

**Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penambat Nitrogen
pada Ekosistem Mangrove di Kawasan Hutan Ibu Kota
Nusantara (IKN)**

**ZULFIKRI BASRI
M021201001**



**PROGRAM STUDI REKAYASA KEHUTANAN
FAKULTAS KEHUTANAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penambat Nitrogen pada
Ekosistem Mangrove di Kawasan Hutan Ibu Kota Nusantara (IKN)**



ZULFIKRI BASRI
M021201001

SKRIPSI

PROGRAM STUDI REKAYASA KEHUTANAN

pada

**PROGRAM STUDI REKAYASA KEHUTANAN
DEPARTEMEN KEHUTANAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

SKRIPSI

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penambat Nitrogen pada
Ekosistem Mangrove di Kawasan Hutan Ibu Kota Nusantara (IKN)

ZULFIKRI BASRI

M021201001

Skripsi,

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Sarjana
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan
Program Studi Rekayasa Kehutanan
Fakultas Kehutanan
Universitas Hasundin
Makassar
Menyetujui :


Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping

Pembimbing Pendamping



Dr. Siti Halimah Larekeng, S.P., M.P
NIP. 198202092015042002



Gusmiaty, S.P, M.P
NIP. 197911202009122002



Dr. Retno Prayudyaningsih, S.Si., M.Sc
NIP. 197411292001122003

Ketua Program Studi



Dr. Siti Halimah Larekeng, S.P, M.P
NIP. 198202092015042002

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, skripsi berjudul "Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penambat Nitrogen pada Ekosistem Mangrove Di Kawasan Hutan Ibu Kota Nusantara (IKN)" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing (Dr. Siti Halimah Larekeng, S.P., M.P., Gusmiaty, S.P, M.P dan Dr. Retno Prayudyaningsih, S.Si., M.Sc) Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka skripsi ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa skripsi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, September 2024



Zulfikri Basri
M021201001

ABSTRAK

Bakteri penambat nitrogen berperan penting dalam ekosistem karena kemampuannya untuk mengikat nitrogen dari atmosfer lalu mengubahnya menjadi bentuk yang digunakan untuk kesuburan tanah dan produktivitas tanaman. Proses ini, yang dikenal sebagai fiksasi nitrogen. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri penambat nitrogen pada ekosistem mangrove di kawasan Hutan Ibu Kota Nusantara (IKN). Lokasi penelitian mencakup Teluk Balikpapan dan Delta Mahakam, Kalimantan Timur. Metode penelitian meliputi pengambilan sampel tanah, pembuatan media selektif, isolasi dan perhitungan jumlah koloni bakteri dengan *Total Plate Count* (TPC), pemurnian bakteri, penentuan bakteri simbiotik dan non simbiotik, serta karakterisasi morfologis dan fisiologis bakteri penambat nitrogen. Hasil isolasi menunjukkan populasi bakteri penambat nitrogen yang bervariasi di beberapa lokasi, dengan populasi tertinggi ditemukan di Delta Mahakam. Karakterisasi menunjukkan keberadaan bakteri penambat nitrogen simbiotik dan non-simbiotik, yang memainkan peran penting dalam menyediakan nutrisi bagi tanaman dan mendukung produktivitas tanah. Penelitian ini memberikan informasi mengenai potensi bakteri penambat nitrogen di ekosistem mangrove IKN, yang dapat dimanfaatkan untuk mendukung keberlanjutan ekosistem dan pembangunan IKN. Genus bakteri yang didapatkan yaitu *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Rhizobium*, *Klebsiella*, *Nitrococcus*.

Kata Kunci: Mangrove, Bakteri Penambat Nitrogen, Media selektif, Simbiotik, Non-Simbiotik, Genus Bakteri.

ABSTRACT

Nitrogen-fixing bacteria play an important role in ecosystems because of their ability to fix nitrogen from the atmosphere and then convert it into a form that is used for soil fertility and plant productivity. This process, known as nitrogen fixation. This research aims to isolate and characterize nitrogen-fixing bacteria in the mangrove ecosystem in the Indonesian Capital Forest (IKN) area. Research locations include Balikpapan Bay and the Mahakam Delta, East Kalimantan. Research methods include taking soil samples, making selective media, isolating and calculating the number of bacterial colonies using Total Plate Count (TPC), purifying bacteria, determining symbiotic and non-symbiotic bacteria, as well as morphological and physiological characterization of nitrogen-fixing bacteria. The isolation results showed that the population of nitrogen-fixing bacteria varied in several locations, with the highest population found in the Mahakam Delta. Characterization shows the presence of symbiotic and non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria, which play an important role in providing nutrients to plants and supporting soil productivity. This research provides information regarding the potential of nitrogen-fixing bacteria in the IKN mangrove ecosystem, which can be used to support ecosystem sustainability and IKN development. The bacterial genera obtained were *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Rhizobium*, *Klebsiella*, *Nitrococcus*.

Keyword : Mangrove Ecosystem, Nusantara Capital City Forest (IKN), Nitrogen-Fixing Bacteria, Symbiotic Bacteria, Non-Symbiotic Bacteria, Genus Bacteria

KATA PENGANTAR

Puji dan Syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala nikmat dan karunianya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul “**Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penambat Nitrogen pada Ekosistem Mangrove Di Kawasan Hutan Ibu Kota Nusantara (IKN)**”. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah membantu selama penelitian juga dalam proses penyusunan skripsi, terutama Ibu Dr. **Siti Halimah Larekeng, S.P., M.P.**, Ibu **Gusmiaty, S.P, M.P** dan Ibu **Dr. Retno Prayudyaningsih, S.Si., M.Sc.** selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga dan pikiran dalam membimbing serta memberi arahan dalam penyusunan skripsi ini.

Ucapan terima kasih yang tiada tara untuk kedua orang tua tercinta, Ayahanda **Muhammad Basri** dan Ibunda **Waty** serta saudara-saudara kandung saya **Zulfikar Basri** dan **Zulfiyana Basri** yang selalu memberi nasihat, perhatian, doa, dan memberi motivasi. Tidak lupa selalu memberi materi mulai dari perlengkapan kuliah hingga jajan untuk menunjang keberhasilan selama proses menimba ilmu. Dalam penyusunan skripsi ini tidak terlepas bantuan dan dorongan dari berbagai pihak, sehingga skripsi ini dapat terselesaikan. Untuk itu, sudah selayaknya dalam kesempatan ini penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Ibu **Dr. Andi Sri Rahayu Diza Lestari A., S.Hut., M.Si.** dan Bapak **Iswanto, S.Hut., M.Si.**, selaku dosen penguji yang telah memberikan masukan dan saran dalam penyusunan skripsi ini.
2. Bapak **Prof. Muhammad Restu**, sebagai **Dosen Pembimbing Akademik**. Bapak/ibu **Dosen Fakultas Kehutanan** yang memberikan ilmu dengan penuh tanggung jawab tanpa mengenal lelah, serta **Staf Fakultas Kehutanan** yang selalu melayani pengurusan administrasi selama berada di lingkungan Fakultas Kehutanan.
3. Tim Bola kesayangan penulis yaitu **Liverpool FC** dan **FC Barcelona** yang memberi kekuatan tersendiri berupa semangat dan kerja keras, walaupun tidak selalu menang melainkan memberi hiburan kepada penulis. Penulis mengutip **Justinus Lhaksana “Pasti ada kalahnya, bukan hanya dalam olahraga. Kamu pacaran emang kamu menang terus ?, kamu nikah emang kamu menang terus ?, kamu berbisnis emang kamu untung terus ?, kamu diskusi emang benar terus ?, ‘TIDAK’ Kalah itu bukan bagian dari olahraga tapi dari hidup kamu. SOMETIMES YOU GIFT, SOMETIMES YOU TAKE”**
4. Sobat-sobat **PULAU** yaitu **anap, abdee, alung, pu’ad** dan **dd** yang selalu mengisi waktu luang, menemani nonton bola bareng, memberikan tawa, diskusi sehat dan kebahagiaan kepada penulis serta *trip* yang tak terduga.
5. Keluarga besar **SKMA Unhas** yang senantiasa membantu dan menemani penulis dari awal perkuliahan. Semoga ikatan kekeluargaan ini tetap solid dan tetap mementingkan jiwa korsa rimbawan.
6. Kelompok **GambrenG** yang berisikan **Penulis, Gina Mutmainnah** dan **Andi Elnafilah** selaku tim riset mikroba di Kawasan Hutan Mangrove Ibu Kota Nusantara.

7. Keluarga besar **IMPERIUM 2020** dan **FOREN KITA”** **Jl.**
8. Teman-teman grup **atlit jompo** yaitu **Watam, PuPut, Jasting, AmiR, pila,** dan **Vermass** yang membantu penulis terutama hal yang berhubungan dengan teknologi selama perkuliahan.
9. Teman-teman **LOGGER (Lorong Gereja)** yang senantiasa menginfokan kejadian-kejadian yang terjadi di lingkungan sekitar rumah penulis.
10. Pasukan **TAGIHAN** yaitu **Incung/nunung, Vito, Aska, Unch@, Radinee, ucup/aldilla** dan **Akez** selaku teman KKN serta pernongkian yang berbagi cerita dan memberi sudut pandang berbeda terkait pergaulan yang sehat dan positif.
11. Mentor-mentor saya Kak **Sri Wahyuni Jufri,** Kak **Indriyani Astuti,** Kak **Nopi** dan Kak **Fitri** yang telah meluangkan waktunya untuk membimbing, mendengarkan keresahan hingga memberi jajanan untuk penulis.
12. Teman-teman seperjuangan penulis **“Pojok Belakang”** saat menjalani PKL Gelombang 5. Mereka memberi warna, masukan, dan berbagi suka dan duka selama 30 hari.
13. Grup **Langsung Gass,** yaitu **Allu, Azhar, Ndingg, Jabal, Parhan, Mas’ud, Ikram, Ekky, Galib, Aldi** dan **Furqan** yang menemani penulis dari awal perkuliahan serta selama waktu luang baik dalam maupun luar kampus.
14. **Tellia Hani, Miter, Ciplii,** dan **Tiko** selaku teman **Dirty Jokes.** Terima kasih karena telah menghibur penulis semasa kuliah dan penyusunan skripsi.
15. **PATImaH, Misboy, Ning-Ning** selaku teman **sharing** tugas-tugas kelompok dari awal perkuliahan.
16. **Aswar, Ripka, Yonas, Nilm, AHnaf, Marsel, Nopal, Stooo, oji** selaku teman **Curcol,** penulis sejak SMK hingga sekarang.
17. **Anshorr, Alif, Indraw, Fitrah, Dwee, Afdi, Nawaf, RB, Faruq, NK, Amin** serta segenap teman **Spezhar** dan **Smazhar** yang selalu membersamai **Penulis.**
18. **Gimun,** sebagai partner selama perkuliahan yang senantiasa membantu, mendukung dan memberikan motivasi serta solusi saat **Penulis** menghadapi tantangan akademik maupun non-akademik. **“Big Thanks dan sukses terus BRODI ku”**
19. Terakhir, **Penulis** ingin meminta **“MAAF”** kepada **Zulfikri Basri** yaitu diri sendiri karena setiap perjuangan yang telah dilalui adalah bagian dari pengembangan dan pengoreksian diri. **Penulis** berhak mendapatkan rasa bangga dan kasih sayang dari diri sendiri. Mulai hari ini, saya **Zulfikri Basri** akan lebih sadar dalam merayakan setiap pencapaian, sekecil apapun itu, dan lebih menghargai diriku apa adanya.

Makassar, 2 September 2024

Zulfikri Basri

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	i
PERNYATAAN KEASLIAN	iii
ABSTRAK.....	iv
KATA PENGANTAR.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Teori	2
II. METODE PENELITIAN	5
2.1 Waktu dan Tempat Penelitian	5
2.2 Alat dan Bahan	5
2.2.1 Alat	5
2.2.2 Bahan	5
2.3 Prosedur Penelitian	5
2.3.1 Pengambilan Sampel	5
2.3.2 Pembuatan Media	7
2.3.3 Isolasi Bakteri Penambat Nitrogen dari Sampel Tanah	9
2.3.4 Penghitungan Jumlah Koloni Bakteri (Duplo).....	9
2.3.5 Pemurnian Bakteri.....	10
2.3.6 Pengamatan Makroskopis Koloni Bakteri.....	10

2.3.7 Karakterisasi Isolat Bakteri Penambat Nitrogen Simbiotik & Non Simbiotik	10
2.3.8 Karakterisasi Morfologi Bakteri Penambat Nitrogen.....	11
2.3.9 Karakterisasi Fisiologi Bakteri Penambat Nitrogen	12
III. HASIL DAN PEMBAHASAN	14
3.1 Isolasi Bakteri Penambat Nitrogen (BPN) di Kawasan Hutan Mangrove IKN.....	14
3.2 Pemurnian Bakteri Penambat Nitrogen di Kawasan Hutan Mangrove IKN	15
3.3 Pengamatan Makroskopik Isolat Bakteri Penambat Nitrogen.....	17
3.4 Pengamatan Mikroskopik Bakteri Penambat Nitrogen di Kawasan Hutan Mangrove IKN	24
3.5 Identifikasi Fisiologi Bakteri Penambat Nitrogen di Kawasan Hutan Mangrove IKN.....	27
3.6 Hasil Identifikasi Genus Bakteri Penambat Nitrogen di Kawasan Hutan Mangrove IKN	32
IV. KESIMPULAN	41
4. Kesimpulan	41
DAFTAR PUSTAKA.....	42
LAMPIRAN	47

DAFTAR GAMBAR

Nomor Urut	Halaman
1. Peta Lokasi Pengambilan Sampel di Teluk Balikpapan	6
2. Peta Lokasi Pengambilan Sampel di Delta Mahakam	6
3. Hasil Pembuatan Media YEMA + BTB (kiri), Media YEMA (Tengah), Media YEMA + CR (kanan)	8
4. Hasil Isolasi Bakteri Penambat Nitrogen di Kawasan Hutan Mangrove IKN	14
5. Hasil Pemurnian Isolat Bakteri Penambat Nitrogen di Kawasan Hutan Mangrove IKN, Tampak Depan (a), Tampak Belakang (b).	17
6. Hasil Pemurnian Isolat Bakteri Penambat Nitrogen pada Media YEMA+CR (a) Menyerap CR ; (b) Tidak menyerap CR	23
7. Hasil Pemurnian Isolat Bakteri Penambat Nitrogen pada Media YEMA+BTB (a) Reaksi asam ; (b) Reaksi basa	24
8. Hasil Pewarnaan Gram Pada Isolat Bakteri Penambat Nitrogen di Kawasan Hutan Mangrove IKN, (a) Gram Negatif ; (b) Gram Positif.	26
9. Bentuk Sel Bakteri Penambat Nitrogen Pada Pengujian Pewarnaan Gram di Kawasan Hutan Mangrove IKN, (a) Basil ; (b) Cocus ; (c) Spiral	26
10. Bentuk Spora Hasil Pengujian Pewarnaan Endospora Bakteri Penambat Nitrogen di Kawasan Hutan Mangrove IKN, (a) Spora Mengembang ; (b) Spora Sentral ; (c) Spora Terminal.	27
11. Pengujian Katalase Pada Bakteri Penambat Nitrogen, (a) Terdapat Gelembung ; (b) Tidak Terdapat Gelembung.	29
12. Pengujian Pergerakan Bakteri Penambat Nitrogen Pada Media SIM, (a) Motil + ; (b) Motil -	30
13. Pengujian Indol Bakteri Penambat Nitrogen di Kawasan Hutan Mangrove IKN Pada Media SIM	30
14. Pengujian Indol Bakteri Penambat Nitrogen Pada Media SIM (Rifai, 2021). (a) Indol+ (b) Indol-	31
15. Pengujian Sulfide Bakteri Penambat Nitrogen Pada Media SIM di Kawasan Hutan Mangrove IKN, (a) Media SIM sebelum pengujian ; (b) Media SIM setelah Pengujian	31
16. Pengujian Sulfide Pada Media SIM (Azizah, 2016).	32

17. Genus *Azotobacter* Isolat MSB 1 dari Hasil Identifikasi Bakteri Penambat Nitrogen di Kawasan Mangrove Ibu Kota Nusantara. Kenampakan secara Makro (a) ; Kenampakan secara Mikro (b).34
18. Genus *Azospirillum* Isolat TBB 6 dari Hasil Identifikasi Bakteri Penambat Nitrogen di Kawasan Mangrove Ibu Kota Nusantara. Kenampakan secara Makro (a) ; Kenampakan secara Mikro (b).35
19. Genus *Bacillus* Isolat DMB 4.4 dari Hasil Identifikasi Bakteri Penambat Nitrogen di Kawasan Mangrove Ibu Kota Nusantara. Kenampakan secara Makro (a) ; Kenampakan secara Mikro (b). 36
20. Genus *Clostridium* Isolat DMB 3.2 dari Hasil Identifikasi Bakteri Penambat Nitrogen di Kawasan Mangrove Ibu Kota Nusantara. Kenampakan secara Makro (a) ; Kenampakan secara Mikro (b).37
21. Genus *Klebsiella* Isolat DMB 1.3 dari Hasil Identifikasi Bakteri Penambat Nitrogen di Kawasan Mangrove Ibu Kota Nusantara. Kenampakan secara Makro (a) ; Kenampakan secara Mikro (b).38
22. Genus *Rhizobium* Isolat GJB 1 dari Hasil Identifikasi Bakteri Penambat Nitrogen di Kawasan Mangrove Ibu Kota Nusantara. Kenampakan secara Makro (a) ; Kenampakan secara Mikro (b).39
23. Genus *Nireococcus* Isolat DMB 2.3 dari Hasil Identifikasi Bakteri Penambat Nitrogen di Kawasan Mangrove Ibu Kota Nusantara. Kenampakan Secara ..40

DAFTAR TABEL

Nomor Urut	Halaman
1. Hasil Perhitungan Populasi Bakteri Penambat Nitrogen di Kawasan Hutan Mangrove IKN	14
2. Hasil Pemurnian Bakteri Penambat Nitrogen di Kawasan Hutan Mangrove IKN	15
3. Hasil Identifikasi Makroskopis Bakteri Penambat Nitrogen di Kawasan Hutan Mangrove IKN	17
4. Hasil Pemurnian Bakteri Penambat Nitrogen di Kawasan Hutan Mangrove IKN Pada Media Selektif.....	20
5. Hasil Pengamatan Mikroskopik Bakteri Penambat Nitrogen di Kawasan Hutan Mangrove IKN	24
6. Hasil Pengujian Fisiologi Bakteri Penambat Nitrogen di Kawasan Hutan Mangrove IKN	27
7. Genus Bakteri Penambat Nitrogen di Kawasan Hutan Mangrove IKN.....	32

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor Urut	Halaman
1. Penghitungan Data Koloni Bakteri Pada Kawasan Mangrove IKN	48
2. Dokumentasi Hasil Isolasi Koloni Bakteri Pada Kawasan Mangrove IKN	49
3. Pemurnian Koloni Bakteri Pada Kawasan Mangrove IKN	57
4. Dokumentasi Hasil Pemurnian Koloni Bakteri Pada Kawasan Mangrove IKN	Error!
Bookmark not defined.	
5. Pengujian Bakteri Pada Media YEMA+CR.....	Error! Bookmark not defined.
6. Hasil Pengujian Bakteri pada Media YEMA+CR	Error! Bookmark not defined.
7. Pengujian Bakteri Pada Media YEMA+BTB	Error! Bookmark not defined.
8. Hasil Pengujian Bakteri Pada Media YEMA+BTB ...	Error! Bookmark not defined.
9. Pengujian Mikroskopik Bakteri Penambat Nitrogen di Kawasan Hutan Mangrove IKN.....	Error! Bookmark not defined.
10. Hasil Identifikasi Bakteri Penambat Nitrogen di Kawasan Hutan Mangrove IKN	Error! Bookmark not defined.

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kawasan mangrove di Teluk Balikpapan dan Delta Mahakam merupakan salah satu ekosistem paling penting di Kalimantan Timur, yang berfungsi sebagai penyangga alami terhadap erosi pantai, habitat bagi berbagai spesies satwa, serta penyaring polutan sebelum mencapai laut. Dengan rencana pemindahan ibu kota baru Republik Indonesia ke wilayah Penajam Paser Utara dan sebagian Kutai Kartanegara, perhatian terhadap keberlanjutan dan pelestarian kawasan mangrove ini menjadi sangat krusial. Harapannya kawasan ini dapat berkembang secara berkelanjutan dan memberikan manfaat jangka panjang bagi masyarakat dan lingkungan (Hasibuan & Aisa, 2020). Patut diperhatikan bahwa hutan mangrove memiliki peranan ekologis yang penting sebagai penunjang dan penyedia berbagai jasa bagi kelangsungan hidup manusia. Salah satu aspek penting yaitu proses dekomposisi hal ini mikroorganisme merupakan kunci dari siklus dekomposisi ekosistem mangrove (Argiantini et al., 2021).

Dekomposisi ekosistem mangrove ialah bahan-bahan organik dipecah oleh beragam komunitas pengurai dalam hal ini bakteri yang berperan dalam proses dekomposisi melepaskan berbagai nutrisi kembali ke ekosistem mangrove (Andriyanto et al., 2019). Nutrisi yang kaya pada ekosistem mangrove dipengaruhi oleh pasang surut air laut, aliran air tawar dari daratan, akumulasi mineral, dan aktivitas mikroorganisme yang menghasilkan ekosistem variatif dengan keanekaragaman mikroorganisme yang mampu beradaptasi dengan kondisi ekstrem (Hartati et al., 2023). Keanekaragaman dan kemampuan adaptasi bakteri berperan penting dalam mempertahankan keseimbangan ekosistem mangrove, sehingga ekosistem tersebut tetap produktif dan berfungsi optimal.

Peranan bakteri dalam menjaga ekosistem mangrove tetap optimal yaitu berkontribusi menyediakan nutrisi bagi tanaman, melindungi tanaman dari infeksi bakteri patogen (terutama di daerah perakaran), menghasilkan hormon pertumbuhan, seperti *indol acetic acid*, pelarut fosfat, penambat nitrogen, dan lain-lain (Khairani et al., 2019). Unsur nitrogen berfungsi menyusun klorofil, komponen utama asam nukleotida yang diperlukan dalam pembentukan dan pembelahan sel, komponen utama asam amino dalam pembentukan protein, dan komponen enzim yang sangat penting dalam reaksi-reaksi kimia dalam tanaman (Hartati et al., 2023).

Nitrogen merupakan nutrisi yang sedikit tersedia dalam tanah sehingga perlu adanya sumber nitrogen eksogen dari atmosfer (Israwan, 2014). Nitrogen di atmosfer sebagian besar terdapat dalam bentuk N_2 yang tidak dapat digunakan langsung oleh tanaman. Tanaman memerlukan nitrogen dalam bentuk nitrat (NO_3^-) atau amonium (NH_4^+) agar dapat menggunakannya sebagai nutrisi (Astuti et al., 2021). Penambat nitrogen secara biologis terjadi dengan menggunakan bakteri (Sapalina et al., 2022).

Bakteri penambat nitrogen berfungsi sebagai perangsang pertumbuhan, memberi warna hijau pada daun, serta mengatasi kurangnya unsur hara N dalam tanah dengan memanfaatkan kelompok mikroorganisme yang berguna sebagai

penyedia hara pada tanah yang nantinya tersedia untuk tanaman dalam mendukung produktivitas tanah dan pertumbuhan mangrove. Berdasarkan ulasan terkait mikroorganisme di kawasan mangrove maka dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui jumlah populasi bakteri dan mengidentifikasi keanekaragaman jenis bakteri penambat nitrogen. Adapun kegunaan dari penelitian ini yaitu memberikan informasi potensi bakteri penambat nitrogen pada tanah di area sekitaran Kawasan Hutan Mangrove Ibu Kota Nusantara (IKN).

1.2 Teori

Ekosistem hutan mangrove merupakan salah satu ekosistem yang memiliki produktivitas tinggi dibandingkan ekosistem lain dengan dekomposisi bahan organik yang tinggi, dan menjadikannya sebagai mata rantai ekologis yang sangat penting bagi kehidupan makhluk hidup yang berada di perairan sekitarnya (Imran & Effendi, 2016). Tumbuhan mangrove berperan penting dalam menjaga kestabilan pantai, melindungi ekosistem pesisir, dan menyediakan habitat yang ideal bagi berbagai spesies hayati di ekosistem mangrove karena kemampuannya sebagai perangkap sedimen dan pengendap sedimen (Karimah, 2017).

Sedimen merupakan sumber nutrisi bagi ekosistem mangrove berupa nitrogen dan fosfor yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan produktivitas tanaman mangrove. (Yulma et al., 2019). Bakteri merupakan salah satu mikroorganisme yang berperan sebagai pengurai di dalam sedimen mangrove. Kehilangan sedimen tidak hanya mengurangi habitat dan sumber makanan bagi banyak spesies, tetapi juga mengganggu proses dekomposisi yang dilakukan oleh bakteri. Seperti yang dinyatakan oleh Yulma et al. (2017) proses dekomposisi dari dedaunan yang gugur berkontribusi signifikan terhadap kesuburan ekosistem mangrove. Proses ini memungkinkan bakteri untuk mendaur ulang elemen-elemen esensial seperti karbon, nitrogen, dan fosfor, yang sangat penting bagi kehidupan di ekosistem.

Bakteri merupakan salah satu mikroorganisme yang berperan sebagai pengurai di dalam sedimen. Peran utama bakteri sebagai pengurai atau dekomposer sangat penting dalam siklus material di lingkungan (Purnomo et al., 2016).

Salah satu unsur yang dihasilkan dari proses dekomposisi dalam siklus material adalah Nitrogen. Unsur ini penting untuk membentuk senyawa-senyawa vital dalam sel, seperti protein, DNA, dan RNA. Namun, seiring waktu, sumber nitrogen dalam tanah menjadi semakin tidak mencukupi untuk kebutuhan tanaman, sehingga diperlukan penggunaan pupuk sintetik sebagai sumber tambahan nitrogen untuk meningkatkan produksi (Sari & Prayudyaningsih, 2015). Sebagai salah satu unsur hara utama yang dibutuhkan tanaman untuk proses fotosintesis, pembentukan protein, dan pertumbuhan jaringan vegetatif, nitrogen diperoleh dari bahan organik yang terurai, residu tanaman, atau fiksasi nitrogen oleh bakteri tanah (Mastur et al., 2015).

Bakteri yang mengambil nitrogen dari udara (N_2) dan mengubahnya menjadi bentuk yang dapat dimanfaatkan oleh tanaman (seperti amonia atau nitrat). Kemampuan untuk memfiksasi (menambat) nitrogen tergolong kelompok bakteri

diazotrof dan dibedakan menjadi bakteri yang hidup bebas (non-simbiotik) dan yang hidup bersimbiosis dengan akar tanaman (simbiotik) dengan pembentukan bintil akar (Danapriatna, 2010). Nitrogen organik terdapat dalam bentuk senyawa-senyawa yang terkandung dalam bahan organik, seperti protein, asam nukleat, dan senyawa lainnya tetapi tidak langsung dimanfaatkan oleh tanaman sehingga membutuhkan bantuan bakteri penambat nitrogen (Sapalina et al., 2022). Proses penambatan nitrogen dilakukan oleh enzim nitrogenase yang dimiliki oleh bakteri penambat nitrogen non simbiotik. Bakteri tersebut berkontribusi pada peningkatan ketersediaan nitrogen di dalam tanah sehingga dapat diserap oleh tanaman, serta membantu menjaga kesuburan tanah dan mendukung pertumbuhan tanaman (Putri, 2018). Ekowati, dkk., (2021) menegaskan tahap awal dalam proses fiksasi nitrogen yang melibatkan enzim nitrogenase dimulai saat molekul nitrogen yang tidak terikat dari udara membentuk ikatan dengan kelompok enzim nitrogenase. Aktivitas nitrogenase dalam menambat nitrogen diawali ketika molekul nitrogen dari atmosfer berinteraksi dengan situs katalik pada kompleks enzim ini

Sebagaimana yang diungkapkan Sapalina et al., (2022) pengelompokan bakteri penambat nitrogen yang hidup bebas, seperti *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, dan *Klebsiella*, bakteri tersebut tidak membentuk hubungan langsung dengan organisme lain. Sebaliknya, kelompok bakteri penambat nitrogen yang bersimbiosis dengan tanaman, seperti *Rhizobium*, *Frankia*, dan *Anabaena*, yang membentuk nodul atau bintil pada akar tanaman (Sapalina et al., 2022). *Azospirillum* adalah bakteri penambat nitrogen non-simbiotik atau rhizobakteria pengikat nitrogen bebas yang dapat hidup di sekitar akar tanaman. Bakteri ini mendapatkan makanan dan nutrisi dari tanaman tersebut serta membantu mengembalikan nitrogen ke dalam tanah (Shahwar et al., 2023). Bakteri *Rhizobium* merupakan bakteri penambat nitrogen simbiotik yang biasanya disebut bakteri bintil akar karena dapat menginfeksi akar tanaman legum dan membentuk bintil yang merupakan tempat terjadinya fiksasi nitrogen (Reeve et al., 2015).

Pembiakan mikroorganisme dalam laboratorium memerlukan media yang berisi zat hara serta lingkungan pertumbuhan yang sesuai bagi mikroorganisme. Media pertumbuhan adalah media nutrisi yang disiapkan untuk menumbuhkan bakteri. Beberapa bakteri dapat tumbuh dengan baik pada setiap media dan beberapa bakteri membutuhkan media khusus. Media harus dapat menyediakan energi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan (Kasiyati et al., 2023). Pertumbuhan bakteri pada media kultur merupakan komponen penting dalam berbagai aplikasi mikrobiologi, mulai dari isolasi, perbanyakan, pengujian sifat fisiologi, hingga perhitungan jumlah mikroba. Media pertumbuhan menjadi alat yang sangat bermanfaat dalam studi dan perbanyakani mikroorganisme. (Cahyani, 2014) .

Media harus mengandung sumber nutrisi yang dibutuhkan mikroba, seperti air, sumber karbon, mineral, vitamin, dan gas. Komposisi nutrisi harus sesuai dengan kebutuhan spesifik mikroba yang akan ditumbuhkan. pH media umumnya netral, namun ada juga mikroba yang membutuhkan kondisi alkali. Suhu inkubasi harus sesuai dengan suhu optimal pertumbuhan mikroba. Media dibutuhkan tidak hanya untuk menumbuhkan mikroba, tetapi juga untuk isolasi, inokulasi, serta uji fisiologi

dan biokimia mikroba. Pemilihan media yang sesuai dengan kebutuhan spesifik mikroba akan sangat menentukan keberhasilan dalam berbagai aplikasi mikrobiologi. (Yusmaniar et al., 2017).

Media diperlukan untuk membiakkan mikroorganisme, karena berisi nutrisi yang dibutuhkan dalam pertumbuhan dan perkembangan mikrobia. Selain media, faktor lain seperti lingkungan yang sesuai juga berpengaruh untuk pertumbuhan mikroorganisme. Nutrisi yang diperlukan untuk pertumbuhan mikroorganisme meliputi nitrogen, karbon, unsur logam seperti vitamin, air, energi, unsur non logam seperti sulfur dan fosfor, (Kasiyati et al., 2023). Komponen utama *Yeast Ekstrak* (YE) adalah protein, asam amino, peptida, vitamin, dan mineral yang kaya akan nutrisi untuk pertumbuhan mikroba. YE mengandung komponen larut dari sel ragi (yeast) yang dihasilkan melalui proses pemecahan dinding sel. Penambahan YE ke dalam media dapat meningkatkan laju pertumbuhan dan produktivitas mikroba (Zarei et al., 2016).

II. METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan April 2023 – Februari 2024. Sampel tanah/substrat diambil dari hutan mangrove sekitar kawasan IKN yaitu sepanjang Teluk Balikpapan, yang termasuk dalam wilayah Kabupaten Penajam Paser Utara dan Kota Balikpapan, serta Delta Mahakam, wilayah Kabupaten Kutai Kartanegara. Tahap isolasi, penghitungan koloni, pemurnian, karakterisasi, dan identifikasi dilakukan di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Pohon, Laboratorium Terpadu, Fakultas Kehutanan, dan Mikrobiologi PKR Mikroba Karst, LPPM, Universitas Hasanuddin, Makassar

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *laminary air flow* (LAF), cawan petri, *autoclaf*, oven, *mikro pipet*, erlenmeyer, jarum preparat, *glass breaker*, gelas ukur, tabung reaksi, *Hot plate Magnetic stirrer*, *Colony Counter*, botol kuljar, botol sampel, pipet tetes, spatula, spektrofotometer, tabung reaksi, *vortex*, mikroskop, penggaris, *box*, timbangan analitik, rak tabung reaksi, tip, bunsen, spatula, batang penyebar, kamera, pemantik api dan alat tulis.

2.2.2 Bahan

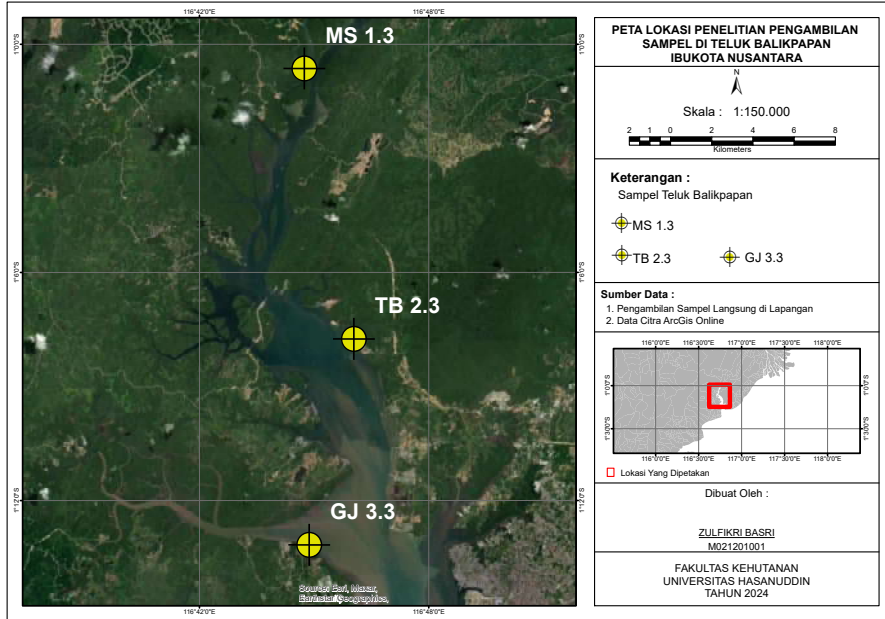
Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alkohol 70%, aquades, *Handscoon*, *tissue*, *plastic wrapping*, *aluminium foil*, spiritus, label, *Mannitol*, *Depotasium phosphate* ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$) *NaCl* (*sodium chloride*), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (*magnesium sulphate heptahydrate*), $CaCO_3$ (*Calcium carbonate*), *yeast extract*, agar, aquades, antibiotik *Ketokonazole*, *Congo Red*, *Biometyl Blue*, *Crystal Violet*, *Iodin*, *Safranin*, *Malachite Green*, *Hidrogen Peroksida*, *Media SIM*, *Reagen Kovac's*, dan sampel tanah Delta Mahakam, Teluk Balikpapan.

2.3 Prosedur Penelitian

2.3.1 Pengambilan Sampel

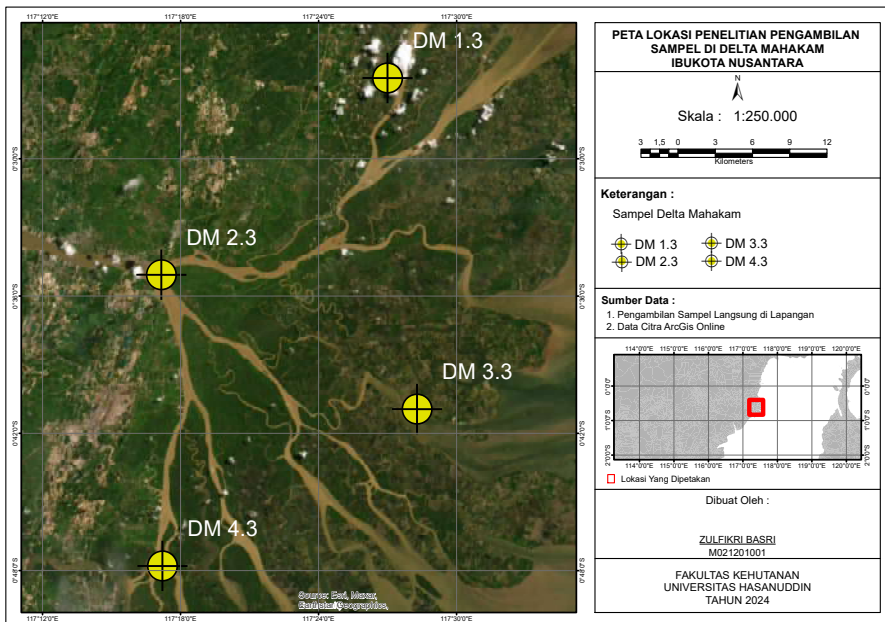
Pengambilan sampel oleh Tim Peneliti BRIN untuk kegiatan Riset Inovatif untuk Indonesia Maju (RIIM) Gelombang 2. Pengambilan sampel tanah dilakukan pada daerah perairan dan daratan yang ada di tepi sungai Teluk Balikpapan dan Delta Mahakam menggunakan pipa paralon atau cetok di setiap areal atau 3 titik (hulu, tengah, hilir), kemudian dicampur dan diambil titik koordinatnya untuk mendapatkan *bulk* sampel. Pengambilan sampel pada bagian tengah perairan dilakukan saat air sungai surut, sehingga pipa paralon dapat menjangkau dasar sungai untuk mengambil sampel. Sampel tanah dari 3 titik tersebut diambil sebanyak ± 2 kg dan diaduk dalam ember. Kemudian sebagian diambil dan disimpan dalam *falcon tube* 50 ml yang telah diberi label. Sampel tanah disimpan dalam lemari pendingin hingga

dapat digunakan untuk analisa mikrobial. Adapun peta lokasi pengambilan sampel tanah dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2.



*Keterangan : MS (Muara Sepakau) ; TB (Teluk Balikpapan) ; GJ (Gresik Jenebora)

Gambar 1. Peta Lokasi Pengambilan Sampel di Teluk Balikpapan



*Keterangan : DM (Delta Mahakam)

Gambar 2. Peta Lokasi Pengambilan Sampel di Delta Mahakam

2.3.2 Pembuatan Media

A. Pembuatan Media YEMA

Media yang digunakan dalam pembuatan media ialah media selektif yaitu YEMA. Pembuatan media YEMA (*Yeast Extarct Mannitol Agar*) dengan tingkat aseptis yang tinggi guna menghindari kontaminasi pertumbuhan dari fungi, cawan petri yang digunakan untuk tempat media di oven dengan suhu 150 °C selama 2 jam, selanjutnya cawan yang telah di oven dimasukkan ke LAF lalu nyalakan sinar UV. Adapun prosedur pembuatan YEMA dengan komposisi 250 ml aquades sebagai berikut :

Menimbang *Yeast Extarct* sebanyak 0,25 gram, *Mannitol* 2,5 gram, *Depotasium phosphate* ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$) 0,125 gram, *NaCl* (*natrium chloride*) 0,025 gram, *MgSO₄·7H₂O* (*magnesium sulphate heptahydrate*) 0,05 gram, *CaCO₃* (*Calcium carbonate*) 0,25 gram, Agar 5 gram. Bahan yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Kemudian dituangkan 250 ml aquades pada erlenmeyer dan dipanaskan diatas *hot plate stirrer* hingga mendidih sambil diaduk dengan *magnet stirrer* sampai homogen. Setelah homogen kemudian ditutup menggunakan aluminium foil, dan dimasukkan dalam autoclaf untuk disterilkan pada suhu 121 °C selama 15 menit. Sebagian media dituang secara aseptik ke dalam cawan Petri steril, digoyang/geser hingga permukaan media merata, dan didiamkan hingga mengeras lalu di *wrapping*. Terakhir, Masukkan ke box yang telah disterilkan

B. Pembuatan Media YEMA + Congo Red (CR)

Pembuatan media selektif pada aquades 250 ml yaitu dengan cara menimbang *Yeast Extarct* sebanyak 0,25 gram, *Mannitol* 2,5 gram, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (*Depotasium phosphate*) 0,125 gram, *NaCl* (*natrium chloride*) 0,025 gram, *MgSO₄·7H₂O* (*magnesium sulphate heptahydrate*) 0,05 gram, *CaCO₃* (*Calcium carbonate*) 0,25 gram, Agar 5 gram. Setelah homogen lalu *Congo red* (CR) yang ditambahkan sebanyak 0,025 g, (Dini et al., 2020).

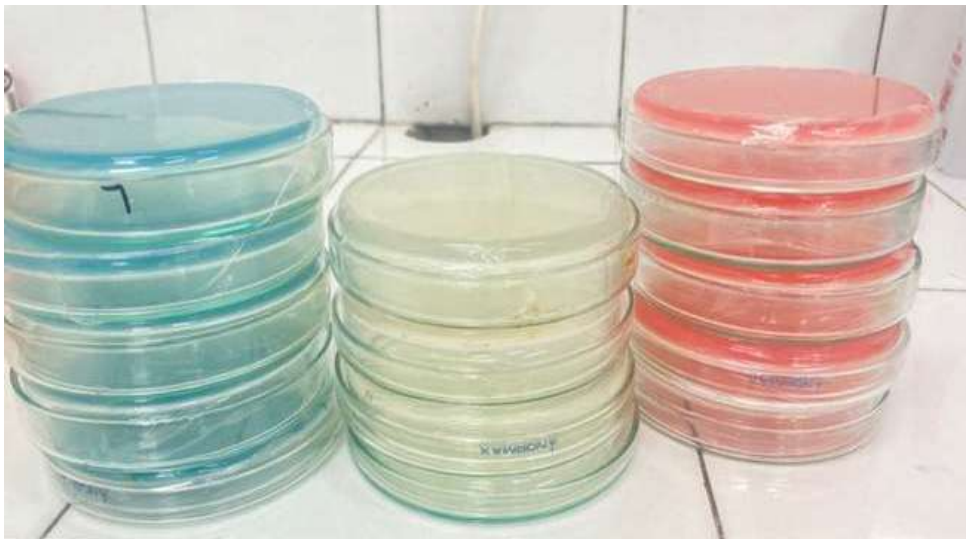
- a. Menyerap *congo red*
 - Media diinkubasikan selama 3 hari
 - Setiap koloni dipindahkan ke sub kultur media YEMA dan diinkubasikan selama 3 hari
 - Memindahkan ke agar miring YEMA di tabung, 2 ulangan (1 nya untuk pengujian selanjutnya dan 1 lagi disimpan sebagai stok)
- b. Tidak menyerap *congo red*
 - Media isolate diinkubasikan selama 3-5 hari (apabila koloni tumbuh maka tergolong ke dalam bakteri pertumbuhan cepat) Jika belum tumbuh koloni, maka diinkubasikan lagi hingga paling lama 9 hari (tergolong bakteri yang lambat tumbuh) dan apabila belum tumbuh juga maka harus diulang

C. Pembuatan Media Yema + Bromothymol Blue (BTB)

Pembuatan media selektif pada aquades 250 ml yaitu dengan cara menimbang *Yeast Extarct* sebanyak 0,25 gram, *Mannitol* 2,5 gram, *Depotasium phosphate* ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$) 0,125 gram, *NaCl* (*natrium chloride*) 0,025 gram, *MgSO₄·7H₂O*

(*magnesium sulphate heptahydrate*) 0,05 gram, CaCO_3 (*Calcium carbonate*) 0,25 gram, agar 5 gram. Setelah homogen lalu BTB ditambahkan sebanyak 0,1 ml dalam 250 ml media YEMA (Dini et al., 2020). Selanjutnya dilakukan identifikasi bakteri pada media uji YEMA+ *bromothymol blue* (BTB) Melakukan pengamatan genus dengan melihat ciri dari koloni, menentukan kecepatan pertumbuhan dari koloni, menentukan pH dari koloni yaitu dengan asam (biru) dan basa (kuning). Memindahkan koloni ke sub kultur media YEMA dan di inkubasi selama 3-5 hari atau 9 hari. Memindahkan ke agar miring YEMA di tabung, 2 ulangan (1 nya untuk pengujian selanjutnya dan 1 lagi disimpan sebagai stok).

Media selektif mengandung bahan-bahan kimia atau zat-zat tertentu yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri tertentu sementara membiarkan bakteri target tumbuh. Ini membantu dalam pemisahan dan pemurnian bakteri dari campuran mikroorganisme lainnya. Hasil dari pembuatan 3 media selektif dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil Pembuatan Media YEMA + BTB (kiri), Media YEMA (Tengah), Media YEMA + CR (kanan)

Pada umumnya, karakterisasi isolat bakteri dilakukan dengan berbagai metode yang mencakup pengamatan morfologi koloni, uji biokimia, serta pengujian resistensi atau sensitivitas terhadap antibiotik dalam artian memiliki aktivitas antimikroba menghambat (Zulkifli et al., 2016). Karakterisasi isolat dilakukan dengan menggunakan media selektif yang telah dimodifikasi dengan penambahan pewarna sebagai indikator. Dalam konteks ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Somasegaran & Hoben, (1978) menguraikan beberapa hal terkait dengan pewarna BTB (*Bromothymol Blue*) yang digunakan sebagai indikator untuk melihat kecepatan pertumbuhan dan CR (*Congo Red*) untuk menguji kemurnian isolat bakteri *Rhizobium*.

D. Pembuatan Media SIM

Media SIM adalah media semisolid untuk melihat produksi sulfid, pembentukan indole, dan pergerakan bakteri. Medium SIM dibuat dengan cara menimbang 10 gram trypton, 0,1 gram ferrous ammonium sulphate, 0,2 gram sodium thiosulphate, dan 1,75 gram agar. Medium dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer dan tambahkan aquades steril 500 ml. Medium diaduk hingga homogen dan dipanaskan hingga mendidih. Medium dimasukkan ke dalam tiap tabung reaksi sebanyak 7 ml dan tutup dengan sumbat. Medium disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C, tekanan 2 atm selama 15 menit (Azizah, 2016).

2.3.3 Isolasi Bakteri Penambat Nitrogen dari Sampel Tanah

Isolasi dilakukan dengan cara pengenceran bertingkat menggunakan perbandingan berat sampel dengan volume tabung pertama adalah 1 : 9, diambil 1 ml dari tabung 10^{-1} dengan pipet ukur kemudian dipindahkan ke tabung 10^{-2} secara aseptis kemudian dihomogenkan dengan bantuan vortex. Pemindahan dilanjutkan hingga tabung pengenceran terakhir dengan cara yang sama. Hal yang perlu diingat bahwa pipet ukur yang digunakan harus selalu diganti, artinya setiap tingkat pengenceran digunakan pipet ukur steril yang berbeda/baru. Prinsipnya bahwa pipet tidak perlu diganti jika memindahkan cairan dari sumber yang sama, untuk cara tebar atau sebar pemindahan 0,1 ml kultur bakteri secara aseptis ke permukaan media YEMA dalam cawan petri, dengan menggunakan *spreader* yang dibakar yang telah di celupkan dalam alkohol, selanjutnya di sebar secara merata di media sampai mengering, dan bandingkan setiap pengenceran. Untuk teknik ini merupakan lanjutan dari pengenceran bertingkat.

Pengambilan suspensi dapat diambil dari pengenceran mana saja tapi biasanya untuk tujuan isolasi (mendapatkan koloni tunggal) diambil beberapa tabung pengenceran terakhir (pengenceran 10^{-4} ; 10^{-5} ; dan 10^{-6}). Koloni yang tumbuh pada setiap pengulangan pengenceran kemudian dibandingkan. Penentuan besarnya atau banyaknya tingkat pengenceran tergantung kepada perkiraan jumlah mikroba dalam sampel. Digunakan perbandingan 1 : 9 untuk sampel dan pengenceran pertama dan selanjutnya, sehingga pengenceran berikutnya mengandung 1/10 sel mikroorganisme dari pengenceran sebelumnya (Mayasari, 2020).

2.3.4 Penghitungan Jumlah Koloni Bakteri (Duplo)

Penghitungan jumlah koloni dilakukan secara duplo (dua kali pengulangan). agar dapat menilai galat percobaan (*eksperimental error*) atau keragaman bahan percobaan. Cara perhitungan *Total Plate Count* (TPC) (SNI 2897:2008) yaitu :

TPC :

- Jika jumlah koloni lebih dari 25-250 dianggap TBUD (tak bisa untuk dihitung) atau TNTC (*too numerous to count*)

- Jika semua ulangan TBUD maka pengenceran harus dinaikkan 2 Pengulangan (10^{-9})

2.3.5 Pemurnian Bakteri

Prosedur pemurniaan bakteri dilakukan dengan mengambil satu koloni bakteri yang ingin dimurnikan menggunakan jarum ose yang telah disterilisasi dengan metode cawan gores. Penggoresan yang sempurna akan menghasilkan koloni yang terpisah. Cara penggoresan dilakukan pada medium pembiakan padat bentuk lempeng (Suharman, 2020). Bakteri digores ke bagian tengah media YEMA dengan bentuk zigzag. Panaskan kembali bibir cawan petri, kemudian ditutup dan direkatkan menggunakan *plastic wrap* untuk mencegah terjadinya kontaminasi, mengamati bakteri selama 3 hari. Koloni tunggal diperoleh dengan metode gores kuadran (*Streak quadrant*) dengan tujuan mendapatkan biakan murni. Cara ini dilakukan dengan membagi cawan petri menjadi 4 bagian dan masing-masing bagian merupakan pengenceran dari streak sebelumnya (Seprianto, 2017).

2.3.6 Pengamatan Makroskopis Koloni Bakteri

Karakterisasi makroskopis bakteri dilakukan dengan pengamatan morfologi koloni bakteri. Prosedur kerja diawali dengan menyemprotkan alkohol 70% ke tangan, kemudian mengamati ukuran, bentuk, warna, tepi dan elevasi koloni bakteri. Pengambilan gambar koloni merupakan tahap setelah pengamatan morfologi selesai. Pengambilan gambar isolat menggunakan kamera dengan bantuan. Pengamatan karakter makroskopis menggunakan *e-Book* Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Dasar Laboratorium Mikrobiologi (Soedirman, 2008) yang meliputi warna, bentuk, tepian, elevasi dan struktur permukaan

Bentuk koloni terdiri bentuk bulat, tak teratur, seperti akar dan filament. Tipe koloni bakteri terdiri dari tipe koloni utuh, halus, berombak, dankal, dan berombak dalam. Warna dari koloni bakteri yang tumbuh terdiri dari kuning, merah, dan putih. Elevasi koloni bakteri terdiri dari rata, cembung rendah, dan cembung tinggi. Struktur permukaan koloni bakteri yakni halus dan kasar.

2.3.7 Karakterisasi Isolat Bakteri Penambat Nitrogen Simbiotik & Non Simbiotik

Penggunaan indikator pewarna seperti *congo red* dan *bromothymol blue* dalam media YEMA memungkinkan identifikasi awal kemampuan fiksasi nitrogen dan pengelompokan bakteri penambat nitrogen secara cepat dan sederhana. Metode ini sangat berguna dalam skrining dan seleksi isolat bakteri penambat nitrogen yang potensial. Jika *congo red* terserap oleh koloni, menandakan bakteri tersebut adalah bakteri penambat nitrogen non-simbiotik. Jika *congo red* tidak terserap, menandakan bakteri tersebut adalah bakteri penambat nitrogen simbiotik. Selanjutnya pemurnian bakteri Non-simbiotik dilakukan pada media YEMA+BTB dan bakteri simbiotik dimurnikan pada media YEMA. Isolat yang tumbuh di media YEMA + BTB berwarna kuning (asam) dan biru (basa).

2.3.8 Karakterisasi Morfologi Bakteri Penambat Nitrogen

A. Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram merupakan cara yang efektif untuk klasifikasi dalam menentukan beberapa kelompok organisme. Hasil pewarnaan mencerminkan perbedaan dasar dan kompleks pada sel bakteri (struktur dinding sel), sehingga dapat membagi bakteri menjadi 2 kelompok, yaitu bakteri Gram-positif dan bakteri Gram-negatif (Fatmariza et al., 2017).

Pewarnaan Gram merupakan salah satu metode pewarnaan yang digunakan dalam mikrobiologi untuk membedakan jenis bakteri berdasarkan sifat dinding sel bakteri ini. Dalam proses ini, empat jenis larutan diperlukan (Kurniati et al., 2018) :

- a. Larutan Zat Warna Basa (*Crystal Violet* atau *Methyl Violet*): Larutan ini digunakan sebagai pewarna utama yang memberikan warna pada sel-sel bakteri.
- b. *Mordant*: *Mordant* adalah zat tambahan yang meningkatkan afinitas atau pengikatan antara sel dan zat warna. Beberapa contoh mordant yang dapat digunakan dalam pewarnaan Gram termasuk asam, basa, garam logam, dan yodium. Mordant membantu zat warna untuk lebih sukar tercuci dari sel-sel bakteri.
- c. Pencuci Zat Warna (Alkohol atau Aseton): Larutan pencuci zat warna digunakan untuk menghilangkan zat warna dari sel bakteri. Beberapa sel bakteri lebih mudah melepaskan zat warna daripada sel-sel lainnya. Pencucian ini akan membedakan bakteri berdasarkan sifat dinding sel bakteri ini.
- d. Zat Warna *Counterstain*: Setelah pencucian, digunakan zat warna kedua yang disebut *counterstain*. *Counterstain* memiliki warna yang berbeda dari zat warna pertama. Sel-sel yang tidak dapat segera melepaskan zat warna setelah pencucian akan tetap berwarna seperti zat warna pertama. Sementara itu, sel-sel yang dapat segera melepaskan zat warna setelah pencucian akan mengikat zat warna kedua.

Empat jenis larutan tersebut dikombinasikan sehingga dengan pewarnaan Gram dapat membedakan bakteri menjadi dua kelompok utama, yaitu Gram-positif dan Gram-negatif, berdasarkan sifat dinding sel bakteri ini dan kemampuan melepaskan zat warna selama proses pewarnaan. Gram-positif biasanya tetap berwarna violet, sementara Gram-negatif akan berubah menjadi warna kontras setelah penggunaan counterstain.

Pewarnaan Gram merupakan prosedur yang paling umum digunakan dalam mikrobiologi untuk mencirikan banyak jenis bakteri. Dengan melakukan pewarnaan Gram diperoleh informasi penting berupa morfologi sel bakteri, termasuk sifat Gram-positif atau Gram-negatif, bentuk sel, dan penataan sel (NauE et al., 2022). Prosedur pewarnaan gram mengacu pada penelitian yang dilakukan (Suarjana et al., 2017) yaitu mengambil satu ose bakteri selulolitik digoreskan pada *object glass*, pertama diberi larutan kristal violet selama 1 menit, iodine selama 1 menit, etanol 95% selama 30 detik, dan safranin selama 1 menit, kemudian diamati biakan bakteri dibawah

mikroskop. Pengamatan dilakukan terhadap bentuk dan warna bakteri gram negatif menunjukkan warna merah muda, maka bakteri gram positif akan mempertahankan warna ungu dari kristal violet dan terlihat berwarna ungu saat diamati di bawah mikroskop. Hal ini merupakan salah satu karakteristik penting dalam mengidentifikasi dan membedakan bakteri gram positif dan gram negatif. (Fajrin., 2017).

B. Pewarnaan Endospora

Endospora berfungsi melindungi bakteri dari suhu tinggi. Pada pewarnaan endospora, reagen yang digunakan adalah malachite green dan safranin sebagai pewarnaspora (Buchanan dan Gibbons, 2003 ; Muthmainnah, 2018). Bakteri membentuk spora atau endospora untuk mempertahankan dirinya. misalnya ketika nutrisi yang dibutuhkan tidak ada atau ketika lingkungan berubah menjadi ekstrem sehingga dapat menyebabkan bakteri mati. Bakteri kemudian membentuk endospora yang merupakan sel tidak aktif, namun sangat resisten.

Metode Schaeffer-Fulton dapat membedakan keberadaan endospora dan sel vegetatif dalam suatu kultur bakteri. Hal ini sangat penting dalam identifikasi dan karakterisasi bakteri, terutama yang memiliki kemampuan membentuk endospore (Muthmainnah, 2018). Adapun cara pewarnaan endospora menggunakan metode Schaeffer-Fulton (Rindita, 2021) :

- a. Kaca objek dibersihkan dengan kapas alkohol.
- b. Jarum ose dipanaskan ujungnya hingga berwarna merah.
- c. Sebuah suspensi bakteri diambil dengan menggunakan ose yang telah dipanaskan
- d. Suspensi diratakan di kaca objek dengan gerakan berputar dari tengah melebar keluar.
- e. Sediaan dikeringkan lalu direkatkan dengan melayangkan di atas nyala api 2–3 kali.
- f. Preparat direkatkan smear pada rak pengecatan lalu tetesi 2-3 tetes *malachite green* 5% dan biarkan selama 1 menit, lalu panaskan di atas nyala lampu spiritus selama setengah menit atau kira-kira sampai timbul uap, jangan sampai mendidih lalu dinginkan.
- g. Preparat dicuci dengan air mengalir lalu tiriskan.
- h. Preparat ditetesi dengan cat safranin selama 1 menit.
- i. Preparat dicuci dengan air mengalir lalu tiriskan.
- j. Preparat dikeringkan menggunakan kertas serap untuk menyerap air pada permukaan.
- k. Preparat diamati dengan mikroskop

2.3.9 Karakterisasi Fisiologi Bakteri Penambat Nitrogen

A. Uji Katalase

Uji katalase bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memproduksi enzim katalase, yang nantinya akan menrlisir efek toksik hydrogen peroksida.

Katalase adalah enzim yang dapat mengkatalis penguraian hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi air (H_2O) dan gas oksigen (Dewi, 2013).

Adapun pengujian bakteri dengan metode Uji Katalase ialah (Lasmini et al., 2022) :

- a. Kaca objek ditaruh lalu ditetesi satu tetes H_2O_2 3%
- b. Koloni bakteri ditambahkan dan penguraian hidrogen peroksida langsung diamati.
- c. Menentukan hasil, apabila menghasilkan enzim katalase yang ditandai dengan terbentuknya gelembung udara maka dinyatakan positif dan negatif bila tidak ada gelembung udara. Ini terjadi karena bakteri tersebut apabila ditambahkan hydrogen peroksida menghasilkan peroksida.

B. Uji SIM

Media SIM (*Sulfid Indol Motility*) digunakan dalam laboratorium mikrobiologi klinis maupun lingkungan untuk mengetahui profil biokimia dan fisiologi bakteri, yang berguna dalam proses identifikasi dan klasifikasi bakteri. Lebih lanjut Sahiba et al., (2024) menyebutkan bahwa media SIM ialah media semi padat dapat menguji tiga sifat penting bakteri secara bersamaan yaitu H_2S , Indol, dan pergerakan bakteri. Sehingga dapat membantu identifikasi dan karakterisasi bakteri dengan lebih efisien.

Adapun pengujian bakteri dengan metode Uji SIM ialah (Suarjana et al., 2017) :

- a. Satu ose jarum bakteri ditanam secara tegak lurus di tengah Medium SIM (*Sulfid Indol Motility*) dengan cara menusukkannya.
- b. Media SIM diinkubasi pada suhu $37^\circ C$ selama 24 jam. Jika koloni tumbuh menyebar dan kekeruhan seperti kabut muncul, hal ini menandakan bakteri bergerak (Uji Motil).
- c. Media SIM ditambahkan dengan *reagen covac's* sebanyak 1-2 tetes kedalam media.
- d. Indol positif terbentuk cincin merah pada permukaan media, sedangkan apabila terjadi kekeruhan media ditempat tusukan ose, maka hal itu menunjukkan indol negative (uji indol).
- e. Produksi H_2S yang ditunjukkan oleh media berwarna hitam (Uji sulfide).