

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penambat Nitrogen Asal Bintil Akar Akasia Daun Lebar (*Acacia mangium*) di Lahan Pascatambang Timah

*Isolation and Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria from Root Nodules of Broadleaf Acacia (*Acacia mangium*) in Post-Tin Mining Land*

Bunga Lestari*, Dina Famuri, Marisa Olieviani, Ririn Cindya Sari, & Shopy Mayang Sari

Program Studi Biologi, Jurusan Sains Alam dan Ilmu Formal, Fakultas Sains dan Teknik,
Universitas Bangka Belitung, Indonesia

*Email: bungalestari33173@gmail.com

ABSTRAK

Bakteri penambat nitrogen memiliki peranan penting dalam pemulihan struktur agregat tanah dan penting dalam pemulihan lahan. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri penambat nitrogen dari bintil akar *Acacia mangium* yang tumbuh di lahan pascatambang timah di Bangka. Penelitian dilaksanakan melalui beberapa tahapan, mulai dari pengambilan sampel bintil akar, isolasi bakteri pada media YEMA, uji kemampuan fiksasi nitrogen pada media *Löwenstein-Jensen* dan *Nitrogen-Free Bromothymol Blue*, serta karakterisasi makroskopis, mikroskopis, dan biokimia. Hasil menunjukkan bahwa keempat isolat bakteri (R1, R2, R3, dan R4) mampu menambat nitrogen, yang ditandai dengan perubahan warna media *Nitrogen-Free Bromothymol Blue* (NfB) menjadi biru dan pertumbuhan koloni pada media *Lowenstein-Jensen* (LJ). Karakterisasi menunjukkan bahwa seluruh isolat merupakan bakteri Gram negatif, dengan bentuk koloni putih dan elevasi datar, serta positif terhadap uji katalase dan motilitas. Perhitungan TPC menunjukkan populasi bakteri yang tinggi, terutama pada isolat R3 dan R4 dengan rata-rata $1,69 \times 10^8$ CFU/ml. Kesimpulan dari penelitian ini adalah bahwa *Acacia mangium* memiliki potensi simbiosis yang efektif dalam fiksasi nitrogen, sehingga berperan penting dalam strategi reklamasi lahan pascatambang untuk memperbaiki kesuburan tanah secara hayati.

Kata Kunci: bakteri penambat nitrogen, *Acacia mangium*, lahan pascatambang timah, karakterisasi bakteri, fiksasi nitrogen biologis.

ABSTRACT

*Nitrogen-fixing bacteria have an important role in restoring soil aggregate structure and are important in land recovery. This study aims to isolate and characterize nitrogen-fixing bacteria from the root nodules of *Acacia mangium* growing on post tin mining land in Bangka. The research was carried out through several stages, starting from root nodule sampling, bacterial isolation on YEMA media, nitrogen fixation ability test on *Löwenstein-Jensen* and *Nitrogen-Free Bromothymol Blue* media, and macroscopic, microscopic, and biochemical characterization. The results showed that the four bacterial isolates (R1, R2, R3, and R4) were able to fix nitrogen, which was indicated by a change in the color of *Nitrogen-Free Bromothymol Blue* (NfB) media to blue and colony growth on *Lowenstein-Jensen* (LJ) media. Characterization showed that all isolates were Gram-negative bacteria, with white colonies and flat elevations, and positive for catalase and motility tests. TPC calculation showed a high bacterial population, especially in isolates R3 and R4 with an average of 1.69×10^8 CFU/ml. The conclusion of this study is that *Acacia mangium* has the potential of symbionts that are effective in nitrogen fixation, thus playing an important role in post-mining land reclamation strategies to improve soil fertility biologically.*

Keywords: Nitrogen fixing bacterial, *Acacia mangium*, post tin mine land, bacterial characterization, biological nitrogen fixation.

PENDAHULUAN

Provinsi Kepulauan Bangka Belitung adalah salah satu daerah penghasil timah terbesar di Indonesia, dan terbesar kedua di dunia setelah China (Sari *et al.*, 2017). Luas lahan pascatambang timah di Pulau Bangka sekitar 79.163 ha, terdiri dari lahan darat seluas 70.176 ha (Lestari *et al.*, 2020). Penambangan timah yang terus berlangsung menyebabkan degradasi lahan dan kualitas tanah semakin menurun sehingga luas lahan kritis terus bertambah (Hamid *et al.*, 2019). Aktivitas penambangan timah di Pulau Bangka dan Belitung menyebabkan pencemaran yang memiliki dampak negatif seperti perubahan bentang alam, menurunkan keanekaragaman hayati dan menurunkan kualitas fisik dan kimia di dalam tanah (Nurtjahya *et al.*, 2022).

Sifat fisik dan kimia tanah juga sangat dipengaruhi oleh aktivitas penambangan. Penurunan sifat fisik tanah misalnya kerusakan struktur tanah, tekstur tanah kasar, peka terhadap erosi dan kemampuan menahan air rendah. Penurunan kimia tanah meliputi rendahnya kapasitas tukar kation dalam tanah, pH tanah tergolong asam, miskin unsur hara dan kadar bahan organik serta tercemarnya tanah akibat kandungan logam berat yang tinggi (Kurnia, 2023). Logam berat yang berlebihan didalam tanah bisa bersifat toksik bagi makhluk hidup dan lingkungan. Selain itu logam berat juga dapat menyerap ke dalam sistem air tanah dan mencemari air tersebut. Logam berat dari sisa penambangan timah dapat mencemari lingkungan meskipun dalam konsentrasi rendah (Mentari *et al.*, 2017). Kandungan logam tertinggi di tailing timah adalah Pb, Cu dan Zn, sementara di kolong pasca penambangan timah adalah Fe, Al dan As (Sari *et al.*, 2017). Terdapat logam lain yang bersifat toksik bagi makhluk hidup dan juga mencemari lingkungan seperti Cd dan Cr (Kurniawan & Sasongko, 2013).

Tingkat kesuburan tanah pada lahan pascatambang timah sangat rendah yang

diakibatkan hilangnya lapisan atas tanah (*top soil*) (Pranata, 2023). Karena sebagian besar mineral berada dekat dengan permukaan tanah, sehingga kawasan tambang menjadi prioritas dalam upaya reklamasi guna memperbaiki lahan yang telah terdampak. Kegiatan reklamasi adalah suatu yang diupayakan dengan tujuan menata, memulihkan dan memperbaiki untuk melindungi kerusakan lingkungan dan ekosistem akibat dari kegiatan pemanfaatan sumber daya alam sehingga dapat berfungsi kembali sesuai dengan peruntukannya (Sari & Buchori, 2015).

Salah satu metode reklamasi yang dapat diterapkan pada lahan bekas tambang adalah revegetasi dengan memanfaatkan tanaman pionir dan tanaman penutup tanah (Riswan *et al.*, 2015). Revegetasi merupakan proses penanaman kembali lahan yang telah ditambang menggunakan jenis tanaman yang mampu beradaptasi, dengan tujuan untuk memperbaiki kondisi lahan, baik dari segi vegetasi maupun karakteristik tanah (Lestari *et al.*, 2022). Tujuannya tidak saja memperbaiki lahan-lahan labil dan tidak produktif serta mengurangi erosi permukaan, tetapi juga dalam jangka panjang diharapkan dapat memperbaiki iklim mikro, memulihkan biodiversitas dan meningkatkan kondisi lahan ke arah yang lebih produktif.

Acacia mangium merupakan salah satu spesies tanaman eksotis yang banyak dimanfaatkan untuk rehabilitasi lahan bekas tambang timah di Pulau Bangka. Akasia memiliki beberapa keunggulan yaitu mampu tumbuh dengan baik pada kondisi tanah yang sangat masam ataupun pada tanah dengan kandungan logam berat yang tinggi seperti lahan pertambangan timah, hal ini yang menjadikan sebagai tumbuhan potensial untuk bioremediasi (Robika & Sari, 2019). Keunggulan mangium lainnya yang membentuk simbiosis asosiasi dengan bakteri bintil akar sehingga menjadikannya mampu dalam mengikat nitrogen, serta sebagai tumbuhan

yang dapat memulihkan dan mempertahankan kesuburan tanah (Rini *et al.*, 2020).

Simbiosis asosiasi ini, dapat terjadi melalui epidermis akar dalam infeksi bakteri juga berhubungan dengan gen *nod* yang disebut sebagai bakteri dari genus *Rhizobium* (Robika & Sari, 2019). Bakteri penambat nitrogen mampu menangkap nitrogen dari udara yang merupakan unsur terbanyak di atmosfer yang digunakan sebagai sumber hara untuk pertumbuhannya juga memberikan kelembapan bagi bumi. Selain itu mampu memperbaiki struktur agregat tanah yang dapat mempengaruhi pertumbuhan tanaman sehingga mampu mengurangi ketergantungan pupuk nitrogen anorganik (Waruwu & Lase, 2025).

Oleh karena itu, penelitian mengenai "Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penambat Nitrogen Asal Bintil Akar Akasia Daun Lebar (*Acacia mangium*) di Lahan Pascatambang Timah" penting untuk dilakukan. Bakteri yang dikarakterisasi diharapkan memiliki kemampuan mengikat nitrogen untuk menyediakan unsur hara alami bagi tanah di lahan pascatambang timah. Dengan demikian, penelitian ini bertujuan untuk memperoleh bakteri potensial yang dapat digunakan dalam teknik reklamasi lahan pascatambang timah, khususnya di Bangka. Penelitian dengan tujuan serupa masih terbatas, sehingga sangat diperlukan untuk memberikan wawasan baru mengenai potensi bakteri penambat nitrogen dari simbiosis *Acacia mangium*.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada tanggal 10-27 Maret 2025, yang berlokasi di Laboratorium Dasar Terpadu, Universitas Bangka Belitung. Pengambilan sampel dilakukan di lahan pascatambang timah Danau Ampar, Desa Riding Panjang, Kabupaten Bangka.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang pengaduk, batang segitiga, botol

Duran, bunsen, cawan petri, cover glass, Erlenmeyer, gelas beaker, gelas ukur, icebox, jarum ose, kaca objek, laminar air flow, mikropipet dan tip, mikroskop cahaya, mortar dan alu, pipet tetes, rak tabung reaksi, saringan, sendok tanah, spatula, tabung reaksi, dan vortex.

Bahan yang digunakan antara lain agar, akuades, alkohol 70%, aluminium foil, asam malat, Bromothymol Blue (BTB), CaCl_2 , CaCO_3 , FeEDTA 1,64%, FeSO_4 , H_2O_2 , K_2HPO_4 , kapas, karet, kasa steril, larutan iodine, larutan kristal violet, larutan safranin, masker, media Löwenstein-Jensen (LJ), media Nitrogen Free Bromothymol Blue (NfB), media Sulfid Indol Motility (SIM), media Yeast Extract Mannitol Agar (YEMA), MgSO_4 , minyak imersi, NaCl, NaOCl 1,5%, NaOH 5%, plastik tahan panas, plastik wrap, sarung tangan, sukrosa, dan tisu.

Prosedur Kerja

Persiapan Alat dan Media

Persiapan alat dilakukan dengan membungkus semua alat menggunakan plastik tahan panas, kertas, dan aluminium foil untuk memastikan kesterilan setelah proses sterilisasi. Beberapa alat tertentu seperti jarum ose disterilkan menggunakan api bunsen hingga mencapai suhu pijar. Pada penelitian ini digunakan beberapa media, yakni media Yeast Extract Mannitol Agar (YEMA), media Löwenstein-Jensen (LJ), dan media Nitrogen-Free Bromothymol Blue (NfB). Media YEMA disiapkan dengan menimbang 6,364 g YEMA dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Kemudian dilarutkan dengan 200 mL akuades. Media Löwenstein-Jensen (LJ) disiapkan dengan menimbang 4 g sukrosa, 0,2 g K_2HPO_4 , 0,1 g MgSO_4 , 0,1 g NaCl, 0,02 g FeSO_4 , 0,4 g CaCO_3 , 4 g agar, dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Kemudian dilarutkan dengan 200 mL akuades. Media Nitrogen-Free Bromothymol Blue (NfB) disiapkan dengan menimbang 1,5 g asam malat, 0,15 g K_2HPO_4 , 0,06 g MgSO_4 , 0,03 g NaCl, 0,006 CaCl_2 , 1,2 mL FeEDTA 1,64%, 0,6 mL BTB, 0,525 agar dan

dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Kemudian dilarutkan dengan 300 mL akuades. Setiap media dipanaskan hingga mendidih dan diaduk hingga homogen.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini, dibungkus menggunakan plastik tahan panas, kertas, dan *aluminium foil* untuk menjaga kesterilan setelah proses sterilisasi. Alat dan media yang sudah disiapkan dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit pada tekanan 2 atm. Alat-alat tertentu seperti jarum ose disterilkan pada nyala api bunsen hingga memijar. Seluruh prosedur pengerjaan dilaksanakan secara aseptis dalam *laminar air flow* yang sudah dibersihkan menggunakan alkohol 70% dan disinari UV selama 20 menit untuk menjaga kestabilan lingkungan kerja.

Pengambilan Sampel

Bagian akar tumbuhan akasia diambil bintil akarnya secara perlahan. Sisa tanah yang menempel pada akar dibersihkan dengan tangan. Bintil akar dipindahkan ke dalam plastik dan disimpan dalam *icebox* sebelum dilakukan isolasi. Untuk membersihkan bintil akar, diletakkan di atas saringan dan dialiri dengan air. Bintil akar segar dapat disimpan dalam lemari es semalaman, sedangkan untuk penyimpanan jangka panjang, sebaiknya disimpan dalam tabung gelas yang kering (Sari *et al.*, 2018).

Isolasi Bakteri Penambat Nitrogen

Permukaan bintil akar yang telah dicuci dilakukan sterilisasi menggunakan etanol 70% selama 1 menit dan NaOCl 1,5% selama 4-6 menit. Selanjutnya dibilas dengan akuades sebanyak 5 kali. Setelah disterilisasi, bintil akar dihaluskan dengan alu dan mortar. Bintil akar yang telah dihaluskan ditimbang sebanyak 1 g dan dimasukkan ke dalam pengenceran 10^{-1} . Dilakukan pengenceran bertingkat dari 10^{-1} hingga 10^{-6} . Diambil sebanyak 0,1 mL dari pengenceran 10^{-5} dan 10^{-6} untuk disebar ke dalam media *Yeast Manitol Agar* (YEMA) dengan teknik *spread plate*. Lalu diinkubasi

pada suhu 37 °C selama 24 jam. Pengenceran dilakukan duplo untuk mendapatkan isolat yang beragam (Sari *et al.*, 2018).

Pemurnian Isolat Bakteri

Isolat bakteri yang menunjukkan karakteristik morfologi yang berbeda dimurnikan dengan metode *four-way streak* pada media YEMA.

Uji Penambat Nitrogen

Kemampuan penambat nitrogen akan diuji dengan menggunakan media *Jensen's nitrogen-free* (LJ) dan media *Nitrogen Free Bromothymol Blue* (NfB). Media *Jensen's nitrogen-free* (LJ) adalah media selektif yang mendukung pertumbuhan bakteri pengikat nitrogen. Hasil uji fiksasi nitrogen menunjukkan bahwa beberapa isolat bakteri dapat tumbuh dengan membentuk koloni berwarna putih pada media ini, yang mengindikasikan bahwa isolat tersebut memiliki kemampuan untuk memfiksasi N_2 (Suryanti *et al.*, 2024). Satu ose isolat bakteri diinokulasikan dalam media Jensen dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 7-14 hari. Suhu inkubasi ini berdasarkan penelitian oleh Pudjiwati *et al.*, (2025), yang melakukan inkubasi kultur bakteri penambat nitrogen pada suhu ruang yaitu 37 °C. Pertumbuhan isolat bakteri pada media tersebut mengindikasikan kemampuannya dalam melakukan fiksasi nitrogen (N_2) di lingkungan alami (Huslina dan Harahap, 2019). Media *Nitrogen Free Bromothymol Blue* (NfB) adalah media pertumbuhan yang tidak mengandung sumber nitrogen (Ariyani *et al.*, 2021). Isolat ditumbuhkan pada media NFb sesuai dengan metode Baldani *et al.*, (2014) dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu 37°C. Indikasi awal kemampuan penambat nitrogen ditunjukkan oleh, perubahan warna media dari hijau menjadi biru, menunjukkan hasil positif.

Karakterisasi Bakteri Penambat Nitrogen

Karakterisasi Makroskopis

Karakterisasi bakteri penambat nitrogen secara makroskopis dilakukan dengan melihat secara langsung menggunakan lup untuk mengidentifikasi bentuk, warna, tepian, dan elevasi koloni isolat bakteri (Febriyantinigrum *et al.*, 2023).

Karakterisasi Mikroskopis

Karakterisasi bakteri penambat nitrogen secara mikroskopis dapat dilakukan dengan pewarnaan gram. Isolat bakteri yang berumur 24 jam diambil sebanyak satu ose dan diletakkan pada kaca objek secara aseptik. Kemudian difiksasi dengan melewati kaca objek diatas api bunsen. Selanjutnya, kaca objek yang berisi isolat ditetesi dengan kristal violet selama 30 detik, lalu dibilas dengan akuades. Setelah itu, kaca objek ditetesi kembali dengan larutan iodine selama 1 menit dan dibilas menggunakan akuades. Selanjutnya, kaca objek ditetesi alkohol 70% hingga sisa kristal violet hilang, lalu dibilas dengan akuades. Setelah itu, kaca objek ditetesi dengan larutan safranin dan didiamkan selama 45 detik lalu dibilas kembali dengan akuades dan dikeringkan. Diamati kaca objek yang berisi isolat dibawah mikroskop dengan bantuan minyak inersi pada perbesaran 1000 $\times$ (Sari *et al.*, 2018).

Uji Katalase

Uji Katalase bertujuan untuk mengidentifikasi mikroorganisme yang ditemukan tergolong bakteri yang mampu menguraikan hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi oksigen. Biakan bakteri dioleskan pada gelas objek menggunakan jarum ose, kemudian teteskan larutan hidrogen peroksida (H_2O_2) 3% sebanyak 2 tetes. Jika hasil akhir terbentuk gelembung gas sebagai hasil degradasi H_2O_2 oleh enzim katalase, maka uji tersebut dinyatakan positif (Lindawati & Suardana, 2016; Fadilah *et al.*, 2022).

Uji Motilitas

Uji motilitas dilakukan dengan menginokulasikan masing-masing kultur bakteri menggunakan jarum ose ke dalam medium SIM (*Sulfid Indol Motility*) dalam tabung reaksi secara aseptik. Inokulasi dilakukan dengan menusukkan jarum secara tegak ke dalam agar, kemudian tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Hasil uji dianggap positif jika terdapat penyebaran bekas tusukan pada media, yang menunjukkan bahwa bakteri bersifat motil. Sebaliknya, hasil negatif ditandai dengan hanya adanya garis sejajar dengan tusukan tanpa penyebaran (Pratiwi *et al.*, 2023).

Analisis Data

Data karakteristik, dan uji isolasi bakteri penambat nitrogen dianalisis secara deskriptif. Data tersebut digunakan untuk mengetahui hubungan karakteristik bakteri dengan kemampuan menambat nitrogen yang dimiliki bakteri dari isolasi bintil akar *Acacia mangium* dalam media selektifnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Lahan pascatambang timah di Pulau Bangka mencapai sekitar 79.163 ha, dengan sebagian besar berupa lahan darat. Aktivitas penambangan yang terus berlangsung menyebabkan degradasi lahan dan peningkatan lahan kritis. Reklamasi dilakukan untuk memulihkan lingkungan yang rusak. *Acacia mangium* banyak digunakan dalam rehabilitasi karena mampu tumbuh di tanah asam dan tercemar logam berat, serta membentuk simbiosis dengan bakteri untuk mengikat nitrogen, sehingga membantu memulihkan kesuburan tanah (Lestari *et al.*, 2020).

Bakteri penambat nitrogen adalah mikroorganisme yang dapat mengikat nitrogen atmosfer (N_2) yang bebas menjadi amonia (NH_3), yang kemudian diolah menjadi asam amino dan akhirnya bertransformasi menjadi senyawa nitrogen yang dibutuhkan untuk pertumbuhan serta perkembangan tanaman. Sementara itu, bakteri penambat nitogen

mendapatkan karbohidrat dari tanaman inang sebagai sumber energinya (Sari & Prayudyaningsih, 2015). Bakteri penambat nitrogen, apabila bersimbiosis dengan tanaman legum kelompok bakteri ini akan menginfeksi akar tanaman dan membentuk bintil akar (Putra, 2021). Mekanisme bakteri penambat nitrogen di dalam bintil akar tersebut, dapat menfiksasi nitrogen atmosfer dari mitra legumnya. Fiksasi nitrogen oleh bakteri penambat nitrogen, dimulai dari interaksi antara senyawa flavonoid yang dilepaskan oleh akar tanaman legum dengan gen *nod* pada bakteri. Gen ini berperan dalam merangsang pembentukan bintil akar (nodul), yang menjadi lokasi utama proses fiksasi nitrogen berlangsung. Setelah proses pengenalan tersebut, bakteri penambat nitrogen menginfeksi rambut akar dan membentuk benang infeksi (*infection thread*) yang

memungkinkan bakteri masuk ke dalam jaringan akar. Di dalam akar, bakteri membentuk struktur nodul yang khas dan berwarna merah muda akibat keberadaan pigmen leghemoglobin. Pigmen ini berfungsi menjaga kondisi mikroaerobik agar enzim nitrogenase dapat bekerja secara optimal, karena enzim ini sangat sensitif terhadap oksigen. Proses fiksasi nitrogen dilakukan dengan mengubah nitrogen atmosfer (N_2) menjadi amonia (NH_3) melalui reaksi yang dikatalisis oleh enzim nitrogenase dengan menggunakan energi sebesar 16 molekul ATP. Selanjutnya, amonia hasil fiksasi digunakan oleh tanaman sebagai sumber nitrogen, sementara bakteri penambat nitrogen memperoleh energi dari senyawa karbon sederhana hasil fotosintesis tanaman (Sapalina *et al.*, 2022).

Tabel 1. Hasil Pengamatan Pertumbuhan Bakteri Penambat Nitrogen (TPC)

No	Pengenceran	Isolat	Jumlah koloni	TPC(CFU/ml)
1.	10^{-5}	R1	TBUD	TBUD
2.	10^{-5}	R2	TBUD	TBUD
3.	10^{-6}	R3	172	$1,72 \times 10^8$
4.	10^{-6}	R4	166	$1,66 \times 10^8$
Rata Rata			1,69	$1,69 \times 10^8$

Keterangan : TBUD (terlalu banyak untuk di hitung)

Total Plate Count (TPC) adalah metode kuantitatif yang digunakan untuk menghitung jumlah total mikroorganisme hidup dalam sampel, biasanya dilaporkan dalam satuan CFU/mL (*Colony Forming Units per milliliter*). Metode ini penting dalam evaluasi populasi mikroba pada berbagai lingkungan, termasuk pada sampel air, tanah, atau bahan biologis lainnya (Karina, 2016). Berdasarkan hasil perhitungan TPC pada Tabel 1. terdapat 4 isolat, yang berasal dari dua pengenceran tertinggi karena, kisaran hasil koloni tersebut yang dapat dihitung pada pengenceran 10^{-6} . Isolat bakteri dari bintil akar tanaman *Acacia*

mangium di lahan bekas tambang timah, diperoleh dua isolat (R1 dan R2) pada tingkat pengenceran 10^{-5} dengan jumlah koloni yang terlalu banyak untuk dihitung (TBUD), yang mengindikasikan kepadatan mikroba sangat tinggi dalam sampel tersebut. Sementara itu, dua isolat lainnya (R3 dan R4) berasal dari pengenceran 10^{-6} dan menghasilkan jumlah koloni masing-masing sebanyak 172 dan 166, yang setara dengan nilai TPC sebesar $1,72 \times 10^8$ dan $1,66 \times 10^8$ CFU/ml. Nilai rata-rata TPC dari kedua isolat tersebut adalah $1,69 \times 10^8$ CFU/ml. Nilai TPC yang tinggi ini menunjukkan bahwa bintil akar *Acacia*

memiliki populasi bakteri penambat nitrogen yang melimpah. Hal ini dikarenakan bakteri yang bersimbiosis dalam bintil akar, seperti salah satunya dari genus *Rhizobium*, berperan dalam fiksasi nitrogen biologis yang sangat berguna untuk memperkaya nitrogen tanah secara alami (Hafid *et al.*, 2021). Kemampuan *Acacia* membentuk bintil akar simbiotik yang produktif ini menjadi indikator potensial bagi penggunaan spesies tersebut dalam strategi revegetasi lahan pascatambang, terutama dalam mempercepat pemulihan kesuburan tanah

secara hayati dan kimiawi (Susanti *et al.*, 2022). Kondisi TBUD pada pengenceran 10^{-5} juga mengindikasikan bahwa pengenceran ini kurang optimal untuk perhitungan kuantitatif. Menurut Nuraini *et al.* (2020) jumlah koloni melebihi ambang batas keterbacaan (biasanya 30–300 koloni per cawan petri). Oleh karena itu, nilai yang digunakan untuk menghitung TPC adalah dari pengenceran 10^{-6} yang berada dalam rentang yang valid untuk analisis mikrobiologis.

Tabel 2. Uji Penambat Nitrogen

Isolat Bakteri	Uji Penambat Nitrogen	
	<i>Nitrogen Free Bromothymol Blue</i> (NfB)	<i>Löwenstein-Jensen</i> (LJ)
R1	+	+
R2	+	+
R3	+	+
R4	+	+

Kemampuan bakteri untuk menambat nitrogen secara biologis dapat dikenali melalui perubahan warna pada media *Nitrogen Free Bromothymol Blue* (NfB) semi-padat. Media yang awalnya berwarna hijau akan berubah menjadi biru apabila terdapat aktivitas penambatan nitrogen, sebagaimana dijelaskan oleh Baldani *et al.* (2014). Perubahan warna ini terjadi karena adanya peningkatan pH akibat aktivitas enzim nitrogenase yang dihasilkan oleh bakteri penambat nitrogen. Indikator *bromothymol blue* dalam media NFB bersifat sensitif terhadap perubahan pH, pada kondisi basa (pH meningkat), warnanya berubah menjadi biru. Dengan demikian, perubahan warna media dari hijau ke biru menjadi indikator adanya aktivitas biologis penambatan nitrogen. Salah satu kelompok bakteri yang dikenal memiliki kemampuan menambat nitrogen adalah genus *Rhizobium*. Bakteri ini membentuk hubungan simbiosis dengan tanaman legum, dan diketahui menghasilkan enzim nitrogenase yang berperan dalam proses penambatan nitrogen bebas dari atmosfer

menjadi bentuk yang dapat dimanfaatkan oleh tumbuhan.

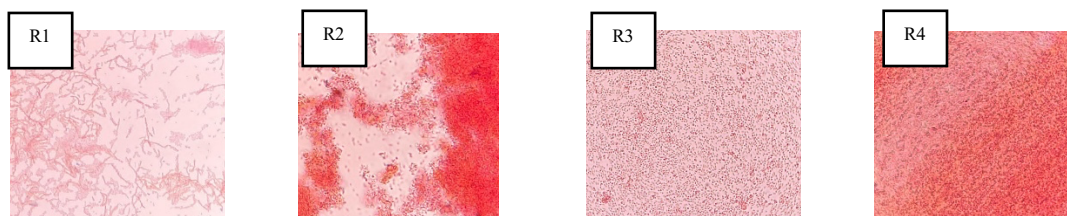
Dalam penelitian ini, terdapat empat isolat bakteri yang menunjukkan reaksi positif terhadap media NfB, yaitu isolat R1, R2, R3, dan R4. Keempat isolat tersebut mengalami perubahan warna media dari hijau menjadi biru, yang mengindikasikan bahwa isolat-isolat tersebut, berpotensi sebagai bakteri penambat nitrogen, yang kemungkinan termasuk ke dalam genus *Rhizobium*. Hal ini didukung oleh Ariyani *et al.* (2021) yang berhasil mengisolasi dan mengkarakterisasi genus *Rhizobium* dari perakaran kelapa sawit di lahan gambut. Hasilnya menunjukkan bahwa beberapa isolat memiliki sifat sebagai *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR), termasuk kemampuan fiksasi nitrogen (NfB positif). Selain itu, Dewi & Trimulyono (2024) menyatakan bahwa beberapa isolat bakteri dari rizosfer tanaman nanas di lereng Gunung Kelud memiliki kemampuan menambat nitrogen, yang ditandai dengan perubahan warna media NfB dari hijau menjadi biru.

Bakteri *Rhizobium* memiliki beragam jenis yang dapat hidup dalam satu tanaman. Bakteri ini masuk ke akar legum melalui rambut akar atau langsung ke titik tumbuh akar lateral. Rambut akar menjadi bagian pertama yang merespons infeksi *Rhizobium* dan membentuk bintil akar. Dalam satu bintil, bisa

terdapat dua atau lebih strain *Rhizobium*. Namun, beberapa genus bersifat spesifik dan hanya ditemukan pada tanaman inang tertentu. Strain *Rhizobium* menginfeksi legum dengan melepaskan polisakarida spesifik yang memicu peningkatan aktivitas enzim pektolitik oleh akar (Dini *et al.*, 2020).

Tabel 3. Karakteristik Makroskopis dan Mikroskopis Bakteri Penambat Nitrogen

Karakteristik	Isolat Bakteri			
	R1	R2	R3	R4
Makroskopis				
Bentuk	<i>Spindle</i>	<i>Circular</i>	<i>Irregular</i>	<i>Circular</i>
Warna	<i>White</i>	<i>White</i>	<i>White</i>	<i>White</i>
Ukuran	<i>Small</i>	<i>Small</i>	<i>Moderate</i>	<i>Small</i>
Elevasi	<i>Flat</i>	<i>Flat</i>	<i>Flat</i>	<i>Flat</i>
Tepi	<i>Entire</i>	<i>Entire</i>	<i>Lobate</i>	<i>Entire</i>
Mikroskopis				
Gram	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Spora	-	-	-	-
Bentuk sel	<i>Bacilli</i>	<i>Coccobacillus</i>	<i>Coccobacillus</i>	<i>Coccobacillus</i>



Gambar 1. Karakteristik Mikroskopis Pewarnaan Gram

Karakteristik hasil uji makroskopis dan mikroskopis dari isolat bakteri penambat nitrogen disajikan pada Tabel 3. pada warna dan elevasi keempat isolat yang sama secara berurutan *white* dan *flat*, ukuran serta tepian isolat R1, R2, R4 yang sama secara berurutan *small* dan *entire*, sedangkan R3 ukuran dan tepian yang berbeda secara berurutan *moderate* dan *lobate*, serta keempat isolat memiliki bentuk berbeda yang dominan *circular*. Hasil pengamatan mikroskopis isolat R1 gram negatif dengan bentuk sel *bacilli*, sedangkan isolat lainnya termasuk bakteri gram negatif dengan bentuk sel *coccobacillus*. Hasil gambar pengamatan mikroskopis dapat dilihat pada Gambar 1. Penelitian oleh Ekowati *et al.* (2021) karakteristik dalam isolat bakteri rizosfer penambat nitrogen, makroskopis seperti *circular*, *entire*, warna putih serta bakteri gram

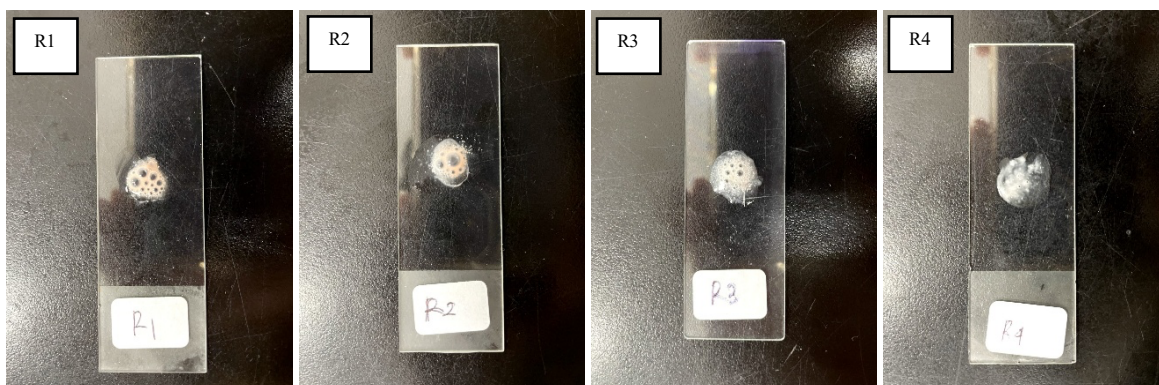
negatif bentuk sel *coccobacillus*. Sedangkan, oleh Sari & Prayudyaningsih (2015) karakteristik genus *Rhizobium* itu sendiri seperti warna koloni putih susu, tidak transparan, bentuk koloni *circular*, mikroskopis sel bakteri *Rhizobium* berbentuk batang, aerobik serta termasuk Gram negatif. Kemudian, oleh Dini *et al.* (2020) isolat bakteri bintil akar *Rhizobium* memiliki koloni berwarna putih susu, berbentuk *circular*, permukaan cembung, halus, mengkilap, dan bertekstur lengket. Koloni tidak tembus cahaya (*opaque*) dengan margin rata (*entire*) dan ukuran 2–4 mm setelah inkubasi 3–5 hari. Di media miring, serta koloni berbentuk *echinulate*. Oleh Pamungkas *et al.* (2018) melaporkan juga koloni *Rhizobium* yang diisolasi dari bintil akar tumbuhan leguminosa memiliki bentuk bulat (*circular*) dengan tepi rata, permukaan

cembung (*convex*), dan tekstur lengket. Warna koloni didominasi putih susu (*semitranslucent*). Isolat koloni berasal dari salah satunya *Acacia*

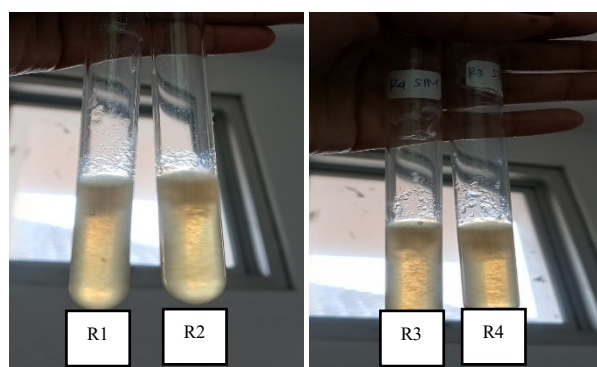
sp. Secara mikroskopis, isolat bakteri termasuk dalam kelompok Gram negatif dan berbentuk batang (basil).

Tabel 4. Uji Katalase dan Motilitas

Isolat Bakteri	Uji Biokimia	
	Katalase	Motilitas
R1	+	+
R2	+	+
R3	+	+
R4	+	+



Gambar 2. Uji Katalase



Gambar 3. Uji Motilitas

Hasil uji katalase dari isolat bakteri penambat nitrogen disajikan pada Tabel 4. Berdasarkan hasil uji katalase, isolat bakteri R1, R2, R3, R4 menunjukkan kemampuan menghasilkan enzim katalase, yang ditandai dengan terbentuknya gelembung. Hal ini sesuai dengan pendapat sebelumnya yang menyatakan bahwa, semua bakteri yang mampu mengikat nitrogen yang diperoleh menunjukkan reaksi positif dalam memproduksi enzim katalase yang ditunjukkan dengan munculnya gelembung (Buak *et al.*, 2022). Beberapa jenis

bakteri menghasilkan senyawa hidrogen peroksida (H_2O_2) selama proses respirasi atau dalam keadaan tertentu. Senyawa tersebut dapat beracun dan merusak proses metabolisme bakteri, sehingga diperlukan adanya enzim katalase. Enzim katalase mampu mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen agar tidak membahayakan bakteri. Oksigen yang dihasilkan tersebut terlihat sebagai gelembung dalam uji katalase (Dewi & Trimulyono, 2024). Bakteri yang mampu memproduksi enzim katalase dapat melindungi

diri dari ancaman peroksida yang dapat menyebabkan perubahan pada sel (Pulungan dan Tumangger, 2018).

Hasil uji motilitas menunjukkan bahwa semua isolat bakteri R1, R2, R3, R4 merupakan bakteri motil Tabel 4. Hasil positif dari uji motilitas ditandai jika bakteri yang tumbuh pada media menyebar di sekitar tusukan isolat dan sebaliknya jika tidak ada penyebaran pertumbuhan bakteri pada tusukan isolat maka bakteri bersifat non motil (Buak *et al.*, 2022). Seluruh isolat bakteri terpilih merupakan bakteri yang motil. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Santoso *et al.* (2019), ketiga isolat bakteri penambat nitrogen yang didapat mempunyai ciri sebagai bakteri motil. Didukung oleh penelitian Fallo *et al.* (2022), hasil pengamatan uji motilitas dari ke 3 isolat yaitu RKHB 05, RKHB 06, dan RTB 06 pada perakaran tanaman kacang hijau dan perakaran tanaman tomat bersifat motil, ditandai dengan adanya pertumbuhan bakteri pada sekitar tusukan isolat (motil) menandakan bahwa isolat memiliki flagela. Penelitian Buak *et al.* (2022), juga diperoleh bahwa semua isolat bakteri yang dapat menambat nitrogen bersifat motil karena pertumbuhan bakteri menyebar di sekitar tusukan isolate. Menurut Fallo *et al.* (2022), uji motilitas yang positif (motil) ditandai dengan adanya pertumbuhan bakteri yang menyebar di sekitar tusukan isolat, apabila tidak ada pertumbuhan bakteri pada tusukan maka dapat dikatakan negatif (non motil).

KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini yakni telah berhasil dilakukannya isolasi dan karakterisasi empat isolat bakteri penambat nitrogen, dari bintil akar *Acacia mangium* yang tumbuh di lahan pascatambang timah di Bangka. Keempat isolat (R1, R2, R3, dan R4) menunjukkan kemampuan menambat nitrogen, yang dibuktikan dengan perubahan warna media NfB dari hijau menjadi biru serta pertumbuhan koloni pada media *Lowenstein-Jensen*. Karakterisasi makroskopis menunjukkan perbedaan bentuk koloni, namun seluruhnya

berwarna putih dan memiliki elevasi datar. Secara mikroskopis, semua isolat tergolong Gram negatif, dengan bentuk sel *bacilli* atau *coccobacillus*. Seluruh isolat juga positif pada uji katalase ditandai dengan terbentuknya gelembung dan motilitas ditandai dengan pertumbuhan bakteri pada sekitar tusukan isolat. Hasil *Total Plate Count* (TPC) menunjukkan populasi bakteri yang tinggi dalam bintil akar. Penelitian ini menegaskan bahwa *Acacia mangium* bersimbiosis dengan bakteri penambat nitrogen yang potensial dari genus *Rhizobium* untuk digunakan dalam strategi reklamasi lahan, khususnya dalam meningkatkan kesuburan tanah melalui fiksasi nitrogen secara biologis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih atas bimbingan ilmu untuk menyelesaikan projek ini kepada Ibu Dr. Henny Helmi, S.Si., M.Si.; Bapak Dr. Rahmad Lingga, S.Si., M.Si.; Ibu Monica Kharisma Swandi, S.Si., M.Si. dan Bapak A. Arsyadi, S.Si., M.Si., M.Agr., serta kepada Universitas Bangka Belitung, khususnya Laboratorium Biologi, atas dukungan fasilitas selama pelaksanaan penelitian. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada semua pihak yang telah memberikan bantuan teknis maupun akademik sehingga penelitian ini dapat terselesaikan dengan baik.

SARAN

Kami merekomendasikan agar penelitian ini dapat diperluas dengan melakukan analisis lebih lanjut mengenai dampak jangka panjang dari penggunaan di lapangan bakteri penambat nitrogen dalam reklamasi lahan pascatambang. Penelitian terhadap berbagai spesies tanaman pionir lainnya, yang dapat berkolaborasi dengan bakteri penambat nitrogen, salah satunya dari genus *Rhizobium*, juga dapat memberikan wawasan lebih dalam mengenai strategi reklamasi yang efektif. Selain itu, studi lebih lanjut mengenai interaksi antara bakteri dan tanaman dalam konteks ekosistem yang lebih

luas sangat dianjurkan untuk memahami dampak ekologis secara keseluruhan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ariyani, M. D., Dewi, T. K., Pujiyanto, S., & Suprihadi, A. (2021). Isolasi dan Karakterisasi Plant Growth Promoting Rhizobacteria dari Perakaran Kelapa Sawit pada Lahan Gambut. *Bioma: Berkala Ilmiah Biologi*, 23(2), 159-171.
- Baldani, J. I., Reise, V. M., Videira, S. S., Boddey, L. H., & Baldani, V. L. D. (2014). The Art of Isolating Nitrogen Fixing Bacteria from Non Leguminous Plants Using N Free Semi Solid Media: a Practical Guide for Microbiologists. *Plant Soil*, 384: 413-431.
- Buak A, Fallo G, dan Pardosi L, 2022. Seleksi dan Identifikasi Bakteri Penambat Nitrogen pada Perakaran Tanaman Kacang Hijau (*Vigna radiata* L.) dan Tomat (*Solanum lycopersicum* L.) di Kabupaten Belu. *Jurnal Biologi dan Pembelajarannya*; 9(2): 34-41
- Dewi, P. R., & Trimulyono, G. (2024). Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penambat Nitrogen dari Rizosfer Tanaman Nanas di Lereng Gunung Kelud Kediri. *LenteraBio: Berkala Ilmiah Biologi*, 13(1), 73-85.
- Dini, I. R., Wawan, W., Hapsoh, H., & Devi, R. (2020). Eksplorasi dan karakterisasi bakteri *Rhizobium* dari tanaman *Mucuna bracteata* di tanah gambut (*Exploration and characterization of Rhizobium bacteria from Mucuna bracteata in peatland*). *Jur. Agroekotek* 12 (1) : 1 – 12.
- Ekowati, C. N., Mirani, M., Handayani, K., & Agustina, R. (2021). Detection of nitrogenase producing bacteria from the soil of Liwa botanical garden. *Jurnal Ilmiah Biologi Eksperimen dan Keanekaragaman Hayati (J-BEKH)*, 8(2), 53-58.
- Fadilah, W., Rasyidah, R., & Mayasari, U. (2022). Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Heterotrofik Pada Kawasan Perairan Pantai Indah Kalangan, Tapanuli Tengah. *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences*, 9(2), 306-317.
- Fallo, G., Buak, A., & Pardosi, L. (2022). SELEKSI Seleksi Dan Identifikasi Bakteri Penambat Nitrogen Pada Perakaran Tanaman Kacang Hijau (*Vigna radiata* L) Dan Tomat (*Solanum lycopersicum* L) Di Kabupaten Belu:-. *Jurnal Biologi Dan Pembelajarannya (Jb&P)*, 9(1), 34-41.
- Hafid, H., Sutariati, G. A. K., & Sari, N. M. (2021). Potensi bakteri rizosfer dalam meningkatkan pertumbuhan dan hasil tanaman legum. *Jurnal Agroteknos*, 11(2), 99-106
- Hamid, I., Priatna, S. J., & Hermawan, A. (2019). Karakteristik Beberapa Sifat Fisika Dan Kimia Tanah Pada Lahan Bekas Tambang Timah. *Jurnal Penelitian Sains*, 19(1), 23-31.
- Karina, A. I. (2016). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penambat Nitrogen, Pelarut Fosfat, dan Bakteri Pendegradasi Selulosa pada Tanah Bekas Tanaman Bawang Merah (*Allium cepa* L.) yang Diberi Biofertilizer (Doctoral dissertation, Universitas Airlangga).
- Kurnia, A. (2023). Identifikasi Logam Berat Pada Air Kolong dan Mikroba Potensial Untuk Bioremediasi di Lahan Pasca Penambangan Timah. *Jurnal Geominerba*, 8(1), 36-43.
- Kurniawan, S., & Sasongko, D. P. (2013). Pengaruh Aktivitas Penambangan Timah Terhadap Kualitas Air Laut dan Ikan Kakap Merah di Wilayah Pesisir Kabupaten Bangka. *Jurnal Saintek Perikanan*, 2(1), 21-23.
- Lestari, T., Apriyadi, R., & Ulfa, D. R. (2020). Pemanfaatan Lahan Pascatambang Timah dengan Budidaya Sawi. *Agrotechnology Research Journal*, 4(1), 17-21.
- Lindawati, S. A. & W. Suardana. (2016). Isolasi dan Identifikasi Spesies Bakteri Asam Laktat Penghasil Senyawa Antimikroba Asal Koloning Sapi Bali. *Jurnal Veteriner*, 17(4): 576-6581.
- Mentari, M., Umroh, U., & Kurniawan, K. (2017). Pengaruh Aktivitas Penambangan Timah Terhadap Kualitas Air di Sungai Baturusa Kabupaten Bangka. *Akuatik: Jurnal Sumberdaya Perairan*, 11(2), 23-30.
- Nuraini, R., & Wahyudi, A. (2020). Evaluasi metode perhitungan total mikroba tanah dengan metode Total Plate Count (TPC). *Jurnal Biologi Tropis*, 20(3), 312-319
- Nurtjahya, E., Santi, R., & Sari, E. (2022). Karakter Bakteri *Azotobacter* dan *Azospirillum* dari Rizosfer Tanaman Lada di Lahan Bekas Tambang Timah. *Jurnal Bios Logos*, 12(1), 46-54.
- Pamungkas, R. D. S., & Irfan, M. Eksplorasi dan isolasi bakteri *Rhizobium* tumbuhan leguminosa di lahan bergambut kampus UIN

- Suska Riau Pekanbaru. *Jurnal Agroteknologi*, 9(1), 31-40.
- Pratiwi, L., Rasyidah, R., & Mayasari, U. (2023). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Heterotrofik di Perairan Pantai Pandaratan Kecamatan Sarudik Kabupaten Tapanuli Tengah Provinsi Sumatera Utara. *Bioma: Berkala Ilmiah Biologi*, 25(1), 28-37.
- Pudjiwati, E. H., & Damanik, D. K. (2025). Optimalisasi Penggunaan Nitrogen pada Tanaman Jagung di Tanah Marginal Melalui Bakteri Penambat Nitrogen dan Limbah Udang. *Journal Galung Tropika*, 14(3), 373-382.
- Putra, A. W. C. (2021). *Pengaruh Limbah Cangkang Telur Dan Rhizobium Terhadap Pertumbuhan Dan Produksi Kedelai (Glycine Max L.)* (Doctoral dissertation, Doctoral dissertation, Universitas Islam Riau).
- Rini, I. A., Oktaviani, I., Asril, M., Agustin, R., & Frima, F. K. (2020). Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil IAA (*Indole Acetic Acid*) dari Rizosfer Tanaman Akasia (*Acacia mangium*). *Agro Bali: Agricultural Journal*, 3(2), 210-219.
- Robika, R., & Sari, E. (2019). Pertumbuhan dan Kadar Klorofil Daun *Acacia mangium* Pada Lahan Bekas Tambang Timah Di Pulau Bangka. *Ekotonia: Jurnal Penelitian Biologi, Botani, Zoologi Dan Mikrobiologi*, 4(1), 7-11.
- Sapalina, F., Ginting, E. N., & Hidayat, F. (2022). Bakteri penambat nitrogen sebagai agen biofertilizer. *War. Pus. Penelit. Kelapa Sawit*, 27(1), 41-50.
- Sari, D. P., & Buchori, I. (2015). Efektivitas Program Reklamasi Pascatambang Timah di Kecamatan Merawang Kabupaten Bangka. *Jurnal Pembangunan Wilayah dan Kota*, 11(3), 299-312.
- Sari, E., Fiona, D. S., Hidayati, N., & Nurtjahya, E. (2017). Analisis Kandungan Logam pada Tumbuhan Dominan di Daerah Daratan dan Bawah Tanah Pasca Penambangan Timah di Bangka Selatan. *Jurnal Promine*, 5 (2), 15-29.
- Sari, R., & Prayudyaningsih, R. (2015). *Rhizobium*: pemanfaatannya sebagai bakteri penambat nitrogen. *Jurnal Penelitian Sosial dan Ekonomi Kehutanan*, 12(1), 51-64.
- Susanti, R., Santoso, M. A., & Nurwahyuni, D. (2022). Pemanfaatan tanaman legum dalam rehabilitasi lahan bekas tambang. *Jurnal Reklamasi Lahan*, 9(1), 15-24.
- Tarigan, R. S., & Jamilah, I. (2013). Seleksi bakteri penambat nitrogen dan penghasil hormon IAA (indole acetic acid) dari rizosfer tanah perkebunan kedelai (*Glycine max L.*). *Saintia Biologi*, 1(2), 42-48.
- Waruwu, D. R. Y., & Lase, N. K. (2025). Peran Bakteri Pengikat Nitrogen dalam Meningkatkan Kesuburan Tanah dan Produktivitas Pertanian: Kajian Literatur. *Hidroponik: Jurnal Ilmu Pertanian Dan Teknologi Dalam Ilmu Tanaman*, 2(1), 109-114.