

Karakter Bakteri *Azotobacter* dan *Azospirillum* dari Rizosfer Tanaman Lada di Lahan Bekas Tambang Timah

(*Characters of Azotobacter and Azospirillum Bacteria from Pepper Rhizosphere in ExTin-Mined Soil*)

Novalia^{1)*}, Eddy Nurtjahya¹⁾, Ratna Santi²⁾, Eka Sari¹⁾

¹⁾Program Studi Biologi, Universitas Bangka Belitung, Kampus Terpadu UBB, Kec. Merawang, Kab. Bangka, Provinsi Kepulauan Bangka Belitung 33172

²⁾Program Studi Agroteknologi, Universitas Bangka Belitung, Kampus Terpadu UBB, Kec. Merawang, Kab. Bangka, Provinsi Kepulauan Bangka Belitung 33172

*Email korespondensi: Novalia838@gmail.com

(Article History: Received Juli 15, 2021; Revised Mar 14, 2022; Accepted Apr 11, 2022)

Abstrak

Dampak negatif dari penambangan timah yaitu dapat menurunkan produktivitas fungsi lahan bagi pertumbuhan tanaman. Upaya perbaikan tanah yang dapat ditawarkan yaitu secara biologi dengan mendapatkan mikroba potensial seperti bakteri *Azotobacter* dan *Azospirillum*. Penelitian ini bertujuan menghitung jumlah populasi dan mengkarakterisasi bakteri *Azotobacter* dan *Azospirillum* asal rizosfer tanaman lada di lahan bekas tambang timah. Lokasi penelitian ini adalah Desa Air Duren, Kabupaten Bangka dan Desa Mesu, Kabupaten Bangka Tengah. Metode penelitian yang digunakan yaitu pengambilan sampel tanah, isolasi, karakterisasi morfologi dan fisiologis biokimia. Hasil penelitian menunjukkan jumlah populasi bakteri *Azotobacter* dan *Azospirillum* tertinggi terdapat pada lokasi Desa Mesu. Dari hasil penelitian juga diperoleh tujuh isolat yang mengarah pada genus *Azotobacter* dengan kode isolat TMT6U3, TMT6U2, TST6U1, TST6U3, TMT7U3 dan genus *Azospirillum* kode isolat TST5U1, TST6U2 yang merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang. Ketujuh isolat tersebut menunjukkan bakteri resisten terhadap logam berat Pb, tidak patogen terhadap tumbuhan, hewan dan manusia.

Kata kunci: bakteri *Azotobacter* dan *Azospirillum*; lada; lahan bekas tambang timah

Abstract

The negative impact of tin mining is that it can decrease the productivity of land functions for plant growth. Efforts to improve the soil that can be offered biologically by obtaining potential microbes such as *Azotobacter* and *Azospirillum* bacteria. This study aims to count up the population and to isolate and characterize *Azotobacter* and *Azospirillum* bacteria of pepper crop rhizosphere in ex-tin mined soil. The research site is Air Duren Village, Bangka Regency and Mesu Village, Central Bangka Regency. The research methods used are soil sampling, isolation, morphological and physiological characterization of biochemistry. The results showed the highest number of *Azotobacter* and *Azospirillum* bacterial populations found in the location of Mesu Village. Also obtained seven isolates that lead to the genus *Azotobacter* with isolate codes TMT6U3, TMT6U2, TST6U1, TST6U3, TMT7U3 and genus *Azospirillum* isolate code TST5U1, TST6U2 which are gram rods negative bacteria. The seven isolates show resistant to heavy metal Pb, not pathogen to plants, animals and humans.

Keywords: *Azotobacter* and *Azospirillum* bacteria; pepper; ex tin-mined soil

PENDAHULUAN

Provinsi Kepulauan Bangka Belitung merupakan daerah penghasil timah terbesar di Indonesia (Asmarhansyah dan Hasan 2018). Penambangan timah menyebabkan perubahan bentang alam, menurunkan keanekaragaman hayati dan menurunkan kualitas fisik dan kimia tanah (Nurtjahya *et al.* 2009). Upaya pemerintah dalam mengurangi dampak dari kegiatan penambangan timah tersebut yaitu dengan cara reklamasi lahan. Reklamasi merupakan kegiatan yang dilakukan sepanjang tahapan usaha pertambangan untuk menata, memulihkan dan memperbaiki kualitas lingkungan dan ekosistem agar dapat berfungsi kembali sesuai peruntukannya (Permen ESDM 2018). Salah satu tanaman yang sekarang ini digunakan untuk reklamasi lahan bekas penambangan timah di Bangka adalah lada. Lada merupakan salah satu tanaman tanaman yang berpotensi untuk dibudidayakan di lahan bekas tambang timah (Nurtjahya *et al.* 2020). Penanaman lada tidak memerlukan masa tanah yang banyak yaitu dengan kedalaman 30 cm. Tanah dengan kedalaman tersebut merupakan lapisan yang lebih mudah mengalami perbaikan (Balitbangtan 2011).

Strategi yang dapat diterapkan dalam menunjang keberhasilan proses reklamasi di lahan bekas penambangan timah yaitu berupa pemanfaatan mikroba potensial. Bakteri potensial bermanfaat sebagai agen pupuk hayati sekaligus berperan sebagai agen pemacu pertumbuhan tanaman dan salah satu upaya meningkatkan daya dukung tanah marginal sehingga produktivitas tanah tersebut dapat meningkat (Nurmas *et al.* 2014). Salah satu mikroba yang berpotensi sebagai agen pupuk hayati

yaitu bakteri penambat N_2 non simbiosis. Menurut Khairul (2001) bakteri penambat N_2 non simbiosis berperan dalam dalam penyediaan unsur N bagi tanaman. Ward dan Jensen (2014) bakteri *Azotobacter* dan *Azospirillum* akan membantu mengubah N_2 dari udara menjadi NH_3 dengan menggunakan enzim nitrogenase, kemudian NH_3 diubah menjadi menjadi glutamin dan alanin. Widawati dan Muharam (2012) menyebutkan bahwa bakteri *Azospirillum* mampu memproduksi hormon tumbuh IAA dan sekaligus sebagai pemantap agregat tanah.

Salah satu upaya untuk meningkatkan produktivitas fungsi lahan adalah dengan cara reklamasi. Upaya perbaikan tanah yang dapat ditawarkan secara biologi dengan pengayaan mikroba potensial seperti bakteri *Azotobacter* dan *Azospirillum*. Tujuan penelitian ini untuk menghitung jumlah populasi dan mengkarakterisasi bakteri *Azotobacter* dan *Azospirillum* asal rizosfer tanaman lada di lahan bekas tambang timah. Pengayaan mikroba potensial yang adaptif di lahan bekas tambang timah diharapkan meningkatkan produksi lada yang ditanam di lahan suboptimal.

METODE

Metode pengambilan sampel tanah

Pengambilan sampel tanah ditentukan dengan menggunakan metode *random sampling*. Sampel tanah rizosfer diambil menggunakan pola titik pengambilan arah mata angin yang dikompositkan. Sampel tanah diambil di area rizosfer akar tanaman lada dengan kedalaman 0-20 cm (Saraswati *et al.* 2007).

Isolasi bakteri *Azotobacter* dan *Azospirillum*

Isolasi dilakukan dengan melakukan pengenceran bertingkat dan menggunakan metode tuang (*Pour Plate*). Isolasi dilakukan dengan cara memasukkan tanah sebanyak 10 g ke dalam erlenmeyer berisi 90 mL larutan NaCl 0,85 % sebagai pengenceran 10^{-1} . Kemudian diambil 1 mL larutan dari tabung reaksi dan dimasukkan ke dalam 9 mL larutan fisiologis pada tabung reaksi lain (10^{-2}) kemudian dibuat seri pengenceran hingga 10^{-7} (Waluyo 2008). Selanjutnya diambil 1 mL dari masing-masing pengenceran diinokulasikan ke dalam media *Azospirillum* untuk pertumbuhan *Azospirillum* dan medium *Ashby* untuk pertumbuhan *Azotobacter*. inkubasi suhu 30°C selama 3-4 hari hingga terbentuk koloni (Saraswati et al. 2007).

Purifikasi dan enumerasi bakteri *Azotobacter* dan *Azospirillum*

Pemurnian isolat dilakukan dengan menggoreskan koloni tunggal yang terbentuk diatas lempeng agar medium *Azospirillum* dan medium *Ashby* (Danapriatna 2016). Koloni yang tumbuh dihitung menggunakan perhitungan cawan TPC (*Total Plat Count*) (Waluyo 2008).

Karakterisasi morfologi isolat *Azotobacter* dan *Azospirillum*

Karakter morfologi bakteri meliputi warna, bentuk koloni, elevasi, bentuk tepian dan permukaan. Pengamatan morfologi sel meliputi bentuk sel (Holt et al. 1994).

Skrining logam berat (Pb)

Skrining dilakukan dengan menggunakan metode *streak plate* pada media Na-PbCl₂. Kadar Pb yang

digunakan yaitu 0; 12,5; 25; 50; 100 ppm (Zulaika et al. 2012).

Uji hipersensitivitas dan uji hemolisis

Pengujian hipersensitivitas dilakukan dengan menggunakan tanaman tembakau (Permentan 2011). Pengujian hemolisis dilakukan menggunakan media *Blood Agar* (Difco 2009).

Bentuk sel dan uji gram

Satu ose isolat diletakkan diatas kaca objek, kemudian difiksasi dengan melewati kaca objek diatas api bunsen. Kaca objek yang berisi isolat kemudian ditetesi kristal violet kemudian dibilas aquades, ditetesi iodin, lalu dibilas dengan aquades. Kemudian ditetesi alkohol 70%, bilas dengan aquades. Tetesi dengan safranin diamkan selama 45 detik, lalu bilas dengan aquades dan dikeringkan (Pelczar dan Chan 1986). Sel bakteri gram positif akan terwarnai ungu dan sel bakteri gram negatif akan terwarnai merah (Hadioetomo 1993).

Karakter fisiologis biokimia bakteri *Azotobacter* dan *Azospirillum*

Karakter fisiologis biokimia yaitu terdiri dari uji TSIA, uji katalase (Bullock dan Aslanzadeh 2013), uji SIM (Hadioetomo 1993), uji MR-MV dan uji SCA (Bullock dan Aslanzadeh 2013).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan koloni yang tumbuh pada media *Ashby* mencirikan bakteri *Azotobacter* yang ditandai dengan karakter morfologi putih keruh dan transparan, berlendir, berbentuk bulat, elevasi konveks, tepian entire dengan ukuran *small* dan *moderate*. Siti et al. (2019) dalam penelitiannya

telah mengisolasi bakteri dari rizosfer tanaman lada yang ditanam di tanah tailing dengan adanya pemberian pupuk hayati, isolat memiliki koloni berbentuk bulat beraturan, bulat tidak beraturan, irregular, berfilamen dan hampir semua isolat memiliki bentuk tepian yang rata.

Koloni yang tumbuh pada media *Azospirillum* mencirikan bakteri *Azospirillum* dengan karakter koloni berwarna putih transparan, permukaan konveks dan ukuran koloni kecil seperti tetesan air. Penelitian ini sejalan dengan Santoso *et al.* (2019) menyebutkan bahwa genus *Azospirillum* memiliki karakter morfologi koloni berbentuk bulat, tepian rata, elevasi konveks dan berwarna kuning. Rusmana dan Hadijaya (1994) pertumbuhan bakteri *Azospirillum* sangat baik pada medium yang mengandung asam malat, asam suksinat atau piruvat dan pertumbuhannya kurang baik pada glukosa dan asam sitrat.

Jumlah populasi bakteri *Azotobacter* dan *Azospirillum* dihitung

berdasarkan metode TPC (*Total Plate Count*). Hasil penelitian menunjukkan jumlah total populasi bakteri *Azotobacter* di lahan Desa Mesu lebih tinggi (Tabel 1) yaitu 102×10^6 dan bakteri *Azospirillum* 40×10^6 , sedangkan jumlah total populasi bakteri *Azotobacter* di lahan Desa Air Duren yaitu 6×10^6 dan jumlah populasi bakteri *Azospirillum* 7×10^6 . Jumlah populasi sel bakteri menunjukkan bahwa kedua lahan tersebut tergolong kurang subur. Sari (2015) melaporkan bahwa pada lahan bekas tambang timah yang sudah direklamasi ditemukan total jumlah bakteri yaitu $1,01 \times 10^4$ CFU g^{-1} dan $1,09 \times 10^4$ CFU g^{-1} pada lahan bekas tambang timah yang sudah ditinggalkan selama 3-12 bulan dan belum direklamasi. Hutan memiliki jumlah sel bakteri yang tinggi yaitu $5.770.000 \times 10^4$ CFU g^{-1} . Tinggi rendahnya jumlah sel bakteri tersebut disebabkan oleh sifat kimia fisik tanah di lahan tersebut, dimana hutan memiliki kadar *clay* dan bahan organik tanah yang tinggi.

Tabel 1. Rerata jumlah sel per gram tanah pada rizosfer tanaman lada

Lokasi	Pengeceran	Total populasi bakteri		Rata-rata jumlah populasi bakteri (CFU/g Tanah) $\times 10^6$	
		<i>Azospirillum</i>	<i>Azotobacter</i>	<i>Azospirillum</i>	<i>Azotobacter</i>
Mesu	10^{-5}	20×10^5	40×10^5	$40 \pm 3,5$	$102 \pm 6,7$
	10^{-6}	16×10^6	31×10^6		
	10^{-7}	13×10^7	27×10^7		
Air Duren	10^{-5}	3×10^5	12×10^5	$7 \pm 0,6$	$6 \pm 5,5$
	10^{-6}	2×10^6	7×10^6		
	10^{-7}	2×10^7	1×10^7		

Tinggi rendahnya jumlah populasi bakteri pada tanah tambang timah dapat disebabkan oleh kandungan unsur hara yang rendah. Lahan bekas penambangan timah memiliki sifat fisik kimia tanah dan unsur hara yang

rendah. Ketersediaan bahan organik seperti unsur makro dan mikro didalam tanah merupakan faktor pembatas bagi pertumbuhan bakteri. Jumlah populasi bakteri juga dipengaruhi oleh jenis dan jumlah

tanaman yang tumbuh di daerah tersebut, hal ini dikarenakan akar tanaman mengeluarkan nutrisi yang bermanfaat untuk mendorong pertumbuhan bakteri (Widawati dan Sulasih 2019).

Tanaman lada yang ditanam pada lahan bekas tambang timah tersebut memiliki pertumbuhan yang tidak baik, dicirikan dengan tanaman menjadi kerdil, pertumbuhan yang lambat, produksi buah berkurang. Sumber nutrisi dapat berasal dari bahan organik. Bahan organik menambah energi yang diperlukan kehidupan mikrob tanah. Selain N tersedia, miskinnya unsur hara pada tailing tidak menunjang pertumbuhan akar dan mengakibatkan serapan N terhambat. Menurut Parnata (2011) diacu dalam Indriani *et al.* (2017) kekurangan unsur hara fosfor menyebabkan pertumbuhan akar tidak baik, tanaman menjadi kerdil, warna daun lebih hijau dari pada keadaan normal.

Hasil skrining logam berat Pb menunjukkan sebagian besar isolat resistensi terhadap logam Pb pada

semua kadar Pb yang tertinggi yaitu 100 ppm. Penelitian Astutik (2015), berhasil mengisolasi lima isolat bakteri *Azotobacter* yang mampu tumbuh dengan baik pada medium $PbCl_2$ sampai dengan konsentrasi 300 ml/L. Resistensi *Azotobacter* terhadap $PbCl_2$ karena isolat tersebut mampu menghasilkan kista yang resisten terhadap cekaman lingkungan termasuk logam.

Berdasarkan hasil uji hipersensitivitas diketahui dua isolat *Azospirillum* dan lima isolat *Azotobacter* tidak menunjukkan gejala nekrosis pada daun tembakau (Tabel 2). Bakteri patogen akan menimbulkan reaksi hipersensitif positif dengan ditandai munculnya nekrosis berwarna cokelat dan daun tembakau menjadi seperti kertas. Dalam penelitian Fitriyanti *et al.* (2017) sembilan isolat bakteri yang diperoleh dari penambangan batu kapur pada uji hipersensitivitas menunjukkan hasil negatif dengan tidak menunjukkan adanya adanya bercak kuning kecoklatan pada daun tembakau.

Tabel 2. Uji hipersensitivitas dan uji hemolisis isolat bakteri *Azospirillum* dan *Azotobacter*

	Kode isolat	Hipersensitivitas	Hemolisis
<i>Azospirillum</i>	TST5U1	TN	γ
	TST6U2	TN	γ
	TMT7U3	N	γ
	TMT7U2	N	γ
	TST6U1	TN	γ
<i>Azotobacter</i>	TST6U3	TN	γ
	TST6U2	N	γ
	TMT6U3	TN	γ
	TMT7U3	TN	γ
	TMT6U2	TN	γ

N = nekrosis, TN = tidak nekrosis, γ = Gamma (tidak lisis)

Hasil dari tujuh isolat yang lulus dalam tahap hipersensitivitas menunjukkan gamma hemolisis pada

uji hemolisis. Hal ini menunjukkan bahwa isolat tersebut tidak patogen terhadap manusia, mamalia dan baik

jika digunakan sebagai pupuk hayati atau biofertilizer. Dalam penelitian Sari (2015) menunjukkan bahwa bakteri rizosfer yang berhasil diisolasi dari lahan bekas tambang timah yaitu *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes* dan *Paenibacillus* sp. menunjukkan hemolisis gamma, yaitu bakteri bersifat non patogen terhadap manusia dan mamalia.

Berdasarkan hasil karakter uji biokimia menunjukkan bahwa lima isolat *Azotobacter* yaitu TMT6U3, TMT6U2, TST6U1, TST6U3, TMT7U3 termasuk bakteri Gram negatif dan bentuk selnya batang. Lima isolat *Azotobacter* bersifat motil, uji sitrat memiliki reaksi positif, sedangkan reaksi negatif ditunjukkan dengan tidak memproduksi H₂S, indole. Isolat TMT6U3 dan TMT7U3 reaksi pada media TSIA menunjukkan bakteri mampu memfermentasikan sukrosa, glukosa dan laktosa. Isolat TMT6U2, TST6U1 dan TST6U3 pada uji TSIA menunjukkan bahwa isolat bakteri hanya mampu memfermentasikan glukosa (Tabel 3).

Anggota genus *Azotobacter* memiliki bentuk sel ovoid, batang maupun kokus, berdiameter 1,5-2,0 µm. Bakteri Gram negatif, bersifat motil dengan adanya flagella, namun ada juga yang non-motil. *Azotobacter* mampu tumbuh dengan pH optimum untuk pertumbuhan dan fiksasi nitrogen yaitu berkisar 7,0-7,5. Beberapa spesies memanfaatkan garam nitrat amonium dan asam amino tertentu sebagai sumber nitrogen. Bakteri ini terdapat di tanah maupun perairan, beberapa spesies bersimbiosis dengan akar tanaman (Holt *et al.* 1994).

Berdasarkan hasil pengamatan uji Gram dan bentuk sel menunjukkan

bahwa isolat *Azospirillum* dengan kode isolat TST6U2 dan TST5U1 termasuk kedalam bakteri Gram negatif dengan bentuk sel batang. Karakter fisiologis berdasarkan uji biokimia isolat TST6U2 bersifat motil, isolat TST5U1 bersifat non motil. Uji sitrat menunjukkan reaksi positif, sedangkan reaksi negatif ditunjukkan dengan tidak memproduksi H₂S dan indole pada uji SIM. Uji TSIA menunjukkan isolat TST6U2 mampu memfermentasikan glukosa, sukrosa dan laktosa. Isolat TST5U1 hanya mampu memfermentasikan glukosa (Tabel 3). Hal ini sesuai dengan Holt *et al.* (1994) anggota genus *Azospirillum* memiliki bentuk sel vibroid atau batang dengan panjang 0,9-1 µm. Sel Gram negatif ke variabel gram. Sel bersifat motil dengan menggunakan flagela. Bakteri ini mempunyai kemampuan memfiksasi nitrogen.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa jumlah total populasi bakteri dari rizosfer tanaman lada di lahan bekas tambang Desa Mesu, Kabupaten Bangka Tengah lebih tinggi dari Desa Air Duren Kabupaten Bangka. Sekitar 33 isolat yang terseleksi diperoleh tujuh isolat yang resisten terhadap logam berat hingga kadar tertinggi yaitu 100 ppm Pb, tidak patogen terhadap tumbuhan, hewan dan manusia. Berdasarkan hasil pengujian karakter morfologi, fisiologi dan biokimia diduga bakteri dengan kode TMT6U3, TMT6U2, TST6U1, TST6U3, TMT7U3 merupakan bakteri *Azotobacter* dan kode isolat TST6U2, TST5U1 diduga bakteri *Azospirillum*.

Tabel 3. Karakter morfologi, fisiologis dan biokimia isolat bakteri *Azotobacter* dan *Azospirillum*

Karakterisasi	<i>Azotobacter</i>				<i>Azospirillum</i>		
	TMT6U3	TMT6U2	TST6U1	TST6U3	TMT7U3	TST6U2	TST5U1
1. PCP							
a. Pigmentasi	putih keruh	putih	putih keruh	putih keruh	putih keruh	putih keruh	transparan
b. Karakterisasi optik	<i>translucent</i>	<i>translucent</i>	<i>translucent</i>	<i>translucent</i>	<i>translucent</i>	<i>translucent</i>	<i>translucent</i>
c. Bentuk	<i>circular</i>	<i>circular</i>	<i>circular</i>	<i>circular</i>	<i>circular</i>	<i>circular</i>	<i>circular</i>
d. Elevasi	<i>convex</i>	<i>convex</i>	<i>convex</i>	<i>umbonate</i>	<i>convex</i>	<i>convex</i>	<i>flat</i>
e. Permukaan	hm	hm	hm	hm	hm	hm	hm
f. Margin	<i>entire</i>	<i>entire</i>	<i>entire</i>	<i>entire</i>	<i>entire</i>	<i>undulate</i>	<i>entire</i>
g. Ukuran	<i>moderate</i>	<i>small</i>	<i>small</i>	<i>moderate</i>	<i>small</i>	<i>small</i>	<i>small</i>
2. Kelompok Gram	negatif	negatif	negatif	negatif	negatif	negatif	negatif
3. Bentuk Sel	batang	batang	batang	batang	batang	batang	batang
4. TSIA							
a. Glukosa	+	+	+	+	+	+	+
b. Laktosa	+	-	-	-	+	+	-
c. Sukrosa	+	-	-	-	+	+	-
d. Gas	-	-	-	-	-	-	-
e. H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-
5. Katalase	+	+	+	+	+	+	+
6. SIM							
a. Indole	-	-	-	-	-	-	-
b. Motility	+	+	+	+	+	+	-
7. MR	-	-	-	-	-	-	-
8. VP	-	-	-	-	-	-	-
9. SS	+	+	+	+	+	+	+

Keterangan : (+) : positif, (-) : negatif, hm = halus mengkilap

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Desa dan masyarakat Desa Mesu Kabupaten Bangka Tengah dan Kepala Desa dan masyarakat Desa Air Duren Kabupaten Bangka yang mengizinkan peneliti ke lapangan, serta kepada Laboratorium Biologi, Fakultas Pertanian Perikanan dan Biologi, Universitas Bangka Belitung yang telah memfasilitasi penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

[Balitbangtan] Badan Litbang Pertanian (2011) penanaman lada dilahan bekas tambang timah. Agroinovasi.

[Permen ESDM] Peraturan Menteri Energi Dan Sumber Daya Mineral Republik Indonesia (2018) Menteri Energi Dan Sumber Daya Mineral Republik Indonesia. pp 45.

Asmarhansyah, Hasan R (2018) Reklamasi lahan bekas tambang timah sebagai lahan pertanian di Kepulauan Bangka Belitung. Jurnal Sumberdaya Lahan 2(2): 73-82.

Astutik LW (2015) Resistensi dan potensi *Azotobacter* sebagai bioremoval timbal (Pb). Skripsi. Jurusan Biologi, Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengatahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Surabaya.

Bullock NO, Aslanzadeh J (2013) Biocemical profile-based microbial identification systems. Dalam: Tang YW, Stratton CW (eds) Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology seceond edition. Springer: New York : pp 967.

Danapriatna N (2016) Penjarangan *Azotobacter* sp. dan *Azospirillum*

- sp. dari ekosistem lahan sawah sebagai sumber isolat pupuk hayati penambatan nitrogen. *Jurnal Agrotek Indonesia* 1(2): 115-122.
- Difco (2009) Manual of microbiological culture media. Dalam: Zimbro MJ, Power DA, Miller SM, Wilson GE, Jhonson JA, editor. Ed ke-2 Becton, Dickinson and Company. Maryland. pp 82-83.
- Fitriyanti D, Mubarik NR, Tjahjoleksono (2017) Karakterisasi bakteri pelarut fosfat dan bakteri pengikat nitrogen dari wilayah penambangan batu kapur. *Jurnal Mikrobiologi Malaysia*. 13 (3):147-155.
- Hadioetomo RS (1993) Mikrobiologi dasar dalam praktek teknik dan prosedur dasar laboratorium. PT Gramedia Pustaka. Jakarta. pp 163.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST (1994) *Bergey's manual of determinative bacteriology ninth edition*. USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Indriani FE, Hindersah R, Suryatmana P (2017) N-Total, serapan N, dan pertumbuhan kacang tanah (*Arachis hypogaea* L.) akibat inokulasi *Azotobacter* dan bahan organik pada tailing tambang emas Pulau Buru, Maluku. *Soilrens*.15 (2): 33-40.
- Khairul U (2001) Pemanfaatan bioteknologi untuk peningkatan produksi pertanian. <http://www.worddagroforestry.org/sea/publocation/files/book/bk0028pdf>. Diakses pada 13 Januari 2019.
- Nurmas A, Nofianti, Rahman A, Khaeruni A (2014) Eksplorasi dan karakterisasi *Azotobacter* indigenous untuk pengembangan pupuk hayati tanaman pada gogo lokal di lahan marginal. *Jurnal Agroteknos*. 4 (2): 128-134.
- Nurtjahya E, Setiadi D, Guhardja E, Muhadiono, Setiadi Y (2009) Succession on tin-mined land in Bangka Island. *Blumea* 54: 131-138.
- Nurtjahya E, Santi R, Inonu I (2020) Lahan bekas tambang timah dan pemanfaatannya. Yogyakarta: Kanisius.
- Pelczar MJ, Chan ESC (1986) *Dasar-dasar mikrobiologi*. UI Press, Jakarta
- Rusmana I, Hadijaya DD (1994) Aktivitas nitrogenase *Azospirillum* sp. dan efektivitas simbiotiknya dengan jagung. *Hayati* 1(2): 51-54.
- Santoso K. Rahmawati, Rafdinal (2019) Ekplorasi bakteri penambat nitrogen dari tanah hutan mangrove sengai peniti, Kabupaten Mepawah. *Jurnal Probiot*. 8 (1) : 52-58.
- Saraswati R, Husen E, Simanungkalit RDM (2007) *Metode analisis biologi tanah*. Balai Besar Penelitian Dan Pengembangan Sumberdaya Lahan Pertanian. Bogor.
- Sari E (2015) Ekplorasi vegetasi fitoremediator dan bakteri rizosfer resisten logam berat Pb dan Sn di lahan bekas tambang timah di Pulau Bangka [Thesis]. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Siti P, Ismed I, Euis A (2019) Pengaruh aplikasi pupuk hayati terhadap dinamika kelimpahan mikrob pada lahan bekas tambang timah yang ditanami tanaman lada (*Piper nigrum* L.). *J. Il. Tan. Lingk*. 21 (2): 51-57.

- Waluyo L (2008) Teknik metode dan dasar dalam mikrobiologi. Malang.
- Ward BB, Jensen MM (2014) The microbial nitrogen cycle. *Frontiers in Microbiology*. 5: 1-2.
- Widawati S, Muharam A (2012) Uji laboratorium *Azospirillum* sp. yang diisolasi dari beberapa ekosistem. *J. Hort.* 22 (3): 258-267.
- Widawati S, Suliasih (2019) Role of indigenous nitrogen-fixing bacteria in promoting plant growth on post tin mining soil. *Makara Journal of Science*. 23(1): 28-38.
- Zulaika E, Luqman E, Arindah T, Sholikhah U (2012) Bakteri resisten logam berat yang berpotensi sebagai biosorben dan bioakumulator. Seminar Nasional Waste Management For Sustainable Urban Development; 2012 Februari 21; Semarang Indonesia. FTSP-ITS, Semarang. pp 1-5.