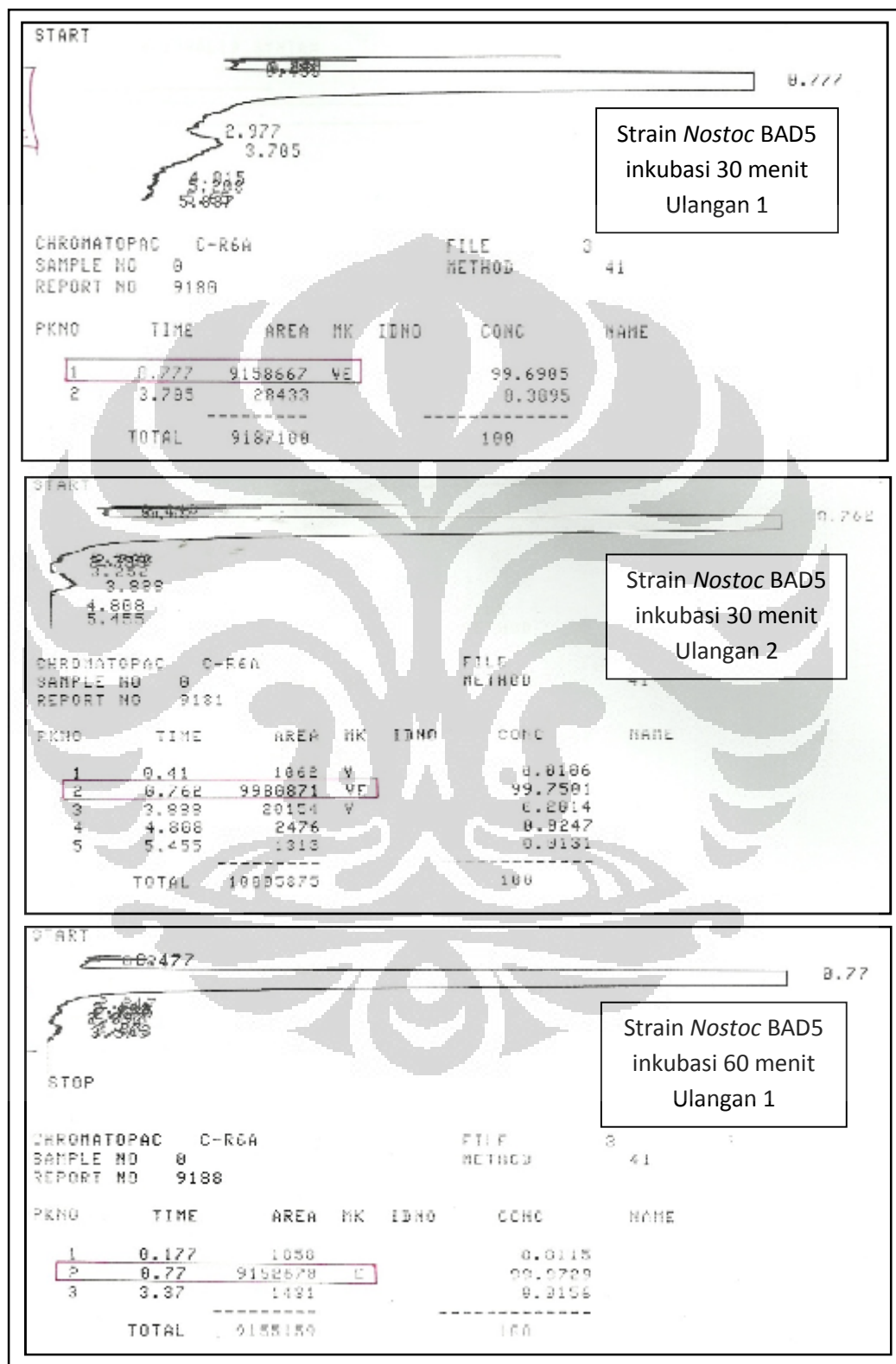
Lampiran 17
Kromatogram strain *Nostoc* CPG8



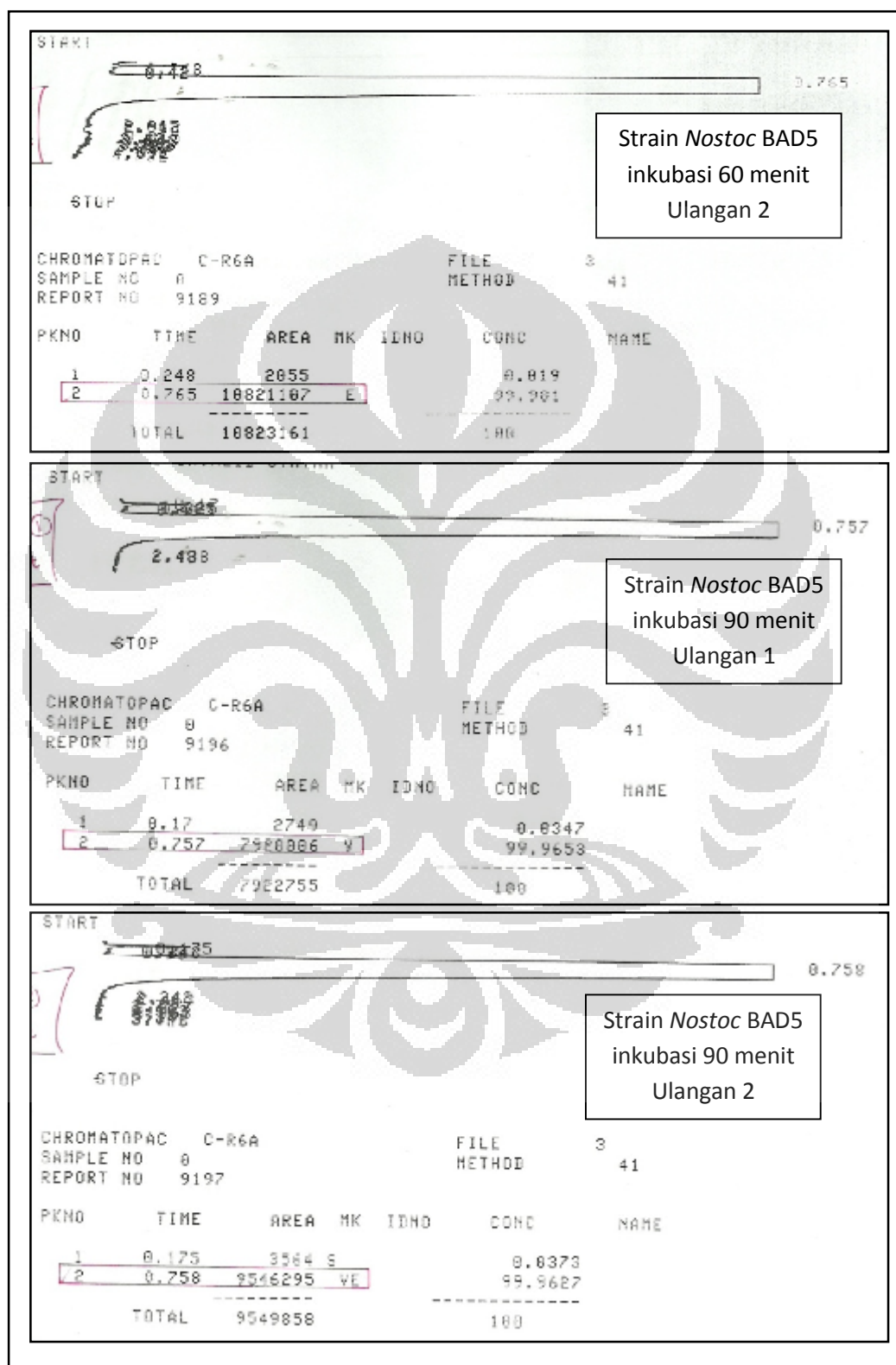
Lampiran 18
Kromatogram strain *Nostoc* CPG8



Lampiran 19
Kromatogram strain *Nostoc* BAD5



Lampiran 20
Kromatogram strain *Nostoc* BAD5



Lampiran 21

Contoh Perhitungan Nilai Laju Reduksi Asetilen menjadi Etilen

No	Isolat	Ulangan	Biomassa (gram)	Luas puncak pada waktu inkubasi		
				30 menit	60 menit	90 menit
1	TAB7	1	0,1087	69.992	42.873	30.615
2		2	0,1053	57.446	54.371	52.652

Luas puncak standar yang digunakan: 10.831

Ulangan 1 (U1):

$$\frac{\left\{ \frac{\text{luas puncak sampel}}{\text{luas puncak standar}} \times \text{konsentrasi standar yang digunakan} \right\}}{\text{Berat molekul etilen}} = \left\{ \frac{69.992}{10.831} \times 80 \text{ ppm} \right\} \frac{1}{28}$$

$$\frac{\text{Berat sampel (gram)}}{\text{Berat molekul etilen}} = 0,1087$$

$$= 169,86 \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{ml.gram}} \right)$$

Ulangan 2 (U2):

$$\frac{\left\{ \frac{\text{luas puncak sampel}}{\text{luas puncak standar}} \times \text{konsentrasi standar yang digunakan} \right\}}{\text{Berat molekul etilen}} = \left\{ \frac{57.446}{10.831} \times 80 \text{ ppm} \right\} \frac{1}{28}$$

$$\frac{\text{Berat sampel (gram)}}{\text{Berat molekul etilen}} = 0,1053$$

$$= 143,91 \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{ml.gram}} \right)$$

Rerata Nilai Laju Reduksi Asetilen menjadi Etilen :

$$= (U1 + U2) : 2 = (169,86 + 143,91) : 2 = 156,89 \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{ml.gram}} \right)$$