



**AGROPROSS**

National Conference  
Proceedings of Agriculture

**Proceedings:  
Penguatan Potensi Sumberdaya Lokal Guna Pertanian  
Masa Depan Berkelanjutan**

Tempat: Politeknik Negeri Jember  
Tanggal: 5-7 Juli 2023

**Publisher:**  
**Agropross, National Conference Proceedings of Agriculture**  
E-ISSN: 2964-0172  
DOI: 10.25047/agropross.2023.500

## **Analisis Viabilitas Isolat Bakteri Penambat Nitrogen *Azotobacter* 33 pada Bahan Pembawa dan Suhu Penyimpanan yang Berbeda**

### *Analysis of Viability of Nitrogen-Fixing Bacterial Isolate *Azotobacter* 33 on Different Carrier Materials and Storage Temperatures*

Author(s): Sri Ismiani<sup>(1)\*</sup>; Elly Daru Ika Wilujeng<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Program Studi Rekayasa Hayati, Institut Teknologi Lombok

<sup>(2)</sup> Program Studi Teknik Produksi Benih, Politeknik Negeri Jember

\* Corresponding author: [sriismiani863@gmail.com](mailto:sriismiani863@gmail.com)

#### **ABSTRAK**

*Azotobacter* merupakan mikroorganisme yang dapat meningkatkan ketersediaan nitrogen bagi tanaman dan memiliki potensi sebagai pupuk hayati. Untuk menentukan kualitas pupuk hayati yang baik, viabilitas mikroorganisme di dalamnya perlu diperhatikan. Salah satu faktor yang mempengaruhi viabilitas bakteri *Azotobacter* adalah media pembawa dan suhu penyimpanan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik media pembawa dan suhu penyimpanan terbaik untuk mendukung pertumbuhan *Azotobacter* sebagai pupuk hayati sebelum digunakan di lapangan. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Tanah dan Lingkungan, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Uji viabilitas *Azotobacter* dilakukan menggunakan media pembawa Zeolit dan Molase, serta penyimpanan dilakukan pada suhu 4°C dan 27°C, parameter yang diamati adalah jumlah populasi bakteri pada hari ke-14 dan hari ke-28 setelah inokulasi. Hasil penelitian menunjukkan, viabilitas *Azotobacter* pada hari ke-28 setelah inokulasi yang menggunakan media pembawa zeolit dan disimpan pada suhu 4°C memiliki jumlah populasi mencapai  $3.7 \times 10^6$  CFU/ml sedangkan penyimpanan pada suhu 27°C mengalami peningkatan jumlah populasi mencapai  $5.3 \times 10^7$  CFU/ml. Viabilitas *Azotobacter* menggunakan media pembawa molase dengan penyimpanan pada suhu pada suhu 4°C memiliki jumlah populasi  $8.5 \times 10^8$  CFU/ml sedangkan penyimpanan pada suhu 27°C memiliki jumlah populasi  $7.9 \times 10^6$  CFU/ml pada hari ke-28 setelah inokulasi. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa kedua bahan pembawa memiliki viabilitas yang baik. Viabilitas *Azotobacter* pada media pembawa molase baik pada penyimpanan suhu 4°C, sedangkan viabilitas *Azotobacter* pada media pembawa Zeolit baik pada penyimpanan suhu 27°C dengan kepadatan populasi yang tetap stabil tanpa mengalami penurunan jumlah populasi.

#### **Kata Kunci:**

*Azotobacter*;  
Bahan  
Pembawa;  
Biofertilizer;  
Viability

#### **Keywords: ABSTRACT**

*Azotobacter*;

Carrier  
Media;

Biofertilizer;  
Viability

*Azotobacter* is a microorganism that enhances nitrogen availability for plants and has the potential to be used as a biofertilizer. Assessing the viability of microorganisms within a biofertilizer is crucial in determining its quality. The carrier medium and storage temperature influence the viability of *Azotobacter* bacteria. Therefore, this research aims to identify the most suitable carrier medium and storage temperature to promote the growth of *Azotobacter* as a biofertilizer before its field application. The study was conducted at the Soil and Environmental Biotechnology Laboratory, Faculty of Agriculture, Bogor Agricultural University. The viability of *Azotobacter* was tested using Zeolite and Molasses as carrier media, and stored at temperatures of 4°C and 27°C. The parameters observed were the bacterial population count on the 14<sup>th</sup> day and the 28<sup>th</sup> day after inoculation. The results showed that the *Azotobacter* viability analysis using Zeolite as the carrier medium, storage at 4°C resulted in a population count of  $3.7 \times 10^6$  CFU/ml, in comparison stored at 27°C resulted in an increased population count of  $5.3 \times 10^7$  CFU/ml on the 28<sup>th</sup> day after inoculation. On the other hand, the *Azotobacter* viability analysis using Molasses as the carrier medium, storage at 4°C the bacterial population count reached  $8.5 \times 10^8$ , and storage at 27°C resulted in a bacterial population count of  $7.9 \times 10^6$  on the 28<sup>th</sup> day after inoculation. It can be concluded that both of carriers have a good ability. The viability of *Azotobacter* is better in Molasses as the carrier medium, with storage at 4°C and the viability of *Azotobacter* is optimal in Zeolite as the carrier medium, with storage at 27°C, maintaining a stable population density without a decrease in the population count.



## PENDAHULUAN

Aplikasi pupuk hayati sangat dibutuhkan untuk produksi tanaman ramah lingkungan dan berkelanjutan. Pupuk hayati memiliki kemampuan untuk mengubah unsur-unsur nutrisi penting dari bentuk yang tidak tersedia menjadi tersedia melalui proses biologis. Beberapa jenis pupuk hayati telah dikembangkan dari bakteri, khususnya *Azotobacter* spp dan digunakan dalam produksi berbagai jenis tanaman. *Azotobacter* spp. adalah jenis bakteri gram negative yang hidup bebas, aerobik, hidup di dalam tanah yang memiliki kemampuan untuk fiksasi nitrogen atmosferic (Salhia B. M., 2013). Kemelimpahan *azotobacter* bervariasi sesuai dengan kedalaman profil tanah (V, kannapiran, & Harimuraleedharan, 2010). Kehadiran *azitobacter* dalam tanah memiliki banyak manfaat bagi tanaman, namun kelimpahan bakteri ini terkait dengan banyak factor baik fisik dan kimia tanah seperti ketersediaan bahan organik, pH, suhu, kelembaban tanah dan sifat mikrobiologi tanah (Kizikaya, 2009).

Dalam aplikasi pupuk hayati proses penambahan inokulum mikroba ke dalam tanah dianggap masih kurang praktis karena dibutuhkan kondisi yang aseptis. Oleh karena itu, muncullah teknologi untuk menyediakan inokulum mikroba yang praktis diaplikasikan di lapangan yaitu bahan pembawa (*carrier*). Bahan pembawa merupakan faktor penting untuk mendukung proliferasi sel mikroba dan fungsi biologis yang optimal. Viabilitas dan efektivitas mikroba dalam dalam pupuk cair ditentukan oleh bahan pembawa baik berbentuk cair maupun padat. bahan pembawa dapat dibuat dari beberapa jenis bahan pembawa seperti gambut, sekam padi, dedak gandum, alginate dan molase (El-Fattah, Eweda, Zayed, & Hassanein, 2013). Dari hasil penelitian terdahulu diketahui bahwa bahan pembawa molase dapat meningkatkan respon pertumbuhan dan produktivitas tanaman sawi dengan nilai tinggi tanaman 24,259 cm, jumlah

daun 2,959,8 mm<sup>2</sup> dan berat kering 3,90 gram (Alami, et al., 2018). Kombinasi NPK dan penambahan pupuk hayati bahan pembawa zeolit memiliki rata-rata tinggi tanaman yang lebih baik. Penggunaan kombinasi pupuk hayati *Azotobacter* 33 dan NPK memberikan pengaruh yang signifikan terhadap pertumbuhan tanaman jagung pada fase vegetatif (Wilujeng, Ismiani, & Adnan, 2022).

Viabilitas mikroba dalam bahan pembawa menentukan efektifitas kerja mikroba dalam pupuk organik cair. Jumlah dan jenis mikroba yang terdapat dalam bahan pembawa akan menentukan hasil dari proses pengubahan unsur-unsur yang tidak dapat larut dalam tanah seperti nitrogen dan fosfat yang akan berpengaruh pada pertumbuhan tinggi tanaman, jumlah daun dan warna daun. Sehingga viabilitas mikroba dalam bahan pembawa dan suhu penyimpanan harus tetap dijaga agar tetap potensial digunakan sebagai pupuk hayati.

## METODOLOGI

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Tanah dan Lingkungan Fakultas Pertanian Bogor. Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari-April tahun 2018. Alat yang digunakan dalam penelitian antara lain pengaduk, gelas ukur, erlenmeyer, autoklaf, oven, saringan, sekop kecil, *water bath*, *shacher*, neraca analitik, PH meter, autoklaf, dan *magnetic stirrer*. Bahan yang digunakan adalah isolat bakteri *Azotobacter* 33 yang merupakan isolat koleksi dari Laboratorium Bioteknologi Tanah dan Lingkungan yang berasal dari Tanah Mitra Kerinci, medium *Nitrogen Free Mannitol* ( $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ,  $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , Mannitol, Agar), medium Nutrient Agar (NA), *medium Nutrient Broth* (NB).

Sebelum melakukan peremajaan isolat *Azotobacter* perlu disiapkan media tumbuh terlebih dahulu. Komposisi media tumbuh disesuaikan dengan kebutuhan tumbuh *Azotobacter*, media yang dapat digunakan

adalah media *Nitrogen Free Mannitol* (NFM) sebanyak 7 ml yang disterilkan dalam tabung reaksi lalu di dinginkan dengan posisi dimiringkan. Setelah media NFM padat inokulan diambil dengan jarum ose bundar, setelah itu digores rapat secara zig-zag dari bawah sampai atas media agar miring.

Perbanyak isolat *Azotobacter* dilakukan dengan menggunakan media Nutrient Broth sebanyak 50 ml. *Azotobacter* yang diinokulasikan diambil dari isolat *Azotobacter* di agar miring yang sudah diremajakan menggunakan jarum ose bundar. Isolat terpilih *Azotobacter* 33 ditumbuhkan pada media NB inkubasi pada suhu 34 °c selama 24 jam. Untuk melakukan uji antagonis isolate terpilih diambil dengan suntik sebanyak 1 ml isolate terpilih lalu diinjeksikan ke daun tembakau secara hati-hati dan perlahan. Perubahan yang terjadi pada daun tembakau, jika spot yang disuntikkan berubah menguning maka diasumsikan bakteri *Azotobacter* 33 mempunyai kemungkinan bersifat patogen terhadap tanaman.

Uji hemolisis menggunakan Blood agar atau agar darah dari Tryptic Soy Agar atau Columbia Agar Base dengan darah domba 5%. Isolate *Azotobacter* 33 digores secara zig-zag pada media agar menggunakan jarum ose bundar. Setelah 2 x 24 jam, pengamatan reaksi hemolitik pada media agar darah. Pengamatan dilakukan dengan mengangkat petri yang berisi agar darah ke sumber cahaya dan diamati dari cahaya yang datang dari belakang.

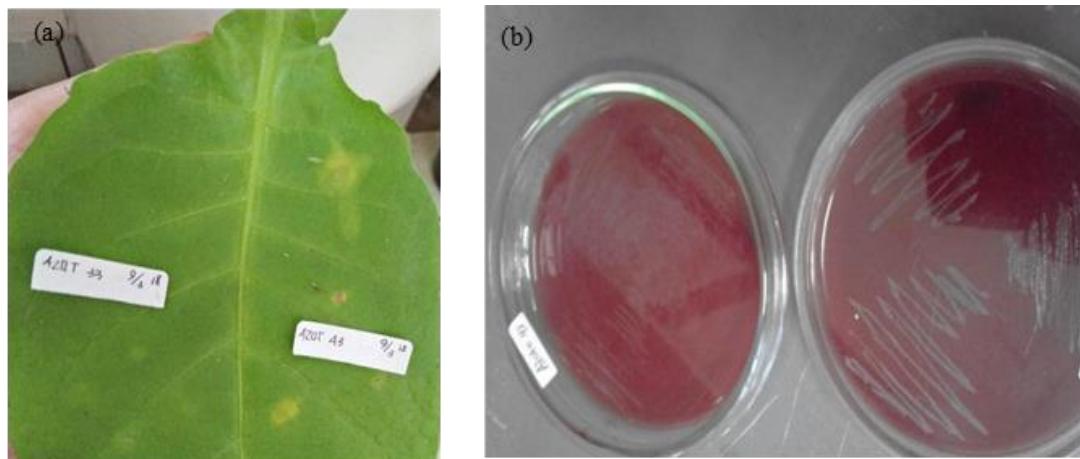
Isolat terpilih *Azotobacter* 33 ditumbuhkan pada media Nutrient Broth (NB) lalu dilakukan diinkubasi selama 72 jam. Tahap selanjutnya adalah pengukuran jumlah sel dengan melakukan *total plate count* (TPC) menggunakan media *Nitrogen Free Mannitol* (NFM) digunakan sebagai populasi awal. Setelah mengetahui jumlah sel yang tumbuh dalam media NB, dilakukan persiapan bahan pembawa molase dan zeolit masing-masing dipersiapkan untuk penyimpanan pada suhu ruang dan

suhu refrigerator dengan 3 kali ulangan. Isolat *Azotobacter* 33 diinokulasikan dalam media pembawa zeolit sejumlah 7 ml dan pada 50 gr zeolit.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Uji Patogenitas

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat bakteri *Azotobacter* 33 yang telah diremajakan tidak bersifat patogen setelah dilakukan uji reaksi hipersensitivitas isolat yang disuntikkan ke dalam daun tembakau tidak menunjukkan gejala nekrosis hingga 96 jam setelah inokulasi (Gambar 1). Kerr dan Gibb (1997) menyatakan bahwa apabila isolate bakteri memiliki sifat patogen maka akan terjadi nekrosis pada daun tembakau yang disebabkan karena adanya hubungan yang kompatibel antara bakteri patogen dan tanaman tembakau. Hal ini menunjukkan bahwa inokulan bakteri *Azotobacter* 33 tidak berpotensi menjadi patogen bagi tanaman, sesuai dengan standar teknis minimal pupuk hayati yang ditentukan oleh kementerian pertanian melalui keputusan menteri pertanian No. 261/KPTS/SR.310/M/4/2019 yang menyatakan bahwa mikroba-mikroba dalam formulasi pupuk hayati harus menunjukkan hasil uji hipersensitivitas yang menghasilkan respon negatif pada daun tembakau. Isolat yang digunakan untuk uji hipersensitivitas juga digunakan untuk uji hemolisis yang dilakukan pada media *blood* agar. Hasil pengujian hemolisis terhadap bakteri *Azotobacter* 33 yang telah diinkubasi pada media *Blood* Agar selama 24 sampai 48 jam menunjukkan hasil *hemolysis negative* atau tidak terjadi pembentukan zona bening di sekitar isolate bakteri *Azotobacter* 33 (Gambar 1). Bakteri yang mampu melisis eritrosit secara sempurna dalam media *blood* agar sehingga terbentuk zona bening disekitar pertumbuhan koloni bakteri maka bakteri tersebut digolongkan dalam  $\beta$ -hemolisis (Mckane & Kandel, 1998). Dari hasil uji patogenitas dapat disimpulkan bahwa isolate bakteri *Azotobacter* 33 aman untuk digunakan manusia dan hewan karena tidak berpotensi menimbulkan penyakit.



Gambar 4. Uji Patogenitas (a) hasil uji hipersensitivitas, (b) hasil uji hemolisis pada blood agar

Tabel 1. Jumlah populasi *Azotobacter 33* sebelum dan sesudah penyimpanan

Bahan Pembawa	Populasi awal (CFU/ml)	Sesudah penyimpanan			
		Suhu ruang 27°C		Suhu Refrigerator 4°C	
		14 HSI	28 HSI	14 HSI	28 HSI
Molase	$5.3 \times 10^8$	$8.7 \times 10^8$	$7.9 \times 10^6$	$7 \times 10^8$	$8.5 \times 10^8$
Zeolit	$3.6 \times 10^8$	$2.1 \times 10^7$	$5.3 \times 10^7$	$1.9 \times 10^9$	$3.7 \times 10^6$

Keterangan : HSI (Hari Setelah Inokulasi)

### Uji Viabilitas *Azotobacter 33*

Viabilitas bakteri dalam pupuk hayati penting untuk dipertahankan mengingat adanya efek menguntungkan dari keberadaan sel tersebut bagi pertumbuhan tanaman. Menurut Syamsiah M, (2014) Jumlah populasi bakteri yang terdapat pada rhizosfer dapat mempengaruhi respon pertumbuhan tanaman. Berdasarkan hasil penelitian pada uji viabilitas bakteri *Azotobacter 33* pada bahan pembawa dan suhu penyimpanan yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan jumlah populasi *Azotobacter 33* dapat dilihat pada Table 1.

Data pada tabel 1 menunjukkan bahwa terjadi peningkatan jumlah populasi yang fluktuatif, dimana jumlah populasi awal yang diinokulasikan yaitu  $5,3 \times 10^8$  cfu/ml yang berasal dari kultur cair atau bahan pembawa molase setelah inkubasi selama 72 jam. Populasi *Azotobacter* mengalami peningkatan jumlah setelah penyimpanan menggunakan bahan pembawa molase pada hari ke-14 SI (setelah inokulasi) dengan perlakuan suhu refrigerator 4°C, peningkatan jumlah populasi bakteri *Azotobacter 33* mencapai 64,15% dan

mengalami penurunan pada hari ke-28 SI. Penyimpanan dengan perlakuan suhu ruang 27°C terus mengalami peningkatan jumlah populasi dari hari pertama sampai dengan hari ke-28 IS dengan total jumlah populasi tertinggi mencapai  $8.5 \times 10^8$  CFU/ml. Hal tersebut sesuai dengan batas minimal yang ditetapkan oleh keputusan menteri pertanian No. 261/KPTS/SR.310/M/4/2019. Molase merupakan bahan pembawa yang sudah sering digunakan sebagai substrat untuk produksi inokulan cair *azotobacter* karena memiliki kandungan disakarida serta komposisi karbon di dalam molase seperti fruktosa, glukosa dan sukrosa (W, L, & M, 2015). Molase juga mengandung kalsium, natrium, komponen bukan gula dan mineral lainnya yang mampu meningkatkan metabolisme mikroba (Sandra, Ilyas, Malik, & Javaid, 2013). Hasil penelitian Hindersah R dan Pratiwi E (2021) menunjukkan bahwa produksi EPS di bahan pembawa molase dengan asam amino menyamai kadar EPS di bahan pembawa anorganik. Setelah dua bulan penyimpanan bahan pembawa cair berbasis molase dengan penambahan sisteina 0,25% dan serina 0,1%

meningkatkan populasi sel, serta kadar EPS dan N dibandingkan media anorganik, serta mempertahankan pH netral.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penyimpanan menggunakan bahan pembawa zeolit dengan perlakuan suhu ruang 27°C menunjukkan terjadi penurunan jumlah populasi dari hari pertama yaitu  $3.6 \times 10^8$  CFU/ml setelah inokulasi menjadi  $2.1 \times 10^7$  CFU/ml pada hari ke-14 SI. Penurunan jumlah populasi pada hari ke-14 SI diasumsikan bahwa bakteri berada pada fase adaptasi, Fase ini merupakan fase penyesuaian bakteri terhadap lingkungan yang baru. Pada fase ini tidak terjadi pertumbuhan dan kenaikan jumlah sel tetapi peningkatan ukuran atau volume sel, peningkatan total protein seluruhnya, hingga pada hari ke-28 SI menunjukkan adanya penambahan jumlah populasi menjadi  $5.3 \times 10^7$  CFU/ml. Data ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Rahmayuni *et al* (2018) menunjukkan bahwa dengan bahan pembawa zeolit dapat mempertahankan jumlah isolate bakteri pelarut fosfat mencapai  $9 \times 10^7$  cfu.g<sup>1</sup>. Zeolit memiliki kemampuan menyerap air dan kapasitas tukar kation yang tinggi untuk pertumbuhan mikroorganisme. Hasil penelitian serupa juga dilaporkan oleh Putri *et al* (2010) bahwa bahan pembawa zeolite memberikan hasil yang lebih baik dalam mempertahankan viabilitas inokulum *Azospirillum*, *Azotobacter* dan fungi pelarut fosfat hingga masa penyimpanan 70 hari. Sedangkan pada penyimpanan suhu refrigerator 4°C terjadi peningkatan jumlah populasi pada hari ke-14 SI mencapai  $1.9 \times 10^9$  CFU/ml dan mengalami penurunan jumlah populasi pada hari ke-28 SI dengan jumlah populasi  $3.7 \times 10^6$ . Hal ini dapat disebabkan pada saat pertumbuhan, aktivitas metabolisme sel tinggi, kecepatan pembelahan tinggi serta waktu generasi pendek. Dari data ini dapat disimpulkan bahwa bakteri *azotobacter* pada bahan pembawa zeolite dengan penyimpanan suhu refrigerator tidak memenuhi standar batas minimal yang telah ditentukan oleh menteri pertanian

## KESIMPULAN

*Azotobacter 33* pada kedua jenis media pembawa *Azotobacter* dapat tumbuh dengan baik hingga pengamatan hari ke-28 dan Viabilitas sel mengalami peningkatan pada suhu penyimpanan yang berbeda. *Azotobacter* dengan bahan pembawa Molase tumbuh baik dengan penyimpanan 2 menunjukkan bahwa suhu dan lama penyimpanan berpengaruh terhadap viabilitas bakteri *Azotobacter 33* dalam media pembawa zeolit dan molase. Dapat disimpulkan bahwa pada refrigerator dan tumbuh baik dengan media pembawa zeolit pada penyimpanan suhu ruang.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alami, N. H., Duhita, C. K., Muslihatun, W., Kuswyasari, N. D., Zulaika, E., & Shovitri, M. (2018). Effect of Yeast Carrier Media with *Azotobacter* Addition as Biofertilizer Against Growth and Productivity of Mustard (*Brassica juncea* L.). *IOP Conf. Ser.: Earth Environ.* doi:10.1088/1755-1315/197/1/012001
- El-Fattah, D. A., Eweda, W. E., Zayed, M. S., & Hassanein, M. K. (2013). Effect of carrier materials, sterilization method, and storage temperature on survival and biological activities of *Azotobacter chroococcum* inoculant. *Annals of Agricultural Sciences.* 52(2) 111-118. doi:https://doi.org/10.1016/j.aos.2013.07.001
- Hindersah R dan Pratiwi E. 2021. Media Cair Berbasis Molase untuk Meningkatkan Viabilitas dan Produksi Ekspolisakarida *Azotobacter*. *Jurnal Tanah dan Iklim.* 45(1): 39-46 <http://dx.doi.org/10.21082/jti.v45n1.2021.39-46>
- Mckane, L., and J. Kandel. 1998. *Microbiology, Essentials and Applications.* 2<sup>nd</sup>ed. McGraw, Inc. Philadelphia.

- Keputusan Menteri pertanian nomor 261 tahun 2019. Persyaratan teknis minimal pupuk organik, pupuk hayati, dan pembenahan tanah. 1 april 2019. Kementrian pertanian republic Indonesia
- Kerr, A. and K. Gibb. 1997. Bacteria and phytoplasma as plant parasites. In : Brown, J.F. and Olge(eds). *Plant pathogens and plant disease*. Australia plant pathology. Armidale.
- Kizikaya, R. (2009). Nitrogen Fixation Capacity of Azotobacter spp. Strains Isolated from Soil in Different Ecosystems and Relationship Between Them and The Microbiological Properties of Soils. *J Environ Biol*. 30(1): 73-82.
- Putri S. M., I. Anas, F. Hazra, A. Citraresmini. 2010. Viabilitas Inokulum dalam Bahan Pembawa Gambut, Kompos, Arang Batok dan Zeolit yang Disteril dengan Iradiasi Sinar Gamma Co- 60 dan Mesin Berkas Elektron. *J. Tanah Link.*, 12(1):23-30
- Rahmayani E, Ismiani S, Wilujeng E. D. I., Muslimah D. H., Rizqulloh M. N.. 2018. Karakterisasi dan Viabilitas Bakteri Pelarut Fosfat dalam Bahan Pembawa Kompos dan Zaolit. *Jurnal Agrosins dan Teknologi*.3(1): 31-38
- Sandra, S., Ilyas, S., Malik, S., & Javaid, K. (2013). Compost Fertilizer Production From Sugar Press Mud (SPM). *J Microbial Res*. 3:20-27.
- Salhia B. M.2013. The Effect of Azotobacter Chroococumas Nitrogen Biofertilizer on The Growth and Yield of Cucumis Sativus (Thesis). *botany: the islamic university gaza*.
- Syamsiah M., 2014. Respon Pertumbuhan dan Produksi Tanaman Cabai Merah (*Capsicum annum* L) Terhadap Pemberian PGPR dari Akar Bamboo dan Urine Kelinci. *J Ago*. 4(2):109-114
- V, K., kannapiran, E., & Harimuraleedharan. (2010). Azotobacter population in Rhizosphere and non-Rhizosphere sediments of tondi coast. *international journal of biological technology*. 1:63-65.
- Wilujeng, E. D., Ismiani, S., & Adnan, M. R. (2022). respon pertumbuhan vegetatif tanaman jagung manis varietas SD3 IPB terhadap pemberian kombinasi NPK dan Pupuk Hayati Azotobacter. *Gontor Agrotech Science Journal*. 8(2):102-108. <https://doi.org/10.21111/agrotech.v8i2.8481>
- Xu W, Liang L, Zhu M. 2015. Determination of sugars in molasses by HPLC following solid-phase extraction, *Int J Food Prop*. 18:(3):547-557