

**ISOLASI DAN POTENSI BAKTERI FIKSASI NITROGEN SIMBIOTIS DARI BINTIL AKAR
Falcataria moluccana (Miq.) Barneby & J.W.Grimes UNTUK Mendukung
REKLAMASI LAHAN BEKAS TAMBANG NIKEL**

***(Isolation and Potency of Symbiotic Nitrogen Fixation Bacteria from Nodules of
Falcataria moluccana (Miq.) Barneby & J.W.Grimes for Supporting Nickle
Postmining Area Reclamation)***

Ramdana Sari and Retno Prayudyaningsih*

Balai Penelitian dan Pengembangan Lingkungan Hidup dan Kehutanan Makassar
Jalan Perintis kemerdekaan Km. 16 Makassar Kode Pos 90243, Sulawesi Selatan, Indonesia

Article Info

ABSTRAK

Article History:

Received 18 May 2020;
received in revised form 1
August 2020; accepted 4
August 2020.
Available online since
31 August 2020

Kata Kunci:

Isolasi, Sengon, Fiksasi
nitrogen, *Rhizobium*,
Bradyrhizobium

Keywords:

Isolation, Sengon, Nitrogen
fixation, *Rhizobium*,
Bradyrhizobium

How to cite this article:

Sari, R., & Prayudyaningsih,
R. (2020). *Isolation and
potency of Symbiotic
Nitrogen Fixation Bacteria
from Nodules of Falcataria
moluccana* (Miq.) Barneby
& J.W.Grimes for Supporting
Nickle Postmining Area
Reclamation. *Jurnal
Penelitian Kehutanan
Wallacea*, 9(2), 111-120.
doi:<http://dx.doi.org/10.18330/jwallacea.2020.vol9iss2pp111-120>

Read online:



Scan this
QR code
with your
Smart
phone or
mobile
device to read online.

Tambang nikel merupakan salah satu penyumbang devisa terbesar di Indonesia, juga meninggalkan lahan dengan sifat fisik, kimia dan biologi tanah yang buruk. Kondisi lahan seperti itu berpengaruh langsung terhadap pertumbuhan tanaman sehingga menghambat upaya reklamasi. Penanaman jenis-jenis legum, salah satunya sengon laut (*Falcataria moluccana*), pada reklamasi lahan bekas tambang bertujuan untuk memperbaiki sifat-sifat tanah. Tanam legum mempunyai rasio C/N rendah sehingga introduksi mikroorganisme tanah penambat nitrogen merupakan salah satu alternatif yang dapat digunakan untuk mengembalikan kesuburan tanah. Bakteri penambat nitrogen mampu menyediakan senyawa nitrogen yang bisa langsung dimanfaatkan oleh tanaman. Selain itu, pemanfaatan jenis tanaman cepat tumbuh seperti sengon laut cocok untuk memulihkan lahan kritis. Tujuan penelitian ini adalah melakukan isolasi dan karakterisasi bakteri fiksasi nitrogen simbiotik dari bintil akar sengon laut sehingga dapat dibuat inokulum dan diaplikasikan pada tanaman di lahan bekas tambang nikel. Sebanyak 5 isolat bakteri diperoleh dari bintil akar sengon laut yang tergolong pada genus *rhizobium* (3 isolat) dan *Bradyrhizobium* (2 isolat). Semua isolat yang diperoleh berbentuk batang, Gram negatif dan tidak membentuk endospora. Uji fisiologis yang dilakukan menunjukkan bahwa kelima isolat bersifat aerob, motil, tumbuh optimal pada media YEMA (*Yeast Extract Mannitol Agar*) dengan pH 6 dan 7, tetapi tidak tumbuh pada pH 4. Uji potensi yang meliputi *Acetylen Reduction Assay* dan uji *Indole Acetic Acid* menunjukkan bahwa isolat A3.1 SL 5 memiliki nilai tertinggi, yaitu 9,01 ppm dan 0,447 ppm dan berpotensi dikembangkan sebagai inokulum.

ABSTRACT

Nickel mine is one of the contributors foreign to exchange earners in Indonesia. However, the former mining area creates a complex problem in the physical, chemical, and biological soil properties which directly affect the ability of plant growth for restoration. The planting of legume species, one of them is sengon laut (*Falcataria moluccana*), in the reclamation of ex-mining land aims to improve soil properties. Legume plants have low C/N ratio so the introduction of nitrogen-fixing soil microorganisms is one alternative that can be used to improve soil fertility. Nitrogen fixing bacteria can provide nitrogen compounds that can be directly utilized by plants. In addition, the utilization of fast-growing species such as sengon laut is suitable for rehabilitation of critical lands. This study aims to isolate and characterize symbiotic nitrogen fixation bacteria so it can be made as inoculum and applied on revegetation in nickel postmining area. Five bacterial isolates were obtained from nodules of sengon laut belonging to genus *Rhizobium* (3 isolates) and *Bradyrhizobium* (2 isolates). All isolates obtained were rod-shaped, Gram negative and did not have endospores. Physiological tests showed that all isolates were aerobic, motile, grew optimally on YEMA media at pH 6 and 7, but did not grow at pH 4. Initial potential test of *Acetylen Reduction Assay* and IAA test showed that A3.1 SL 5 isolate has the highest value (9.01 ppm and 0.447 ppm) and potential to be inoculum.

I. PENDAHULUAN

Tingginya potensi kekayaan mineral seperti nikel di Indonesia menyebabkan banyak investor asing berminat menanamkan modalnya (Suciana & Surdin, 2016). Kondisi ini berpengaruh positif terhadap pertumbuhan ekonomi Indonesia, terlebih tambang nikel merupakan salah satu penyumbang terbesar devisa negara. Selain itu, kegiatan penambangan nikel juga membuka peluang kerja bagi masyarakat. Oleh karena itu, sampai saat ini ketergantungan Indonesia terhadap penerimaan sektor energi dan sumber daya mineral masih tinggi. Mempertimbangkan kondisi tersebut maka Kementerian Energi dan Sumber Daya Mineral (ESDM) membuat suatu kebijakan untuk meningkatkan peran sektor ESDM (Usman, 2011).

Nikel dapat ditemukan pada lapisan bumi dekat dengan permukaan tanah. Untuk memperoleh mineral ini diperlukan penggalan yang dikenal dengan sistem penambangan terbuka (*open pit mine method*) (Dariah *et al.*, 2010). Kegiatan ini tentunya menimbulkan kerugian seperti hilangnya vegetasi penutup lahan yang meninggalkan masalah serius, baik dari sifat fisik, kimia maupun biologi tanah. Utami (2009) menjabarkan bahwa kerusakan tanah secara fisik dapat dilihat dari porositas tanah yang rendah, nilai *bulk density* yang meningkat dan pori drainase yang menurun. Hal ini terjadi karena penggunaan alat-alat berat selama penambangan menyebabkan terjadinya pemadatan tanah. Begitu pula dengan aspek kimia, sistem penambangan terbuka menyebabkan nilai Kapasitas Tukar Kation (KTK) rendah, terjadinya perubahan pH serta menurunnya kandungan unsur-unsur hara esensial di dalam tanah. Kerusakan pada kedua aspek tersebut tentunya akan berpengaruh pada keberadaan mikroorganisme tanah. Kondisi tanah yang buruk seperti ini akan berdampak negatif terhadap fungsi dan perkembangan akar tanaman.

Undang-undang No. 4 Tahun 2009 tentang bahan mineral dan batubara memberi aturan yang tegas bahwa pemegang izin usaha penambangan harus melaksanakan reklamasi pasca penambangan. Akan tetapi, upaya ini terkadang mengalami hambatan, salah

satunya disebabkan oleh kondisi lahan miskin unsur hara sehingga tanaman sangat sulit untuk tumbuh. Dengan demikian, untuk mendukung keberhasilan reklamasi lahan bekas tambang nikel dapat dicapai melalui introduksi mikroorganisme tanah yang bersimbiosis dengan akar tanaman. Penelitian yang dilakukan oleh Leomo *et al.* (2013) menunjukkan bahwa rhizobakteri yang diaplikasikan pada lahan bekas tambang dapat menyediakan hara yang cukup seimbang sehingga mampu memacu pertumbuhan legum jenis *cover crop*. Rhizobia merupakan salah satu kelompok mikroorganisme tanah yang bersimbiosis dengan tanaman legum dan mampu menyediakan hara, khususnya unsur nitrogen, untuk dimanfaatkan secara langsung oleh tanaman dalam proses metabolisme. Bakteri yang bersimbiosis dengan bintil akar tanaman legum ini telah terbukti dapat memacu pertumbuhan tanaman, khususnya pada lahan marginal (Widawati *et al.*, 2015).

Sengon laut (*Falcataria moluccana* (Miq.) Barneby & J.W.Grimes) merupakan salah satu jenis legum yang memiliki nilai Indeks Nilai Penting (INP) tertinggi pada lahan bekas tambang nikel PT. Stargate Pasific Resources, sebesar 223,21 untuk fase pancang dan tergolong jenis yang tumbuh cepat (*fast growing species*) (Prayudyansingih *et al.*, 2015). Oleh karena itu, tanaman ini cocok dipilih untuk reklamasi lahan bekas tambang. Akan tetapi masih sedikit penelitian, khususnya di Indonesia, mengenai pemanfaatan bakteri rhizobia pada lahan bekas tambang nikel yang diintroduksi pada tanaman kehutanan. Bahkan belum ada penelitian yang mengkaji bakteri fiksasi nitrogen simbiotik indigenous dari bintil akar sengon laut untuk diaplikasikan dalam reklamasi lahan kritis, terlebih pembuatan inokulumnya. Oleh karena itu, hasil penelitian ini akan memberikan informasi baru yang mampu melengkapi informasi-informasi sebelumnya terkait pemanfaatan bakteri fiksasi nitrogen simbiotis. Sebagai tahap awal, pembuatan inokulum, isolasi, dan karakterisasi bakteri fiksasi nitrogen simbiotis perlu dilakukan untuk memperoleh informasi mengenai sifat bakteri yang potensial dalam mendukung upaya reklamasi lahan kritis, seperti pada lahan bekas tambang nikel.

II. METODE PENELITIAN

A. Lokasi dan Waktu Penelitian

Pengambilan sampel bintil akar dilakukan bulan Agustus 2015 pada tanaman sengon laut yang ditanam di lahan bekas tambang nikel PT. Stargate Pasific Resources, Kabupaten Konawe Utara, Sulawesi Tenggara. Tanaman sengon laut tersebut berumur 2 tahun dengan rata-rata diameter 1,31 cm dan tinggi 2,37 m. Tanaman tersebut ditanam di lahan yang sebelumnya telah ditaburi *top soil*. Penanaman sengon laut merupakan bagian dari kegiatan revegetasi untuk reklamasi lahan bekas tambang nikel. Proses isolasi dan karakterisasi bakteri fiksasi nitrogen dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Balai Penelitian dan Pengembangan Lingkungan Hidup dan Kehutanan (BP2LHK) Makassar yang dilakukan pada bulan September 2015-Juni 2016. Uji potensi isolat rhizobia dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi BP2LHK Makassar dan Laboratorium Balai Besar Pasca Panen Pertanian, Bogor.

B. Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan untuk pengambilan sampel di lapangan adalah botol sampel, linggis, gunting, silica gel, dan kapas. Alat dan bahan yang digunakan di laboratorium adalah *Laminary Air Flow* (LAF), *autoclave*, timbangan digital, inkubator, *hot plate*, stirrer, erlenmeyer, gelas ukur, spatula, labu semprot, jarum ose (lurus dan bulat), mikroskop, bintil akar, media *Yeast Extract Mannitol Agar* (YEMA), pewarna Gram, H_2O_2 3%, media *Sulfit Indole Motility Agar* (SIMA), *Malachite Green*, Safranin 5%, minyak emersi, akuades. Alat dan bahan yang digunakan dalam uji potensi awal adalah spektrofotometer, *shaker*, sentrifuse, media *Luria Bertani* (LB) cair yang mengandung triptofan dan reagen Salkowsky.

C. Prosedur Kerja

1. Pengambilan bintil akar

Pengambilan bintil akar legum dimulai dengan menentukan pohon yang akan diambil bintil akarnya. Setelah menemukan bintil akar, maka bintil tersebut dipotong dengan menggunakan *cutter*/gunting lalu tanah yang menempel pada bintil dibersihkan. Bintil akar yang dipilih adalah bintil yang berukuran

cukup besar dan apabila dibelah berwarna merah muda.

2. Isolasi Bakteri Penambat Nitrogen

Bintil akar dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan tanah yang menempel pada permukaannya lalu direndam dalam etanol 95% selama 5–10 detik, selanjutnya dicuci dengan aquadest steril. Bintil akar kemudian direndam pada H_2O_2 3% selama 3–4 menit lalu dicuci dengan aquadest steril untuk menghilangkan H_2O_2 3% dari bintil (pencucian dilakukan sebanyak 5 kali). Bintil akar kemudian dikeringkan lalu ditumbuk dengan mortar dan selanjutnya ditambahkan 1 tetes larutan NaCl 0,85%. Suspensi kemudian diinokulasi pada media YEMA. Koloni yang tumbuh dengan morfologi berbeda kemudian ditumbuhkan pada media YEMA dengan penambahan *Congo Red* (CR) sebanyak 10 ml/L untuk menguji kemurnian isolat serta media YEMA dengan penambahan *Bromthymol Blue* (BTB) sebanyak 5 ml/L untuk melihat sifat dan kecepatan tumbuhnya. Metode ini mengacu pada Somasegaran dan Hoben (1994).

3. Karakterisasi Bakteri Fiksasi Nitrogen

Kultur murni yang telah diperoleh kemudian dikarakterisasi secara mikroskopik dengan melakukan pewarnaan Gram dan pewarnaan endospora, serta uji biokimia berupa uji motilitas, uji ketahanan pH dan uji katalase (Somasegaran & Hoben, 1994). Tingkat kemasaman tanah (pH) di lahan bekas tambang nikel/lokasi penelitian adalah 5,85 (Prayudyaningsih *et al.*, 2015). Nilai pH tanah di lokasi penelitian dapat dijadikan dasar menentukan kisaran pH dalam uji ketahanan pH untuk karakterisasi jenis bakteri yang diperoleh.

4. Uji ARA dan IAA

Untuk memperoleh isolat Rhizobia yang potensial, maka dilakukan proses seleksi dalam 2 tahap pengujian, yaitu uji ARA (*Acetylene Reduction Assay*) dan uji kandungan IAA (*Indole Acetic Acid*). Metode ini mengacu pada Sudrajat *et al.* (2013).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Isolasi Bakteri Fiksasi Nitrogen Simbiotik

Sebanyak 5 isolat bakteri rhizobia berhasil diisolasi dari bintil akar sengon laut

yang ditanam di lahan bekas tambang nikel, khususnya dari areal yang sebelum dilakukan revegetasi telah ditaburi top soil. Sari dan Prayudyaningsih (2016) sebelumnya juga berhasil memperoleh 7 isolat rhizobia dari areal yang sama tetapi sumber isolat berasal dari tanah bukan dari bintil akar sengon laut. Sengon laut adalah jenis pohon yang dapat dipilih untuk revegetasi lahan bekas tambang. Jenis tanaman ini merupakan tanaman pionir (Hakim, 2016) yang umumnya mampu bertahan pada lahan-lahan kritis karena adanya bantuan mikroorganisme potensial, seperti rhizobia yang tumbuh pada bintil akarnya (Howieson & Dilworth, 2016). Menurut Sari dan Prayudyaningsih (2018), bintil akar sengon laut yang terbentuk dari simbiosis dengan rhizobia memiliki tipe *indeterminate* dengan banyak percabangan pada bintilnya.

Kelima isolat tersebut dipilih karena tumbuh baik pada media YEMA (terlihat dari pertumbuhan koloni bakteri yang menyebar di permukaan media) dan memiliki bentuk morfologi koloni yang berbeda-beda (Tabel 1). Media YEMA merupakan media selektif untuk menumbuhkan bakteri rhizobia. Isolat A1.1 SL 1 memiliki bentuk koloni bulat dengan elevasi terangkat. Isolat tersebut memiliki tepi (batas) koloni yang rata dan nampak jelas keseluruhan, sedangkan isolat A1.1 SL 8, A3.3 SL 3, A.3.1 SL 5, dan A3.3 SL 4 memiliki bentuk

koloni yang tidak beraturan dengan elevasi datar (tidak cembung) dan tepi koloni bergelombang. Permukaan koloni kelima isolat tersebut licin (*smooth*) dan memiliki lendir disebut *extracellular polysaccharida* (EPS) yang mengindikasikan semua isolat termasuk dalam kelompok bakteri rhizobia. Warna koloni bervariasi, ada yang berwarna putih, putih kecokelatan, dan cokelat. Shetta *et al.* (2011) menyatakan lendir transparan yang dihasilkan oleh koloni bakteri rhizobia berubah menjadi kecokelatan setelah diinkubasi selama 3 x 24 jam pada suhu 28°C. Selain itu, komposisi dan kadar EPS yang dimiliki oleh mikroorganisme tergantung pada jenis mikroorganisme itu sendiri, umur biofilm dan keadaan lingkungan yang berbeda-beda (Mayer *et al.*, 1999). Isolat bakteri rhizobia yang diisolasi oleh Gyorgy *et al.* (2010) dari padang rumput di pegunungan Ciuc di Transylvania, Romania, umumnya memiliki bentuk bulat (satu isolat dengan bentuk *tidak beraturan*), elevasi koloni terangkat ataupun *datar* dengan tepi koloni yang jelas keseluruhan ataupun bergelombang serta warna koloni kuning dan krem.

Semua isolat kemudian diinokulasi pada media YEMA yang ditambahkan larutan indikator *Congo Red* (CR) dan *Bromthymol Blue* (BTB). Somasegaran dan Hoben (1994) menyatakan rhizobia tidak memiliki

Tabel 1. Karakteristik morfologi koloni bakteri Rhizobia

Table 1. *Morphological characteristics of Rhizobia colony bacteria*

Isolat (Isolate)	Karakteristik morfologi koloni (Morphological characteristic of colony)				
	Bentuk (Shape)	Kemiringan (Elevation)	Tepi (Margin)	Permukaan (Surface)	Warna (Colour)
A1.1 SL 1	Circular	Raised	Entire	Smooth	Putih kecokelatan (brownish white)
A1.1 SL 8	Irregular	Flat	Undulate	Smooth	Putih kecokelatan (brownish white)
A3.3 SL 3	Irregular	Flat	Undulate	Smooth	Putih (white)
A3.1 SL 5	Irregular	Flat	Lobate	Smooth	Cokelat (Brown)
A3.3 SL 4	Irregular	Flat	Lobate	Smooth	Putih (White)

Keterangan (Remarks):

A1. 1.SL.1= isolat ke 1 dari bintil akar sengon laut di areal revegetasi A1 pada plot ke-1 (*1st isolate from sea sengon root nodule in the A1 revegetation area in the 1st plot*)

A1.1. SL.8 = isolat ke 8 dari bintil akar sengon laut di areal revegetasi A1 pada plot ke-1 (*8th isolate from the nodules of sengon laut roots in the A1 revegetation area in the 1st plot*)

A3.3. SL.3 = isolat ke 3 dari bintil akar sengon laut di areal revegetasi A3 pada plot ke-3 (*3rd isolate from the nodules of sengon laut roots in the A1 revegetation area in the 3rd plot*)

A3.1. SL.5 = isolat ke 5 dari bintil akar sengon laut di areal revegetasi A3 pada plot ke-1 (*5th isolate from the nodules of sengon laut roots in the A3 revegetation area in the 1st plot*)

A3.3. SL.4 = isolat ke 4 dari bintil akar sengon laut di areal revegetasi A3 pada plot ke-3 (*4th isolate from the nodules of sengon laut roots in the A1 revegetation area in the 3rd plot*)

kemampuan untuk menyerap larutan indikator CR sehingga isolat yang ditumbuhkan pada media YEMA+CR akan berwarna putih ataupun pink pucat (sedikit menyerap CR), sedangkan uji BTB merupakan uji sederhana untuk mendeterminasi apakah isolat termasuk dalam bakteri rhizobia tumbuh cepat atau tumbuh lambat. Respon isolat rhizobia dapat dilihat pada Tabel 2.

Bakteri rhizobia yang ditumbuhkan pada media YEMA+CR hanya mampu menyerap sedikit warna merah dari larutan indikator. Hal ini terlihat dari warna koloni pink pucat pada semua isolat yang diperoleh. Isolasi rhizobia yang dilakukan oleh Sari & Prayudyaningsih (2016) dari areal yang sama dengan sumber isolat adalah sampel tanah menunjukkan hasil yang sedikit berbeda. Sebanyak 7 isolat yang diperoleh, 4 isolat berwarna pink pucat dan 3 isolat berwarna putih ketika ditumbuhkan dalam media YEMA+CR (Sari & Prayudyaningsih, 2016). Hasil penelitian ini juga sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Deshwal dan Chaubey (2014) bahwa isolat *Rhizobium leguminosarum* yang diisolasi dari bintil akar *Pisum sativum* menunjukkan ketidakmampuan dalam menyerap CR ketika ditumbuhkan pada media YEMA yang mengandung larutan indikator tersebut. Abubakar (2015) menyatakan bahwa isolat yang tidak mampu menyerap CR termasuk ke dalam kelompok rhizobia yang dapat bersimbiosis dengan akar tanaman. Hal yang membedakan antara bakteri rhizobia dengan

bakteri penambat nitrogen nonsimbiotik adalah kemampuan penyerapan CR (Howieson & Dilworth, 2016). Selain itu, Purwaningsih *et al.* (2002) menyatakan isolat bakteri fiksasi nitrogen yang tumbuh pada media YEMA+CR dan mampu menyerap larutan CR tergolong ke dalam kelompok bakteri penambat nitrogen nonsimbiotik.

Pertumbuhan isolat bakteri pada media YEMA+BTB menunjukkan hasil yang bervariasi untuk kelima isolat (Tabel 2). Tiga isolat mampu mengubah warna media yang pada awalnya berwarna biru menjadi kuning. Sementara media pertumbuhan pada dua isolat lainnya tidak mengalami perubahan warna (biru). Berdasarkan respon terhadap uji yang diberikan, 3 isolat yang mampu mengubah media menjadi kuning termasuk ke dalam genus *Rhizobium*, sedangkan isolat yang tidak mampu mengubah warna media termasuk genus *Bradyrhizobium*. Jenis isolat rhizobia yang diisolasi oleh Sari dan Prayudyaningsih (2016) dari sampel tanah pada areal yang sama juga memperoleh genus *Rhizobium* dan *Bradyrhizobium*. Sementara Datta *et al.* (2015) menumbuhkan isolat *Rhizobium* (*R. phaseoli*, *R. trifolii* dan *R. leguminosarum*) dan *Bradyrhizobium japonicum* pada media YEMA yang ditambahkan BTB dan memperoleh hasil bahwa isolat *Rhizobium* mampu tumbuh setelah inkubasi 2 x 24 jam dan mengubah warna media yang semula biru menjadi kuning karena adanya produksi asam oleh bakteri (golongan *fast growing Rhizobia*),

Tabel 2. Sifat isolat bakteri rhizobia berdasarkan respon terhadap larutan indikator
Table 2. Properties of rhizobia bacteria isolates according to response to indicator solution

No.	Isolat (Isolate)	Uji CR (CR test)	Uji BTB (BTB test)
1.	A1.1 SL 1	Pink pucat (pale pink)	Biru (Blue)
2.	A1.1 SL 8	Pink pucat (pale pink)	Kuning (Yellow)
3.	A3.3 SL 3	Pink pucat (pale pink)	Kuning (Yellow)
4.	A3.1 SL 5	Pink pucat (pale pink)	Kuning (Yellow)
5.	A3.3 SL 4	Pink pucat (pale pink)	Biru (Blue)

Keterangan (Remarks) : CR: Congo Red; BTB: Bromthymol Blue

A1. 1.SL.1= isolat ke 1 dari bintil akar sengon laut di areal revegetasi A1 pada plot ke-1 (1st isolate from sea sengon root nodule in the A1 revegetation area in the 1st plot)

A1.1. SL.8 = isolat ke 8 dari bintil akar sengon laut di areal revegetasi A1 pada plot ke-1 (8th isolate from the nodules of sengon laut roots in the A1 revegetation area in the 1st plot)

A3.3. SL.3 = isolat ke 3 dari bintil akar sengon laut di areal revegetasi A3 pada plot ke-3 (3rd isolate from the nodules of sengon laut roots in the A1 revegetation area in the 3rd plot)

A3.1. SL.5 = isolat ke 5 dari bintil akar sengon laut di areal revegetasi A3 pada plot ke-1 (5th isolate from the nodules of sengon laut roots in the A3 revegetation area in the 1st plot)

A3.3. SL.4 = isolat ke 4 dari bintil akar sengon laut di areal revegetasi A3 pada plot ke-3 (4th isolate from the nodules of sengon laut roots in the A1 revegetation area in the 3rd plot)

sedangkan *B. japonicum* tumbuh setelah inkubasi 3x24 jam dan menunjukkan respon negatif terhadap uji BTB (golongan *slow growing Rhizobia*).

B. Karakterisasi Bakteri Fiksasi Nitrogen

Setelah dilakukan pemurnian bakteri, pengujian dilanjutkan dengan pewarnaan Gram dan endospora, katalase, motilitas serta ketahanan pH (isolat ditumbuhkan pada media YEMA pH 4, 5, 6, 7, dan 8). Hasil uji dapat dilihat pada Tabel 3.

Kelima isolat bakteri rhizobia memiliki bentuk seperti batang (*bacil*). Pada pewarnaan Gram, sel terlihat berwarna merah karena menyerap safranin (Gram Negatif). Sel bakteri rhizobia yang telah diwarnai dengan menggunakan *Malachite green* tidak menunjukkan adanya organel sel yang berwarna hijau (Gambar 1). Hal ini membuktikan bahwa rhizobia tidak memiliki endospora yang umumnya digunakan mikroorganisme bertahan pada kondisi ekstrem. Sheu *et al.* (2016) menyatakan bahwa kelompok bakteri dari genus *Rhizobium* merupakan bakteri Gram Negatif, tidak membentuk spora, berbentuk batang,

aerobik dan kemoorganotropik.

Isolat rhizobia yang diperoleh mampu menggunakan oksigen tersedia untuk diubah menjadi energi (*aerob*). Hal ini terlihat pada hasil uji katalase. Setelah penambahan reagen H₂O₂ 3% terbentuk gelembung pada preparat uji. Pengujian yang dilakukan oleh Shahzad *et al.* (2012) menggunakan isolat *R. trifolii* dari bintil akar alfalfa memberikan respon positif terhadap pemberian peroksida ini, demikian juga pada *R. ipomoeae* sp. nov. (Sheu *et al.*, 2016). Uji katalase dilakukan untuk mendeteksi adanya enzim katalase yang dimiliki suatu mikroorganisme. Enzim ini mampu merombak H₂O₂ yang dihasilkan oleh bakteri menjadi H₂O dan O₂ (Datta *et al.*, 2015). H₂O₂ merupakan suatu senyawa yang dihasilkan dari respirasi aerob bakteri dan bersifat toksik bagi bakteri itu sendiri sehingga harus dipecah oleh enzim katalase (Hemraj *et al.*, 2013).

Inokulasi isolat pada media SIM Agar menunjukkan adanya rambatan-rambatan di sepanjang tusukan ose, menunjukkan bahwa isolat memiliki flagela yang digunakan untuk berpindah tempat. Pada uji ketahanan pH, isolat mampu tumbuh pada media dengan pH

Tabel 3. Karakteristik bakteri fiksasi nitrogen
Table 3. Characteristic of nitrogen fixing bacteria

Isolat (Isolate)	Pewarnaan Gram (Gram staining)	Pewarnaan Endospora (Endospora staining)	Katalase (Catalase)	Motilitas (Motility)	Ketahanan pH (pH resistence)				
					4	5	6	7	8
A1.1 SL 1	Basil, Gram Negatif (<i>bacillus, gram negative</i>)	-	+	+	-	+	+	+	+
A1.1 SL 8	Basil, Gram Negatif (<i>bacillus, gram negative</i>)	-	+	+	-	+	+	+	+
A3.3 SL 3	Basil, Gram Negatif (<i>bacillus, gram negative</i>)	-	+	+	-	+	+	+	+
A3.1 SL 5	Basil, Gram Negatif (<i>bacillus, gram negative</i>)	-	+	+	-	+	+	+	+
A3.3 SL 4	Basil, Gram Negatif (<i>bacillus, gram negative</i>)	-	+	+	-	+	+	+	+

Keterangan (Remarks):

(-): hasil negatif terhadap uji (*negative to the test*)

(+): hasil positif terhadap uji (*positive to the test*)

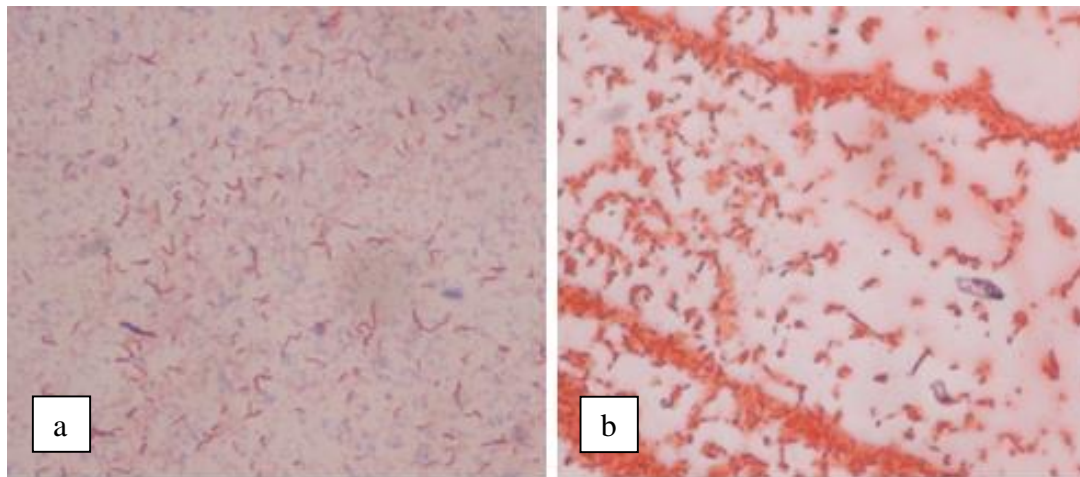
A1. 1.SL.1= isolat ke 1 dari bintil akar sengon laut di areal revegetasi A1 pada plot ke-1 (*1st isolate from sea sengon root nodule in the A1 revegetation area in the 1st plot*)

A1.1. SL.8 = isolat ke 8 dari bintil akar sengon laut di areal revegetasi A1 pada plot ke-1 (*8th isolate from the nodules of sengon laut roots in the A1 revegetation area in the 1st plot*)

A3.3. SL.3 = isolat ke 3 dari bintil akar sengon laut di areal revegetasi A3 pada plot ke-3 (*3rd isolate from the nodules of sengon laut roots in the A1 revegetation area in the 3rd plot*)

A3.1. SL.5 = isolat ke 5 dari bintil akar sengon laut di areal revegetasi A3 pada plot ke-1 (*5th isolate from the nodules of sengon laut roots in the A3 revegetation area in the 1st plot*)

A3.3. SL.4 = isolat ke 4 dari bintil akar sengon laut di areal revegetasi A3 pada plot ke-3 1 (*4th isolate from the nodules of sengon laut roots in the A1 revegetation area in the 3rd plot*)



Gambar 1. (a) sel Rhizobia berbentuk batang (basil) dan berwarna merah (Gram negatif) pada pewarnaan Gram; (b) tidak terlihat adanya endospora pada saat pemberian Malachite Green (perbesaran 40x)

Figure 1. (a) *Rhizobia* cell in bacil shape and red colored (gram negative) in gram staining; (b) *Endospores* appearance in Malachite Green addition (magnification 40x)

8 (basa) tapi tidak mampu tumbuh pada pH 4 (asam). Batas toleransi keasaman isolat rhizobia yaitu pada pH 5. Pertumbuhan optimum terlihat pada media dengan pH 6 dan 7. Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian Pawar *et al.* (2014) yang menginokulasi bakteri rhizobia pada media YEMA dengan pH bervariasi dan memperoleh hasil bahwa pertumbuhan optimum rhizobia pada pH 6,5–7,5, sedikit pertumbuhan pada pH 4 dan tidak mampu tumbuh pada media dengan pH 3,5. Hasil yang serupa juga dikemukakan oleh

Zahran *et al.* (2012) bahwa isolat rhizobia yang diperoleh dari bintil akar gandum mampu tumbuh pada pH 6 – 8, beberapa memiliki toleransi pada pH 3,5 – 4 (asam) dan pH 9 – 10 (basa).

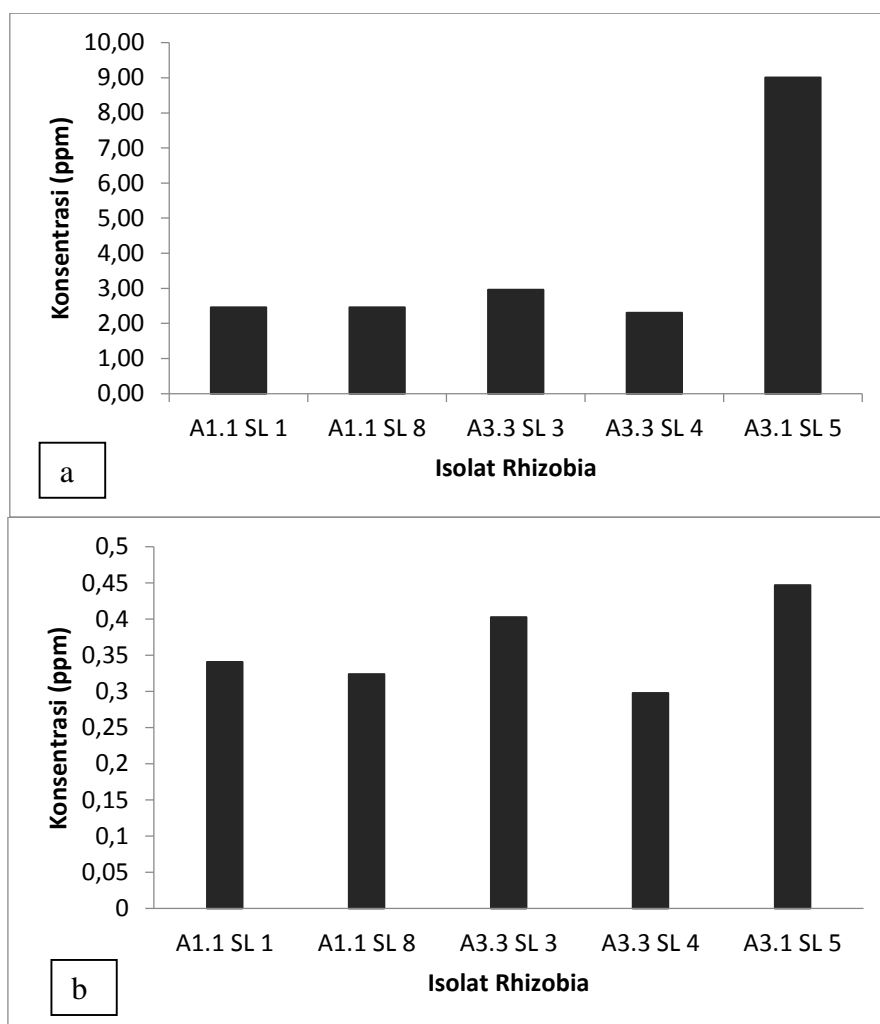
Prayudyaningsih *et al.* (2015) melaporkan bahwa lahan bekas tambang nikel yang menjadi lokasi pengambilan sampel bintil akar sengon laut memiliki keasaman tanah yang tergolong agak masam yaitu pH 5.85. Oleh karena itu, aplikasi inokulum rhizobia di areal tambang nikel masih dimungkinkan karena kondisi pH tanah masih mendukung pembentukan bintil akar. Menurut Novriani (2011), umumnya rhizobia tidak mampu membentuk bintil pada akar legum bahkan mati pada tanah masam, optimal pada pH netral serta mampu *survive* pada kondisi sedikit alkali. Rata-rata tinggi tanaman sengon di lokasi penelitian adalah

237,5 cm dan diameter batang 1,31 cm pada umur 2 tahun. Pertumbuhan sengon laut ini, khususnya diameter, cenderung lebih lambat dibanding yang tumbuh di lahan bekas tambang lain. Syauqie *et al.* (2019) menyebutkan rata-rata pertumbuhan diameter sengon laut di lahan bekas tambang batu bara pada umur 1 tahun adalah 1,07 cm. Aplikasi inokulum rhizobia diharapkan akan lebih memacu pertumbuhan tanaman dalam kegiatan revegetasi untuk reklamasi lahan bekas tambang nikel. Pada akhirnya diharapkan pemulihan lahan bekas tambang nikel juga akan lebih cepat.

C. Uji Potensi Isolat Rhizobia

Untuk mengetahui potensi awal isolat rhizobia maka dilakukan uji ARA dan uji kandungan hormon IAA. Uji ARA dilakukan untuk mengukur laju fiksasi nitrogen. Semakin tinggi aktivitas enzim nitrogenase, yang ditunjukkan oleh semakin besarnya jumlah gas asetilen (C_2H_2) yang direduksi dalam uji ARA, maka semakin tinggi pula kemampuan isolat dalam menambat N_2 dari atmosfer (Arsyad, 2007). Sementara uji IAA dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat menghasilkan hormon pertumbuhan IAA yang dikenal dengan nama auksin. Hasil pengujian potensi isolat rhizobia dapat dilihat pada Gambar 2.

Rangel *et al.* (2016) yang memperoleh isolat rhizobia dari lahan tambang Zn



Gambar 2. Uji potensi isolat rhizobia: (A) Hasil uji ARA; (B) Hasil uji IAA
Figure 2. Potential test of rhizobia isolates: (A) ARA test; (B) IAA test

menyatakan bahwa umumnya isolat-isolat tersebut memiliki potensi sebagai bioremediasi yang mampu menambat nitrogen bebas dan menghasilkan hormon pertumbuhan, seperti IAA (*Indole Acetic Acid*). Hasil pengujian yang dilakukan pada penelitian ini terlihat bahwa A3.1 SL 5 memiliki nilai uji ARA dan uji IAA yang paling tinggi, yaitu 9,01 ppm dan 0,447 ppm sehingga berpotensi untuk dijadikan inokulum rhizobia.

Inokulasi isolat rhizobia terhadap tanaman *Acacia mangium* pada tanah masam bekas tambang menunjukkan bahwa pemberian isolat tersebut dapat meningkatkan kadar amonium, nitrat tanah, kadar N total dan serapan N tanaman (Permatasari, 2011). Oleh karena itu, dengan adanya potensi yang dimiliki oleh bakteri rhizobia, menjadikan isolat ini cocok untuk diaplikasikan pada kegiatan pemulihan lahan marginal, seperti lahan bekas tambang nikel.

IV. KESIMPULAN

Isolasi bakteri fiksasi nitrogen simbiotik dari bintil akar sengon laut menghasilkan 5 isolat dengan karakteristik yang bervariasi. Kelompok bakteri rhizobia ini memiliki bentuk koloni bulat (1 isolat) dan tidak beraturan (4 isolat) dengan permukaan koloni licin. Empat koloni memiliki elevasi datar dan terangkat, tepi koloni yang jelas dan bergelombang. Warna koloni isolat bervariasi dari warna putih, putih kecokelatan, dan cokelat. Sebanyak 2 isolat termasuk dalam kelompok *Bradyrhizobium* (*slow growing rhizobia*) dan 3 isolat lainnya termasuk kelompok *Rhizobium* (*fast growing rhizobia*). Semua isolat merupakan bakteri Gram Negatif, berbentuk batang (*bacil*), tidak memiliki endospora, aerob, dan motil. Semua isolat tidak mampu tumbuh pada kondisi asam dengan pH 4, tapi tumbuh pada pH 5, 6, 7, dan 8 dengan pertumbuhan optimum pada pH 6

dan 7. Uji potensi ARA dan hormon IAA menunjukkan bahwa isolat A3.1 SL 5 mempunyai kemampuan terbaik dalam mereduksi gas asetilen sebesar 9,01 ppm dan menghasilkan hormon IAA terbanyak sebesar 0,447 ppm sehingga memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai inokulum.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Edi Kurniawan, Hajar dan Fajri sebagai teknisi litkayasa yang telah membantu penulis selama pengambilan sampel di lapangan. Ucapan terima kasih juga penulis ucapkan kepada Andi Sri Rahmah Dania dan Hartini yang telah membantu proses isolasi dan pengujian di laboratorium. Kami juga menyampaikan terima kasih secara khusus kepada PT. Stargate Pasific Resources yang telah memberikan izin pengambilan sampel dan melakukan penelitian di lahan bekas tambangnya.

KONTRIBUSI PENULIS

RS dan RP berperan sebagai kontributor utama. RS melaksanakan penelitian, analisis hasil, menginterpretasi hasil dan penulisan naskah. Sementara RP bertindak sebagai koordinator penelitian, konseptualisasi penelitian, melaksanakan penelitian dan penulisan naskah.

KONFLIK KEPENTINGAN

Penulis tidak memiliki hubungan keuangan atau pribadi satu sama lain yang mungkin secara tidak wajar dapat mempengaruhi objektivitas dalam menulis artikel ini.

DAFTAR PUSTAKA

Abubakar, F. (2015). *Isolation and characterisation of indigenous rhizobia and response to inoculation by promiscuous soybean in the Nigerian savanna*. Ahmadu Bello University.

Arsyad, R. H. (2007). *Penggunaan Rhizobium dan Mikroba Pelarut Fosfat (MPF) Untuk Memperbaiki Pertumbuhan Bibit Akasia (Acacia mangium dan Acacia crassicarpa)*. Bogor: Institut Pertanian Bogor. Skripsi. Tidak dipublikasikan

Dariah, A., Abdurachman, A., & Subardja, D. (2010). Reklamasi lahan eks-penambangan untuk perluasan areal pertanian. *Jurnal Sumberdaya Lahan*, 4(1), 1–12.

Datta, A., Singh, R. K., & Tabassum, S. (2015).

Isolation, Characterization and Growth of Rhizobium Strains under Optimum Conditions for Effective Biofertilizer Production. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 32(34), 199–208.

Deshwal, V., & Chaubey, A. (2014). Isolation and characterization of Rhizobium leguminosarum from root nodule of *Pisum sativum* L. *Journal of Academia and Industrial Research*, 2(8), 464–467.

Gyorgy, E., Mara, G., Mathe, I., Laslo, E., Marialigeti, K., Albert, B., Oancea, F., & Lanyi, S. (2010). Characterization and diversity of the nitrogen fixing microbiota from a specific grassland habitat in the Ciuc Mountains. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(4), 5474–5481.

Hakim, E. H. (2016). Penataan lahan kawasan pesisir pasca penambangan pasir besi Pantai Selatan Kabupaten Tasikmalaya. *Jurnal Geografi*, 4(24), 15–23.

Hemraj, V., Diksha, S., & Avneet, G. (2013). A review on commonly used biochemical test for bacteria. *Innovare Journal of Life Science*, 1(1), 1–7.

Howieson, J. G., & Dilworth, M. J. (2016). *Working with rhizobia* (J. Howiensen & M. J. Dilworth (eds.); Issue January). Australian Center for International Agriculture Research (ACIAR).

Leomo, S., Mudi, L. A., & Alam, S. (2013). *Aplikasi rizobakteri pada cover crop dalam mempengaruhi sifat kimia tanah bekas tambang nikel*. *Jurnal Agroteknos*. 3(1), 26–33.

Mayer, C., Moritz, R., Kirschner, C., Borchard, W., Maibaum, R., Wingender, J., & Flemming, H. C. (1999). The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *Int. J. Biol. Macromol.*, 26(1), 3–16.

Novriani. (2011). Peranan Rhizobium dalam Meningkatkan Ketersediaan Nitrogen bagi Tanaman Kedelai. *AgronobiS*, 3(5), 35–42.

Pawar, V. A., Pawar, P. R., Bhosale, A. M., & Chavan, S. V. (2014). Effect of Rhizobium on Seed Germination and Growth of Plants. *Journal of Academia and Industrial Research*, 3(2), 84 - 88.

Permatasari, M. (2011). *Uji Inokulum Rhizobia dan Pengaruhnya Terhadap Pertumbuhan Acacia mangium Pada Tanah Masam Bekas Tambang*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Prayudyaningsih, R., Mangopang, A. D., Broto, B. W., Sari, R., Kurniawan, E., Hajar, & Ansari, F. (2015). *Eksplorasi Mikroba Tanah Simbiotik, Pemilihan Jenis Tumbuhan Lokal dan Keanekaragaman Hayati Lahan Bekas*

- Tambang Nikel*. Laporan Hasil Penelitian. Balai Litbang LHK Makassar. Tidak dipublikasikan.
- Purwaningsih, S., Dan, B., & Kerja, C. (2002). *Isolation of population and characterization of Rhizobium bacteria in soil from Gunung Halimun National Park , West Java*. *Berita Biologi* 6(April), 167–171.
- Rangel, W. M., Thijs, S., Janssen, J., Oliveira Longatti, S. M., Bonaldi, D. S., Ribeiro, P. R. A., Jambon, I., Eevers, N., Weyens, N., Vangronsveld, J., & Moreira, F. M. S. (2016). Native rhizobia from Zn mining soil promote the growth of *Leucaena leucocephala* on contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation*, 19(2), 142–156.
- Sari, R., & Prayudyaningsih, R. (2016). Populasi dan Jenis Bakteri Penambat Nitrogen Simbiotik di Lahan Bekas Tambang Nikel. In M. Litaay, Syahribulan, Fahrudin, R. Umar, & Sardiani (Eds.), *Seminar Nasional Biologi: Peranan Biologi Dalam Peningkatan Konservasi Keragaman Hayati* (pp. 475–483). Fakultas MIPA Universitas Hasauddin.
- Sari, Ramdana, & Prayudyaningsih, R. (2018). Perkembangan bintil akar pada semai sengon laut (*Paraserianthes falcataria* (L) Nielsen). *Info Teknis EBONI*, 15(2), 105–119.
- Shahzad, F., Shafee, M., Abbas, F., Babar, S., Tariq, M. M., & Ahmad, Z. (2012). Isolation and biochemical characterization of rhizobium meliloti from root nodules of Alfalfa (*Medicago sativa*). *Journal of Animal and Plant Sciences*, 22(2), 522–524.
- Shetta, N D, A.-S. and M. A.-A. (2011). Identification and characterization of Rhizobium associated with woody legume trees grown under Saudi Arabia Condition. *Am-Euras J. Agric. & Environ. Sci.*, 10(3), 410–418.
- Sheu, S. Y., Chen, Z. H., Young, C. C., & Chen, W. M. (2016). *Rhizobium ipomoeae* sp. nov., isolated from a water convolvulus field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(4), 1633–1640.
- Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (1994). *Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium Technology* (P. Somasegaran & H. J. Hoben (eds.)). Springer-Verlag.
- Suciana, & Surdin. (2016). Persepsi masyarakat petani pengelolaan pertambangan nikel terhadap hasil produksi sawah di Desa Watumbohoti. *Jurnal Penelitian Pendidikan Geografi*, 1(1), 53–68.
- Sudrajat, D., Mulyana, N., & Ardhari, A. (2013). Seleksi mikroba rizosfer indigen untuk bahan bioaktif pada inokulan berbasis kompos iradiasi. *Prosiding Seminar Nasional Matematika, Sains Dan Teknologi*, 97–110.
- Syauqie, A., Hatta, M., Priaymadi, B. J., & Kissinger. (2019). Pengaruh pemberian kompos dan posisi lereng terhadap pertumbuhan sengon (*Paraserianthes falcataria*) di lahan revegetasi bekas tambang batu bara. *EnviroScienteeae*, 15(2), 146–153.
- Usman, E. (2011). Prospek pengembangan sumber daya nikel Laterit di Kawasan Timur Indonesia. *M&E*, 9(2), 17–25.
- Utami, H. (2009). *Kajian Sifat Fisik, Sifat Kimia dan Sifat Biologi Tanah Paska Tambang Galian C pada Tiga Penutupan Lahan*. Bogor: Institut Pertanian Bogor (IPB).
- Widawati, S., S. dan S. (2015). Isolasi dan uji efektivitas Plant Growth Promoting Rhizobacteria di lahan marginal pada pertumbuhan tanaman kedelai (*Glycine max* L. Merr.) var. Wilis. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia*, 1, 59–65.
- Zahran, H. , Abdel-Fattah, M., Yasser, M. , Mahmoud, A. M., & Bedmar, E. . (2012). Diversity and environmental stress responses of Rhizobial Bacteria from Egyptian Grain legumes. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(10), 571–583.