

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penambat Nitrogen Asal Rizosfer Senggani (*Melastoma malabathricum* L.) di Lahan Pascatambang Timah

*Isolation and Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria from Senggani Rhizosphere (*Melastoma malabathricum* L.) in Post-Tin Mining Land*

Aqilah Fitriandini, Faadilah Majeeda, Rangga Saputra, Alifia Sely Gumay & Siti Komariah

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

*Corresponding author: aqilahqylafitriandini24@gmail.com

ABSTRAK

Pengembangan pupuk hayati yang mengandung bakteri penambat nitrogen dapat menjadi solusi alternatif penanganan lahan pertanian yang tergolong kritis di Provinsi Kepulauan Bangka Belitung. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri penambat nitrogen dari rizosfer tanaman senggani (*Melastoma malabathricum* L.) di lahan pascatambang timah Desa Riding Panjang, Kabupaten Bangka. Sampel tanah dikumpulkan secara acak dari lima titik pada kedalaman 0–20 cm. Isolasi bakteri dilakukan dengan metode pour plate dan mengisolasi sampel tanah pada pengenceran 10⁻⁴ dan 10⁻⁵, dilanjutkan dengan purifikasi dan karakterisasi bakteri berupa morfologi makroskopis maupun mikroskopis dan uji biokimia serta uji penambat nitrogen. Tiga isolat bakteri berhasil diperoleh, masing-masing menunjukkan morfologi koloni yang berbeda serta tergolong bakteri gram negatif. Seluruh isolat menunjukkan reaksi positif terhadap uji katalase, oksidase, dan motilitas, serta memiliki pola fermentasi gula yang bervariasi pada media TSIA. Pengujian pada media Jensen dan NfB mengonfirmasi bahwa ketiga isolat memiliki kemampuan menambat nitrogen, ditunjukkan oleh terbentuknya pelikel dan perubahan warna media. Hasil ini menunjukkan bahwa isolat bakteri dari rizosfer senggani memiliki potensi sebagai agen biofertilizer untuk mendukung rehabilitasi lahan terdegradasi akibat penambangan timah, terutama melalui mekanisme fiksasi nitrogen non-simbiotik.

Kata Kunci: bakteri penambat nitrogen, Bangka Belitung, biofertilizer rizosfer senggani, lahan pascatambang.

ABSTRACT

The development of biofertilizers containing nitrogen-fixing bacteria could be an alternative solution for managing critical agricultural land in the Bangka Belitung Islands Province. This study aims to isolate and characterize nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of senggani plants (*Melastoma malabathricum* L.) in post-tin mining land in Riding Panjang Village, Bangka Regency. Soil samples were collected randomly from five points at a depth of 0–20 cm. Bacterial isolation was carried out using the pour plate method and isolating soil samples at dilutions of 10⁻⁴ and 10⁻⁵, followed by purification and characterization of bacteria in the form of macroscopic and microscopic morphology, biochemical tests, and nitrogen-fixing tests. Three bacterial isolates were successfully obtained, each showing different colony morphology and classified as gram-negative bacteria. All isolates showed positive reactions to catalase, oxidase, and motility tests, and had varying sugar fermentation patterns on TSIA media. Tests on Jensen and NfB media confirmed that the three isolates had the ability to fix nitrogen, as indicated by the formation of a pellicle and changes in media color. These results indicate that bacterial isolates from the senggani rhizosphere have the potential as biofertilizer agents to support the rehabilitation of degraded land due to tin mining, especially through non-symbiotic nitrogen fixation mechanisms.

Keywords: nitrogen-fixing bacteria, Bangka Belitung, biofertilizer, *Melastoma malabathricum* rhizosphere, post-mining land.

PENDAHULUAN

Provinsi Kepulauan Bangka Belitung memiliki kawasan perkebunan komoditi unggul yang sangat luas dan besar, seperti perkebunan karet, kelapa sawit dan lada. Badan Lingkungan Hidup Daerah (BLHD) Provinsi Kepulauan Bangka Belitung melaporkan pada tahun 2014, sebanyak 508,836,47 hektar kawasan budidaya pertanian di Bangka Belitung termasuk ke dalam kelas tingkat lahan potensial kritis. Lahan kritis memiliki lahan yang tidak produktif. Luas lahan yang semakin bertambah disebabkan oleh beberapa hal, seperti adanya penambangan timah. Penambangan timah menyebabkan turunnya kualitas tanah seperti tanah bersifat asam dan kadar unsur hara yang sedikit. Kesuburan tanah yang menurun dapat diatasi oleh sebagian besar petani dengan mengaplikasikan pupuk kimia pada lahan pertanian maupun pada tanamannya.

Penggunaan pupuk kimia digunakan untuk meningkatkan produktivitas hasil pertanian, mengandung unsur hara mudah terurai dan mampu mempercepat proses penyerapan mineral oleh tanaman serta memiliki harga yang terjangkau (Widowati *et al.*, 2022) Namun, penggunaan pupuk kimia dalam jangka panjang dan berlebihan menyebabkan timbulnya dampak negatif seperti penurunan bahan organik, terjadi pengerasan pada tanah sehingga merusak struktur tanah, pencemaran lingkungan, dan pencemaran air. Jika hal tersebut terus dilakukan maka kualitas tanah maupun kesehatan lingkungan akan terus menurun dan menurunkan hasil produksi pertanian (Simanjuntak *et al.*, 2013, Widowati *et al.*, 2022). Dampak penggunaan pupuk kimia dapat dikurangi dengan cara mengganti pupuk kimia menjadi pupuk hayati. Pupuk hayati mengandung mikroba aktif yang berperan dalam proses dekomposer, meningkatkan pertumbuhan tanaman, berperan sebagai agen biokontrol dan mampu menyediakan unsur hara bagi tanaman.

Salah satu unsur hara yang sangat dibutuhkan oleh tanaman adalah nitrogen. Unsur nitrogen (N) termasuk dalam kelompok unsur hara esensial yang dibutuhkan dalam jumlah banyak bagi pertumbuhan tanaman. Ketersediaan unsur N dalam tanah tergolong rendah dikarenakan unsur mudah hilang melalui proses penguapan dan pencucian, sedangkan ketersediaan unsur N tergolong tersedia bebas di atmosfer dalam bentuk N_2 . Umadi *et al.*, 2023). Ketersediaan unsur N di atmosfer berupa gas tidak dapat langsung diserap oleh tanaman tingkat tinggi, dan diperlukan mekanisme khusus dengan bantuan mikroorganisme tertentu untuk diserap oleh tanaman dalam bentuk senyawa ammonium (NH_4). Kelompok mikroba yang dapat menambat nitrogen dari udara dan menyusun atom nitrogen ke dalam molekul ammonium, nitrat, atau senyawa lain untuk dapat digunakan oleh tanaman dikenal sebagai bakteri penambat nitrogen (Huslina dan Harahap, 2019).

Bakteri penambat nitrogen dapat hidup secara bebas atau bersimbiosis dengan tanaman. Bakteri yang hidup bersimbiosis dengan membentuk struktur simbiosis berupa bintil akar pada tanaman legum yaitu *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, dan *Sinorhizobium*. Sedangkan bakteri penambat nitrogen yang hidup bebas di perakaran tanaman yaitu *Azospirillum*, *Azotobacter*, dan *Pseudomonas* (Jalal *et al.*, 2022).

Lahan bekas tambang timah memiliki karakteristik tanah dengan derajat keasaman yang rendah atau asam, kandungan hara terbatas dan kondisi lahan kering. Salah satu jenis tumbuhan yang dapat beradaptasi dan dapat ditemukan di lahan pasca tambang timah adalah tanaman senggani (*Melastoma malabathricum* L.) (Fani *et al.*, 2022). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri penambat nitrogen asal rizosfer tanaman senggani di lahan pasca tambang timah.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret- Mei 2025. Pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan metode cuplikan acak dari sampel tanah sekitar perakaran tanaman senggani. Lokasi pengambilan sampel tanah berlokasi di lahan bekas tambang timah Desa Riding Panjang, Kecamatan Merawang, Kabupaten Bangka, Kepulauan Bangka Belitung (1°59'02"S 106°06'39"E). Karakterisasi dan pengujian penambat nitrogen dilakukan di Laboratorium Biologi, Gedung Daya F, Fakultas Pertanian, Perikanan dan Kelautan, Universitas Bangka Belitung.

Gambar 1. Peta Penelitian Lokasi Pengambilan Sampel

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah autoklaf, batang pengaduk, bunsen, cawan petri, *colony counter*, *cool box*, erlenmeyer, gelas ukur, gunting, inkubator, jarum ose, kaca objek, kaca penutup, kapas, karet, kasa, kertas, kertas saring, mikroskop, neraca analitik, pipet tetes, rak tabung reaksi, sekop, *soil tester*, dan tabung reaksi.

Bahan-bahan yang digunakan adalah akuades, agar, alkohol 70%, H₂O₂, iodin, kristal violet, media Jensen, media *Natrium Agar* (NA), media *Nutrient Broth* (NB), media *Nitrogen free Bromothylblue* (NfB), media *Sulfide Indole Medium* (SIM), media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), NaCl 0,9%, plastik

sampel, reagen Kovac, safranin, dan sampel tanah perakaran tanaman senggani.

Prosedur Kerja

1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang akan digunakan disiapkan terlebih dahulu. Selanjutnya dilakukan sterilisasi pada semua alat dan bahan yang akan digunakan dengan autoklaf. Kondisi sterilisasi autoklaf diatur dengan tekanan sebesar 15 psi, suhu sebesar 121°C, dan dalam waktu kurang lebih 15 menit (Gupta & Shukshith. 2016).

2. Pengambilan Sampel Tanah

Sampel tanah diambil secara acak (*random sampling*) pada lima titik berbeda. Pengambilan sampel tanah dilakukan dengan mengambil tanah yang berada di area rizosfer akar tanaman senggani. Kemudian sampel tanah dihomogenkan. Sampel tanah dimasukkan ke dalam plastik dan diberikan label berdasarkan kode lokasi. Selanjutnya sampel tanah disimpan sementara di dalam *cool box* untuk menjaga kondisinya tetap segar dan mendapatkan hasil isolat yang baik pada saat pengujian di laboratorium. Pengukuran mikroklimat dilakukan setiap pengambilan sampel tanah di dekat area rizosfer akar tanaman senggani. Mikroklimat yang diukur adalah kelembaban tanah dan pH tanah dengan *soil tester*, dan suhu tanah dengan termometer.

3. Isolasi Bakteri Penambat Nitrogen

Isolasi bakteri pada sampel tanah rizosfer dilakukan dengan pengenceran bertingkat hingga pengenceran 10⁻⁵. Isolasi dilakukan dengan metode tuang (*pour plate*) (Novalia et al., 2022). Tanah sebanyak 1 gram dilarutkan dalam 9 mL larutan fisiologis (NaCl 0,9%) sebagai pengenceran 10⁻¹. Selanjutnya diambil sebanyak 1 mL larutan pengenceran 10⁻¹ ke dalam tabung yang telah berisi 9 mL larutan fisiologis (NaCl 0,9%) sebagai pengenceran 10⁻². Hal tersebut dilakukan kembali hingga didapatkan pengenceran 10⁻⁵. Selanjutnya dilakukan inokulasi pada pengambilan

pengenceran 10^{-4} dan 10^{-5} sebanyak 1 mL ke dalam media NA. Kemudian hasil inokulasi diinkubasi selama 72-96 jam dengan suhu 30°C hingga terbentuk koloni.

4. Purifikasi dan Enumerasi Bakteri Penambat Nitrogen

Purifikasi atau pemurnian bakteri dilakukan dengan menginokulasi bakteri yang tumbuh ke media NA baru menggunakan metode *streak plate* (Dewi & Trimulyono, 2024). Enumerasi bakteri dilakukan dengan metode *Total Plate Count* (TPC) menggunakan *colony counter*.

5. Karakterisasi Bakteri

Karakterisasi isolat dilakukan dengan pengamatan pada morfologi bakteri, dan karakter fisiologis. Morfologi bakteri yang diamati baik secara makroskopis maupun mikroskopis, meliputi warna, bentuk koloni, elevasi, bentuk tepian, dan permukaan. Karakter fisiologis diamati dengan beberapa pengujian biokimia untuk mengkarakterisasi isolat. Uji biokimia yang akan dilakukan meliputi uji katalase, uji oksidase, uji motilitas, uji TSIA, dan uji penambat nitrogen.

a. Morfologi Makroskopis

Morfologi bakteri diamati pada koloni tunggal yang terbentuk setelah pemurnian secara makroskopis tanpa alat bantu. Pengamatan makroskopis dilakukan dengan pengamatan warna, elevasi, tepian, dan permukaan bakteri yang tumbuh pada media.

b. Morfologi Mikroskopis

Pengamatan secara mikroskopis dengan alat bantu berupa mikroskop meliputi bentuk sel bakteri. Pengujian Pewarnaan Gram dilakukan dengan beberapa tahap. Sebanyak satu ose isolat diletakkan ke atas kaca objek. Selanjutnya, dilakukan fiksasi dengan perlakuan kaca objek dikering-anginkan di atas api bunsen. Isolat yang berada di atas kaca objek ditetesi dengan kristal violet. Kemudian dibilas dengan aquades. Kemudian ditetesi iodin, dan dibilas kembali

dengan aquades. Selanjutnya ditetesi alkohol 70%, dan dibilas dengan aquades. Selanjutnya ditetes dengan safranin dan didiamkan selama 45 detik. Setelah didiamkan, kemudian dibilas dengan aquades dan dikering-anginkan. Hasil pewarnaan Gram menunjukkan sel bakteri Gram positif berwarna ungu dan sel bakteri Gram negatif berwarna merah.

c. Uji Katalase

Pengujian dilakukan dengan penggunaan reagen hidrogen peroksida (H_2O_2). Pengambilan satu ose koloni bakteri dilakukan secara aseptis, dan diinokulasikan pada kaca objek. Selanjutnya pada kaca objek, ditetesi reagen hidrogen peroksida (H_2O_2). Hasil pengujian ditandai dengan ada atau tidak terbentuknya gelembung. Apabila tidak terbentuk gelembung, maka hasil uji menunjukkan hasil negatif (Fallo & Sineb, 2016).

d. Uji Oksidase

Uji oksidase dilakukan dengan ditetaskan Reagen Kovac pada kertas saring. Lalu satu ose isolat bakteri dioleskan pada kertas saring. Hasil pengujian positif ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi ungu, dan pengujian negatif ditandai dengan tidak adanya perubahan warna. Hasil uji yang positif menandakan bahwa bakteri mampu menghasilkan enzim oksidase (Arfiandi & Tumbol, 2020).

e. Uji Motilitas

Pengujian dilakukan dengan teknik inokulasi penusukkan tegak lurus pada media SIM menggunakan jarum ose. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Hasil pengujian positif ditandai dengan adanya penyebaran koloni pada media dan media berubah menjadi keruh. Hal tersebut menandakan bahwa bakteri bersifat motil atau dapat bergerak (Damayanti et al., 2018).

f. Uji TSIA

Pengujian dilakukan dengan teknik inokulasi penusukkan jarum ose pada media agar miring. Isolat diinokulasikan pada media TSIA dengan cara inokulasi tusuk sampai sepertiga dasar tabung. Kemudian diangkat dan digores secara zig-zag pada permukaannya. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang (Sardiani, et al, 2015).

Hasil perubahan warna pada bagian media tusuk dan media gores berwarna kuning menandakan bawa bakteri memiliki kemampuan dalam memfermentasi glukosa. Sedangkan jika hasil perubahan pada kedua bagian media (tusuk dan gores), maka menandakan bahwa bakteri memiliki kemampuan dalam memfermentasi sukrosa dan laktosa (Ginting et al., 2018).

6. Uji Penambat Nitrogen

Uji kemampuan penambat nitrogen dilakukan pada 2 jenis media yaitu media NfB - semi solid dan media Jensen. Koloni bakteri sebanyak 1 ose dari medium NA murni ditumbuhkan ke media NB yang diinkubasi selama 1 hari pada suhu 37°C dengan tujuan memperbanyak jumlah bakteri. Sebanyak 1 mL isolat bakteri dari media NB diinokulasikan pada 9 mL media NfB, kemudian isolat diinkubasi pada suhu ruang (30°C) selama 10 hari. Hasil uji positif ditandai dengan terjadi perubahan warna media dari hijau menjadi biru dan adanya pelikel. Hal tersebut menandakan bahwa bakteri memiliki kemampuan dalam menambat nitrogen (Dewi & Trimulyono, 2024).

Uji kemampuan penambat nitrogen menggunakan media Jensen dilakukan dengan menginokulasikan isolat bakteri sebanyak 1 ose ke media Jensen secara *streak plate* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil uji positif ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni yang menandakan bahwa bakteri

tersebut mampu menambat nitrogen (Buak et al., 2022).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi bakteri rizosfer tanaman senggani dilakukan dengan metode *pour plate* pada media NA, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Enumerasi bakteri yang tumbuh dihitung menggunakan metode TPC dan diperoleh jumlah sebesar $1,6 \times 10^{-5}$.

Jumlah populasi sel bakteri di lahan pasca tambang timah memiliki jumlah yang rendah dikarenakan sifat fisika kimia dari lahan tersebut memiliki karakteristik seperti kandungan bahan organik rendah (Novalia et al., 2022), pH rendah (Rohmah et al., 2016) dan kelembaban tanah rendah (Wicaksono et al., 2015).

Derajat keasaman (pH) optimum sekitar 6,0 hingga 7,5, dan pada bakteri yang mampu menambat nitrogen umumnya membutuhkan pH lebih dari 6. pH pada lokasi pengambilan sampel yaitu 5,5 dan menyebabkan terganggunya kerja enzim sehingga akan memengaruhi pertumbuhan bakteri menjadi kurang optimal dan terhambat sehingga koloni bakteri yang didapatkan sedikit. Kelembaban yang didapatkan dari hasil pengukuran mikroklimat sebesar 36%. Tanah dengan permukaan keras dan kering, bakteri tetap bersifat dorman, hanya akan tumbuh ketika ada kelembaban, sehingga semakin lembab maka pertumbuhan bakteri semakin optimal (Wicaksono et al., 2015). Suhu yang didapatkan dari pengukuran mikroklimat sebesar 29,3 °C. Koloni bakteri yang didapatkan sedikit dikarenakan peningkatan suhu yang terjadi pada tanah belum meningkat secara optimal, apabila meningkat secara optimal maka akan menyebabkan terjadinya peningkatan pertumbuhan hingga batas optimal (Subagiyo et al., 2015).

Berdasarkan hasil isolasi bakteri, didapatkan sebanyak 3 isolat bakteri yang tumbuh dan memiliki karakteristik morfologi koloni berbeda dengan kode isolat 1 (IS1), isolat 2 (IS2), dan isolat 3 (IS3) (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil Karakterisasi Isolat Bakteri Rhizofe Sengani

Isolat	Karakteristik											
	Makroskopis						Mikroskopis			Uji Biokimia		
	Bentuk	Elevasi	Tepi	Ukuran	Warna	Permukaan	Sifat Optik	Pewarnaan Gram	Katalase	Oksidase	Motilitas	TSIA
IS1	<i>Circular</i>	<i>Raised</i>	<i>Entire</i>	<i>Small</i>	<i>Cream</i>	Halus	<i>Opaque</i>	<i>Coccobacill</i> , Gram negatif	+	+	+	K/A
IS2	<i>Circular</i>	<i>Raised</i>	<i>Entire</i>	<i>Small</i>	Kuning	Halus	<i>Transparent</i>	<i>Bacilli</i> , Gram negatif	+	+	+	A/A
IS3	<i>Circular</i>	<i>Raised</i>	<i>Entire</i>	<i>Small</i>	Putih	Halus mengkilap	<i>Opaque</i>	<i>Coccus</i> , Gram negatif	+	+	+	K/A

Perbedaan utama pada karakteristik morfologi makroskopis di antara ketiga isolat adalah warna koloni. IS1 memiliki warna koloni cream atau putih keruh, IS2 memiliki warna kuning dan IS3 memiliki warna koloni putih mengkilap (Gambar 2). Karakteristik tersebut sesuai dengan penelitian Dewi & Trimulyono (2024), yang mengisolasi bakteri penambat nitrogen dari rizosfer tanaman nanas, didapatkan satu isolat yang memiliki karakteristik morfologi koloni sama dengan IS3 yaitu koloni berwarna putih dengan permukaan halus mengkilap, berbentuk *circular*, elevasi *raised*, bentuk tepi *entire* dan memiliki karakteristik optik *opaque*. Karakteristik morfologi IS1 dan IS2 memiliki karakteristik sama dengan isolat bakteri dengan penelitian Hala & Suryani (2023), bahwa terdapat isolat bakteri penambat nitrogen asal rizosfer tanaman Kayu Jawa yang memiliki karakteristik morfologi koloni dengan warna cream dan kuning berbentuk *circular*.

Karakteristik morfologi koloni bakteri dilakukan dengan pengamatan untuk mempermudah dalam tahapan identifikasi dikarenakan setiap jenis bakteri memiliki karakteristik yang berbeda. Ketiga isolat bakteri yang berhasil tumbuh di media NA dilakukan pemurnian pada media NA baru menggunakan metode streak plate. Kemudian bakteri yang berhasil tumbuh akan dilakukan karakteristik morfologi secara mikroskopis dan uji biokimia.

Karakteristik morfologi mikroskopis bakteri diamati dibawah mikroskop dan setiap isolat memiliki morfologi yang berbeda (Gambar 2).

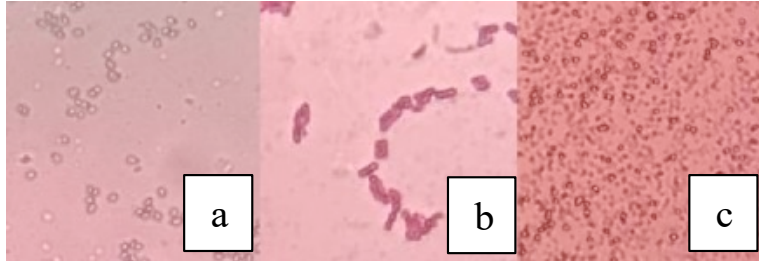
Uji pewarnaan Gram dilakukan untuk membedakan bakteri Gram negatif dan bakteri Gram positif. Kelompok bakteri tersebut memiliki struktur dan komposisi dinding sel yang berbeda sehingga dua komponen tersebut akan mempengaruhi hasil warna pada uji pewarnaan gram (Amin et al., 2023). Berdasarkan hasil pewarnaan gram, didapatkan hasil ketiga isolat merupakan bakteri gram negatif yang diketahui IS1 memiliki bentuk bulat batang, IS2 memiliki bentuk batang dan IS3 memiliki bentuk bulat (Gambar 2). Hasil ini sama dengan penelitian Sangkala et al., (2021) yang melaporkan bahwa bakteri penambat nitrogen yang diisolasi adalah bakteri gram negatif. Pada proses pewarnaan gram, bakteri gram negatif dapat menyerap zat warna merah dari safranin dan tidak menyerap zat warna ungu dari kristal violet sehingga jika diamati dibawah mikroskop maka akan didapatkan bakteri yang berwarna merah muda hingga merah (Buak et al., 2022).

Bakteri gram negatif memiliki lapisan peptidoglikan yang tipis sehingga saat penambahan alkohol maka zat kristal violet akan tercuci dan tidak menempel pada dinding sel dan zat pewarna safranin yang akhirnya akan tetap menempel pada dinding sel bakteri (Amin et al., 2023). Sedangkan kelompok

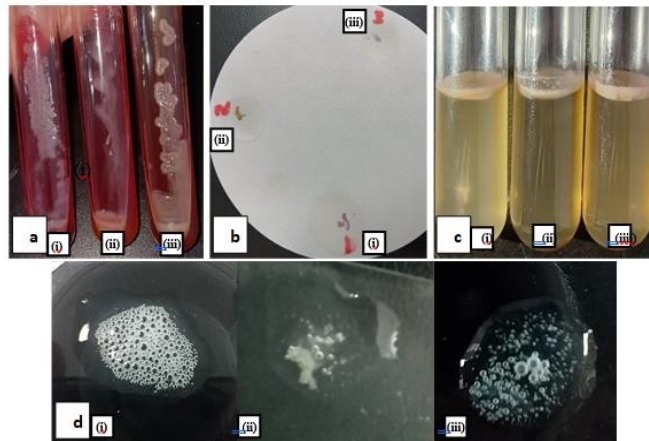
bakteri gram positif memiliki lapisan peptidoglikan tebal, sehingga warna ungu dari kristal violet tidak hilang walaupun terpapar alkohol dan ketika ditambahkan safranin maka warna merah dari safranin tidak dapat menempel pada dinding sel sehingga akan didapatkan bakteri yang berwarna ungu jika

diamati dibawah mikroskop (Nasution et al., 2020).

Berdasarkan hasil karakterisasi isolat pada uji biokimia menunjukkan bahwa ketiga isolat bakteri yang diperoleh menunjukkan reaksi positif terhadap uji katalase, oksidase, dan motilitas, serta memiliki pola fermentasi yang bervariasi pada media TSIA (Gambar 3).



Gambar 2. Hasil dari pengamatan morfologi bakteri dibawah mikroskop dengan perbesaran 100 x.
Keterangan: a = IS1, b = IS2, c = IS3



Gambar 3. Hasil Uji Biokimia isolat bakteri rhizosfer senggani

Keterangan: a = uji TSIA, b = uji oksidase, c = uji motilitas, d = uji katalase; (i) = IS1, (ii) = IS2, (iii) = IS3

Uji katalase bertujuan untuk mendeteksi keberadaan enzim katalase yang berperan dalam menguraikan hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi air dan oksigen. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya gelembung gas oksigen saat isolat ditetesi H_2O_2 . Hal ini menunjukkan bahwa ketiga isolat memiliki mekanisme perlindungan terhadap stres oksidatif, yang umumnya dimiliki oleh bakteri aerobik atau fakultatif anaerob. Kemampuan ini penting bagi mikroorganisme yang hidup di lingkungan ekstrem seperti lahan pasca tambang (Cappuccino & Welsh, 2017).

Reaksi oksidase positif mengindikasikan bahwa isolat menghasilkan enzim sitokrom c oksidase, yang merupakan bagian penting dari rantai transpor elektron dalam respirasi aerob. Uji ini menghasilkan warna biru tua atau ungu pada strip reagen sebagai tanda positif. Hasil ini menguatkan bahwa isolat memiliki kemampuan respirasi aerobik dan kemungkinan termasuk kelompok bakteri non-*Enterobacteriaceae* seperti *Pseudomonas*, *Azotobacter*, atau *Rhizobium*, yang diketahui berperan dalam fiksasi nitrogen (Madigan et al., 2018).

Pada uji motilitas, ketiga isolat menunjukkan pertumbuhan menyebar dari titik inokulasi dalam media semi padat, yang menandakan bahwa bakteri memiliki flagela dan mampu bergerak aktif. Motilitas merupakan salah satu faktor penting dalam kolonisasi akar tanaman (rizosfer), karena memungkinkan bakteri menjangkau sumber nutrisi dan memperkuat hubungan simbiotik dengan inang (Atlas, 2004). Sementara itu, hasil uji TSIA menunjukkan pola fermentasi yang berbeda antar isolat: satu isolat menunjukkan reaksi K/A (fermentasi glukosa saja), satu menunjukkan A/A (fermentasi glukosa serta laktosa/sukrosa), dan satu lainnya juga K/A. Perubahan warna media dari merah ke kuning pada bagian butt (dasar tabung) menunjukkan produksi asam akibat fermentasi gula. Warna kuning pada slant dan butt (A/A) menandakan fermentasi lebih dari satu jenis gula, sedangkan slant merah dan butt kuning (K/A) menunjukkan fermentasi glukosa saja. TSIA juga memungkinkan deteksi produksi gas dan H₂S, meskipun dalam penelitian ini tidak

dilaporkan adanya H₂S (warna hitam) (Tortora et al., 2019).

Keberagaman hasil fermentasi pada TSIA mencerminkan keragaman metabolik antar isolat, yang menjadi petunjuk penting dalam proses identifikasi dan klasifikasi. Selain itu, kemampuan fermentatif ini menunjukkan potensi isolat dalam beradaptasi pada berbagai sumber karbon di lingkungan ekstrem seperti tanah bekas tambang. Secara keseluruhan, profil biokimia ketiga isolat mendukung hipotesis bahwa isolat bakteri dari rizosfer Senggani merupakan bakteri penambat nitrogen yang adaptif, memiliki potensi besar dalam pengembangan biofertilizer dan bioremediasi tanah. Karakteristik biokimia seperti aktivitas katalase dan oksidase, motilitas, serta fermentasi gula memberikan dasar kuat untuk mengidentifikasi dan mengevaluasi peran ekologisnya dalam rehabilitasi lahan terdegradasi. Hasil dari uji penambat nitrogen menunjukkan bahwa ketiga isolat bakteri memiliki kemampuan dalam menambat nitrogen pada media Jensen maupun media NfB (Tabel 2).

Tabel 2) Hasil Uji Penambatan Nitrogen

Uji Penambat Nitrogen	IS1	IS2	IS3
Media Jensen	+	+	+
Media NfB	±	±	±

Keterangan: IS1 = isolat 1, IS2 = isolat 2, IS3 = isolat 3, (+) = hasil positif terhadap uji penambat nitrogen

Media yang digunakan pada penelitian untuk menguji bakteri dalam menambat nitrogen adalah media Jensen dan NfB. Hasil isolat yang didapatkan dan diuji menunjukkan bakteri positif menambat nitrogen. Hasil positif pada media Jensen ditandai dengan adanya zona bening atau koloni berlendir pada daerah sekitar goresan streak, dan pada media NfB ditandai dengan perubahan media menjadi warna biru dan adanya pelikel (Gambar 4).

Media Jensen mengandung nutrisi yang dibutuhkan dan diformulasikan untuk mendeteksi dan menumbuhkan bakteri pengikat

nitrogen, seperti sukrosa sebagai sumber karbon, dipotassium fosfat, magnesium sulfat sebagai sumber magnesium, sodium klorida sebagai sumber mineral dapat mempertahankan keseimbangan tekanan osmotik media, ferrous sulfat, sodium molibdat sebagai sumber molybdenum dapat meningkatkan aktivitas pengikatan nitrogen, dan kalsium karbonat sebagai buffer pH (Huslina & Harahap, 2019). Konsistensi lendir dan zona bening sebagai hasil positif pada media jensen disebabkan oleh produksi eksopolisakarida (EPS) yang melindungi enzim nitrogenase dari oksigen.

Gambar 4. Hasil Uji Penambatan Nitrogen Isolat Bakteri Rhizofe Senggani

Keterangan: a = pengujian pada media jensen, b = pengujian pada media NfB; (i) = IS1 , (ii) = IS2 , (iii) = IS3

Media Jensen mengandung nutrisi yang dibutuhkan dan diformulasikan untuk mendeteksi dan menumbuhkan bakteri pengikat nitrogen, seperti sukrosa sebagai sumber karbon, dipotassium fosfat, magnesium sulfat sebagai sumber magnesium, sodium klorida sebagai sumber mineral dapat mempertahankan keseimbangan tekanan osmotik media, ferrous sulfat, sodium molibdat sebagai sumber molybdenum dapat meningkatkan aktivitas pengikatan nitrogen, dan kalsium karbonat sebagai buffer pH (Huslina & Harahap, 2019). Konsistensi lendir dan zona bening sebagai hasil positif pada media jensen disebabkan oleh produksi eksopolisakarida (EPS) yang melindungi enzim nitrogenase dari oksigen.

Bakteri penambat nitrogen dapat tumbuh baik pada media yang tidak mengandung nitrogen. Ketiadaan sumber nitrogen dalam media menyebabkan bakteri menggunakan nitrogen atmosfer (N_2) yang masih tersedia pada cawan sebagai sumber nitrogen. Proses ini melibatkan enzim nitrogenase yang mengkatalisis reduksi nitrogen atmosfer menjadi amonia (NH_3), yang kemudian digunakan bakteri untuk biosintesis asam amino dan senyawa nitrogen lainnya. Pada kondisi bakteri di alam bebas, bakteri memanfaatkan gas nitrogen atmosfer untuk proses sintesis protein sel dan dimineralisasi di dalam tanah sehingga ketersediaan nitrogen bagi tanaman dalam jumlah yang cukup.

Media NfB mengandung nutrisi komposisi terdiri dari asam malat sebagai

sumber karbon, K_2HPO_4 dan KH_2PO_4 sebagai buffer dan sumber fosfor, $MgSO_4$ sebagai sumber magnesium, NaCl sebagai sumber mineral, $CaCl_2$ sebagai sumber kalsium, serta mikronutrien seperti Fe, Mo, dan Mn. Media NfB mengandung biru bromtimol atau bromothymolblue sebagai indikator pH dan tidak memiliki sumber nitrogen. Perubahan warna media NfB dikarenakan sifat indikator bromothymol blue berubah menjadi biru pada pH lebih tinggi, akibat dari adanya aktivitas nitrogenase. Bakteri penambat nitrogen non simbiotik yang ditumbuhkan pada medium NfB menggunakan sumber N yang berasal dari NaCl. Nitrogen murni dibuat dengan dekomposisi termal natrium. Isolat bakteri yang memiliki kemampuan kuat dalam mengikat N maka akan merubah warna medium menjadi biru tua dan mampu membentuk pelikel (Saraswati et al., 2023).

Media NfB menciptakan gradien oksigen yang memungkinkan bakteri tumbuh pada zona dengan konsentrasi oksigen optimal. Hasil positif pada media NfB ditandai dengan pembentukan pelikel (lapisan tipis bakteri) di bawah permukaan media, dikarenakan bakteri bergerak ke area dengan konsentrasi oksigen optimal untuk aktivitas nitrogenase. Ketika bakteri penambat nitrogen tumbuh, maka bakteri akan menghasilkan amonia sebagai hasil dari fiksasi nitrogen, menyebabkan terjadinya peningkatan pH media. Akibatnya, warna media berubah dari hijau menjadi biru

(alkalis), yang merupakan indikator positif pertumbuhan bakteri penambat nitrogen.

Sebagian besar bakteri yang berperan dalam pengikatan nitrogen bersifat heterotrof, apabila sumber karbon dalam jumlah kecil untuk bertahan hidup, seperti kelompok Azotobacteria dan Azospirillum. Sebagian kecil lainnya merupakan kelompok bakteri autotrof yang mampu mereduksi karbondioksida sebagai bagian dari metabolismenya. Secara umum, proses fiksasi nitrogen berlangsung dalam kondisi anaerob, dengan hanya sejumlah kecil strain dari jenis tertentu yang dapat menjalankan mekanisme ini secara efektif (Huslina & Harahap, 2019). Rendahnya jumlah isolat yang diperoleh dipengaruhi oleh ketersediaan sumber energi berupa karbon organik dan juga kemampuan bakteri dalam mengambil sumber energi dari habitatnya.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan didapatkan hasil sebanyak 3 isolat bakteri asal rizosfer tanaman Senggani (*Melastoma malabatricum* L.). Isolat yang didapatkan termasuk dalam kelompok bakteri Gram negatif dengan morfologi koloni berbeda. Isolat IS1 berwarna *cream* dengan bentuk *coccobacil* tepi *entire*, isolat IS2 berwarna kuning dengan bentuk *bacilli* tepi *entire*, dan isolat IS3 berwarna putih mengkilap dengan bentuk *coccus* tepi *entire*. Hasil uji biokimia menunjukkan semua isolat positif terhadap uji katalase, oksidase, dan motilitas, dengan pola fermentasi yang bervariasi pada media TSIA. Hasil fermentasi glukosa pada IS1 dan IS3, sedangkan hasil fermentasi laktosa dan sukrosa pada IS2. Uji pada media Jensen dan NfB mengonfirmasi kemampuan ketiga isolat dapat menambat nitrogen, menunjukkan potensi isolat sebagai kandidat *biofertilizer* untuk rehabilitasi lahan terdegradasi pasca tambang timah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada dosen pendamping yaitu Monica Kharisma Swandi, S.Si., M.Si., A.Arsyadi, S.Si., M.Si.,

M.Agr., Dr. Henny Helmi, S.Si., M.Si., dan Dr. Rahmad Lingga, S.Si., M.Si yang telah mendukung dan mendampingi proyek penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Arfiandi, & Tumbol, R. A. (2020). Isolasi dan identifikasi bakteri patogen pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang dibudidayakan di Kecamatan Dimembe Kabupaten Minahasa Utara Tahun 2019. *Budidaya Perairan*, 8(1), 19-26.
- Atlas, R. M. (2004). *Handbook of Microbiological Media*. CRC Press.
- Badan Lingkungan Hidup Daerah Provinsi Kepulauan Bangka Belitung. (2015). Status Lingkungan Hidup Daerah Provinsi Kepulauan Bangka Belitung Tahun 2015. Pemerintah Provinsi Kepulauan Bangka Belitung Pangkalpinang.
- Buak, A., Fallo, G., & 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 (Jb&P)*, 9(1), 34-41.
- Cappuccino, J. G., & Welsh, C. (2017). *Microbiology: A Laboratory Manual* (11th ed.). Pearson Education.
- Damayanti, S. S., Komala, O., & Effendi, E. M. (2018). Identifikasi Bakteri dari Pupuk Organik Cair Isi Rumen Sapi. *Ekologia: Jurnal Ilmiah Ilmu Dasar dan Lingkungan Hidup*, 18(2), 63-71.
- Dewi, P. R., & Trimulyono, G. (2024). Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penambat Nitrogen dari Rizosfer Tanaman Nanas di Lereng Gunung Kelud Kediri. *LenteraBio*, 13(1), 73-85.
- Fallo, G., & Sineb, Y. (2016). Isolasi dan Uji Biokimia Bakteri Selulolitik Asal Saluran Pencernaan Rayap Pekerja (*Macrotermes* spp.). *Bio – Edu*, 1(2), 27-29.
- Ginting, S. S. B., Suryanto, D., & Desrita, D.

- (2018). Isolasi dan karakterisasi bakteri potensial probiotik pada saluran pencernaan ikan bandeng (*Chanos chanos*). *Acta Aquatica: Aquatic Sciences Journal*, 5(1), 23-29.
- Hala, F., & Suryani, A. I. (2023). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penambat Nitrogen Bebas Rhizofeora Tanaman Kayu Jawa (*Lannea coromandelica*). *Seminar Nasional Hasil Penelitian*. Universitas Negeri Makassar.
- Huslina, F., & Harahap, D. (2019). Isolasi Bakteri Pengikat Nitrogen dengan Menggunakan Media Jensen. *Jurnal Agrotek Ummat*, 6(2), 91-94.
- Jalal, A., Filho, M. C. M. T., da Silva, E. C., da Silva Oliveira, C. E., Freitas, L. A., & do Nascimento, V. (2022). Plant Growth-Promoting Bacteria and Nitrogen Fixing Bacteria: Sustainability of Non-legume Crops. In S. Mehnaz (Ed.), *Nitrogen Fixing Bacteria: Sustainable Growth of Non-legumes*, 233-275.
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2018). *Brock Biology of Microorganisms* (15th ed.). Pearson.
- Nasution MHB, Ramadhani S, dan Fachrial E, (2020). Isolation, Characterization and Antibacterial Activities of Lactic Acid Bacteria Isolated from Batak's Special Food "Dali Ni Horbo". *J. Natur Indonesia*, 18(1), 1–11.
- Novalia, 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.
- Rohmah, N., Muslihatin, W., & Nurhidayati, T. (2016). Pengaruh Kombinasi Media Pembawa Pupuk Hayati Bakteri Penambat Nitrogen terhadap PH dan Unsur Hara Nitrogen dalam Tanah. *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 4(1), 44-46.
- Sangkala, S., Bakhtiar, A., & Syam'un, E. (2021). Keragaman Morfologi Bakteri Penambat Nitrogen dan Pelarut Fosfat dari Berbagai Lingkungan Agroekosistem di Kabupaten Takalar. *Jurnal Biotek*, 9(1), 93-112.
- Sardiani, N., Litaay, M., Budji, R. G., Priosambodo, D., Syahribulan., & Dwyana, Z. (2015). Potensi Tunikata *Rhopalaea* sp sebagai Sumber Inokulum Bakteri Endosimbion Penghasil Antibakteri. *Jurnal Alam dan Lingkungan*, 6(11), 1-10.
- Simanjuntak, A., Lahay, R. R., & Purba, E. (2013). Respon pertumbuhan dan produksi bawang merah (*Allium ascalonicum* L.) terhadap pemberian pupuk NPK dan kompos kulit buah kopi. *Jurnal Agroekoteknologi Universitas Sumatera Utara*, 1(3), 94785.
- Subagiyo, S., Margino, S., Triyanto, T., & Setyati, W. A. (2015). Pengaruh Ph, Suhu Dan Salinitas Terhadap Pertumbuhan Dan Produksi Asam Organik Bakteri Asam Laktat Yang Diisolasi Dari Intestinum Udang Penaeid.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2019). *Microbiology: An Introduction* (13th ed.). Pearson.
- Umadi, S. S., Ilyas, S., & Widyastuti, R. (2023). Karakterisasi dan Viabilitas Bakteri Penambat Nitrogen dan Bakteri Pelarut Fosfat dalam Media Pembawa Biochar. *Jurnal Ilmu Tanah dan Lingkungan*, 25(2), 40-45.
- Wicaksono, T., Sagiman, S., & Umran, I. (2015). Kajian Aktivitas Mikroorganisme Tanah Pada Beberapa Cara Penggunaan Lahan Di Desa Pal IX Kecamatan Sungai Kakap Kabupaten Kuburaya. *Jurnal Sains Pertanian Equator*, 4(1).
- Widowati, L. R., Hartatik, W., Setyorini, D., Trisnawati, Y. (2022). Pupuk Organik Dibuatnya Mudah, Hasil Tanam Melimpah. Kementerian Pertanian Republik Indonesia : Bogor.