

Dinamika Sel Heterokis *Anabaena azollae* dalam Media Tumbuh dengan Konsentrasi Nitrogen Berbeda
(The Dynamics of *Anabaena azollae* Heterocyst Cel which Growth on Different Nitrogen Concentrate)

Niken Tunjung Murti Pratiwi*, Inna Puspa Ayu, Sigid Hariyadi, Siti Nursiyamah, Goran Suryanti Afifah Sulaiman, & Aliati Iswantari

Departemen Manajemen Sumberdaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB
Jl. Lingkar Akademik, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680
*E-mail korespondensi: niken_tmpratiwi@yahoo.com

Memasukkan: November 2015, **Diterima:** April 2016

ABSTRACT

Anabaena azollae is an heterocyst Cyanophyceae as symbiont of *Azolla* sp. *Anabaena azollae* is able to fix N_2 from atmosphere and transform it into ammonium by its heterocyst cell. This research was conducted to study the influence of different concentration level of nitrogen to the dynamic of *Anabaena azollae* heterocyst cell. Research was conducted by observing heterocyst cell and variation nitrogen concentration in growing media in 21 days. In each sampling of *Azolla* sp., heterocyst observation was conducted for every 1000 cells in *Anabaena azollae* filament colonies. Result showed that media with 0 mg/L nitrogen has the highest number of heterocyst cell. In early observation, there was increasing of ammonium concentration in media 0 mg/L and 5 mg/L. Media without nitrogen addition has generated the highest number of heterocyst cell.

Keywords: *Anabaena azollae*, *Azolla* sp., heterocyst

ABSTRAK

Anabaena azollae merupakan Cyanophyceae berheterokis yang bersimbiosis dengan *Azolla* sp. *Anabaena azollae* memiliki sel heterokis yang membuatnya mampu mengikat nitrogen (N_2) dari udara dan mengubahnya menjadi amonium (NH_4^+). Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji pengaruh konsentrasi nitrogen yang berbeda terhadap dinamika jumlah sel heterokis pada *Anabaena azollae*. Penelitian dilakukan dengan mengamati heterokis dan perubahan konsentrasi nitrogen pada media selama 21 hari pengamatan. Pada setiap pengambilan contoh, pengamatan heterokis dilakukan terhadap setiap 1000 sel dalam koloni filamen *Anabaena azollae*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah sel heterokis tertinggi terdapat pada filamen dalam media dengan konsentrasi nitrogen 0 mg/L. Pada awal pengamatan, peningkatan konsentrasi amonium terjadi pada perlakuan 0 mg/L dan 5 mg/L. Media tanpa penambahan nitrogen memunculkan heterokis dengan jumlah tertinggi.

Kata Kunci: *Anabaena azollae*, *Azolla* sp., heterokis

PENDAHULUAN

Tumbuhan *Azolla* sp. merupakan jenis tumbuhan paku air yang mengapung yang umumnya terdapat di perairan tergenang, terutama di sawah, rawa, dan kolam. *Azolla* sp. dapat digunakan sebagai pupuk organik karena mampu meningkatkan konsentrasi nitrogen pada lingkungan hidupnya. Hal ini disebabkan oleh kemampuan *Azolla* sp. berasosiasi dengan *Anabaena azollae*.

Anabaena azollae merupakan alga berfilamen yang memiliki kemampuan mengikat nitrogen (N_2) langsung dari udara dan mengubahnya menjadi amonium (NH_4^+) dengan bantuan enzim nitrogenase (Meeks & Elhai 2002). Proses fiksasi nitrogen terjadi pada sel heterokis. Sel heterokis merupakan diferensiasi sel vegetatif yang terbentuk ketika

nitrogen pada lingkungan berada dalam konsentrasi yang rendah (Wei *et al.* 1994). Sel heterokis muncul dengan interval yang hampir teratur terhadap keberadaan sel vegetatif. Letak sel heterokis dapat berada di terminal (ujung) atau interkalar (tengah) koloni (Meeks & Elhai 2002).

Sel vegetatif dan sel heterokis saling melengkapi dalam aktivitas metabolisme *Anabaena azollae*. Sel vegetatif berperan menyediakan gula, sedangkan sel heterokis menyediakan nitrogen (Golden & Yoon 2003). Sel heterokis pada rangkaian filamen memfiksasi nitrogen dan mengubahnya menjadi glutamin, selanjutnya akan di ubah menjadi karbohidrat oleh sel vegetatif melalui proses fotosintesis. Proses fotosintesis pada Cyanophyceae memanfaatkan klorofil-a dan pigmen *phycobiliprotein* (Cohen & Bryant 1982 *in* Mur *et al.* 1999). Pigmen

tersebut menyerap cahaya hijau, kuning, dan jingga yang merupakan bagian dari spektrum (500-650 μm) (Mur *et al.* 1999).

Buikema (1991) menjelaskan bahwa pada Cyanophyceae berheterokis, seperti *Anabaena*, seluruh sel dalam satu rangkaian filamen akan memiliki morfologi yang sama saat kondisi nitrogen terpenuhi. Sebaliknya, saat sumber nitrogen (amonium atau nitrat) tidak terpenuhi pada media pertumbuhannya, maka sel heterokis akan terbentuk. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh konsentrasi nitrogen yang berbeda terhadap dinamika jumlah sel heterokis pada *Anabaena azollae* yang bersimbiosis dengan *Azolla* sp.

BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari sampai April 2015. Kegiatan penelitian dilakukan pada skala laboratorium, bertempat di Laboratorium Riset Plankton, Laboratorium Biologi Mikro I, dan Laboratorium Fisika Kimia Perairan, Divisi Produktivitas dan Lingkungan Perairan, Departemen Manajemen Sumberdaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.

Azolla sp. (Gambar 1) ditumbuhkan dan diperbanyak pada kondisi *semi-outdoor* dengan kondisi lingkungan (suhu dan intensitas cahaya) yang dapat ditolerir oleh organisme tersebut. *Azolla* sp. dapat berkembang dengan baik pada kisaran suhu 20-35°C, pada intensitas cahaya berkisar antara 25-50% dari penyinaran matahari penuh dengan intensitas cahaya 15 klux selama 12 jam setiap hari (Tamad 1994).

Inokulan yang digunakan adalah *Azolla* sp. dengan usia 13-15 hari dengan akar berjumlah 3-4 helai. Selanjutnya, *Azolla* sp. dibilas akuades dan direndam dengan Kalium Permanganat 20 mg/L selama 60 menit (Mursalin 2007). Tujuan perendaman adalah untuk menekan keberadaan jumlah hama dan penyakit, sehingga *Azolla* sp. yang



Gambar 1 *Azolla* sp. yang dijadikan inokulan

akan ditebar memiliki kondisi awal yang seragam sebelum diberi perlakuan. Pada penelitian ini, bobot *Azolla* sp. yang ditebar pada masing-masing wadah adalah sebesar 5 gram.

Penyiapan wadah dilakukan dengan memposisikan wadah secara acak. Wadah yang digunakan adalah akuarium yang memiliki ukuran 30 cm x 30 cm x 30 cm yang diisi dengan air sampai dengan ketinggian 25 cm (volume 22,5 liter). Media cair disiapkan dengan melarutkan pupuk ZA (*Zwavelzuur Amoniak*) sebagai sumber nitrogen dan TSP (*Triple Super Phosfat*) sebagai sumber fosfor pada masing-masing akuarium berisi air sesuai dengan konsentrasi yang ditentukan. Konsentrasi pupuk ZA dalam bentuk nitrogen yang digunakan sebagai perlakuan adalah 0 mg/L N, 5 mg/L N, dan 10 mg/L N, sedangkan konsentrasi TSP dalam bentuk fosfor yang digunakan adalah 30 mg/L P. Perhitungan konsentrasi N dan P mengacu pada SNI (2005). Pengadukan perlahan dilakukan untuk memastikan pupuk terlarut dengan air pada wadah.

Penelitian ini meliputi tiga jenis perlakuan dengan tiga kali ulangan. Penempatan wadah dilakukan secara acak dan kondisi lingkungan dibuat homogen sehingga dapat memenuhi kaidah penggunaan Rancangan Acak Lengkap (RAL).

Azolla sp. yang sudah disiapkan, ditebar ke dalam wadah uji dengan perlakuan konsentrasi nitrogen sebesar 0 mg/L, 5 mg/L, dan 10 mg/L. Setelah penebaran inokulan, pengamatan terhadap *Azolla* sp. dan sel heterokis *Anabaena azollae* (selanjutnya disebut sebagai *Anabaena*) dan pengukuran kualitas air dilakukan. *Azolla* sp. ditumbuhkan di dalam wadah tersebut selama 21 hari.

Sebelum dan sesudah penebaran inokulan, dilakukan pengamatan jumlah sel heterokis *Anabaena* pada perbesaran lensa mikroskop 400x, pengukuran unsur hara ($\text{NH}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$, dan $\text{PO}_4\text{-P}$) pada media cair (Eaton *et al.* 2005), serta pengukuran parameter kualitas air seperti, suhu, pH, dan intensitas cahaya (Eaton *et al.* 2005). Pengamatan sel heterokis dilakukan setiap 2 hari sekali dimulai dari hari ke-4 penelitian (Handajani 2011) dan pengukuran unsur hara dan kualitas air dilakukan dengan interval waktu 7 hari.

Penelitian ini dilakukan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) *in time* untuk melihat pengaruh perlakuan (sumber nitrogen yang berbeda) yang diberikan terhadap unit uji (jumlah sel heterokis), dengan melibatkan waktu pengamatan.

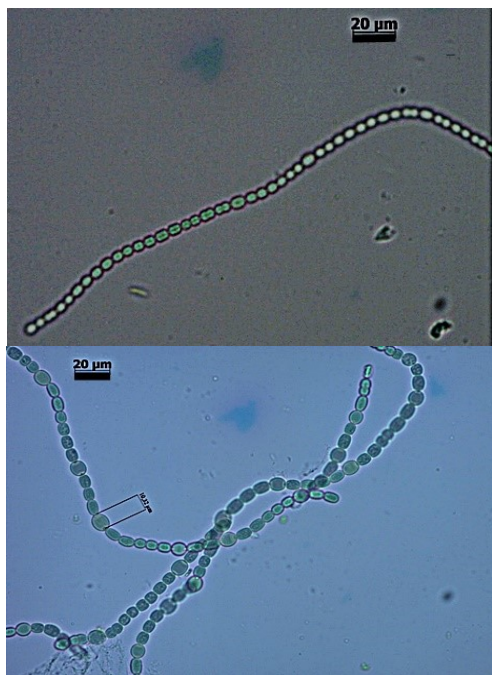
Rancangan ini melibatkan waktu pengamatan terhadap organisme uji dengan harapan mampu melihat perkembangan respon selama penelitian. Analisis RAL *in time* dilakukan berdasarkan Mattjik & Sumertajaya (2000). Selanjutnya, *Duncan multiple range test* (DMRT) dilakukan sebagai uji lanjutan hasil dari analisis RAL *in time*.

HASIL

Jumlah sel heterokis pada *Anabaena*

Hasil pengamatan menunjukkan adanya serangkaian filamen tanpa heterokis dan serangkaian filamen yang memiliki sel heterokis dengan interval yang hampir teratur sepanjang selnya (Gambar 2). Pada *Anabaena* yang memiliki sel heterokis, satu sel heterokis ditemukan pada setiap 2-20 sel vegetatif.

Jumlah sel heterokis pada *Anabaena* selama penelitian menggambarkan dinamika sel heterokis dari organisme yang ditumbuhkan dalam media yang berbeda. Perlakuan 0 mg/L umumnya mengalami peningkatan. Jumlah heterokis berfluktuasi selama 21 hari pengamatan (Gambar 3). Sebaliknya, perlakuan 10 mg/L umumnya mengalami penurunan jumlah sel heterokis. Uji statistik menunjukkan jumlah sel heterokis yang berbeda nyata antar perlakuan (konsentrasi nitrogen) dan antar waktu ($P < 0,05$).



Gambar 2. (A) *Anabaena azollae* tanpa sel heterokis dan (B) *Anabaena azollae* dengan sel heterokis

Amonium (NH_4^+)

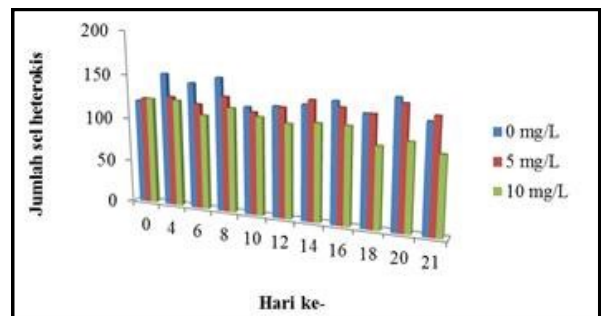
Amonium didapatkan dari penghitungan nilai $\text{NH}_3\text{-N}$ (TAN) yang merupakan nilai amonia bebas dan amonium. Pada umumnya, perlakuan 0 mg/L mengalami penambahan konsentrasi amonium pada media di awal pengamatan (Gambar 4). Sebaliknya, pada perlakuan 10 mg/L amonium pada media cair umumnya mengalami penurunan. Konsentrasi amonium pada perlakuan 0 mg/L lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Analisis statistik menunjukkan bahwa perubahan konsentrasi amonium pada media antar perlakuan (konsentrasi nitrogen) dan waktu berbeda nyata ($P < 0,05$).

Nitrit ($\text{NO}_2\text{-N}$)

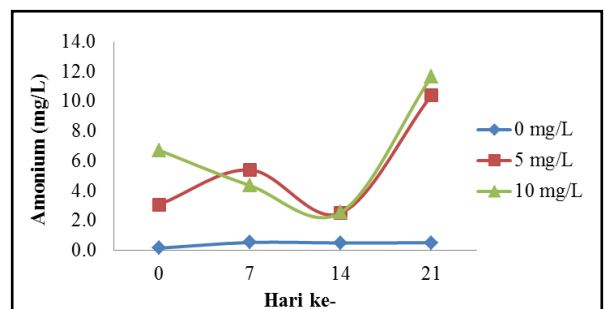
Nilai nitrit pada ketiga perlakuan berkisar 0,002 -0,004 mg/L (Gambar 5). Nilai nitrit pada ketiga perlakuan tidak menunjukkan perbedaan signifikan pada ketiga perlakuan. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa perubahan konsentrasi nitrit pada media antar perlakuan tidak berbeda nyata ($P > 0,05$). Uji statistik terhadap waktu pengamatan menunjukkan bahwa konsentrasi nitrit berbeda nyata terhadap perlakuan ($P < 0,05$).

Nitrat ($\text{NO}_3\text{-N}$)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nitrat selama pengamatan pada perlakuan 0 mg/L memiliki



Gambar 3. Jumlah sel heterokis selama 21 hari pengamatan

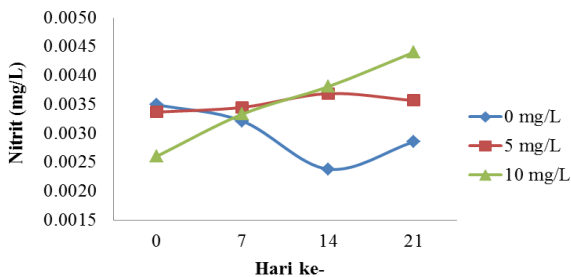


Gambar 4. Hasil analisis parameter amonium selama penelitian

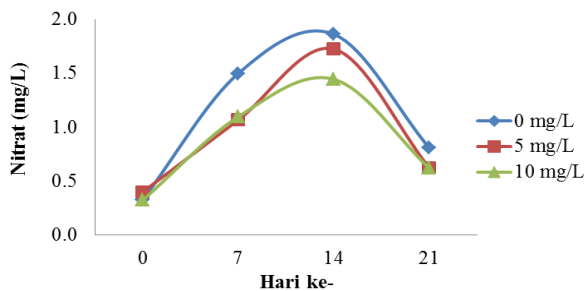
konsentrasi lebih tinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Konsentrasi nitrat pada semua perlakuan meningkat hingga hari ke-14 penelitian, namun turun pada analisis hari ke-21 (Gambar 6). Hasil statistik yang dilakukan menunjukkan bahwa perubahan konsentrasi nitrat pada media antarperlakuan (konsentrasi nitrogen) tidak berbeda nyata ($P>0,05$). Uji statistik perlakuan terhadap waktu pengamatan menunjukkan bahwa konsentrasi nitrat berbeda nyata ($P<0,05$).

Ortofosfat ($PO_4\text{-P}$)

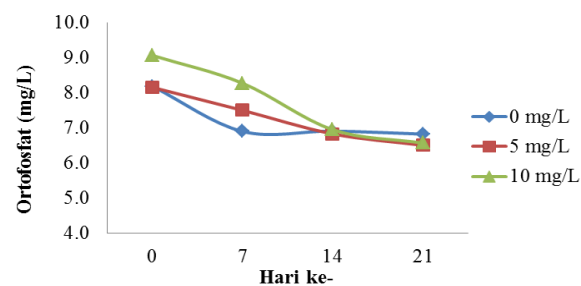
Konsentrasi ortofosfat mengalami penurunan pada setiap minggu pengamatan (Gambar 7). Nilai ortofosfat pada perlakuan 10 mg/L lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Perubahan nilai tersebut dipengaruhi oleh pemanfaatan oleh



Gambar 5. Hasil analisis parameter nitrit selama penelitian



Gambar 6. Hasil analisis parameter nitrat selama penelitian



Gambar 7. Hasil analisis parameter ortofosfat selama penelitian

alga, bakteri, maupun tanaman air (Wetzel & Likens 1995). Uji statistik menunjukkan konsentrasi ortofosfat berbeda nyata terhadap perlakuan (konsentrasi nitrogen) dan waktu ($P<0,05$).

Kualitas air

Kondisi lingkungan yang diamati melalui parameter kualitas air (suhu, pH, dan intensitas cahaya) memiliki kisaran yang hampir sama untuk semua perlakuan. Hal ini disebabkan karena lokasi penelitian serta tata letak wadah terhadap penyinaran matahari adalah sejajar dan sama. Parameter kualitas air berupa pH menunjukkan kisaran nilai sebesar 5,50-7,35. Parameter suhu selama penelitian berlangsung berkisar antara 27-31°C. Pengukuran parameter intensitas cahaya berada pada kisaran 3250 -5960 lux. Suhu, pH, dan intensitas cahaya tersebut sesuai dengan kebutuhan hidup *Anabaena* dan *Azolla* sp.

PEMBAHASAN

Berdasarkan penelitian diketahui bahwa jumlah heterokis berfluktuasi pada ketiga perlakuan (0 mg/L, 5 mg/L, dan 10 mg/L). Fogg (1949) menjelaskan bahwa jumlah heterokis pada *Anabaena* berfluktuasi selama siklus pertumbuhannya, dan struktur heterokis berkembang ketika beberapa zat nitrogen spesifik dalam sel normal berada pada konsentrasi kritis. Berdasarkan pengamatan heterokis yang dilakukan secara visual, diketahui bahwa satu sel heterokis ditemukan di antara 2-20 sel vegetatif. Berdasarkan Watanabe (1984), *Anabaena azollae* yang bersimbiosis dengan *Azolla* sp. dapat mencapai jumlah heterokis yang tinggi. Jarak antara dua sel heterokis berada di antara 3-5 sel vegetatif. Pada alga biru yang tidak bersimbiosis, jarak antara dua sel heterokis berkisar 15-30 sel vegetatif.

Sel heterokis pada *Anabaena* dengan media tanpa penambahan sumber nitrogen (perlakuan 0 mg/L), memiliki jumlah lebih tinggi dibandingkan perlakuan lainnya (Gambar 3). Sel heterokis tersebut terbentuk karena diferensiasi sel vegetatif menjadi sel heterokis, yang merupakan respon dari kurangnya konsentrasi nitrogen pada media hidup *Anabaena* dan *Azolla* sp. Sumber nitrogen yang cukup pada media, menyebabkan jumlah sel heterokis yang terbentuk kurang dari media bernitrogen rendah. Hal ini sesuai dengan Hill (1977) yang menyatakan

bahwa terbentuknya heterokis pada *Anabaena* dapat dihambat oleh nitrogen yang disuplai *Azolla* sp.

Sel heterokis akan mengikat nitrogen dari udara dan mengubahnya menjadi amonium. Sejumlah kecil amonium hasil fiksasi akan dilepaskan ke dalam air selama pertumbuhannya (Watanabe 1984). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian, yang menunjukkan adanya peningkatan konsentrasi amonium pada media (Gambar 4). Peningkatan amonium juga dapat disebabkan oleh *Azolla* sp. yang mati dan melepaskan amonium ke media hidupnya. Selama dekomposisi, nitrogen organik dimineralisasi secara cepat pada dua minggu pertama, selanjutnya laju dekomposisi berjalan lebih lambat (Watanabe 1984). Oleh karena itu, pada akhir pengamatan, konsentrasi amonium pada semua perlakuan meningkat dibandingkan dengan minggu sebelumnya. *Azolla* sp. yang mati ditunjukkan dengan warna daun yang kecoklatan.

Selain amonium, sumber nitrogen anorganik lainnya yang dapat dimanfaatkan oleh alga atau tanaman air adalah nitrat. Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi nitrat dalam media hidup *Azolla* sp. pada ketiga perlakuan meningkat hingga hari ke 14 (Gambar 6). Peningkatan nitrat diduga terjadi karena adanya proses nitrifikasi. Penurunan konsentrasi nitrat terjadi seiring dengan kritisnya konsentrasi amonium (H-21). Sigeo (2005) menjelaskan bahwa nitrat akan dimanfaatkan apabila ketersediaan amonium berada dalam kondisi kritis, karena dibutuhkan lebih banyak energi untuk melakukan proses penyerapan nitrat.

Nitrit merupakan sumber nitrogen anorganik lainnya yang dapat dimanfaatkan oleh alga dan tanaman air. Namun, alga akan lebih memilih menggunakan nutrisi dalam bentuk nitrat atau amonium (Widiastuti 2012). Hal ini ditunjukkan oleh nilai nitrit pada penelitian yang tidak mengalami perubahan konsentrasi yang signifikan di setiap pengamatan (Gambar 5). Hal ini terjadi karena sifat nitrit yang tidak stabil, berkaitan dengan keberadaan oksigen, sehingga memiliki konsentrasi yang relatif rendah di perairan.

Tersedianya sumber fosfor juga menjadi salah satu faktor yang menentukan pertumbuhan *Anabaena* dan *Azolla* sp. Orthofosfat merupakan bentuk fosfor anorganik yang dapat langsung diserap oleh alga dan tumbuhan. Konsentrasi Orthofosfat pada ketiga perlakuan selama penelitian mengalami

penurunan setiap minggunya (Gambar 7). Hal ini menunjukkan adanya pemanfaatan fosfor yang digunakan untuk pertumbuhan *Anabaena* dan *Azolla* sp. Fosfor merupakan komponen esensial yang digunakan untuk proses metabolisme (Wagner 1997).

Uji statistik dengan RAL *in time* menunjukkan bahwa perlakuan konsentrasi nitrogen berpengaruh nyata terhadap parameter heterokis dan amonia, sedangkan waktu penelitian memberikan pengaruh nyata terhadap semua parameter yang diuji, yaitu jumlah sel heterokis, amonia, nitrit, dan nitrat. Uji lanjut yang dilakukan menunjukkan bahwa ketiga perlakuan memiliki pengaruh yang berbeda terhadap perubahan jumlah sel heterokis dan konsentrasi amonium.

Dinamika sel heterokis dapat dilihat dari perubahan jumlah sel heterokis sebagai respon dari kurangnya ketersediaan nitrogen (amonium dan nitrat) pada media. Sel heterokis dapat terbentuk dan menjadi heterokis dewasa dalam waktu 15 jam (Wilcox *et al.* 1973). Hal ini menunjukkan heterokis dapat cepat terbentuk sebagai respon dari kurangnya sumber nitrogen. Sesuai dengan hasil akhir penelitian ini, persentase sel heterokis tertinggi dimiliki oleh perlakuan 0 mg/L (tanpa sediaan nitrogen). Perubahan sel heterokis terlihat pada minggu awal, yang ditandai dengan peningkatan jumlah sel heterokis yang signifikan pada perlakuan 0 mg/L. Selanjutnya, jumlah sel heterokis pada *Anabaena* berfluktuasi bergantung pada ketersediaan konsentrasi nitrogen pada media. Nitrogen yang difiksasi oleh sel heterokis dapat dilepas ke media pada saat pertumbuhan dan ketika *Azolla* sp. mengalami dekomposisi. Perubahan jumlah sel heterokis pada *Anabaena*, bermanfaat memberikan informasi mengenai peran *Anabaena* dan *Azolla* sp. dalam memperkaya nitrogen pada lingkungan hidupnya. Secara ekologi, hal ini berkaitan dengan ketersediaan nutrisi khususnya nitrogen pada lingkungan perairan.

KESIMPULAN

Perlakuan konsentrasi nitrogen yang diberikan pada media pertumbuhan *Azolla* sp. menghasilkan jumlah heterokis *Anabaena azollae* yang berbeda. Jumlah sel heterokis tertinggi terdapat pada perlakuan dengan konsentrasi nitrogen 0 mg/L.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami sampaikan kepada Direktorat Jenderal Perguruan Tinggi (DIKTI) atas bantuan dana penelitian BOPTN Tahun 2015, Skim Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi dengan judul penelitian “Eksplorasi Potensi Filamentus Mikroalgae sebagai Alternatif Sumberdaya Terbarukan-Tahap 2.

DAFTAR PUSTAKA

- Buikema, WJ., & R. Haselkorn. 1991. Isolation and complementation of nitrogen fixation mutants of the cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain pcc 7120. *Journal of Bacteriology*. 173 (6). 1879-1885.
- Eaton, DA., SL. Clebceri, EA. Greenberg. 2005. *Standard Method for The Examination of Water and Waste Water*. 21st Edition. Washington (US). American Public Health Association.
- Fogg, GE. 1949. Growth and heterocyst production in *Anabaena cylindrica* Lemm. II. in relation to carbon and nitrogen metabolism. *Annals of Botany (London)*. 13. 241-259.
- Golden, JW. & HS. Yoon. 2003. Heterocyst development in *Anabaena*. *Current Opinion in Microbiology*. (6). 557-563.
- Handajani, H. 2011. Optimization of nitrogen and phosphorus in *Azolla* growth as biofertilizer. *Makara Teknologi*. 15(2). 142-146.
- Hill, DJ. 1977. The role of *Anabaena* in the *Azolla-Anabaena* symbiosis. *New Phytologist*. 78. 611-616
- Mattjik AA, & IM Sumertajaya. 2000. *Perancangan Percobaan dengan Aplikasi SAS dan MINITAB Jilid I*. IPB-Press. Bogor.
- Meeks, JC. & Elhai. J. 2002. Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66 (1). 94-121.
- Mur, LR. MS. Olav, & U. Hans. 1999. *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. Editor Ingrid C & Jamie B. London. E&FN Spon.
- Mursalin. 2007. Pemanfaatan kayu apu (*Pistia stratiotes*), kiambang (*Salvinia molesta*), dan gulma itik (*Lemna perpusilla*) dalam memperbaiki kondisi air limbah kantin. [Skripsi]. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. IPB. Bogor.
- Sigee, DC. 2005. *Freshwater Microbiology*. England. John Wiley & Sons, LTD.
- [SNI] Standar Nasional Indonesia. 2005. *Pupuk Amonium Sulfat*. Badan Standarisasi Nasional. Jakarta.
- [SNI] Standar Nasional Indonesia. 2005. *Pupuk Tripel Super Fosfat*. Badan Standarisasi Nasional. Jakarta.
- Tamad. 1994. Peranan *Azolla* sp. dan penggenangan dalam menekan penguapan NH₃ pada beberapa takaran urea dari tanah sawah. [Tesis]. Program Pascasarjana. IPB. Bogor.
- Wagner, GM. 1997. *Azolla*: A review of its biology and utilization. *The Botanical Review*. (63). 1-26.
- Watanabe, I. & CM.. Ramirez. 1984. Relationship between soil phosphorus availability and *Azolla* growth. *Soil Science and Plant Nutrition*. 30(4). 95-598.
- Wetzel, RG. & GE. Likens. 1995. *Limnological Analyses*. 2nd Edition. New York. Springer-Verlag.
- Wei, TF, TS. Ramasubramanian, & WG. James. 1994. *Anabaena* sp. Strain Pcc 7120 ntcA gene required for growth on nitrate and heterocyst development. *Journal of Bacteriology*. 176 (15). 4473-4482.
- Widiastuti. 2012. Pengukuran laju fiksasi nitrogen strain-strain *Nostoc* [Vaucer 1803] Borneo et Flahault 1886 dengan metode acetylene reduction assay (ARA). [Skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia. Jakarta.
- Wilcox, M. GJ. Mitchison, & RJ. Smith. 1973. Pattern formation in the blue-green alga, *Anabaena*. *Journal of Cell Science*. 12. 707-723.