

Isolasi, Enumerasi dan Karakterisasi Bakteri Fiksatif Nitrogen Simbiotik dari Hutan Lindung di Kawasan Pertambangan Nikel

RAMDANA SARI¹, RETNO PRAYUDYANINGSIH¹

¹Balai Penelitian dan Pengembangan Lingkungan Hidup dan Kehutanan Makassar
Jln. Perintis Kemerdekaan Km. 16,5, Makassar, Sulawesi Selatan, Kode Pos 90243
Email: ramdana_sari@yahoo.co.id; prayudya93@yahoo.com

ABSTRAK

Hutan Lalindu merupakan hutan lindung yang berada di kawasan pertambangan nikel, berfungsi untuk mengatur tata air dan menjaga kesuburan tanah. Terjadinya kebakaran pada wilayah hutan lindung ini menyebabkan terjadinya degradasi lahan. Bakteri Rhizobia merupakan salah satu mikroba tanah potensial untuk restorasi lahan marginal. Bakteri ini mampu menyediakan nutrisi bagi tanaman, khususnya Nitrogen, dengan melakukan fiksasi N₂ dari udara. Isolasi, enumerasi, dan karakterisasi bakteri Rhizobia dilakukan untuk mengetahui status bakteri Rhizobia pada wilayah ini. Pengambilan sampel tanah dilakukan dengan menentukan 5 titik sampling pada tiap plot di areal hutan lindung yang tidak terganggu (HL) dan hutan lindung yang terbakar (HT). Sebanyak 1 kg tanah diambil pada kedalaman 0 – 20 cm lalu dimasukkan ke dalam plastik sampel dan selanjutnya dibawa ke laboratorium untuk proses selanjutnya. Kepadatan bakteri Rhizobia pada areal Hutan Lindung Alami (HL) adalah $4,6 \times 10^5$ cfu/gr lebih tinggi dibandingkan Hutan Lindung Terbakar (HT), yaitu $4,4 \times 10^5$ cfu/gr. Dari 14 isolat yang berhasil diisolasi, 12 isolat termasuk kelompok *Rhizobium* dan 2 lainnya termasuk *Bradyrhizobium*. Semua isolat bersifat aerob, motil, serta tidak mampu tumbuh pada pH 4 secara in vitro, tetapi tumbuh pada pH 5 – 8 dimana pH optimum pertumbuhan bervariasi untuk semua isolat.

Kata Kunci: Enumerasi, Hutan Lindung, Isolasi, Karakterisasi, Rhizobia

PENDAHULUAN

Berdasarkan Undang-Undang No. 41 Tahun 1999 tentang Kehutanan, hutan lindung merupakan kawasan hutan yang mempunyai fungsi pokok sebagai perlindungan sistem penyangga kehidupan untuk mengatur tata air, mencegah banjir, mengendalikan erosi, mencegah intrusi air laut, dan memelihara kesuburan tanah (Kementerian Kehutanan, 2014). Untuk menunjang kegiatan pembangunan di Indonesia, pemerintah membuat kebijakan dengan mengubah kawasan hutan menjadi lahan yang diperuntukkan untuk pemukiman, infrastruktur, kepentingan industri, pertanian, perkebunan, peternakan, dan pertambangan. Laju deforestasi ini menimbulkan dampak yang dapat merusak lingkungan, baik secara lokal maupun global.

Hutan Lalindu merupakan hutan lindung yang dibiarkan tetap alami dan berada di kawasan pertambangan nikel PT. Stargate

Pacific Resources, Konawe Utara. Pada pertengahan tahun 2014, saat musim kemarau, sebagian lahan dari hutan lindung mengalami kebakaran sehingga menyebabkan terjadinya degradasi lahan. Rusaknya vegetasi penutup hutan menimbulkan dampak negatif, baik secara fisik, kimia, maupun biologi tanah. Secara fisik, kebakaran hutan menyebabkan tanah menjadi terbuka sehingga terjadi erosi bahkan banjir. Bahan-bahan organik tanah akan mengalami pencucian (*leaching*) saat hujan sehingga akan berpengaruh terhadap keberadaan mikroorganisme tanah potensial dan pada akhirnya tanah akan menjadi kahat unsur hara. Menurunnya tingkat kesuburan tanah akan menghambat proses rehabilitasi pada lahan kritis.

Bakteri fiksatif nitrogen simbiotik merupakan salah satu mikroba potensial yang dapat memacu pertumbuhan tanaman dengan menyediakan unsur nitrogen. Nitrogen merupakan salah satu makronutrien esensial

yang digunakan dalam proses sintesis protein, asam amino, dan beberapa senyawa nitrogen organik yang lain. Franche *et al.* (2009) menyatakan bahwa senyawa nitrogen tidak dapat diasimilasi oleh tanaman, tetapi akan menjadi tersedia melalui proses fiksasi nitrogen yang hanya dapat dilakukan oleh prokariotik. Shridhar (2012) menambahkan bahwa sekitar 386×10^{16} kg nitrogen terdapat di atmosfer dan kembali ke bumi dalam proses siklus nitrogen. Mikroorganisme berperan dengan menambat 139×10^9 kg nitrogen dan 65% di antaranya (89×10^9 kg) disumbangkan oleh bakteri pembintil akar legum. Untuk menunjang keberhasilan proses rehabilitasi di lahan-lahan marginal, pemanfaatan mikroba potensial merupakan salah satu alternatif strategi yang dapat diterapkan. Oleh karena itu, perlu diketahui status bakteri fiksatif nitrogen simbiotik di areal hutan Lalindu.

METODE

Lokasi dan Waktu. Lokasi pengambilan sampel yaitu di hutan lindung Lalindu yang berada di kawasan pertambangan nikel PT. Stargate Pacific Resources, Konawe Utara, Sulawesi Tenggara. Areal pengambilan sampel dibedakan menjadi dua tipe berdasarkan kondisi hutan yang berbeda, yaitu hutan lindung yang tidak terganggu (HL) dan hutan lindung yang mengalami kebakaran (HT). Isolasi, enumerasi, dan karakterisasi bakteri fiksatif nitrogen dilakukan di laboratorium Mikrobiologi, Balai Penelitian dan Pengembangan Lingkungan Hidup dan Kehutanan Makassar pada bulan September – Desember 2015.

Alat Penelitian. Alat-alat yang digunakan di lapangan yaitu parang, linggis, dan plastik sampel. Sedangkan alat-alat yang digunakan di labotarium yaitu timbangan digital, *Laminary Air Flow* (LAF), *hot plate*, *magnetic stirrer*, *autoclave*, *incubator*, *colony counter*, *beaker*, *erlenmeyer*, cawan petri, botol pengencer, tabung reaksi (15 ml dan 20 ml), rak tabung reaksi, bunsen, pipet tetes, spoit, gelas ukur, batang L, jarum inokulasi (lurus dan bulat), *object glass*, *deg glass*, dan mikroskop.

Bahan Penelitian. Bahan-bahan yang digunakan yaitu sampel tanah, media YEMA (*Yeast Extract Mannitol Agar*), media YEMB (*Yeast Extract Mannitol Broth*), media SIMA (*Sulfit Indole Motility Agar*), NaCl 0,85%, reagen pewarnaan Gram, Malachite green, safranin 5%, H₂O₂ 3%, minyak emersi, HCl 0,1 N, KOH, pH meter, aquadest, *cling wrap*, dan aluminium foil.

Pengambilan Sampel Tanah. Sampel tanah diambil dengan sebelumnya menentukan 5 titik sampling pada tiap plot di areal hutan lindung yang tidak terganggu (HL) dan hutan lindung yang terbakar (HT). Sebanyak 1 kg tanah diambil pada kedalaman 0 – 20 cm dan selanjutnya dimasukkan ke dalam plastik sampel dan diberi label yang berisi informasi tanggal pengambilan sampel, plot dan areal.

Isolasi Bakteri Fiksatif Nitrogen. Sebanyak 1 gram sampel tanah dilarutkan ke dalam 9 ml NaCl 0,85% dan dibuatkan seri pengenceran 10^{-1} – 10^{-4} . Suspensi tanah kemudian diambil sebanyak 0,1 ml dari pengenceran 10^{-2} – 10^{-4} dan diinokulasi ke dalam media YEMA, diinkubasi pada suhu 26°C selama 3 – 4 hari. Masing-masing koloni bakteri yang tumbuh dan menunjukkan karakteristik morfologi koloni yang berbeda kemudian ditumbuhkan pada media yang dimodifikasi dengan penambahan larutan indikator, media YEMA+*Congo Red* untuk melihat sifat bakteri dalam menyerap larutan indikator, serta media YEMA+*Bromthymol Blue* untuk melihat kecepatan pertumbuhannya (Somasegaran *and* Hobben, 1985). Setelah melakukan pemurnian, isolat kemudian dibuat dalam bentuk stok bakteri.

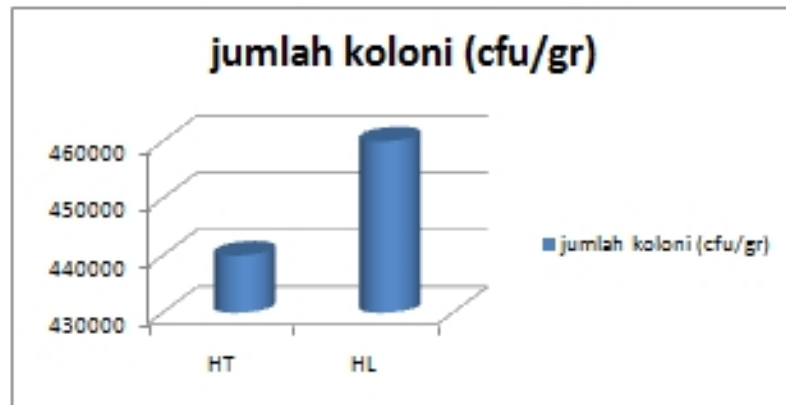
Karakterisasi Bakteri Fiksatif Nitrogen. Isolat bakteri fiksatif nitrogen yang telah diperoleh kemudian diuji secara mikroskopik dengan pewarnaan Gram dan Endospora serta uji biokimia seperti uji motilitas, uji katalase, dan uji ketahanan asam. Isolat yang teridentifikasi mengikuti *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kepadatan Koloni Bakteri Fiksatif Nitrogen Simbiotik di Areal Hutan

Lindung Lalindu. Isolasi bakteri fiksatif nitrogen simbiotik yang dilakukan dengan metode pengenceran bertingkat menunjukkan jumlah koloni bakteri yang bervariasi pada tiap jenis sampel tanah. Hasil penghitungan koloni bakteri menunjukkan bahwa jumlah

bakteri fiksatif nitrogen simbiotik pada areal HL (Hutan Lindung) lebih tinggi dibandingkan areal HT (Hutan Terbakar) seperti yang terlihat pada diagram di bawah ini.



Gambar 1. Jumlah koloni bakteri fiksatif nitrogen simbiotik

Karakteristik Makroskopik Bakteri Fiksatif Nitrogen Simbiotik. Sebanyak 14 isolat yang telah diperoleh menunjukkan karakteristik morfologi koloni yang berbeda-beda dan tumbuh subur pada media YEMA. Hasil pertumbuhan isolat pada media selektif yang dimodifikasi dengan penambahan reagen *Congo Red* (CR) dan *Bromthymol Blue* (BTB) menunjukkan adanya variasi respon terhadap larutan indikator tersebut. Pada media YEMA+CR, terlihat bahwa isolat

tidak mampu atau hanya sedikit menyerap warna merah dari *Congo Red* dengan menunjukkan warna koloni pink (1 isolat), pink pucat (9 isolat), dan putih (4 isolat). Sedangkan pada media YEMA+BTB, terlihat bahwa 12 isolat termasuk ke dalam kelompok tumbuh cepat dan reaksi bersifat asam (media berwarna kuning), serta 2 isolat lainnya tumbuh lambat dan reaksi bersifat basa (media berwarna biru).

Tabel 1. Karakteristik Morfologi Koloni Isolat Bakteri Fiksatif Nitrogen Simbiotik Serta Respon Terhadap Media Pertumbuhan Yang Dimodifikasi

Isolat	Karakteristik Morfologi Koloni					Uji CR	Uji BTB
	Bentuk	Elevasi	Tepi	Permukaan	Warna		
HT.1.5	Irregular	Flat	Undulate	Smooth	Putih kecokelatan	Pink pucat	Kuning
HT.2.6	Circular	Raised	Entire	Smooth	Putih kecokelatan	Pink	Kuning
HT.3.2	Circular	Raised	Entire	Smooth (berlendir)	Putih kecokelatan	Pink pucat	Kuning
HT.3.4	Irregular	Flat	Curlied	Smooth	Putih kecokelatan	Pink pucat	Kuning
HT.3.9	Circular	Flat	Entire	Smooth	Cokelat	Pink pucat	Kuning
HT.4.1	Circular	Raised	Entire	Smooth	Putih kekuningan	Pink pucat	Kuning
HT.4.4	Circular	Convex	Entire	Smooth (berlendir)	Putih kekuningan	Putih	Kuning

HT.4.5	Circular	Raised	Entire	Smooth	Kuning	Pink pucat	Kuning
HT.5.2	Circular	Convex	Entire	Smooth (berlendir)	Putih	Putih	Biru
HL.1.3	Circular	Raised	Entire	Smooth (berlendir)	Putih kekuningan	Putih	Kuning
HL.4.1	Circular	Flat	Entire	Smooth	Putih kecokelatan	Pink pucat	Kuning
HL.5.4	Circular	Flat	Entire	Smooth	Putih kecokelatan	Putih	Kuning
HL.6.2	Irregular	Raised	Lobate	Smooth	Putih kekuningan	Pink pucat	Kuning
HL.6.7	Circular	Flat	Entire	Smooth	Putih kecokelatan	Pink pucat	Biru

Sifat dan Karakteristik Mikroskopik Bakteri Fiksatif Nitrogen. Isolat murni bakteri kemudian dikarakterisasi untuk

mengetahui sifat dan karakter yang dimiliki. Hasil pengujian dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 2. Sifat dan Karakter Bakteri Fiksatif Nitrogen Hasil Uji Karakterisasi

Isolat	Pewarnaan Gram		Endospora	Uji Katalase	Uji Motilitas	Uji Ketahanan Asam				
	Sifat	Bentuk				4	5	6	7	8
HT.1.5	(Negatif)	Batang	Tidak ada	+	+	-	+	+	+	+
HT.2.6	(Negatif)	Batang	Tidak ada	+	+	-	+	+	+	+
HT.3.2	(Negatif)	Batang	Tidak ada	+	+	-	+	+	+	+
HT.3.4	(Negatif)	Batang	Tidak ada	+	+	-	+	+	+	+
HT.3.9	(Negatif)	Batang	Tidak ada	+	+	-	+	+	+	+
HT.4.1	(Negatif)	Batang	Tidak ada	+	+	-	+	+	+	+
HT.4.4	(Negatif)	Batang	Tidak ada	+	+	-	+	+	+	+
HT.4.5	(Negatif)	Batang	Tidak ada	+	+	-	+	+	+	+
HT.5.2	(Negatif)	Batang	Tidak ada	+	+	-	+	+	+	+
HL.1.3	(Negatif)	Batang	Tidak ada	+	+	-	+	+	+	+
HL.4.1	(Negatif)	Batang	Tidak ada	+	+	-	+	+	+	+
HL.5.4	(Negatif)	Batang	Tidak ada	+	+	-	+	+	+	+
HL.6.2	(Negatif)	Batang	Tidak ada	+	+	-	+	+	+	+
HL.6.7	(Negatif)	Batang	Tidak ada	+	+	-	+	+	+	+

Pewarnaan Gram yang dilakukan pada ke-14 isolat menunjukkan bahwa isolat yang diperoleh merupakan Gram Negatif berbentuk batang dan tidak memiliki endospora. Respon positif ditunjukkan pada uji katalase dengan terbentuknya gelembung udara pada saat preparat ditambahkan reagen H_2O_2 . Begitupun pada uji motilitas, semua isolat menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya rambatan-rambatan koloni bakteri di sekitar bekas tusukan jarum ose pada saat inokulasi. Pada uji ketahanan asam secara in vitro, semua isolat mampu tumbuh pada pH 5 – 8, tapi tidak mampu tumbuh pada pH 4 dimana medium terlihat bening dan

tidak menunjukkan terjadinya pertumbuhan bakteri.

Status Bakteri Fiksatif Nitrogen Simbiotik Pada Hutan Lalindu. Enumerasi koloni bakteri fiksatif nitrogen yang diisolasi dari tanah hutan Lalindu menunjukkan hasil tertinggi pada areal HL, yaitu 4.6×10^5 cfu/gr, sedangkan jumlah koloni pada areal HT yaitu 4.4×10^5 cfu/gr. Kondisi hutan yang telah mengalami kebakaran menyebabkan kerusakan pada vegetasi sehingga bahan organik tanah menjadi berkurang. Selain itu, kematian tanaman legum yang merupakan mitra bakteri fiksatif nitrogen menyebabkan bakteri yang berada di dalam bintil akar pun

mati. Meskipun demikian, kepadatan bakteri Rhizobia di areal HT ini masih lebih tinggi dibandingkan di lahan bekas tambang nikel. Hasil penelitian Sari dan Prayudyaningsih (2016) menyatakan kepadatan bakteri Rhizobia di lahan bekas tambang nikel

sebesar 2.5×10^5 cfu/gr (areal *backfilling*), 3.5×10^5 cfu/gr (areal revegetasi tanpa top soil), 3.6×10^5 cfu/gr (areal revegetasi dengan top soil), dan 3.9×10^5 cfu/gr (areal tersukses alami).



Gambar 2. (a) areal Hutan Lindung Alami (HL); (b) areal Hutan Lindung Terbakar (HT)

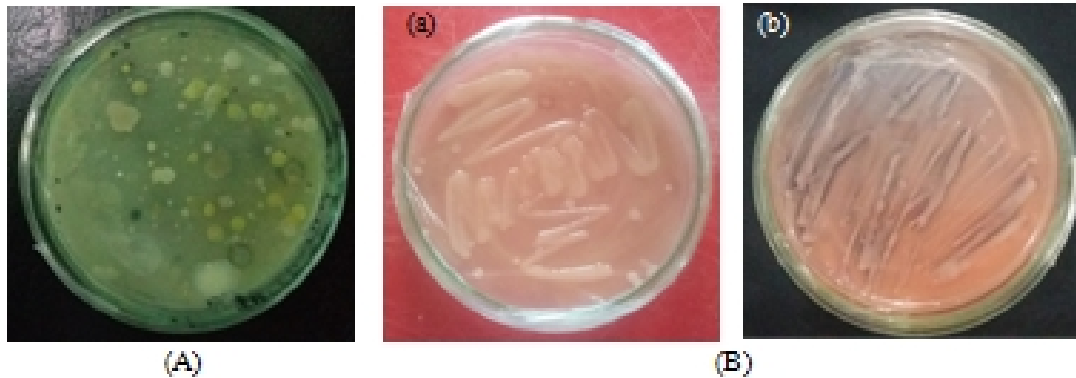
Karakteristik Morfologi Koloni Bakteri Rhizobia. Bakteri Rhizobia yang diperoleh memiliki karakteristik morfologi koloni yang berbeda-beda. Ada yang berbentuk *circular* dan *irreguler* dengan elevasi *flat*, *raised*, dan *convex*. Isolasi memiliki tepi koloni yang berbeda-beda pula, seperti *entire*, *curlied*, *lobate*, dan *undulate* dengan permukaan yang lembut, bahkan ada yang berlendir (tabel 1). Isolasi bakteri Rhizobia dari tanaman legum liar yang dilakukan oleh Bhargava *et al.* (2016) di wilayah Seriarid, Tirupati, India menunjukkan koloni bakteri berbentuk *circular* dan *irregular*, elevasi *flat*, *raised*, hingga *convex*, serta tepi *entire* dan *lobate*. Kumari *et al.* (2009) menambahkan bahwa Rhizobia yang ditumbuhkan pada media yang mengandung mannitol menghasilkan eksopolisakarida (EPS) yang tinggi. Rhizobia memproduksi EPS untuk pembentukan nodul pemfiksasi nitrogen pada tipe nodul-legum indeterminate. EPS berperan dalam invasi dan perkembangan nodul, pelepasan bakteri dari benang infeksi, perkembangan bakteroid, dan penekanan terhadap respons pertahanan

tanaman dan perlindungan terhadap senyawa antimikroba tanaman (Hidayat, 2013).

Koloni yang terpisah dan menunjukkan ciri-ciri morfologi koloni yang berbeda kemudian diinokulasi pada media YEMA+CR. Hasil pengujian menunjukkan bahwa semua isolat tidak mampu atau hanya sedikit menyerap warna merah dari larutan indikator (tabel 2). Sesuai penelitian yang dilakukan oleh Shetta *et al.* (2011) bahwa semua isolat *Rhizobium* yang ditumbuhkan pada media yang mengandung CR dan diinkubasi selama 3 hari tumbuh cepat dan tidak menyerap larutan indikator. Pengujian pada media YEMA+BTB menunjukkan 12 isolat mampu mengubah media menjadi warna kuning dan 2 isolat lainnya tidak mampu mengubah warna media (tetap biru). Harpreet *et al.* (2012) menyatakan bahwa medium YEMA+BTB digunakan untuk mengelompokkan bakteri Rhizobia yang memiliki pertumbuhan cepat dan lambat berdasarkan produksi asam atau alkali pada media. Pada medium yang mengandung BTB, koloni bakteri *Rhizobium* dan medium berubah menjadi kuning karena adanya produksi asam oleh mikroorganisme. Shetta *et*

al. (2011) menambahkan bahwa produksi asam diamati setelah isolat diinkubasi 72 jam pada suhu 28°C dengan mengubah warna medium menjadi kuning. Waktu generasi pada kultur YEMB antara 2,07 dan 3,85 jam pada suhu 28°C. *Bradyrhizobium* yang

tumbuh lambat memiliki koloni dengan ukuran kecil (diameter sekitar 1 – 2 mm) setelah 7 – 10 hari inkubasi, elevasi *raised* dan *mucoïd*, umumnya koloni berwarna putih atau *cream* (Gyorgi *et al.* 2010).

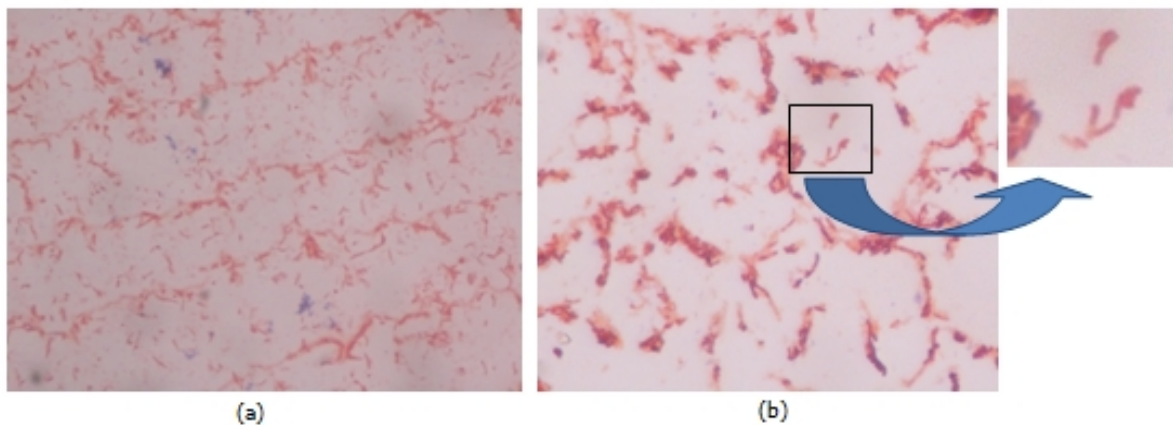


Gambar 3. A. Hasil isolasi bakteri Rhizobia dari sampel tanah hutan lindung yang ditumbuhkan pada media YEMA; B. Uji CR : (a) koloni berwarna putih; (b) koloni berwarna pink pucat

Sifat dan Karakter Bakteri Rhizobia.

Karakterisasi mikroskopik yang dilakukan pada semua isolat Rhizobia menunjukkan bahwa bakteri bersifat Gram negatif yang berbentuk batang dan tidak memiliki endospora (Gambar 3). Hal ini sesuai dengan

penelitian yang dilakukan oleh Gyorgi *et al.* (2010) yang menunjukkan bahwa 50 isolat Rhizobia terseleksi yang berasal dari padang rumput di pegunungan Ciuc merupakan bakteri Gram Negatif berbentuk batang dan tidak memiliki endospora.



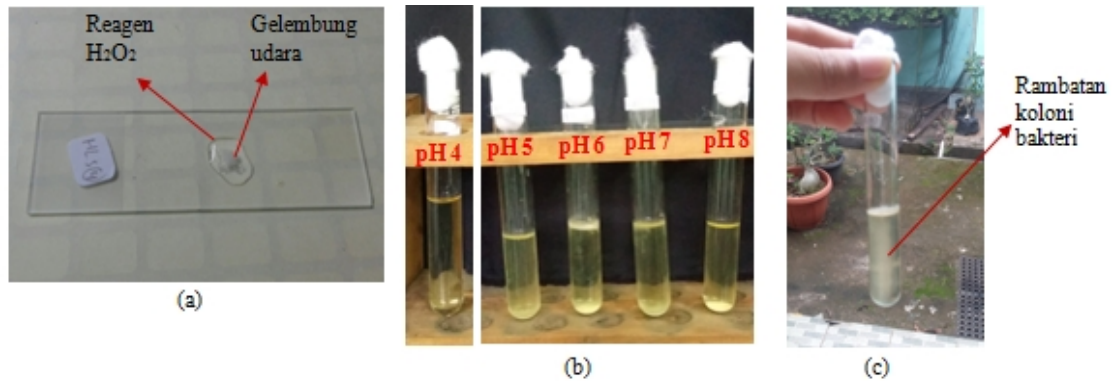
Gambar 4. (a) Sel terlihat berbentuk batang dan berwarna merah (Gram Negatif) pada pewarnaan Gram; (b) tidak terlihat adanya endospora (ditandai dengan tidak adanya organel berwarna hijau) di dalam sel pada pewarnaan endospora (perbesaran 40 x 10)

Empat belas isolat memberikan hasil yang positif terhadap uji katalase. Hasil uji ini menandakan isolat bersifat aerob, yaitu membutuhkan oksigen dalam proses

metabolismenya (tabel 2). Gyorgi *et al.* (2010) bahwa umumnya strain isolat yang diperoleh bersifat aerob dan 12 strain lainnya bersifat anaerob fakultatif. Beberapa strain

mampu memanfaatkan nitrat sebagai akseptor elektron untuk tumbuh secara anaerob, dimana nitrat diubah menjadi nitrit. Selain itu, isolat bersifat motil yang ditandai dengan adanya rambatan-rambatan koloni bakteri di sekitar bekas tusukan jarum inokulasi. Sesuai dengan penelitian Shahzad *et al.* (2012) bahwa semua sampel bakteri Rhizobia yang

diisolasi dari nodul Alfalfa menunjukkan hasil yang positif terhadap uji motilitas. Rhizobia dapat bergerak dengan menggunakan 2-6 flagela peritrik (*Rhizobium*) atau 1 flagela pada kutub/subkutub (*Bradyrhizobium*) (Somasegaran and Hobben, 1985).



Gambar 5. (a) uji katalase; (b) uji ketahanan pH 4 – 8; (c) uji motilitas

Kemampuan Rhizobia untuk tumbuh, menginfeksi tanaman, dan menambat nitrogen dari udara bebas dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, termasuk pH tanah. Hasil penelitian menunjukkan semua isolat tidak mampu tumbuh pada pH 4 secara in vitro, tapi mampu tumbuh pada pH 5, 6, 7, dan 8 (tabel 2). Tsegaye *et al.* (2015) menyatakan sekitar 44% isolat Rhizobia yang diisolasi dari *Trigonella foenum-graecum* L. tidak mampu tumbuh pada pH 4.5 dan 56% tumbuh pada pH 4.5 – 9, pertumbuhan optimum pada pH 6.5 – 8.5. Kisaran pH optimal untuk bakteri Rhizobia adalah sedikit di bawah netral hingga agak alkali. pH media secara tidak langsung berhubungan dengan pH tanah yang merupakan habitat bakteri tersebut. Bakteri Rhizobia cenderung mampu tumbuh pada media yang bersifat alkali.

KESIMPULAN

Rhizobia merupakan salah satu mikroba tanah potensial untuk mendukung pertumbuhan tanaman pada lahan kritis. Bakteri simbiotik ini mampu menyediakan unsur nitrogen yang dapat dimanfaatkan tanaman dalam proses metabolismenya.

Isolasi bakteri Rhizobia pada hutan lindung Lalindu menunjukkan kepadatan bakteri Rhizobia di Hutan Lindung Alami lebih tinggi ($4,6 \times 10^5$ cfu/gr) dibandingkan di Hutan Lindung Terbakar ($4,4 \times 10^5$ cfu/gr). Dari 14 isolat yang berhasil diisolasi, sebanyak 12 isolat termasuk ke dalam kelompok *Rhizobium* dan 2 isolat lainnya termasuk *Bradyrhizobium*. Semua isolat merupakan bakteri aerob, motil, tidak mampu tumbuh pada pH 4 secara in vitro, tetapi tumbuh pada pH 5 – 8. Bakteri ini hanya mampu menambat nitrogen apabila berasosiasi dengan akar legum membentuk nodul. Keberhasilan restorasi lahan marginal dapat dicapai melalui penyediaan unsur hara tanaman, terutama nitrogen, oleh bakteri Rhizobia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada PT. Stargate, Konawe Utara, dan pemerintah setempat atas izinnya sehingga kami bisa melakukan pengambilan data dan sampel penelitian pada hutan lindung Lalindu di kawasan pertambangan nikel PT. Stargate. Ucapan terima kasih juga kepada Bapak Hajar, S.Hut, M.Hut dan Bapak Edi

Kurniawan, S.Hut, M.Hut yang telah membantu selama melakukan survey dan penelitian di lapangan, serta A. Sri Rahmah Dania, S.Si, Hartini, SP dan Mutiah Ummusyahidah, S.Hut yang telah membantu di Laboratorium Mikrobiologi, Balai Penelitian dan Pengembangan Lingkungan Hidup dan Kehutanan Makassar.

DAFTAR PUSTAKA

- Bhargava, Y., J. S. R. Murthy, T. V. R. Kumar, and M. N. Rao. 2016. Phenotypic, stress tolerance and plant growth promoting characteristics of rhizobial isolates from selected wild legumes of Semiarid Region, Tirupati, India. *Advances in Microbiology*. Published Online January 2016 in Scribes. <http://scirp.org/journal/aim>.
- Franche, C., K. Lindstrom, and C. Elmerich. 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil*, 321 : 35 – 59.
- Gyorgi, E., G. Mara, I. Mathe, M., E. Laslo, K. Marialigeti, B. Albert, F. Oancea, and S. Lanyi. 2010. Characterization and diversity of the nitrogen fixing microbiota from a specific grassland habitat in the Ciuc mountains. *Romanian Biotechnological Letter*, 15 (4) : 5474 – 5481.
- Harpreet, K., P. Sharma, N. Kaur, and B. S. Gill. 2012. Phenotypic and biochemical characterization of *Bradyrhizobium* and *Ensifer* spp. isolated from soybean rhizosphere. *Bioscience Discovery*, 3 (1) : 40 – 46.
- Hidayat, C. 2013. Struktur dan fungsi eksopolisakarida dalam simbiosis legum-*Rhizobium*. *Jurnal Kajian Islam, Sains dan Teknologi*, 7 (1) : 18 – 32.
- Kementerian Kehutanan. 2014. Statistik Kementerian Kehutanan Tahun 2013.
- Kumari, B. S., M. R. Ram, and K. V. Mallaiah. 2009. Studies on exopolysaccharide and indole acetic acid production by *Rhizobium* strains from *Indigofera*. *African Journal of Microbiology Research*, 3 (1) : 10 – 14.
- Sari, R. dan R. Prayudyarningsih. 2016. Populasi dan jenis bakteri penambat nitrogen simbiotik di lahan bekas tambang nikel. Prosiding Seminar Nasional Biologi 2016 ‘Peranan Biologi dalam Peningkatan Konservasi Keragaman Hayati’, 6 Juni 2016. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Shahzad, F., M. Shafee, F. Abbas, S. Babar, M. M. Tariq, and Z. Ahmad. 2012. Isolation and biochemical characterization of *Rhizobium meliloti* from root nodules of Alfalfa (*Medicago sativa*). *Journal animal and Plant Sciences*, 22 (2) : 522 – 524.
- Shetta, N. D., T. S. Al-Shaharani, and M. Abdel-Aal. 2011. Identification and characterization of *Rhizobium* associated with woody legume trees grown under Saudi Arabia condition. *American-Eurasian Journal Agriculture and Environment Sciences*, 10 (3) : 410 – 418.
- Shridhar, B. S. 2012. Review : Nitrogen fixing microorganisms. *International Journal of Microbiology Research*, 3 (1) : 46 – 52.
- Somasegaran, P. and H. J. Hoben. 1985. *Methodes in Legume-Rhizobium Technology*. Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources.
- Tsegaye, M., F. Assefa, and J. Zeleke. 2015. Symbiotic and phenotypic characterization of *Rhizobium* isolates nodulating Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) from north and east Shewa, Ethiopia. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*, 7 (1) : 93 – 104.