

ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PENAMBAT NITROGEN INDIGENOUS POTENSIAL SEBAGAI PUPUK HAYATI DALAM REMEDIASI LAHAN BEKAS TAMBANG BATU KAPUR

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PROSPECTIVE INDIGENOUS NITROGEN FIXING BACTERIA USE AS BIOFERTILIZER IN REMEDIATION OF POST-MINING LIMESTONE QUARRY

Mashudi¹⁾ dan Nisa Rachmania Mubarik²⁾

¹⁾Departemen Teknik Lingkungan, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya 60111, Indonesia

²⁾Departemen Biologi, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680, Indonesia

^{*)}E-mail: mashudi1993@its.ac.id

Abstrak

Lahan bekas pertambangan umumnya memiliki struktur fisik dan kimia yang kurang optimum untuk pertumbuhan tanaman. Bakteri tanah indigenous dapat digunakan untuk membantu proses remediasi lahan bekas pertambangan dengan cara dimanfaatkan sebagai pupuk hayati. Bakteri penambat nitrogen merupakan salah satu bakteri yang dapat membantu mempercepat remediasi tanah karena memiliki kemampuan memperkaya kandungan nitrogen dalam tanah. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan melakukan karakterisasi bakteri penambat nitrogen dari tanah bekas tambang batu kapur di wilayah Cirebon, Jawa Barat. Isolasi bakteri dilakukan terhadap 13 sampel yang berasal dari area sekitar lahan bekas tambang batu kapur. Hasil isolasi diperoleh 6 isolat bakteri penambat nitrogen hidup bebas dan 2 isolat bakteri penambat nitrogen simbiosis. Seluruh isolat memiliki kemampuan menghasilkan Indole-3-acetic acid (IAA) jika ditambahkan 1 mM L-tryptofan. Dua isolat dipilih (7B21Y dan 5A22) berdasarkan ciri morfologi sel dan koloni untuk dilakukan pengujian fisiologis. Aktivitas nitrogenase isolat 7B21Y dan 5A22 diukur dengan menggunakan Pengujian Reduksi Asetilen dan diperoleh masing-masing 7.09 ppm dan 5.59 ppm. Isolat 7B21Y kemudian diidentifikasi secara fisiologi menggunakan kit API dan diketahui memiliki kemiripan 99.9% dengan *Rhizobium radiobacter*.

Kata kunci: Bakteri penambat nitrogen, Remediasi tanah, Lahan bekas tambang, Pupuk hayati

Abstract

Post-mining sites typically exhibit suboptimal physical and chemical properties for plant growth. Indigenous soil bacteria represent a viable approach for facilitating the remediation of post-mining lands through their utilization as biofertilizers. Notably, nitrogen-fixing bacteria stand out among these microorganisms due to their capacity to enhance soil nitrogen content. This study aims to isolate and characterize nitrogen-fixing bacteria from post-mining limestone quarry in the Cirebon, West Java. The bacterial isolation targeted 13 soil samples from former limestone mining sites, resulted in 6 isolates of free-living nitrogen-fixing bacteria and 2 isolates of symbiotic nitrogen-fixing bacteria. All isolates exhibited the ability to produce Indole-3-acetic acid (IAA) when supplemented with 1 mM L-tryptophan. Subsequent to morphological characterization, two isolates, namely 7B21Y and 5A22, were selected for further physiological testing. Nitrogenase activity for isolates 7B21Y and 5A22 was quantified utilizing the Acetylene Reduction Assay, yielding values of 7.09 ppm

and 5.59 ppm, respectively. Isolate 7B21Y underwent additional physiological identification using the API kit, revealing a 99.9% similarity with *Rhizobium radiobacter*.

Keywords: Nitrogen-fixing bacteria, Soil Remediation, Post-mining soil, Biofertilizer

1. PENDAHULUAN

Pada umumnya, lahan bekas tambang memiliki sifat fisik dan kimia yang kurang optimum untuk pertumbuhan tanaman (Arifin, Hamidah, Hatta, & Razie, 2018). Sebagai contoh, penambangan batu kapur menggunakan alat berat mengakibatkan pemadatan tanah, penurunan permeabilitas, porositas, dan kapasitas air pada tanah (Edache & Mallo, 2019). Selain itu, lahan bekas tambang juga mengalami kekurangan unsur hara penting seperti nitrogen, kalium, dan fosfat dalam bentuk tersedia (Subowo 2011). Hilangnya lapisan tanah pucuk (*topsoil*) akibat penambangan menyebabkan tanah kehilangan lapisan organik yang sangat penting untuk pertumbuhan tanaman (Ganapathi & Phukan, 2020).

Pemulihan atau remediasi lahan bekas tambang perlu dilakukan untuk mengembalikan fungsi ekologis dan fungsi lingkungan dari lahan tersebut. Usaha remediasi tanah tambang ini dapat dipercepat dengan mengintroduksi atau mengembangkan mikroba *indigenous* seperti mikoriza, bakteri penambat nitrogen, bakteri pelarut fosfat, dan bakteri penghasil hormon tumbuh. Selanjutnya, kualitas tanah yang sudah baik akan mendukung pertumbuhan vegetasi yang umum ditanam pasca-tambang seperti tanaman lamtoro, akasia, sengon, dan tanaman jenis legum lainnya (Novo, Castro, Alvarenga, & da Silva, 2018). Adanya bakteri dan tanaman legum yang tumbuh secara alami akan memulihkan sifat fisik dan kimia tanah sehingga pemulihan ekosistem dapat terwujud (Kumari & Maiti, 2022). Selain itu, pulihnya kesuburan tanah juga dapat dimanfaatkan untuk kegiatan pertanian, peternakan, atau sebagai ruang hijau.

Kelompok bakteri yang dapat memacu pertumbuhan tanaman tersebut dikenal dengan istilah PGPR (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) yang meliputi bakteri penambat

nitrogen, bakteri pelarut fosfat, dan bakteri penghasil hormon tumbuh (Novo et al., 2018). Bakteri penambat nitrogen berperan menyediakan sumber nitrogen yang dapat diserap oleh tanaman. Bakteri jenis ini mampu memfiksasi nitrogen bebas (N_2) dan mengubahnya menjadi NH_3 (amonia) sehingga dapat diserap tanaman. Nitrogen merupakan unsur hara makro bagi tanaman karena berperan penting untuk metabolisme protein, basa nitrogen, dan berbagai senyawa lain turunan protein. Nitrogen juga berperan penting dalam berbagai reaksi metabolisme dan penyusunan struktur sel tanaman (Madigan et al. 2012).

Bakteri penambat nitrogen dapat hidup secara bebas atau bersimbiosis dengan tanaman. Contoh bakteri yang dapat bersimbiosis dengan tanaman legum adalah *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, dan *Sinorhizobium*. Jika diproduksi sebagai pupuk hayati, kelompok bakteri ini cocok diterapkan untuk kelompok tanaman Legum dan umumnya akan membentuk struktur simbiosis berupa bintil akar (Franché, Lindström, & Elmerich, 2009). Sementara itu, bakteri penambat nitrogen yang hidup bebas, seperti *Azospirillum*, *Azotobacter*, dan *Pseudomonas* dapat diterapkan untuk tanaman secara umum (Jalal et al., 2022). Salah satu masalah penting dalam aplikasi bakteri sebagai pupuk hayati ialah tingkat kompetisinya yang tinggi dengan bakteri asli yang hidup di tanah tersebut. Oleh karena itu, masalah ini dapat diatasi dengan mengembangkan pupuk hayati yang menggunakan bakteri *indigenous*.

2. METODE

2.1 Isolasi Bakteri Penambat Nitrogen Simbiosis dengan Metode *Trapping*

Media pasir putih dalam botol selai yang telah disterilkan dengan autoklaf (suhu 121 °C, tekanan 1 Atm selama 10 menit) disiram dengan larutan hara bebas nitrogen Ahmed-Evans steril hingga membasahi permukaan pasir. Biji

kedelai yang telah disterilkan ditanam di dalam media pasir putih tersebut. Sampel tanah sebanyak 1 gram disuspensikan ke dalam garam fisiologis (NaCl 0.85%) 9 mL. Suspensi tanah diinokulasikan ke dalam media pasir putih yang telah ditanami biji kedelai. Tanaman kedelai disiram menggunakan hara Ahmed-Evans bebas nitrogen selama 2 hari sekali selama 5 minggu hingga diamati bintil akar. Tanaman kedelai yang berhasil membentuk bintil akar diambil bintilnya dan diisolasi menggunakan media YMA (*Yeast Mannitol Agar*).

2.2 Isolasi Bakteri Penambat Nitrogen Hidup Bebas

Sampel tanah 1 g dimasukkan ke dalam media Nfb (asam malat 5 g; KH_2PO_4 0.5 g; NaCl 0.1 g; CaCl_2 0.02 g; KOH 4.5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g; H_3BO_3 0.56 mg; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.04 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.47 mg; biotin 1 mL; Fe EDTA 0.066 g; BTB 0.01 g, pH 5.8; NH_4Cl 1.25 g untuk 1000 mL Nfb) semipadat dengan pewarna BTB (*bromtimol blue*) untuk mendapatkan bakteri penambat nitrogen yang hidup bebas (Bastian et al. 1998). Kultur diinkubasi selama 3 hari dan dilihat adanya pelikel putih pada permukaan media. Pelikel yang terbentuk kemudian diisolasi menggunakan media Nfb padat dengan pewarna congo red 0.0025%. Koloni dipilih yang dapat membentuk warna merah pada media, lalu diamati morfologi selnya.

2.3 Uji Produksi IAA (Indole 3-Acetic Acid) Isolat Bakteri

Isolat bakteri penambat nitrogen diuji kemampuannya menghasilkan IAA. Isolat ditumbuhkan selama 3 hari pada media YMB/Nfb cair, dengan dan tanpa penambahan 1 mM L-triptofan kemudian disentrifuse dengan VWR Galaxy 16D. Sebanyak 750 μL kultur diambil dan disentrifuse 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil sebanyak 500 μL , direaksikan dengan reagen salkowsky 2 mL dan diinkubasi selama 20 menit. Hasil inkubasi kemudian dianalisis menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 520 nm.

2.4 Uji Hipersensitivitas pada Tanaman Tembakau

Uji hipersensitivitas digunakan untuk mengetahui sifat patogen bakteri terhadap tanaman. Isolat bakteri dikulturkan pada media YMB/Nfb cair hingga OD mencapai 0.6-0.8 pada panjang gelombang 620 nm. Sebanyak 1 mL kultur setiap isolat disuntik menggunakan *syringe* ke daun tembakau sebanyak tiga ulangan. Sebagai kontrol positif menggunakan kultur bakteri *Xanthomonas oryzae*, sedangkan sebagai kontrol negatifnya menggunakan akuades steril. Setelah 2 hari penyuntikkan dilihat terjadinya nekrosis pada daun tembakau (Harca 2015).

2.5 Uji Reduksi Asetilen

ARA (*Acetylene Reduction Assay*) atau Uji Reduksi Asetilen digunakan untuk mengetahui aktivitas enzim nitrogenase pada isolat. Dua isolat dipilih untuk diuji aktivitas nitrogenasenya yaitu isolat 7B21Y dan 5A22. Masing-masing isolat ditumbuhkan pada media YMA dan Nfb semisolid selama satu minggu. Sebanyak 1 mL udara pada tabung kultur diambil dan digantikan dengan gas asetilen. Inkubasi dilakukan selama satu jam, kemudian diambil 0.1 mL udara untuk dianalisis gas etilennya menggunakan metode kromatografi gas (Hitachi 263-50). Pengukuran aktivitas nitrogenase dengan menggunakan alat kromatografi gas ini merujuk pada metode yang dilakukan Gibson dan Turner (1980).

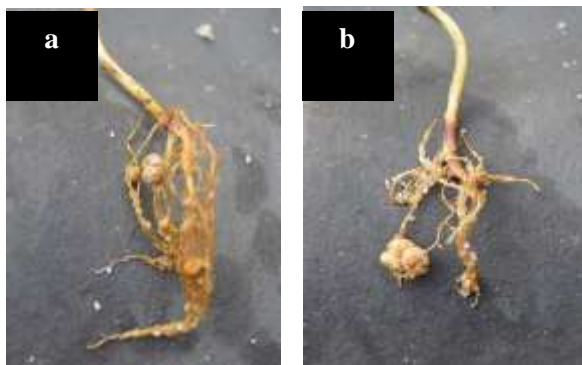
2.6 Identifikasi Fisiologi dengan Kit API 20 NE

Satu isolat paling potensial dipilih untuk dilakukan identifikasi fisiologis yaitu isolat 7B21Y. Isolat ditumbuhkan pada media YMA dan Nfb padat selama 5 hari. Isolat diambil 2-3 ose dan dimasukkan ke garam fisiologis 0.85% dan di vortex. Suspensi yang berisi isolat dimasukkan ke dalam kantung uji pada kit API 20 NE dan diamati setelah 24 dan 48 jam inkubasi. Hasil pengamatan dianalisis menggunakan perangkat lunak APIWEB untuk menentukan spesies bakteri yang diamati.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Isolasi Bakteri Penambat Nitrogen Simbiosis dengan Metode *Trapping*

Isolasi bakteri simbiosis dari 13 sampel tanah berhasil dilakukan dan diperoleh 2 sampel yang menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan munculnya bintil akar pada tanaman kedelai seperti tampak pada Gambar 1. Dua sampel tanah tersebut adalah sampel tanah 7B dan 5A yang masing-masing berasal dari area reklamasi yang ditumbuhi tanaman akasia dan legum.



Gambar 1. Bintil akar yang terbentuk setelah 5 minggu penanaman kedelai, a) bintil dari sampel tanah 7B dan b) bintil dari sampel tanah 5A



Gambar 2. Morfologi isolat bakteri penambat nitrogen non-simbiosis

Bintil akar yang ada kemudian dibawa ke laboratorium untuk mengisolasi bakteri yang tumbuh di dalamnya. Hasil isolasi menggunakan media YMA berhasil memperoleh dua isolat murni yaitu 7B21Y dan 5A41Y. Kedua isolat memiliki karakter Gram negatif dan bentuk sel batang. Dilihat dari morfologi koloninya, isolat 7B21Y memiliki warna putih, elevasi cembung,

dan tepian licin sedangkan isolat 5A41Y membentuk koloni berning, elevasi datar, dan tepian licin. Contoh bentuk koloni isolat bakteri ditampilkan pada Gambar 2. Karakter morfologi ini serupa dengan hasil isolasi yang dilakukan oleh (Wagh, Shermale, & Mahure, 2015).



Gambar 3. Morfologi bakteri penambat nitrogen simbiosis ditumbuhkan pada media YMA

Menurut Ghosh *et al.* (2014), bakteri penambat nitrogen yang mampu menodulasi akar dapat ditemukan di tanah sekitar perakaran tanaman legum. Bakteri yang diisolasi dari tanah lokal memiliki kemampuan adaptasi yang tinggi sehingga berpotensi untuk dijadikan pupuk hayati khusus untuk lahan marginal. Bakteri simbiosis umumnya akan membentuk bintil akar yang nantinya akan menjadi habitat tumbuh bakteri tersebut. Simbiosis mutualisme akan terjalin dimana tanaman akan menyediakan tempat hidup yang aman dan nutrisi berupa gula serta air, sedangkan bakteri akan membantu menyediakan sumber nitrogen bagi tanaman (Peix, Ramírez-Bahena, Velázquez, & Bedmar, 2015).

3.2 Isolasi Bakteri Penambat Nitrogen Hidup Bebas (Non-Simbiosis)

Sebanyak 6 isolat bakteri penambat nitrogen bebas didapatkan dari 13 sampel tanah yang diisolasi menggunakan media Nfb semisolid (agar-agar 0.0175%). Isolat kemudian ditumbuhkan pada media Nfb padat (agar-agar 0.15%) dengan penambahan *congo red* 0.0025%. Isolat yang telah tumbuh dilihat morfologi koloninya yang tampak berwarna merah, elevasi datar, dan sebagian besar

permukaannya licin seperti ditunjukkan pada Gambar 3. Isolat bakteri baik yang simbiosis maupun yang non-simbiosis memiliki karakter morfologi yang beragam, tetapi semua isolat merupakan Gram negatif (Baldani, Reis, Videira, Boddey, & Baldani, 2014; Wagh *et al.*, 2015). Hasil karakterisasi morfologi seluruh isolat disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Morfologi isolat bakteri penambat nitrogen

Kode isolat	Konsentrasi IAA (ppm)	
	(-) L-triptofan	(+) L-triptofan
	1mM	1mM
7B21Y	3.08	52.73
5A41Y	3.78	65.15
7B21	13.11	22.27
1B21	11.28	18.43
7A31	3.59	26.17
7A32	17.76	26.98
5A22	1.06	34.51
5A21	0.00	24.75

3.3 Uji Produksi IAA Isolat Bakteri

Delapan isolat bakteri yang diuji semuanya memiliki kemampuan memproduksi IAA dengan dan tanpa penambahan prekursor L-triptofan 1 mM kecuali isolat 5A21 yang tidak menghasilkan IAA tanpa L-triptofan 1 mM. Produksi IAA setiap isolat dihitung berdasarkan kurva standar IAA yang telah dibuat dan data hasil pengukuran menggunakan spektrofotometer. Konsentrasi IAA tertinggi tanpa penambahan 1mM L-triptofan dihasilkan oleh isolat 7A32 yaitu sebesar 17.16 ppm dan isolat 5A41Y sebesar 65.151 ppm pada media dengan tambahan 1mM L-triptofan sebagaimana ditampilkan pada Tabel 2.

Menurut Janczarek *et al.* (2014) genus *Rhizobium* memproduksi berbagai senyawa untuk menginisiasi pembentukan bintil akar dan berinteraksi dengan inangnya, salah satu senyawa yang diproduksi ialah *Indole3-Acetic acid* (IAA). Bakteri penambat nitrogen yang tidak bersimbiosis seperti *Azospirillum* juga mampu memproduksi senyawa IAA karena

memiliki enzim *aromatic amino acid aminotransferase* (Pedraza *et al.* 2004). Selain itu, tanaman dapat menstimulasi bakteri untuk memproduksi IAA dalam jumlah banyak. Senyawa IAA dari bintil akar dapat ditranspor ke sel tanaman untuk digunakan dalam mendukung percepatan pertumbuhan tanaman (Da dan Basu 1996).

Tabel 2. Hasil uji produksi IAA isolat bakteri

Kode isolat	Gram	Morfo -logi sel	Morfologi koloni		
			Warna	Elevasi	Tepian
7B21Y	-	basil	putih	cembung	licin
5A41Y	-	basil	bening	datar	licin
7A31	-	kokus	merah muda	timbul	licin
7A32	-	kokus	Kekuningan	timbul	berombak
7B21	-	basil	merah	timbul	licin
1B21	-	koko-basil	merah muda	datar	berombak
5A21	-	basil	merah muda	cembung	licin
5A22	-	basil	merah	timbul	licin



Gambar 4. Hasil uji hipersensitivitas pada daun tembakau setelah 2 hari inokulasi. (a) Kontrol positif dengan *Xanthomonas oryzae* (b) hasil positif isolat 7B32 dan (c) hasil negatif isolat 7B21Y

3.4 Uji Hipersensitivitas pada Tanaman

Uji hipersensitivitas dilakukan untuk mengetahui sifat patogen bakteri terhadap tanaman. Uji ini perlu dilakukan karena isolat bakteri akan digunakan sebagai pupuk hayati yang akan diaplikasikan ke tanaman. Hasil uji hipersensitivitas menggunakan tembakau menunjukkan bahwa isolat 7A32 menyebabkan nekrosis pada daun tembakau, sedangkan 7 isolat lainnya menunjukkan hasil negatif. Hasil tiga kali ulangan isolat 7A32 menunjukkan

terjadinya gejala nekrosis daun yang sama seperti pada kontrol positifnya, yaitu bakteri *Xanthomonas oryzae* seperti ditampilkan pada Gambar 4. Bakteri yang menimbulkan nekrosis bersifat patogen terhadap tanaman dan berpotensi mengganggu bahkan mematikan tanaman, sehingga isolat seperti ini tidak potensial untuk dijadikan pupuk hayati.

Tabel 3. Hasil uji fisiologis identifikasi bakteri menggunakan KIT API 20 NE

Uji biokimia	Hasil reaksi	
	Isolat 7B221Y	Isolat 5A22
Kalium Nitrat (NO ₃)	+	-
L-triptofan (TRP)	-	-
D-glukosa (GLU)	-	+
L-arginin (ADH)	-	-
Urea (URE)	+	+
Esculin ferric sitrat (ESC)	+	+
Gelatin (GEL)	-	-
4-nitrofenil-βD-galaktopiranosit (PNPG)	+	-
D-glukosa (GLU)	+	-
L-arabinosa (ARA)	+	-
D-manosa (MNE)	+	-
D-manitol (MAN)	+	-
N-asetil-glukosamin (NAG)	+	-
D-maltosa (MAL)	+	-
Kalium glukonat (GNT)	-	-
Asam kaprat (CAP)	-	-
Asam adipat (ADI)	-	-
Asam malat (MLT)	+	-
Trisidium sitrat (CIT)	-	-
Asam fenilasetat (PAC)	-	-
Oxidase (OX)	+	-

3.5 Uji Reduksi Asetilen

Dua Isolat dipilih (7B21Y dan 5A22) berdasarkan ciri morfologi koloni, morfologi sel, dan kemampuan produksi IAA untuk dilakukan pengujian aktivitas nitrogenase dan identifikasi fisiologis. Kedua isolat memiliki kemampuan mereduksi asetilen menjadi etilen yang menunjukkan adanya aktivitas nitrogenase pada isolat tersebut. Adanya aktivitas nitrogenase juga menunjukkan kemampuan bakteri dalam menambat nitrogen bebas. Enzim nitrogenase selain mampu mengubah nitrogen

bebas menjadi amonia, juga mampu mereduksi asetilen menjadi etilen karena sama-sama memiliki ikatan rangkap tiga. Asetilen digunakan dalam uji ini karena mudah diperoleh dan hasilnya (etilen) dapat diukur dengan jelas menggunakan kromatografi gas (Gibson and Turner 1980). Aktivitas nitrogenase isolat 7B21Y dan 5A22 masing-masing adalah 7.091 ppm dan 5.589 ppm.

3.6 Identifikasi Fisiologi dengan Kit API 20 NE

Identifikasi secara fisiologi dilakukan menggunakan KIT API 20 NE *bioMérieux*® yang terdiri atas 20 *microtubes* untuk pengujian fisiologis bakteri tanah non-enterik. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna atau tingkat kekeruhan reagen di *microtube* pada masa inkubasi selama 24 dan 48 jam. Hasil uji fisiologis terhadap isolat bakteri 7B21Y dan 5A22 disajikan pada Tabel 4. Hasil pengamatan kemudian dianalisis menggunakan perangkat lunak APIWEB untuk mengetahui spesies bakteri yang diidentifikasi. Berdasarkan hasil identifikasi didapatkan isolat 7B21Y memiliki kemiripan 99.9% dengan *Rhizobium radiobacter*. Sementara itu, isolat 5A22 belum berhasil diidentifikasi menggunakan metode ini.

4. KESIMPULAN

Sebanyak 2 isolat bakteri penambat nitrogen simbiosis dan 6 isolat bakteri penambat nitrogen hidup bebas *indigenous* diperoleh dari hasil isolasi 13 sampel tanah dari lahan bekas tambang batu kapur. Semua isolat bakteri penambat nitrogen tersebut merupakan Gram negatif dan mampu menghasilkan IAA setelah diberi L-triptofan 1 mM. Isolat 7A32 menimbulkan gejala nekrosis pada daun tembakau sehingga tidak cocok untuk pupuk hayati. Aktivitas nitrogenase isolat 7B21Y dan 5A22 masing-masing 7.091 ppm dan 5.589 ppm. Isolat 7B21Y memiliki kemiripan 99.9% dengan bakteri *Rhizobium radiobacter*.

DAFTAR PUSTAKA

Arifin, Y. F., Hamidah, S., Hatta, G. M., &

- Razie, F. (2018). Quality of Land Fertility on Post Cement Mine Areas in South Kalimantan, Indonesia. *Environment and Ecology Research*, 6(1), 86-92.
- Baldani, J. I., Reis, V. M., Videira, S. S., Boddey, L. H., & Baldani, V. L. D. (2014). The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and soil*, 384, 413-431.
- Bastian F, Cohen A, Picolli P, Luna V, Baralda R, Bottini R. 1998. Production of indole-3-acetic acid and gibberelin by *Azotobacter* and *Herbaspirillum seropidicae* in chemically defined culture media. *Plant Growth Regul.* 24(1):7-11.
- Edache, L. O., & Mallo, I. I. Y. (2019). Impact of Limestone Mining and Cement Production on Bulk Density, Porosity and Moisture content of Soils in Yandev, Gboko, Benue State, Nigeria. *MAYFEB Journal of Environmental Science*, 1.
- Frache, C., Lindström, K., & Elmerich, C. (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. In: Springer.
- Ganapathi, H., & Phukan, M. (2020). Environmental Hazards of limestone mining and adaptive practices for environment management plan. *Environmental Processes and Management: Tools and Practices*, 121-134.
- Ghosh PK, De TK, Maiti TK. 2014. Ascorbic acid production in root, nodule and Enterobacter spp. (Gammaproteobacteria) isolated from root nodule of the legume *Abrus precatorius* L. *Biocatalysis Agr Biotechnol.* 4:127-134.
- Gibson Ah, Turner GL. 1980. Di dalam: Bergensen FJ, editor. *Method for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. New York (US): John Willey and Sons.
- Gibson AH, Turner GL. 1980. Measurement of Nitrogen Fixation by Indirect Means. Di dalam : Bergensen FJ, editor. *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. New York (US): John Willey & Sons. hlm 111-138.
- Harca NN. 2015. Isolasi dan identifikasi bakteri penambat nitrogen dan penghasil *indole-3-acetic Acid* dari tanah perkebunan kelapa sawit, Jambi [tesis]. Bogor (ID): Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Jalal, A., Filho, M. C. M. T., da Silva, E. C., da Silva Oliveira, C. E., Freitas, L. A., & do Nascimento, V. (2022). Plant Growth-Promoting Bacteria and Nitrogen Fixing Bacteria: Sustainability of Non-legume Crops. In *Nitrogen Fixing Bacteria: Sustainable Growth of Non-legumes* (pp. 233-275): Springer.
- Janczarek M, Rachwal K, Marzec A, Gladziel J, Szysz MP. 2014. Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bacteria. *Appl Soil Ecol.* 85:94-113.
- Kumari, S., & Maiti, S. K. (2022). Nitrogen recovery in reclaimed mine soil under different amendment practices in tandem with legume and non-legume revegetation: A review. *Soil Use and Management*, 38(2), 1113-1145.
- Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA, Clarck DP. 2012. *Brock Biology of Microorganisms*. Edisi ke-13. New York (US): Benjamin Cummings.
- Martani E, Margino S, Indradewa D, Supriyo A. 2011. Isolation and selection of *Rhizobium* tolerant pesticide and aluminum from acid soil in Indonesia. *J Trop Soil.* 16(1):47-54.
- Novo, L. A., Castro, P. M., Alvarenga, P., & da Silva, E. F. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria-assisted

phytoremediation of mine soils. In *Biotechnologies for mine site rehabilitation* (pp. 281-295): Elsevier.

Pedraza OR, Mata AR, Xiqui ML, Baca BE. 2004. Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bacteria. *FEMS*. 233:15-21.

Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E., & Bedmar, E. J. (2015). Bacterial associations with legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1-3), 17-42.

Subowo G. 2011. Penambangan sistem terbuka ramah lingkungan dan upaya reklamasi pasca tambang untuk memperbaiki kualitas sumberdaya lahan dan hayati tanah. *J Sumber Daya Lahan*. 5(2):83-94.

Wagh, D., Shermale, R., & Mahure, B. (2015). Isolation and characterization of nitrogen fixing bacteria from agricultural rhizosphere. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS) e-ISSN*, 2319-2380.