EKSTRAKSI DAN PENENTUAN GUGUS FUNGSI ASAM HUMAT DARI PUPUK KOTORAN SAPI

Nurlina^{1*}, Intan Syahbanu¹, Mirna Tersiana Tamnasi¹,
Chyntia Nabela¹, Maria Desi Furnata¹

¹ Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Tanjungpura, Kalimantan Barat, Indonesia

*Corresponding author: nurlina@chemistry.untan.ac.id

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 May
2018

Accepted 28 May
2018

Available online
26 June 2018

Keywords:

Extraction
Humic acid
Cow manure
Fertilizer
Total acidity

ABSTRACT

Cow manure fertilizer was used as raw material for the extraction of humic acid in this research. The aim of this research were extraction of humic acid from cow manure fertilizer, characterization of functional groups based on FTIR spectra, and determination of humic acid functional groups. Humic acid extraction from cow manure used 0.050 M; 0.100 M; 0.250 M dan 0.500 M KOH solution. A cow manure fertilizer were shaken with KOH solution for 1; 2; 4 and 6 h. The quantitative determination of oxygen-containing functional groups of humic acid was conducted by titrimetri. The FTIR spectrum showed the presence of -OH group and N-H stretching (bands 3361.46 cm^{-1}); C-H aliphatic for CH_2 , CH_3 (2946.52 cm^{-1} and 1442.24 cm^{-1}); C=C aromatic components (1626.48 cm^{-1}); COO- symmetric stretching (1521.71 cm^{-1}); C-O stretching from -COOH (1229.74 cm^{-1}). Total acidity value was 500 cmole.kg^{-1} (Baryta Absorption Method); carboxyl groups content was 250 cmole.kg^{-1} (Ca-Acetate Method); and phenol (OH) concentration was 250 cmole.kg^{-1} . It can be concluded that humic acid successfully extracted from cow manure fertilizer using 0.250 KOH solution as extractant for 2 h, which has yield of 4.486% humic acid.

© 2018 IJoPAC. All rights reserved

1. Pendahuluan

Asam humat merupakan salah satu fraksi dari senyawa humat yang termasuk dalam bahan organik tanah (*natural organic matter*). Senyawa ini berasal dari degradasi biologis (enzimatis), kimia maupun abiotik dari material organik yang ada di atas tanah [1]. Asam humat larut pada pH tinggi (keadaan basa) namun tidak larut pada pH rendah (keadaan asam).

Berbagai publikasi penelitian telah membuktikan bahwa asam humat bertanggungjawab dalam peningkatan produksi dan kualitas tanaman pangan, misalnya padi, gandum, dan brokoli [2], [3], [4], [5]. Asam humat terbukti mampu memberikan perbaikan secara biologis dan fisiologi tanaman [6], [7]. Asam humat berperan dalam memaksimalkan fungsi akar sehingga tanaman dapat menyerap unsur hara yang lebih banyak [8]. Pengaplikasian asam humat pada tanah berperan dalam meningkatkan penyerapan fosfor (P), kalium (K), magnesium (Mg), natrium (Na), tembaga (Cu) dan seng (Zn) [9].

Asam humat dapat diisolasi dari tanah gambut, namun peran ekosistem gambut yang dapat mempertahankan hidrologi dan cadangan karbon untuk lingkungan hidup menyebabkan kepentingan melindungi ekosistem gambut lebih penting sehingga fungsinya dapat

dipertahankan dimasa yang akan datang. Eksplorasi asam humat dapat dilakukan dengan mencari sumber daya alam lainnya yang dapat dijadikan sumber asam humat.

Pupuk kotoran sapi merupakan sumber bahan organik yang dimungkinkan mengandung asam humat, karena pupuk kotoran sapi telah melalui proses biodegradasi melalui pengomposan yang merupakan model sederhana proses humifikasi bahan organik. Pada umumnya, asam humat terbentuk dari proses dekomposisi bahan organik dengan jangka waktu yang cukup lama yang dibantu oleh mikroorganisme pengurai. Hal ini serupa dengan teknik pengomposan, karena teknik pengomposan merupakan salah satu cara dekomposisi bahan organik dengan jangka waktu yang bisa diatur, yang mengakibatkan rasio C/N bahan organik menjadi turun (terdegradasi). Ekstraksi asam humat dari serbuk kotoran sapi telah dilakukan menggunakan larutan NaOH 0,1 M ^[10]. Asam humat yang diekstraksi dari kotoran ternak berperan sebagai *auxin-like compounds* untuk meningkatkan aktivitas enzimatik pada akar tanaman barley ^[11].

Penelitian ini akan mengekstrak asam humat dari pupuk kotoran sapi. Pupuk kotoran sapi adalah kotoran sapi yang telah dikomposkan secara sederhana kemudian dijadikan pupuk. Ekstraksi dilakukan dengan variasi konsentrasi larutan KOH yang divariasi konsentrasinya (0,050-0,500 M) dan variasi waktu pengocokan (1-6 jam). Asam humat yang diperoleh dikarakterisasi serapan gugus fungsinya dengan FTIR dan ditentukan kandungan total keasaman, kandungan gugus karboksilat dan kandungan gugus -OH fenolatnya.

2. Material dan Metode

2.1. Pengumpulan sampel

Pupuk kotoran sapi diperoleh dari salah satu tempat peternakan sapi di Kota Pontianak. Pupuk yang diperoleh sudah dalam keadaan kering.

2.2. Ekstraksi Asam Humat

Secara umum, metode ekstraksi asam humat dilakukan dengan merujuk pada metode dari Stevenson ^[12]. Variasi parameter yang digunakan untuk mengekstraksi asam humat yang digunakan dalam penelitian ini adalah konsentrasi larutan basa pengekstrak dan lama waktu pengocokan pupuk kotoran sapi dengan larutan basa pengekstrak. Larutan basa pengekstrak yang digunakan adalah KOH dengan variasi konsentrasi 0,050 M; 0,100 M; 0,250 M dan 0,50 M. Waktu pengocokan pupuk kotoran sapi dengan larutan KOH divariasi dari 1 jam sampai dengan 6 jam.

Pupuk kotoran sapi yang telah dibersihkan, dikeringkan dan dihaluskan, dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi larutan basa pengekstrak dengan rasio 1:12,5. Campuran dikocok menggunakan *shaker*. Campuran tersebut didiamkan 24 jam. Setelah 24 jam, campuran disaring untuk memperoleh filtrat dan endapan. Filtrat hasil saringan ditambahkan HCl pekat hingga pH 1, dikocok menggunakan *shaker*, kemudian didiamkan selama 24 jam. Campuran disaring hingga diperoleh filtrat dan endapan. Proses pemisahan dengan KOH dan HCl ini diulang dua kali. Endapan yang diperoleh dicuci berulang kali dengan akuades hingga air pencucian bebas ion Cl⁻, yang dapat dibuktikan dengan tidak adanya pembentukan endapan putih AgNO₃ ketika air pencucian direaksikan dengan larutan AgCl. Setelah dicuci asam humat tersebut dikeringkan pada suhu 60°C. Asam humat yang diperoleh dikarakterisasi dengan FTIR.

2.3. Penentuan Total Keasaman

Total keasaman asam humat hasil ekstraksi dari pupuk kompos kotoran sapi dihitung dengan metode barium hidroksida (*Baryta Absorption Methods*). Sebanyak 20 mg asam humat ditambahkan dengan 10 ml Ba(OH)₂ 0,2 M. Campuran ini dikocok selama 24 jam pada temperatur ruangan. Hasil dari pengocokan adalah terbentuknya filtrat dan endapan. Endapan dicuci dengan akuades. Larutan dititrasi dengan HCl 0,25M hingga pH 8,4. Titrasi dilakukan

secara triplo. Prosedur tersebut juga dilakukan untuk blanko yaitu 10 mL larutan Ba(OH)₂ 0,2 N [12]. Total keasaman dihitung dengan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Total keasaman (cmol kg}^{-1}\text{)} = \frac{(V_{\text{blanko}} - V_{\text{sampel}}) \times N_{\text{basa}} \times 10^5}{V'_{\text{sampel}}(\text{mg})} \quad (\text{i})$$

2.4. Penentuan Kandungan Gugus Karboksilat

Penentuan kandungan gugus karboksilat dari pupuk kompos kotoran sapi dilakukan dengan metode Ca-asetat. Sebanyak 20 mg asam humat ditempatkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan 10 ml Ca(CH₃COO)₂ 0,1 N dan 40 ml akuades. Campuran ini dikocok selama 24 jam pada temperatur ruangan. Hasil dari pengocokan adalah terbentuknya filtrat dan endapan. Endapan dicuci dengan akuades. Larutan dititrasi dengan larutan standar NaOH 0,1 M hingga pH 9,8. Titrasi dilakukan secara triplo. Prosedur diulangi untuk blanko yaitu campuran 10 ml Ca(CH₃COO)₂ 0,1 N dan 40 ml akuades [12]. Kandungan gugus karboksilat dihitung dengan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Kandungan gugus karboksilat (cmol kg}^{-1}\text{)} = \frac{(V_{\text{sampel}} - V_{\text{blanko}}) \times N_{\text{basa}} \times 10^5}{V'_{\text{sampel}}(\text{mg})} \quad (\text{ii})$$

2.5. Penentuan Kandungan Gugus -OH Fenolik

Kandungan gugus fenolik dihitung dari selisih total keasaman dengan kandungan gugus karboksilat, seperti pada persamaan berikut ini [12]:

$$\text{Kandungan gugus fenolik (cmol kg}^{-1}\text{)} = \text{TA (cmol kg}^{-1}\text{)} - \text{GK (cmol kg}^{-1}\text{)} \quad (\text{iii})$$

3. Hasil dan Pembahasan

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah pupuk kotoran sapi. Pupuk kotoran sapi berasal dari kotoran sapi yang telah melalui proses pengomposan. Hipotesis penelitian ini adalah terdapat kandungan asam humat pada pupuk kotoran sapi. Hipotesis ini didasarkan pada konsep pembentukan senyawa humat yang terjadi melalui proses humifikasi yang melibatkan mikroorganisme. Secara umum senyawa humat berasal dari proses biosintesis polisakarida dan senyawa amino dengan melibatkan serangkaian proses oksidasi, demetilasi dan kondensasi dengan senyawa nitrogen [11]. Pengomposan merupakan pemodelan sederhana dari proses humifikasi dengan variabel kondisi yang lebih terukur. Komposisi asam humat yang diperoleh dari proses pengomposan tidak berbeda signifikan dengan komposisi asam humat yang diperoleh dari proses humifikasi [13].

Asam humat diekstrak dari pupuk kotoran sapi berdasarkan perbedaan kelarutannya dalam asam dan basa untuk memisahkannya dari senyawa humat yang lain (asam fulvat dan humin). Pupuk kotoran sapi dicampurkan dengan larutan basa kuat yaitu KOH. Larutan basa kuat lebih baik dalam mengekstraksi asam humat daripada larutan asam lemah maupun [12]. Pernyataan ini dikuatkan dengan hasil penelitian lain yang membuktikan bahwa perolehan asam humat dari proses ekstraksi dengan larutan KOH menghasilkan rendemen sebesar 46% lebih banyak daripada perolehan asam humat dari proses ekstraksi dengan larutan NaOH pada konsentrasi yang sama [14]. *Alkaline extraction* (ekstraksi dengan basa) bertujuan untuk mengekstrak karbon total dan karbohidrat dari kotoran sapi [15].

Pencampuran asam humat dengan larutan KOH bertujuan melarutkan asam humat dan memisahkannya dari humin. Filtrat yang mengandung campuran asam humat dan asam fulvat kemudian diperlakukan dengan larutan asam yang bertujuan untuk memisahkan asam humat dengan asam fulvat, karena asam humat tidak larut dalam asam. Endapan yang terbentuk dari proses ini disebut sebagai asam humat.

Perlakuan dengan larutan asam (larutan HCl) akan menyisakan kandungan ion Cl⁻, sehingga keberadaan ion ini harus dihilangkan dengan pencucian berulang dengan mengalirkan air demineral. Pengujian keberadaan ion Cl⁻ dilakukan dengan cara menambahkan larutan AgNO₃ ke dalam air yang telah dialirkan ke asam humat. Asam humat dikatakan bebas ion Cl⁻ apabila tidak terbentuk endapan putih setelah ditambahkan AgNO₃ ke dalam wadah, berdasarkan persamaan reaksi sebagai berikut:

Pengaruh variasi konsentrasi larutan KOH yang digunakan terhadap perolehan asam humat dapat dilihat pada Gambar 1. Berdasarkan Gambar 1, perlakuan ekstraksi asam humat dengan larutan KOH dengan konsentrasi 0,050 M hingga 0,0250 M sebanding dengan peningkatan perolehan asam humat. Perlakuan ekstraksi asam humat dengan konsentrasi larutan KOH 0,250 M menunjukkan perolehan asam humat terbanyak.

Perolehan asam humat dengan ekstraksi dengan konsentrasi larutan KOH lebih besar dari 0,25 M yaitu pada konsentrasi 0,5 M menunjukkan terjadinya penurunan perolehan asam humat. Menurut Apabila konsentrasi KOH yang tinggi menyebabkan meningkatnya peluang rusaknya ikatan antara asam fulvat dengan asam humat, seperti ikatan -H atau ikatan tipe-ester [16]. Keadaan tersebut akan mengubah rasio asam humat dan asam fulvat, akibatnya perolehan filtrat hasil perlakuan dengan larutan KOH 0,5 M lebih sedikit dari perolehan filtrat hasil perlakuan dengan larutan KOH 0,25 M. Filtrat mengandung asam humat yang larut dalam larutan basa.

Pengaruh waktu pengocokan pupuk kompos kotoran sapi dengan larutan KOH 0,25 M terhadap perolehan asam humat dapat dilihat pada Gambar 2. Gambar 2 menunjukkan waktu pengocokan optimum adalah 2 jam, dimana diperoleh massa asam humat paling besar. Hasil uji Anova menunjukkan bahwa perolehan asam humat dengan waktu pengocokan 1 jam dan 2 jam memberikan perbedaan hasil perolehan asam humat yang signifikan. Penambahan waktu pengocokan melebihi 2 jam tidak signifikan terhadap perolehan massa asam humat.

Gambar 1. Pengaruh konsentrasi KOH yang digunakan dengan perolehan asam humat dari pupuk kotoran sapi

Gambar 2. Pengaruh waktu pengocokan terhadap perolehan asam humat dari pupuk kotoran sapi

Ekstraksi pupuk kotoran sapi dengan larutan KOH 0,250 M dengan waktu pengocokan 2 jam menghasilkan asam humat dengan perolehan terbanyak 4,486%. Asam humat yang diperoleh kemudian dikarakterisasi serapan gugus fungsinya dengan spektrometri FTIR (Gambar 3). Karakterisasi serapan gugus fungsi asam humat hasil ekstraksi dari pupuk kotoran sapi dibandingkan dengan serapan gugus fungsi asam humat standar dan serapan gugus fungsi asam humat menurut Stevenson ^[12]. Perbandingan bilangan gelombang yang muncul pada asam humat hasil ekstraksi dari pupuk kotoran sapi dengan asam humat standar dan asam humat menurut Stevenson disajikan pada Tabel 1.

Gambar 3. Spektrum FTIR asam humat hasil ekstraksi dari pupuk kotoran sapi

Berdasarkan interpretasi spektra FTIR, asam humat hasil ekstraksi dari pupuk kotoran sapi mengandung gugus fungsional hidroksil ($-OH$) dan karboksilat ($-COOH$). Indikasi keberadaan gugus $-OH$ ditandai dengan munculnya vibrasi perubahan (*deformation*) $-OH$ dari $-COOH$ dan regang $-C-O$ yang teridentifikasi pada bilangan gelombang $1229,74\text{ cm}^{-1}$. Keberadaan gugus $-COOH$ ditunjukkan dengan munculnya karakteristik serapan gugus fungsi $-OH$ dari $-COOH$ pada bilangan gelombang $3361,46\text{ cm}^{-1}$, meskipun serapan yang menunjukkan adanya gugus karbonil ($-C=O-$) yang umumnya muncul pada bilangan gelombang $1725-1720\text{ cm}^{-1}$ tidak muncul

dalam spektra asam humat hasil ekstraksi, demikian juga pada asam humat standar. Tidak munculnya serapan gugus C=O pada bilangan gelombang 1700 cm^{-1} , yang secara khas menunjukkan keberadaan -COOH , dikarenakan adanya peluang terjadinya ikatan antara gugus -COOH dengan logam yang dimungkinkan terkandung dalam pupuk kotoran sapi [18]. Kandungan logam dari kotoran sapi dapat berasal dari unsur hara makro seperti kalium (K), magnesium (Mg), kalsium (Ca), dan lain-lain.

Tabel 1. Bilangan Gelombang Asam Humat Standar, Asam Humat Hasil Ekstraksi dari Pupuk Kotoran Sapi dan Asam Humat Menurut Stevenson

Bilangan gelombang (cm^{-1})			
Asam Humat Standar [17]	Asam Humat Hasil Ekstraksi dari Pupuk Kotoran Sapi	Asam Humat menurut Stevenson [12]	Gugus Terkait
3425,58	3361,46	3400-3300	regang -OH atau N-H
2924,09	2946,52	2940-2900	regang simetri dan asimetri C-H alifatik dari CH_2 atau -CH_3
-	-	1725-1720	regang C=O dari gugus -COOH atau keton
-	-	1660-1630	regang C=O dari gugus amida, -C=O dari kuinon dan atau -C=O keton
-	1626,70	1620-1600	C=C aromatik, H terkonjugasi dari gugus C=O dari keton dan atau karboksilat
1573,91	1521,71	1590-1517	regang simetrik COO- , <i>deformation</i> N-H dan vibrasi ulur -C=N dari amida ikatan rangkap 2
-	1442,24	1460-1450	C-H alifatik
1388,75	-	1400-1390	<i>deformation</i> -O-H , regang C-O dari -OH fenolik, <i>deformation</i> C-H dari -CH_2 dan CH_3
-	1229,74	1280-1200	Regang C-O , <i>deformation</i> -OH , ulur -CH_3

Serapan pada bilangan gelombang $2946,52\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan vibrasi C-H alifatik dari CH_2 atau -CH_3 . Serapan khas dari asam humat juga muncul pada bilangan gelombang $1626,70\text{ cm}^{-1}$. Keberadaan pita serapan dari regang simetrik COO- atau perubahan vibrasi N-H dan vibrasi ulur -C=N dari amida ikatan rangkap 2 terindikasi pada bilangan gelombang $1521,71\text{ cm}^{-1}$. Serapan ini mengindikasikan gugus C=C dari cincin aromatik dan atau H terkonjugasi C=O dari gugus karbonil (karboksilat dan keton). Serapan pada bilangan gelombang 1230 cm^{-1} menunjukkan perubahan vibrasi C=O dari gugus karboksilat khususnya dari -COOH .

Secara teoritis, keberadaan gugus fungsi -COOH dan -OH dari enolat/fenolat pada asam humat menyebabkan asam humat bersifat asam, karena pelepasan ion H^+ dari gugus-gugus tersebut. Total keasamaan, kandungan -COOH dan -OH fenolat asam humat hasil ekstraksi dari pupuk kotoran sapi dianalisis secara kuantitatif melalui serangkaian metode. Hasil uji kandungan gugus fungsional asam humat disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Kandungan Gugus Fungsi Asam Humat Hasil Ekstraksi Pupuk Kotoran Sapi

Gugus fungsi	Kadar gugus dalam asam humat (cmol.kg ⁻¹)	
	Asam humat menurut Schnitzer ^[19]	Asam humat hasil ekstraksi
Total keasaman	560 – 890	500
Gugus karboksilat	150 – 570	250
Gugus fenolik	270 – 350	250

Penetapan kandungan total keasaman didasarkan pada pertukaran kation H⁺ dari asam humat dengan kation Ba²⁺ dari Ba(OH)₂. Prinsip reaksi juga dapat dikatakan sebagai reaksi penetralan asam-basa yang menghasilkan garam dan air. Asam humat (ditulis dengan lambang RH, dimana R adalah makromolekul asam humat dan H adalah proton dari gugus –COOH dan –OH yang akan ditransfer/dilepaskan) akan bereaksi dengan larutan Ba(OH)₂ berlebih yang bersifat basa, sehingga ion H⁺ dari asam humat (RH) dilepaskan. Ion R⁻ berikatan dengan ion Ba²⁺ dari larutan Ba(OH)₂ membentuk garam R₂Ba. Ion H⁺ dari RH bergabung dengan ion OH⁻ dari larutan Ba(OH)₂ membentuk H₂O. Ion OH⁻ yang berlebih dari Ba(OH)₂ dititrasi dengan dengan larutan HCl. Banyaknya volume larutan HCl yang akan digunakan untuk titrasi akan sebanding dengan banyaknya Ba(OH)₂ sisa, sehingga dapat ditentukan berapa banyak konsentrasi ion OH⁻ dari Ba(OH)₂ yang digunakan untuk menetralkan ion H⁺ yang dilepaskan dari RH. Persamaan reaksi yang terjadi dituliskan sebagai berikut:

Penentuan gugus karboksilat dilakukan dengan menggunakan metode Ca-asetat. Prinsip dari metode Ca-asetat adalah prinsip pertukaran kation H⁺ dari asam humat (dilambangkan dengan R-COOH) dengan kation Ca²⁺ dari larutan Ca(CH₃COO)₂ berlebih. Banyaknya Ca²⁺ yang dipertukarkan sebanding dengan ion H⁺ yang dilepaskan dari asam humat. Larutan Ca(CH₃COO)₂ sisa kemudian dititrasi dengan dengan larutan NaOH. Persamaan reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut:

Penentuan kandungan gugus -OH fenolik atau asam -OH diperoleh dari merupakan selisih antara total keasaman dan kandungan gugus karboksilat. Hanya –OH yang dapat beraksi dengan Ba(OH)₂ yang dapat ditentukan dengan menggunakan pendekatan perhitungan ini.

Berdasarkan perhitungan, asam humat hasil ekstraksi pupuk kotoran sapi mengandung total keasaman dan kandungan karboksilat yang memenuhi rentang nilai yang diberikan oleh Schnitzer ^[19]. Namun nilai gugus –OH fenolik tidak memenuhi rentang nilai yang diberikan oleh Schnitzer ^[19]. Hal ini dapat disebabkan karena ada ion H⁺ dari asam humat dari yang belum atau tidak bereaksi dengan Ba(OH)₂ dalam penentuan total keasamaan, sehingga nilai total keasaman yang terhitung lebih kecil dari kandungan total keasaman yang sebenarnya.

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa asam humat berhasil diekstraksi dari pupuk kotoran sapi larutan KOH 0,250 sebagai larutan pengeskrak dan waktu pengocokan selama 2 jam, dengan perolehan hasil sebesar 4,486%. Spektrum FTIR menunjukkan serapan khas untuk asam humat yaitu pada bilangan gelombang untuk gugus-gugus -OH dan regang N-H ($3361, 46\text{ cm}^{-1}$); C-H alifatik untuk CH_2 , CH_3 ($2946,52\text{ cm}^{-1}$ dan $1442,24\text{ cm}^{-1}$); C=C aromatik ($1626,48\text{ cm}^{-1}$); regang simetrik COO^- ($1521,71\text{ cm}^{-1}$); C-O dari $-\text{COOH}$ ($1229,74\text{ cm}^{-1}$). Asam humat dari kompos kotoran sapi mengandung total keasaman sebesar 500 cmol.kg^{-1} ; kandungan gugus karboksilat sebesar 250 cmol.kg^{-1} dan kandungan -OH fenolik sebesar 250 cmol.kg^{-1} .

Referensi

- [1] Wershaw R. L. Evaluation of Conceptual Models of Natural Organic Matter (Humus) From a Consideration of the Chemical and Biochemical Processes of Humification. Scientific Investigations Report 2004-5121U.S. Department of the Interior and U.S. Geological Survey Denver; 2004.
- [2] Bashir, M., Qadri, R. W. K., Khan, I., Zain, M., Rasool, A., & Ashraf, U. Humic acid application improves the growth, floret and bulb indices of *Gladiolus* (*Gladiolus grandiflorus* L.). *Pakistan Journal of Science*. 2016; 68 (2):121-127.
- [3] Xue, X., Xue, Z., Song, Z., Zhang, F., Wang, Z., & Han, Y. Effect of combined application of humic acid and urea on the wheat growth and yield. *Asian Agricultural Research*. 2016; 8 (9):67-70.
- [4] Wang, X., Su, Y., Xu, X., & Li, G. Effect of fulvic acid on growth and yield components of direct seeding rice, *Agricultural Science & Technology*. 2013; 14 (7):966-972.
- [5] Dai, M., Chen, Q., Hu, Z., Li, X., Zhang, J., Wang, J., & Feng, H. Effects of humic acid and PASP compound fertilizer application on growth, quality and yield of Broccoli, *Agricultural Science & Technology*. 2016; 17 (3):535-538.
- [6] Zandonadi D. B., Santos M. P., Busato J. G., Peres L.E.P, Façanha, A.R. Plant physiology as affected by humified organic matter, *Theor. Exp. Plant Physiol*. 2013; 25 (1):12-25.
- [7] Canellas LP, Spaccini R, Piccolo A, Dobbss LB, Façanha ALO, Santos GA, Olivares FL, and Façanha A.R. Relationships Between Chemical Characteristics and Root Growth Promotion of Humic Acids Isolated From Brazilian Oxisols, *Soil Science*. 2009; 174 (11):611-620.
- [8] Wijaya H. and Suwardi. Peningkatan Produksi Tanaman Pangan dengan Bahan Aktif Asam Humat dengan Zeolit sebagai Pembawa, *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*. 2013; 18 (2):79.
- [9] Khaled H., and Fawy H.A. 2011. Effect of Different Levels of Humic Acids on the Nutrient Content, Plant Growth, and Soil Properties under Conditions of Salinity, *Soil & Water Res*. 2011; 6 (1):21-29.
- [10] Barot, N.S. and Bagla, H.K. Extraction of humic acid from biological matrix-dry cow dung powder. *Journal Green Chemistry Letters and Review*. 2009; 2 (4):217-221.
- [11] Nagasawa, K., Wang, B., Nishiya, K., Ushijima, K., Zhu, Q., Fukushima, M., Ichijo, T. Effects of humic acids derived from lignite and cattle manure on antioxidant enzymatic activities of barley root, *J Environ Sci Health B*. 2016; 51 (2):81-89.
- [12] Stevenson, F.J. 1994. Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reaction. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- [13] Monedero, M.A.S., Cegarra, J., Garcia, D. and Roig, A. Chemical and structural evolution of humic acids during organic waste composting, *Biodegradation*. 2002; 13:361-371.
- [14] Fong, S.S., Lau S., Wong N.C., Janice A., Muhammad F., and Amira S, 2006, Characterization of the Coal Derived Humic Acids from Mukah Sarawak as Soil Conditioner, *J. Braz Chem Soc*. 2006; 17(2):582-587.
- [15] Bellera, C., Abaalkheel, I., Rovira, P. and Alrefai, J. Obtaining commercial humic products from uncomposted manures: previous acid hydrolysis to enhance yields, *Int J Recycl Org Waste Agricult*. 2015; 4:219-231.

- [16] Asing J , N.C. Wong and S. Lau. Optimization Of Extraction Method And Characterization Of Humic Acid Derived From Coals and Composts. *J. Trop. Agric. and Fd. Sc.* 2009; 37 (2): 211-223.
- [17] Astuti, P., Idiawati, N., dan Destiarti, L., 2015. Validasi Metode Pengukuran Kadar Asam Humat Hasil Ekstraksi Kalium Hidroksida dengan Spektrofotometri Ultraviolet, *Jurnal Kimia Khatuslitiwa*. 2015; 5 (2):69-77.
- [18] Mohadi, R., Hidayati, N., Santosa, S.J. Narsito. 2008. Karakterisasi Asam Humat dari Gambut Indralaya, Ogan Ilir Sumatera Selatan, *Jurnal Penelitian Sains*. 11(1):411-420.
- [19] Schnitzer, M. 1986. Pengikatan Bahan Humat Oleh Koloid Mineral Tanah, dalam buku Interaksi Mineral Tanah dengan Organik Alami dan Mikroba, 1997, Huang, P. M dan Schnitzer, M. (editor), Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, 119-155.