

## Isolasi dan Karakterisasi Bakteri *Rhizobium* dari Bintil Akar Putri Malu di Lahan Pascatambang Timah

### *Isolation and Characterization of Rhizobium Bacteria from Mimosa pudica Root Nodules in Post-tin Mining Land*

Latifa Ali Ghasia, Nazwa Angelita Darmawan, Syafira Auliani Syafiqo\*, Marcela & Yuanda Anggari

Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknik, Universitas Bangka Belitung, Indonesia

\*Corresponding author: [syafirath2019@gmail.com](mailto:syafirath2019@gmail.com)

---

#### ABSTRAK

Indonesia sebagai produsen timah terbesar kedua di dunia yang memiliki sejarah panjang penambangan timah sejak era kolonial. Aktivitas penambangan timah yang terus berlangsung menyebabkan degradasi lingkungan yang serius, seperti polusi logam berat, hilangnya keanekaragaman hayati, dan dampak negatif pada kesuburan tanah, kualitas udara, serta ekosistem perairan akibat mayoritas penambangan terbuka yang merusak lanskap dan mencuci unsur hara. Penelitian ini bertujuan mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri penambat nitrogen simbiotik dari bintil akar Putri Malu (*Mimosa pudica*) di lahan bekas tambang timah di Bangka Belitung yang memiliki tanah kritis dengan pH asam, kapasitas tukar kation rendah, dan kadar hara esensial rendah, guna mendukung rehabilitasi tanah terdegradasi melalui peningkatan kesuburan dan produktivitas lahan. Metode penelitian ini meliputi isolasi bakteri penambat nitrogen yang dilakukan melalui metode pengenceran bertingkat (*dilution methods*) dan metode tempel dilanjutkan dengan pengujian kemampuan fiksasi nitrogen (N<sub>2</sub>) serta identifikasi genus bakteri. Hasil yang diperoleh sebanyak 6 isolat terdeteksi mampu menghasilkan enzim nitrogenase dengan kondisi mikrobiotat yang optimal.

**Kata Kunci:** Lahan pascatambang timah, *Mimosa pudica*, *Rhizobium*, rehabilitasi lahan.

#### ABSTRACT

Indonesia as the second largest tin producer in the world has a long history of tin mining since the colonial era. Ongoing tin mining activities cause serious environmental degradation, such as heavy metal pollution, loss of biodiversity, and negative impacts on soil fertility and aquatic and air ecosystems due to the majority of open-pit mining that damages the landscape and leaches nutrients. This study aims to isolate and characterize symbiotic nitrogen-fixing bacteria from the root nodules of the *Mimosa pudica* (*Mimosa pudica*) in a former tin mining area in Bangka Belitung which has critical soil with acidic pH, low cation exchange capacity, and low essential nutrient levels, in order to support the rehabilitation of degraded land by increasing land fertility and productivity. This research method includes the isolation of nitrogen-fixing bacteria using the dilution method and the patch method followed by testing the nitrogen (N<sub>2</sub>) fixation ability and identification of the bacterial genus. The results obtained as many as 6 isolates were detected to be able to produce the nitrogenase enzyme under optimal microbiota conditions.

**Keywords:** Tin mining land, *Mimosa pudica*, *Rhizobium*, land rehabilitation.

## PENDAHULUAN

Indonesia memiliki sejarah panjang dalam penambangan timah dan saat ini merupakan produsen timah terbesar kedua di dunia setelah Cina (Breitfeld *et al.*, 2020; Irzon, 2017; Irzon *et al.*, 2014; Wicaksono & Handayani, 2021). Sejak era kolonial, sektor ini berkontribusi besar terhadap ekonomi, tetapi juga menyebabkan degradasi lingkungan seperti polusi logam berat, erosi, dan hilangnya keanekaragaman hayati (Rosyida *et al.*, 2019; Syahrir, Wall & Diallo, 2020). Mayoritas (>60%) penambangan dilakukan dengan metode terbuka yang merusak lanskap, menghilangkan top soil, mencuci unsur hara, serta menyebabkan akumulasi logam berat yang berdampak pada kesuburan tanah dan ekosistem perairan maupun udara (Mensah, 2015).

Di Bangka Belitung, luas lahan kritis akibat pertambangan terus meningkat, dengan tanah yang sangat porous, memiliki pH masam, kapasitas tukar kation rendah, serta kadar hara esensial yang rendah (Subardja *et al.*, 2009). Jika tidak ditangani, degradasi akan terus berlanjut dan menghambat pemanfaatan kembali lahan untuk sektor pertanian dan kehutanan (PT. Timah (Persero) Tbk., 2013). Penambahan bahan organik, mineral, serta agen hayati, diperlukan agar lahan ini kembali produktif dan memberikan manfaat bagi masyarakat serta lingkungan sekitar. Suarna (2015) menyatakan bahwa diperlukan upaya untuk mengendalikan produktivitas lahan pascatambang salah satunya menggunakan tanaman adaptif terhadap lahan kering, seperti tanaman leguminosa.

Tanaman leguminosa merupakan salah satu kelompok tumbuhan dikotil yang dapat tumbuh dengan optimal di lahan kering. Tanaman ini mampu memperoleh nitrogen dari udara karena bersimbiosis dengan bakteri *Rhizobium* (Rauf *et*

*al.*, 2020). Bakteri *Rhizobium* merupakan bakteri simbiotik yang termasuk kedalam kelompok bakteri *Alphaproteobacteria* dan *Betaproteobacteria* yang memiliki peran utama sebagai penambat nitrogen. Bakteri ini dapat menginfeksi akar tanaman legum dan membentuk bintil yang berperan dalam proses fiksasi nitrogen (Sri, 2015). Salah satu jenis tanaman leguminosa yang diketahui kaya akan simbiosis mikrobial pada rizosfernya adalah putri malu (*Mimosa pudica*). Putri malu dikenal sebagai gulma penutup tanah yang invasif karena pertumbuhannya yang lebih cepat dibandingkan dengan tanaman lain dan kemampuannya untuk bertahan terhadap berbagai jenis cekaman abiotik yang membentuk simbiosis dengan konsorsium mikroba di rizosfer (BBPOPT, 2020). Beberapa mikroba yang diketahui bersimbiosis dengan putri malu termasuk dari genus *Rhizobium*, *Bacillus*, dan *Pseudomonas*, serta beberapa jenis *Actinomycetes*. Mikroba tersebut memiliki peran penting antara lain sebagai penambat nitrogen (*Rhizobium*), mikroba pelarut fosfat (*Bacillus* dan *Pseudomonas*), serta mikroba antagonis yang melawan berbagai patogen tanah (*Pseudomonas putida*) (Harahap, 2008; Nivya, 2015; Sari *et al.*, 2018).

Berdasarkan permasalahan yang ditimbulkan oleh aktivitas pertambangan timah di Bangka Belitung, penelitian ini dilakukan dengan tujuan mengisolasi dan mengarakterisasi bakteri penambat nitrogen simbiosis dari bintil akar putri malu (*Mimosa pudica*) di lahan pascatambang timah guna mendukung rehabilitasi tanah yang terdegradasi. Kebaruan penelitian ini terletak pada isolasi dan karakterisasi bakteri penambat nitrogen dari bintil akar *Mimosa pudica* sebagai agen hayati yang mendukung peran tanaman tersebut

sebagai fitoremediator dalam rehabilitasi tanah pascatambang timah.

## METODE PENELITIAN

### Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret – April 2025. Penelitian ini dilakukan di Lahan Pascatambang Timah yang berlokasi di Air Jangkang, Kecamatan Merawang, Kabupaten Bangka, Kepulauan Bangka Belitung, seperti yang tertera pada (Gambar 1). Sampel bintil akar yang didapat akan diisolasi dan dikarakterisasi di Laboratorium Mikrobiologi, Universitas Bangka Belitung.

### Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu seperangkat alat tulis, alat gelas, alat pengukuran mikroklimat (lux meter, *soil tester*, *Thermometer*), bunsen, *cover glass*, gelas beaker, gunting, kaca objek, *laminar air flow*, mikroskop, mikropipet, mortar dan pistil, ose, plastik klip, sekop kecil, dan tabung reaksi. Sedangkan bahan yang digunakan yaitu bintil akar tanaman putri malu, media *Yeast Extract Manitol Agar* (YEMA), *congo red*, *aquades* steril, alkohol 95%, larutan crystal violet, larutan safranin, media *Nitrogen Free Bromothymol Blue* (NfB), media *Sulfate Indole Motility* (SIM), media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), larutan lugol, dan reagen  $H_2O_2$ .

### Pengukuran Mikroklimat Lingkungan

Pengukuran mikroklimat dilakukan untuk mengetahui kondisi lingkungan dengan parameter suhu udara, suhu tanah, kelembaban udara, kelembaban tanah, intensitas cahaya, dan pH tanah. Suhu tanah diukur dengan *soil thermometer* sedalam 10 cm. Kelembaban tanah diukur menggunakan *soil tester* sedalam 10 cm. Intensitas cahaya diukur menggunakan lux

meter pada ketinggian 1 meter dari tanah. pH tanah diukur dengan *soil tester* yang ditancapkan langsung ke tanah. Pengukuran dilakukan tiga kali pada titik sampling yang berbeda untuk mendapatkan data yang representatif. Data dicatat dalam tabel pengamatan dan dihitung rata-ratanya untuk analisis kondisi mikroklimat.

### Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel bintil akar dari tanaman putri malu dilakukan dengan menggunakan teknik *purposive sampling*. Daerah yang terdapat tanaman putri malu dalam kondisi sehat secara visual akan dilingkari dengan radius 15 cm menggunakan sekop hingga mencapai kedalaman 20 cm. Selanjutnya diangkat secara perlahan dan dibersihkan dari tanah yang menempel pada akar tanaman. Selanjutnya dilakukan pencucian pada permukaan bintil akar agar bersih dari tanah yang masih menempel (Sari *et al.*, 2018).

### Isolasi Bakteri *Rhizobium*

Isolasi bakteri dilakukan secara aseptik. Sebelum melakukan isolasi bakteri, perlu dilakukan sterilisasi alat dan bahan menggunakan autoklaf. Sterilisasi dilakukan pada suhu 121°C. Sampel bintil akar yang telah dicuci harus disterilisasi terlebih dulu. Diambil sekitar 10 bintil akar kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 95% etanol selama 1 menit. Setelah itu, dipindahkan ke cawan petri dan disterilisasi menggunakan sodium hipoklorit 1,5%, dikocok selama 4 – 6 menit, kemudian dibilas dengan *aquades* sebanyak 5 kali. Setelah disterilisasi, bintil akar dipotong menjadi 2 bagian yang tujuannya untuk melihat warna bagian dalam dari bintil akar tersebut. Warna bagian dalam dari bintil akar menentukan kemampuannya dalam mengikat  $N_2$ . Bintil yang aktif mengikat  $N_2$  adalah bintil

yang mengandung protein leghemoglobin berwarna merah muda sampai merah kecoklatan, sedangkan bintil yang tidak aktif memiliki ciri berwarna putih (Sari *et al.*, 2018).

Bintil akar yang terpilih akan dihaluskan menggunakan mortar dan ditambahkan aquades. Masing-masing sampel dilakukan pengenceran bertingkat dari  $10^{-1}$  hingga  $10^{-6}$  kemudian diambil 0,1 mL dari pengenceran  $10^{-5}$  dan  $10^{-6}$  untuk disebar ke dalam media YEMA yang diperkaya dengan *Congo Red* (CR), menggunakan teknik *spread plate*, selanjutnya diinkubasi pada suhu 35 °C selama 24 - 48 jam (Sari *et al.*, 2018). Reagen congo red yang ditambahkan sebanyak 0,025 g dalam 1 L media YEMA. Pada media YEMA + CR jika terbentuk koloni berwarna merah jambu maka termasuk koloni *Rhizobium* (Dini *et al.*, 2020).

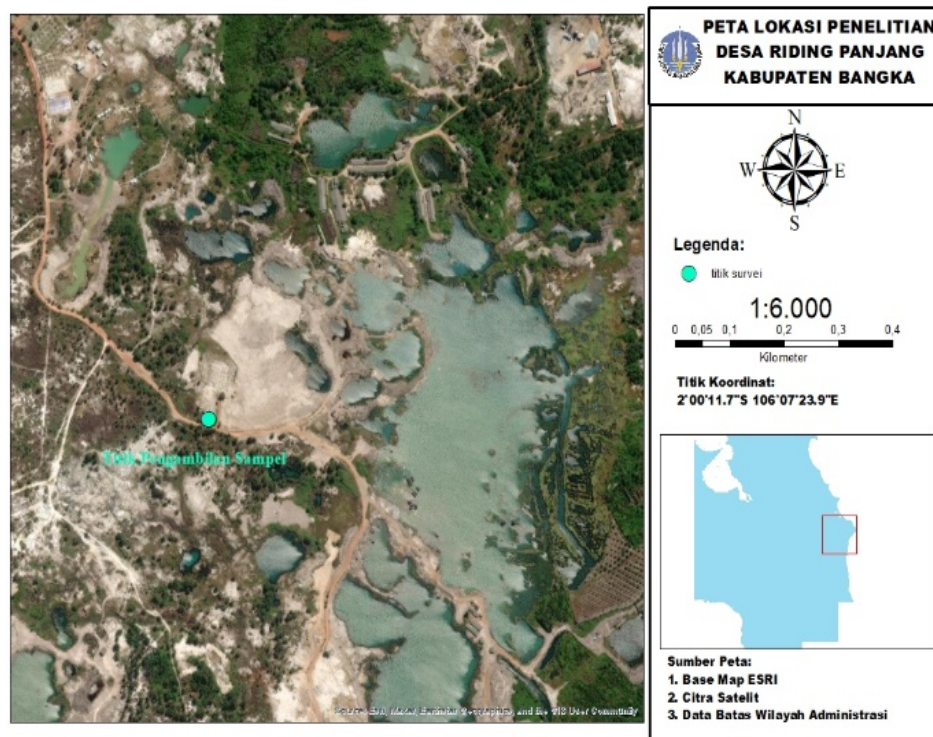
#### Pemurnian Bakteri

Bakteri yang telah diisolasi dimurnikan dengan cara mengambil koloni bakteri menggunakan jarum ose, kemudian digoreskan

ke cawan petri dengan metode gores sinambung 4 kuadran. Selanjutnya, diinkubasikan pada suhu 37°C. Koloni yang tumbuh terpisah, dipilih dan ditanam pada media YEMA dalam tabung reaksi sebagai kultur murni.

#### Uji Kemampuan Fiksasi Nitrogen (N<sub>2</sub>)

Uji kemampuan fiksasi nitrogen lainnya menggunakan media NfB semi solid. Uji ini dilakukan guna untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam memfiksasi nitrogen. Komposisi media NfB yakni 1,5 gr asam malat, 0,15 gr K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,06 gr MgSO<sub>4</sub>, 0,03 gr NaCl, 1,2 mL FeEDTA 1,64%, 0,6 mL BTB, dan 0,525 gr agar. Sebanyak 1 ose isolat bakteri diinokulasikan ke media NfB semi solid, selanjutnya isolat bakteri diinkubasi pada suhu 37 °C selama 7 hari. Reaksi positif ditandai dengan adanya perubahan warna media yang semula kuning kehijauan menjadi kebiruan (Santoso *et al.*, 2019)



Gambar 1. Peta lokasi pengambilan sampel bintil akar

## Karakterisasi Bakteri *Rhizobium*

Koloni yang tumbuh pada media cawan diamati karakteristik morfologi secara makroskopis mulai dari bentuk, warna, elevasi, dan tepian. Hasil yang diperoleh akan dibandingkan dengan data pada buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Sedangkan, pengamatan secara mikroskopis dilakukan dengan pewarnaan Gram.

### Pewarnaan Gram

Langkah pewarnaan Gram bakteri diawali dengan menyiapkan kaca objek yang steril dan kering, selanjutnya ditetesi *aquadest*. Jarum ose dipanaskan kemudian diambil satu ose bakteri terpilih dan dioleskan pada gelas objek. Selanjutnya proses fiksasi pada nyala api bunsen. Apusan bakteri yang telah difiksasi, akan diwarnai berurutan menggunakan beberapa larutan pewarna. Pertama, apusan bakteri ditetesi dengan larutan kristal violet dan didiamkan selama satu menit, kemudian dibilas dengan *aquadest*. Selanjutnya, apusan ditetaskan dengan larutan iodium dan didiamkan selama satu menit, kemudiann dibilas kembali dengan *aquades*. Berikutnya, dilakukan dekolorisasi menggunakan alkohol 95% atau gram *decolourizer*, didiamkan selama 30 detik dan bilas dengan *aquades* kembali. Selanjutnya, apusan ditetesi safranin, didiamkan satu menit dan bilas kembali dengan *aquades*. Setelah proses pewarnaan selesai, apusan bakteri akan diamati di bawah mikroskop dengan menggunakan perbesaran lensa (40x/0.65). Hasil pewarnaan berwarna ungu mengindikasikan bakteri Gram positif dan hasil pewarnaan berwarna merah mengindikasikan bakteri Gram negatif (Apriyanthi *et al.*, 2022).

### Uji Biokimia

Uji biokimia merupakan uji yang dilakukan untuk mengetahui sifat-sifat fisiologis dari koloni bakteri hasil isolasi. Identifikasi bakteri tidak dapat dilakukan dengan hanya mengetahui sifat morfologinya saja, namun harus mengetahui sifat fisiologis bakteri juga. Identifikasi biokimia *Rhizobium* dilakukan melalui serangkaian uji biokimia untuk mengkarakterisasi isolat yang diperoleh dari bintil akar tanaman putri malu. Berikut uji biokimia yang dilakukan :

#### a) Uji Motilitas (*Sulfide Indole Motility*)

Sebanyak satu ose Isolat bakteri diambil lalu diinokulasikan dengan cara ditusuk pada media *Sulfate Indole Motility* (SIM). Kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 2 x 24 jam.

#### b) Uji Katalase

Isolat bakteri diambil sebanyak satu ose dengan menggunakan jarum ose kemudian digoreskan pada kaca preparat lalu ditetesi reagen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Jika terbentuk gelembung gas maka hasilnya positif, dan hasil negatif jika tidak terbentuk gelembung gas.

#### c) Uji Hidrolisis Gula (*Triple Sugar Iron Agar*)

Isolat bakteri diisolasi sebanyak kurang lebih satu ose diambil dengan menggunakan ose cincin/ose bengkok kemudian diinokulasikan dengan cara ditusukkan pada media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA). Selanjutnya, diambil lagi satu ose isolat digoreskan zig zag pada bagian miring media. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Perubahan warna yang terjadi setelah diinkubasi ialah warna media menjadi warna kuning yang menandakan asam. Sedangkan apabila warna media menjadi merah menandakan basa, dan apabila warna menjadi hitam menandakan terbentuknya H<sub>2</sub>S, dan apabila media terangkat menunjukkan bahwa

mikroba tersebut mampu untuk memproduksi gas (Ismiati, 2018).

### Preservasi bakteri

Langkah preservasi bakteri dilakukan pada media NA yang dimiringkan dalam tabung reaksi. Jarum ose disterilkan menggunakan pemanas bunsen, kemudian didiamkan beberapa saat. Satu ose bakteri dari cawan inokulasi bakteri diambil dan digoreskan (zig-zag) pada permukaan media NA miring. Media NA miring yang telah digoreskan dengan inokulan bakteri, diinkubasi selama 24 - 48 jam pada suhu 37°C didalam inkubator. Inokulan bakteri yang telah diinkubasi selama 24 – 48 jam, akan dimasukkan ke dalam kulkas untuk mempertahankan viabilitas bakteri tersebut.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Bakteri *Rhizobium* merupakan bakteri tanah dari genus bakteri Gram-negatif dengan bentuk sel basil (batang) sesuai dengan hasil (Tabel 1 dan Tabel 2), dikenal secara umum dari hubungan simbiosis yang terjadi dengan tanaman leguminosa (kacang-kacangan) seperti tumbuhan putri malu (*Mimosa pudica*). *Rhizobium* jenis ini bernama *Rhizobium leguminosarium* (Mendrofa *et al.*, 2024). Bentuk simbiosis yang terjadi dengan tanaman legum yakni dengan membentuk nodul akar untuk memfiksasi nitrogen yang dibantu oleh enzim nitrogenase yang dapat mengubah nitrogen atmosfer menjadi amonia sehingga dapat dimanfaatkan oleh tumbuhan. Simbiosis yang terjadi antara bakteri dan tanaman legum bersifat saling menguntungkan, dimana bakteri membantu menyediakan nitrogen sedangkan tumbuhan akan menyediakan senyawa organik yang didapatkan dari hasil fotosintesis sebagai nutrisi bagi bakteri tersebut (Suryanti *et al.*, 2024).

Bakteri fiksasi nitrogen yang diperoleh dari bintil akar putri malu yaitu berjumlah enam isolat (IP 1, IP 2, IP 3, IP 4, IT 1, IT 2). Pengamatan morfologi (makroskopis dan mikroskopis) keenam isolat tersebut dilakukan berdasarkan bentuk koloni, warna koloni, tepian koloni, elevasi koloni, tipe Gram, dan bentuk sel bakteri (Tabel 1). Berdasarkan hasil (Tabel 1), didapat enam isolat bakteri fiksasi nitrogen yang mampu tumbuh di media YEMA. Keenam isolat bakteri tersebut memiliki bentuk koloni yang sama yaitu bulat (*entire*), dengan tepian koloni rata. Empat isolat bakteri (IP 1, IP 4, IT 1, dan IT 2) berwarna putih susu, sedangkan dua isolat lainnya (IP 2 dan IP 3) berwarna putih.

Elevasi yang dihasilkan keempat isolat bakteri (IP 1, IP 3, IP 4, IT 1) yaitu cembung, sedangkan elevasi dua isolat lainnya (IP 2 dan IT 2) yaitu datar (*flat*). (Tabel 1) menunjukkan bahwa hampir semua isolat bakteri *Rhizobium* asal bintil akar putri malu memiliki kesamaan morfologi koloni. Hal ini diperjelas oleh penelitian Sari *et al.* (2018) yang menyatakan bahwa hasil isolat *Rhizobium* dari tanaman legum yang diteliti menunjukkan hasil yang sama, yaitu: bakteri mempunyai bentuk *echinulate* ketika ditumbuhkan di media miring, dan ketika ditumbuhkan di media cawan ukuran koloni besar, berwarna putih susu, *opaque*, tidak bisa ditembus cahaya, bentuknya sirkular, elevasinya *convex* (cembung), permukaannya halus mengkilap, marginnya *entire* (rata).

Media YEMA digunakan sebagai media selektif untuk mendapatkan bakteri *Rhizobium*. Hal ini dikarenakan media YEMA mengandung mannitol (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) sebagai sumber karbon dan *yeast extract* sebagai sumber nitrogen yang digunakan oleh bakteri penambat N<sub>2</sub> untuk pertumbuhannya, sehingga bakteri yang mampu tumbuh pada media YEMA menandakan bahwa

bakteri tersebut merupakan kelompok bakteri pemfiksasi  $N_2$  (Rohyani et al. 2014). Selain itu, penambahan reagen *congo red* pada media YEMA berfungsi sebagai indikator warna pada media. Isolat bakteri *Rhizobium* tidak mampu mengabsorpsi warna merah dari *congo red* sehingga warna koloni bakteri yang masuk dalam golongan *Rhizobium* akan berwarna merah muda (Suryanti et al., 2024). Bakteri

*Rhizobium* tergolong bakteri Gram negatif. Bakteri Gram negatif mempunyai tiga lapisan dinding sel yang terdiri dari lipopolisakarida, lipoprotein dan peptidoglikan sehingga ketika bakteri *Rhizobium* ditumbuhkan pada media YEMA + *congo red*, bakteri tersebut sulit untuk menyerap zat *congo red* pada media (Putri & Kusdiyantini 2018).

Tabel 1. Hasil pengamatan karakteristik morfologi koloni

| Kode Isolat | Karakteristik Morfologi Koloni |            |        |         | Tipe Gram | Bentuk Sel   |
|-------------|--------------------------------|------------|--------|---------|-----------|--------------|
|             | Bentuk                         | Warna      | Tepian | Elevasi |           |              |
| IP 1        | Bulat                          | Putih susu | Rata   | Cembung | -         | <i>Basil</i> |
| IP 2        | Bulat                          | Putih      | Rata   | Datar   | -         | <i>Basil</i> |
| IP 3        | Bulat                          | Putih      | Rata   | Cembung | -         | <i>Basil</i> |
| IP 4        | Bulat                          | Putih susu | Rata   | Cembung | -         | <i>Basil</i> |
| IT 1        | Bulat                          | Putih susu | Rata   | Cembung | -         | <i>Basil</i> |
| IT 2        | Bulat                          | Putih susu | Rata   | Datar   | -         | <i>Basil</i> |

Keterangan : IP 1 : Isolat hasil metode pengenceran  $10^5$  (1), IP 2 : Isolat hasil metode pengenceran  $10^5$  (2), IP 3 : Isolat hasil metode pengenceran  $10^5$  (3), IP 4 : Isolat hasil metode pengenceran  $10^5$  (4), IT 1 : Isolat hasil metode tempel 1, IT 2 : Isolat hasil metode tempel 2.

Setelah diisolasi, isolat bakteri dimurnikan dan dilakukan pengujian kemampuan fiksasi nitrogen ( $N_2$ ) dengan menggunakan media NfB semi solid. Hasil uji kemampuan fiksasi nitrogen dengan media NfB semi solid menunjukkan hasil positif karena terdapat perubahan warna media menjadi kebiruan pada keenam isolat bakteri seperti pada (Gambar 2).

Perubahan warna pada media NfB yang semula berwarna hijau menjadi kebiruan

menandakan isolat dapat memfiksasi nitrogen, perubahan warna tersebut didasarkan oleh sifat indikator *bromothymol blue* yang akan mengubah warna media menjadi kebiruan jika terdapat aktivitas fiksasi nitrogen oleh enzim nitrogenase (Baldani et al., 2014). Fiksasi nitrogen ( $N_2$ ) oleh bakteri *Rhizobium* terjadi akibat enzim nitrogenase yang mengkatalisis reduksi  $N_2$ .



Gambar 2. Hasil uji fiksasi nitrogen media NfB semi solid (48 jam inkubasi) pada tabung yang berbeda ukuran.

Enzim ini tersusun atas dua komponen protein, yaitu protein Fe-Mo dan protein Fe-S. Enzim nitrogenase akan memutus ikatan rangkap tiga pada  $N_2$  menjadi amonia ( $NH_3$ ) yang dapat digunakan oleh tanaman (Suryanti *et al.*, 2024).

Selain dilakukan pengamatan morfologi koloni, dilakukan pula pengujian biokimia, seperti uji motilitas, uji TSIA, dan uji katalase pada isolat bakteri fiksasi nitrogen asal bintil akar putri malu (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil uji biokimia isolat bakteri

| Kode Isolat | Gram | Uji Biokimia |          |        |
|-------------|------|--------------|----------|--------|
|             |      | SIM          | Katalase | TSIA   |
| IP 1        | -    | -            | +        | +      |
| IP 2        | -    | -            | +        | +      |
| IP 3        | -    | +            | +        | +      |
| IP 4        | -    | -            | -        | +      |
| IT 1        | -    | -            | +        | +      |
| IT 2        | -    | -            | +        | +(gas) |

Keterangan : IP 1 : Isolat metode pengenceran  $10^5$  (1), IP 2 : Isolat metode pengenceran  $10^5$  (2), IP 3 : Isolat metode pengenceran  $10^5$  (3), IP 4 : Isolat metode pengenceran  $10^5$  (4), IT 1 : Isolat metode tempel 1, IT 2 : Isolat metode tempel 2

Berdasarkan hasil pewarnaan Gram (Tabel 2), diperoleh hasil Gram negatif yang menunjukan warna merah muda dari enam sampel isolat bakteri *Rhizobium sp.* Warna merah yang ditunjukkan oleh bakteri Gram negatif disebabkan adanya penyerapan safranin dan efek pencucian menggunakan alkohol 95% yang meningkatkan porositas dinding sel dengan melarutkan lipid bagian luar, sehingga lapisan peptidoglikan yang tidak terlalu kuat menjadi mudah dihilangkan dari dinding sel. Warna merah muda yang muncul disebabkan oleh pigmen merah yang disebut leghaemoglobin. Keberadaan pigmen leghaemoglobin dikaitkan dengan fiksasi nitrogen yang dilakukan oleh bakteri pada bintil akar tersebut. Meskipun leghaemoglobin tidak berperan langsung dalam pengikatan nitrogen, pigmen tersebut berperan dalam pengaturan pasokan oksigen bagi bakteri pada kondisi optimum. Kondisi ini memungkinkan enzim nitrogenase, yang sensitif terhadap oksigen, untuk berfungsi secara

optimal (Kannan *et al.*, 2015 : Shentilkumar *et al.*, 2020).

Hasil uji SIM pada (Tabel 2) menunjukkan bahwa terdapat lima isolat yang dinyatakan positif (motil) dan satu isolat yang dinyatakan negatif. Pernyataan ini didukung oleh Arsyad (2007) yang mengungkapkan bahwa *Rhizobium* bersifat motil. Diperkirakan hubungan antara hasil tersebut dengan ketersediaan oksigen dalam media terjadi. Selain itu, faktor ketersediaan hara di dalam media yang tersebar ke segala arah juga mempengaruhi, sehingga bakteri terdorong untuk mencari sumber karbon dan energi. Sedangkan hasil negatif disebabkan oleh keberadaan flagela serta kondisi lingkungan yang memungkinkan ekspresi gen yang mengatur motilitas dimana apabila gen tersebut tidak aktif atau flagela tidak terbentuk, maka hasil uji SIM akan menunjukkan hasil negatif pada bagian motilitas (Sharma & Sharma, 2019).

Uji katalase pada Tabel 2 menunjukkan lima isolat bakteri (IP 1, IP 2, IP 3, IT 1, dan IT 2) tercatat menghasilkan gelembung gas setelah

penambahan  $H_2O_2$ , yang mengindikasikan reaksi positif. Hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat aktivitas enzim katalase. Bakteri *Rhizobium* tergolong bakteri fakultatif anaerob (tumbuh dengan baik jika tidak ada oksigen, tetapi juga dapat tumbuh secara aerob). Bakteri aerob dan fakultatif akan mengubah hidrogen peroksida menjadi oksigen dalam proses metabolismenya dibantu oleh enzim katalase yang terdapat pada bakteri. Enzim katalase dapat menguraikan hidrogen peroksida yang bersifat racun bagi sel dan menghasilkan gas oksigen dan air sesuai reaksi (Astika *et al.*, 2020; Puri, 2024). Hasil ini konsisten dengan karakteristik umum genus *Rhizobium*, yang umumnya bersifat katalase positif sebagai bentuk adaptasi terhadap lingkungan aerob dan perlindungan dari stres oksidatif (Sari *et al.*, 2018). Sebaliknya, IP 4 menunjukkan reaksi negatif, ditandai dengan tidak adanya gelembung gas. Kondisi ini diduga

disebabkan oleh aktivitas enzim katalase yang lemah atau tidak aktif dalam memecah hidrogen peroksida.

Uji TSIA pada Tabel 2 bahwa keenam isolat menunjukkan adanya perubahan warna media menjadi merah pada permukaan dan warna kuning pada bagian dasar tabung. Warna merah yang terdapat pada bagian permukaan dan warna kuning yang terdapat bagian dasar tabung menunjukkan bahwa terjadinya fermentasi glukosa. Namun, tidak terjadinya fermentasi laktosa dan sukrosa. Terdapat satu isolat yakni IT 2 yang menunjukkan adanya warna hitam pada media. Pembentukan  $H_2S$  ditandai dengan terbentuknya endapan warna hitam di dasar media (Lisa, 2019).

Hasil pengukuran mikroklimat lingkungan pada lokasi sampel bintil akar putri malu didapat dari 3 titik pengamatan seperti yang tertera pada (Tabel 3).

Tabel 3. Hasil pengukuran mikroklimat lingkungan

| Titik         | Titik Koordinat       | Suhu Tanah (°C) | pH tanah   | Kelembapan Tanah (%) | Intensitas Cahaya (lx) |
|---------------|-----------------------|-----------------|------------|----------------------|------------------------|
| 1             | 2°00'11"S 106°07'25"E | 29              | 6,1        | 48                   | 30533                  |
| 2             | 2°00'11"S 106°07'25"E | 29              | 6,4        | 57                   | 30675                  |
| 3             | 2°00'11"S 106°07'25"E | 28              | 6,6        | 40                   | 29606                  |
| <b>Rerata</b> |                       | <b>28,6</b>     | <b>6,3</b> | <b>48,3</b>          | <b>30271</b>           |

Hasil pengukuran mikroklimat (Tabel 3) di ketiga titik, rata - rata suhu tanah sebesar 28,6 °C dan pH tanah sebesar 6,3. Hasil pengukuran sesuai dengan pernyataan Rosales *et al.* (2013) bahwa *Rhizobium sp.* berkembang secara aerob di dalam tanah dan tumbuh optimal pada suhu 25 – 30 °C dengan pH 6 – 7 dan masih terdapat beberapa strain *Rhizobium sp.* masih dapat bertahan pada pH  $\geq 4,5$ . Variasi kelembapan tanah (Tabel 3) pada tiga lokasi, yaitu antara 40% hingga 57%, dengan rata-rata 48,3%. Berdasarkan penelitian Mnasri *et al.* (2007), kisaran kelembapan optimal untuk *Rhizobium*

adalah 50–70%. Kelembapan di bawah 50% dapat mengganggu kemampuan bakteri dalam menginfeksi akar tanaman, sedangkan kelembapan berlebih berisiko menurunkan aerasi tanah, sehingga menghambat respirasi seluler. Data kelembapan di lokasi (48,3%) berada sedikit di bawah batas optimal, yang mengindikasikan bahwa pertumbuhan *Rhizobium* mungkin tidak maksimal tanpa upaya peningkatan kelembapan, seperti melalui irigasi tambahan.

Intensitas cahaya tercatat dalam kisaran 29.606–30.675 lx, dengan rata-rata 30.271 lx.

Intensitas cahaya yang tinggi berpotensi menjadi tantangan bagi bakteri *Rhizobium*. Paparan sinar ultraviolet (UV) berintensitas tinggi dapat merusak struktur sel dan DNA bakteri. Berdasarkan penelitian Abd-Alla *et al.* (2020), *Rhizobium* lebih adaptif di lingkungan dengan intensitas cahaya rendah (<10.000 lx) atau terlindung oleh vegetasi. Paparan cahaya langsung di atas 30.000 lx, seperti yang terukur di lokasi, dapat mengurangi kelangsungan hidup bakteri, terutama jika tidak ada perlindungan seperti kanopi tanaman. Oleh karena itu, pemeliharaan tutupan vegetasi direkomendasikan untuk meminimalkan dampak negatif cahaya berlebih. Namun, faktor mikroklimat lingkungan pada lokasi pengambilan sampel masih masuk dalam rentang optimum pertumbuhan bakteri *Rhizobium* yang terdapat di bintil akar putri malu.

## KESIMPULAN

Penelitian ini berhasil mengisolasi enam isolat bakteri *Rhizobium* dari bintil akar tanaman *Mimosa pudica* yang tumbuh di lahan pascatambang timah. Seluruh isolat menunjukkan karakter morfologi khas *Rhizobium*, yaitu bentuk koloni bulat, berwarna putih hingga putih susu, dan bersifat Gram negatif berbentuk basil. Uji fiksasi nitrogen pada media NfB semi-solid menunjukkan seluruh isolat memiliki kemampuan fiksasi nitrogen, yang ditunjukkan oleh perubahan warna media menjadi kebiruan. Hasil uji biokimia mendukung identifikasi fisiologis sebagai bakteri *Rhizobium*, dengan sebagian besar isolat menunjukkan aktivitas motilitas, katalase, dan fermentasi glukosa. Kondisi mikroklimat lokasi pengambilan sampel berada dalam kisaran optimum bagi pertumbuhan *Rhizobium*. Penelitian ini menunjukkan bahwa bakteri *Rhizobium* dari *Mimosa pudica* memiliki potensi sebagai agen hayati untuk mendukung upaya rehabilitasi tanah terdegradasi di wilayah

pascatambang timah (López Hernández *et al.*, 2025).

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada ibu Dr. Henny Helmi, S.Si., M.Si., ibu Monica Kharisma Swandi, S.Si., M.Si., bapak A.Arsyadi, S.Si., M.Si., M.Agr., dan bapak Dr. Rahmad Lingga, S.Si., M.Si selaku dosen pembimbing yang senantiasa mendampingi selama proyek berlangsung. Terima kasih juga kepada Universitas Bangka Belitung terkhusus Laboratorium Biologi atas fasilitas yang disediakan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abd-Alla, M. H., El-Enany, A. W. E., Nafady, N. A., Khalaf, D. M., & Morsy, F. M. (2014). Synergistic interaction of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and arbuscular mycorrhizal fungi as plant growth-promoting biofertilizers for faba bean (*Vicia faba* L.) in alkaline soil. *Microbiological Research*, 169(1), 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.07.007>
- Adamu, A., Yacob, M. R., Radam, A., Hashim, R., & Adam, S. U. (2015). Economic valuation of ecotourism resources in Yankari Game Reserve, Bauchi, Nigeria. *Procedia Environmental Sciences*, 30, 139–144. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2015.10.025>
- Apriyanthi, D. P. R. V., Laksmi, A. S., & Widayanti, N. P. (2022). Identifikasi bakteri kontaminasi pada gelang Tri Datu. *Jurnal Biologi Makassar*, 7(2), 24–33.
- Arsyad, R. H. (2007). Penggunaan *Rhizobium* dan mikrob pelarut fosfat (MPF) untuk memperbaiki pertumbuhan bibit akasia (*Acacia mangium* dan *Acacia crassiparva*). *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Astika, E., Anggraeni, S., & Supriatno, B. (2020). Analisis komponen penyusun desain kegiatan laboratorium enzim

- katalase. *Biodik: Jurnal Ilmiah Pendidikan Biologi*, 6(3), 336–351. <https://doi.org/10.22437/bio.v6i3.9469>
- Badan Perencanaan Pembangunan Nasional. (2016). *Indonesian biodiversity strategy and action plan 2015–2020*. Kementerian Perencanaan Pembangunan Nasional/BAPPENAS.
- Balai Besar Peramalan Organisme Pengganggu Tumbuhan. (2020, 9 Juni). *Banyak yang tidak tahu, inilah manfaat putri malu bagi petani*. <https://bbpopt.tanamanpangan.pertanian.go.id/index.php/2020/06/09/banyak-yang-tidak-tahu-inilah-manfaat-putri-malu-bagi-petani/>
- Baldani, J. I., Reis, 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 and Soil*, 384, 413–431. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2186-6>
- Breitfeld, H. T., Hennig-Breitfeld, J., BouDagher-Fadel, M. K., Hall, R., & Galin, T. (2020). Oligocene–Miocene drainage evolution of NW Borneo: Stratigraphy, sedimentology and provenance of Tatau–Nyalau Province sediments. *Journal of Asian Earth Sciences*, 195, 104331. <https://doi.org/10.1016/j.jseaes.2020.104331>
- Dini, I. R., Wawan, Hapsoh, & Devi, R. (2020). Eksplorasi dan karakterisasi bakteri *Rhizobium* asal tanaman *Mucuna bracteata* di tanah gambut. *Jurnal Agroekoteknologi*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.33512/jur.agroekotetek.v12i1.8765>
- Harahap, I. P. (2008). Studi pendahuluan isolasi bakteri *Rhizobium* dari bintil akar tanaman putri malu (*Mimosa pudica* L.) serta pemanfaatannya sebagai pupuk hayati (*biofertilizer*) dengan menggunakan bentonit sebagai medium pembawa. *Skripsi*. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Huslina, F., & Harahap, D. A. (2019). Isolasi bakteri pengikat nitrogen dengan menggunakan media Jensen. *Jurnal Agrotek*, 6, 91–97.
- Irzon, R. (2017). Geochemistry of Late Triassic weak peraluminous A-type Karimun Granite, Karimun Regency, Riau Islands Province. *Indonesian Journal on Geoscience*, 4(1), 21–37.
- Irzon, R., Sendjadja, P., Kurnia, Imtihanah, & Soebandrio, J. (2014). Kandungan rare earth elements dalam tailing tambang timah di Pulau Singkep. *Jurnal Geologi dan Sumberdaya Mineral*, 15(3), 143–151.
- Ismiati. (2018). Isolasi dan karakteristik bakteri pada air gambut di kawasan Desa Sungai Daun, Kecamatan Pasir Limau Kapas, Kabupaten Rokan Hilir, Provinsi Riau. *Skripsi*. Medan: Universitas Medan Area.
- Kannan, V. R., Sithara, S., & Chandru, S. (2015). Proportional analysis of leghaemoglobin concentration in various nodulating plants and intuitive *Rhizobium* species. *European Journal of Experimental Biology*, 5(4), 15–23.
- Lisa, M. (2019). Isolasi dan karakterisasi bakteri pengikat nitrogen dari tanah gambut Kecamatan Trumon, Aceh Selatan. *Skripsi*. Banda Aceh: Universitas Islam Negeri Ar-Raniry.
- López Hernández, M. E., Morales Hernández, O. E., & Lacayo Romero, M. L. (2025). Evaluación del potencial de *Mimosa pudica* para fitorremediación de suelos de residuo minero contaminados con cinc y cobre, en los años 2014 y 2019. *Revista Ciencia y Tecnología El Higo*, 15(2), 130–141. <https://doi.org/10.5377/elhigo.v15i2.21832>
- Mendrofa, P. K. T., Waruwu, A. B. S., & Lase, N. K. (2024). Kajian literatur: Potensi *Rhizobium* dalam fiksasi nitrogen sebagai solusi ramah lingkungan untuk

- peningkatan kesuburan tanah. *PENARIK: Jurnal Ilmu Pertanian dan Perikanan*, 1(2), 156–161.
- Mensah, A. K. (2015). Role of revegetation in restoring fertility of degraded mined soils in Ghana: A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 7(2), 57–80.  
<https://doi.org/10.5897/IJBC2014.0775>
- Mnasri, B., Aouani, M. E., & Mhamdi, R. (2007). Nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris*) under water deficiency. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(7), 1744–1750.  
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.01.030>
- Nivya, R. M. (2015). A study on plant growth-promoting activity of the endophytic bacteria isolated from the root nodules of *Mimosa pudica* plant. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 4(8), 6959–6968.
- PT Timah (Persero) Tbk. (2013). *Reklamasi lahan bekas tambang PT Timah (Persero) Tbk.* [Makalah lokakarya]. Lokakarya Memantapkan Upaya Rehabilitasi Lahan Bekas Tambang melalui Peningkatan Kapasitas Pelaksana.
- Puri, A. A. A. (2025). Uji aktivitas enzim katalase (EC 1.11.1.6) terhadap variasi pH dan suhu. *Maliki Interdisciplinary Journal*, 3(3), 10–14. <https://urj.uin-malang.ac.id/index.php/mij/article/view/14180>
- Putri, A. L. O., & Kusdiyantini, E. (2018). Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat dari pangan fermentasi berbasis ikan (inasua) yang diperjualbelikan di Maluku, Indonesia. *Jurnal Biologi Tropika*, 1, 6–12.
- Rauf, A., Wardah, & Zulkaidah. (2020). Pertumbuhan beberapa jenis pohon leguminosa pada media tanam tanah bekas tambang emas di Poboya, Sulawesi Tengah. *Mitra Sains*, 8(1), 1–18.
- Rincón-Rosales, R., Villalobos-Escobedo, J. M., Rogel, M. A., Martínez, J., Ormeño-Orrillo, E., & Martínez-Romero, E. (2013). *Rhizobium calliandrae* sp. nov., *Rhizobium mayense* sp. nov. and *Rhizobium jaguaris* sp. nov., rhizobial species nodulating the medicinal legume *Calliandra grandiflora*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 3423–3429.
- Rohyani, Zul, D., & Fibrianti, B. L. (2014). Isolasi bakteri indigenus yang potensial sebagai agen biofertilizer asal tanah gambut di kawasan Zamrud dan Taman Nasional Tesso Nilo, Riau. *JOM FMIPA*, 1(2), 417–429.
- Rosyida, I., Ullah, W., Helmi, A., & Sasaoka, M. (2019). Adapting livelihoods to the impacts of tin mining in Indonesia: Options and constraints. *The Extractive Industries and Society*, 6(4), 1302–1313.  
<https://doi.org/10.1016/j.exis.2019.10.018>
- Santoso, K., Rahmawati, & Rafdinal. (2019). Eksplorasi bakteri penambat nitrogen dari tanah hutan mangrove Sungai Peniti, Kabupaten Mempawah. *Protobiont*, 8(1), 52–58.  
<https://doi.org/10.26418/protobiont.v8i1.30855>
- Sari, E., Flatian, A. N., Sari, Z. I., & Sulaeman, E. (2018). Isolasi dan karakterisasi *Rhizobium* dari *Glycine max* L. dan *Mimosa pudica* Linn. *Ekotonia: Jurnal Penelitian Biologi, Botani, Zoologi dan Mikrobiologi*, 3(2), 55–62.  
<https://doi.org/10.33019/ekotonia.v3i2.760>
- Senthilkumar, M., Amaesan, N., & Sankaranarayanan, A. (2021). Quantitative estimation of leghemoglobin content in legume root nodules. In *Plant-microbe interactions* (pp. 33–35). Humana. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1080-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1080-0_4)
- Sharma, P., & Sharma, S. (2019). Bacterial motility and its regulation. *Journal of Microbial Physiology*, 12(3), 150–160.

- Shomi, F. Y., Uddin, M. B., & Zerine, T. (2021). Isolation and characterization of nitrogen-fixing bacteria from soil sample in Dhaka, Bangladesh. *Stamford Journal of Microbiology*, 11(1), 11–13. <https://doi.org/10.3329/sjm.v11i1.57145>
- Sigit, W., Feri Wibisono, B., Nugraheni, M. P., Putri, B., & Makitan, T. (2013). *Naga terbang Wendit*. Indonesia Dragonfly Society.
- Suarna, I. W. (2015). *Peran tanaman pakan gamal (Gliricidia sepium) dalam konservasi lahan pascatambang*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tumbuhan Pakan, Universitas Udayana.
- Subardja, D., Kasno, A., & Suryani, E. (2009). *Teknologi pemulihan lahan bekas tambang timah untuk pertanian di Bangka Belitung*. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian.
- Suryanti, E., Nabilla, A. Y., Prastya, M. E., & Sari, D. A. (2024). Isolasi dan karakterisasi bakteri *Rhizobium* asal bintil akar tanaman kacang tanah (*Arachis hypogaea*) dan koro rawe (*Mucuna bracteata*). *Jurnal Sumberdaya Hayati*, 10(4), 175–182.
- Syahrir, R., Wall, F., & Diallo, P. (2020). Socioeconomic impacts and sustainability of mining: A case study of the historical tin mining in Singkep Island, Indonesia. *The Extractive Industries and Society*, 7(4), 1525–1533. <https://doi.org/10.1016/j.exis.2020.07.023>
- Wicaksono, H. M. H., & Handayani, E. (2021). Karakterisasi mineralogi mineral berbasis Cu-Fe-S dengan SEM-EDS di daerah Kelapa Kampit, Pulau Belitung. *Jurnal Teknologi Mineral dan Batubara*, 17(1), 27–38. <https://doi.org/10.30556/jtmb.Vol17.No1.2021.1127>
- Widawati, S. (2015). Uji bakteri simbiotik dan nonsimbiotik pelarutan Ca versus P dan efek inokulasi bakteri pada anakan turi (*Sesbania grandiflora* L. Pers.). *Jurnal Biologi Indonesia*, 11(2), 295–307.
- Yusuf, M. (2011). Model pengembangan kolong terpadu pascapenambangan timah di wilayah Bangka Belitung. *Skripsi*. Palembang: Universitas Sriwijaya.