

PENGARUH SUMBER KARBON DAN AERASI TERHADAP AKTIVITAS DENITRIFIKASI ISOLAT BAKTERI ASLT2

Lena Novita

Pusat Penelitian Limnologi LIPI
Cibinong Science Center Jln. Raya Bogor Km. 46
Cibinong, Bogor, Jawa Barat
e-mail: lena.novita@gmail.com

ABSTRACT

Nitrate is considered as a pollutant in freshwater or estuarine ecosystem which caused eutrofication. Bacteria can be used to reduce nitrate by denitrification process. The aim of this research was to find out the influence of carbon sources and aeration on denitrification of isolated ASLT2 bacteria. The sources of carbon were acetate, succinate, glucose and glycerol under aerob and anaerob conditions. The denitrification process was measured at seventh day. Isolated ASLT2 bacteria was able to reduce nitrate aerobically and anaerobically in various of carbon sources. The highest activity of aerobic nitrate reduction was found by using acetate as carbon source and anaerobically was found by using succinate as carbon source.

Keywords: nitrate, eutrofication, denitrification, carbon source, aeration.

PENDAHULUAN

Nitrogen merupakan elemen penting yang dibutuhkan organisme untuk memenuhi kebutuhan nutrisi. Siklus nitrogen melibatkan berbagai perubahan bentuk senyawa nitrogen yang merupakan serangkaian reaksi oksidasi-reduksi dimana beberapa tahap reaksi berperan dalam metabolisme energi. Meskipun pada umumnya bentuk-bentuk nitrogen tersebut sangat penting untuk kebutuhan dasar nutrisi pertumbuhan organisme, dalam kenyataannya substansi nitrogen merupakan salah satu polutan di lingkungan perairan.

Dalam sistem perairan, senyawa nitrat, nitrit, dan amonium merupakan nitrogen anorganik terlarut (*Dissolve Inorganic Nitrogen*) yang dapat diperoleh secara langsung (melalui transport membran) dan diasimilasi oleh beberapa mikroorganisme. Kelimpahan nitrat dapat mendukung terjadinya eutrofikasi. Kondisi eutrofik tersebut sangat memungkinkan Cyanobacteria (*blue-green algae*), khususnya *Microcystis* spp untuk tumbuh berkembang biak dengan pesat (*blooming*). Hal ini menyebabkan kualitas air dan

konsentrasi oksigen terlarut menurun. Rendahnya konsentrasi oksigen ini menyebabkan proses pertumbuhan organisme aerobik terhambat, makhluk hidup di perairan seperti ikan dan spesies lainnya tidak bisa tumbuh dengan baik sehingga akhirnya mati. Kematian ikan dan hewan lainnya dalam mata rantai ekosistem perairan menyebabkan terganggunya keseimbangan ekosistem tersebut.¹ Permasalahan lainnya, *Microcystis* spp diketahui menghasilkan toksin sehingga membawa risiko kesehatan bagi manusia dan hewan. *Blooming* alga juga menyebabkan hilangnya nilai konservasi, estetika, rekreasional, dan pariwisata sehingga dibutuhkan biaya sosial dan ekonomi yang tidak sedikit untuk mengatasinya. Pencemaran perairan ini dapat terjadi pada perairan budi daya maupun nonbudi daya.

Salah satu upaya yang terus dikaji dan dikembangkan untuk mengatasi pencemaran perairan tersebut adalah teknik bioremediasi, diantaranya dengan menggunakan bakteri denitrifikasi. Denitrifikasi merupakan proses reduksi senyawa nitrat menjadi nitrit, nitrit menjadi nitrik oksida, nitrik oksida menjadi gas nitrous oksida

hingga pada akhirnya dihasilkan gas nitrogen². Bakteri yang memiliki kemampuan denitrifikasi antara lain *Paracoccus denitrificans*, *Thiobacillus denitrificans* dan beberapa *Pseudomonas sp.*. Bakteri tersebut mampu mereduksi nitrat menjadi nitrit serta menghasilkan gas-gas nitrogen dalam keadaan anaerob. Walaupun demikian, denitrifikasi juga dapat terjadi dalam keadaan aerob seperti pada bakteri *Pseudomonas sp.* dan *Alcaligenes sp.*³

Bakteri yang berperan dalam proses denitrifikasi adalah bakteri heterotrofik yang memerlukan sumber karbon organik untuk pertumbuhan. Richardson² mengemukakan bahwa denitrifikasi merupakan proses reduksi nitrat yang berhubungan langsung dengan proses transfer elektron dan senyawa karbon organik berperan sebagai donor elektron.

Isolat dengan kode ASLT2 merupakan bakteri yang diisolasi dari lingkungan perairan tambak udang di Kendari.⁴ Hasil analisis molekuler 16S rRNA menunjukkan bahwa isolat ASLT2 memiliki kemiripan sebesar 99% dengan bakteri denitrifikasi *Pseudomonas stutzeri*. Kemampuan isolat ASLT2 dalam proses denitrifikasi sampai saat ini belum pernah diketahui. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh sumber karbon dan aerasi terhadap aktivitas denitrifikasi isolat bakteri ASLT2.

METODE PENELITIAN

Waktu dan tempat

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Desember 2005 sampai dengan April 2006 di Laboratorium Mikrobiota, Pusat Penelitian Limnologi, LIPI Cibinong, Bogor.

Pemurnian dan Peremajaan Isolat

Penelitian menggunakan isolat murni bakteri ASLT2 koleksi Laboratorium Mikrobiota, Pusat Penelitian Limnologi LIPI yang diperoleh dari hasil penelitian Widiyanto.⁴ Pemurnian isolat bakteri dilakukan dengan menumbuhkan isolat bakteri pada medium agar denitrifikasi⁵ melalui metode kuadran yang merujuk pada Cappucino dan Sherman⁶. Medium denitrifikasi yang digunakan mempunyai komposisi (g/l) 10 Na-asetat, 5 KNO₃, 0.5 (NH₄)₂SO₄, 0.2 KH₂PO₄,

0.9 K₂HPO₄, 0.1 CaCl₂·2H₂O, 0.5 MgSO₄·7H₂O, dan 0.2 EDTA dengan modifikasi salinitas 2% dan pH 7. Medium padat denitrifikasi dibuat dengan menambahkan 20 g/l bacto agar. Isolat bakteri diinkubasi pada suhu ruang (28–31°C) selama tujuh hari. Koloni murni yang diperoleh ditumbuhkan kembali pada medium agar denitrifikasi kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 3-4 hari.

Uji Aktivitas Denitrifikasi Pada Kondisi Aerob dan Anaerob

Inokulum untuk pengujian pada kondisi aerob disiapkan dengan menumbuhkan isolat bakteri hasil pemurnian pada 50 ml medium cair denitrifikasi, kemudian diinkubasi di atas inkubator berpenggoyang pada kecepatan 80 rpm dan suhu ruang (28–31°C) selama 3 hari. Sedangkan inokulum yang digunakan untuk pengujian pada kondisi anaerob disiapkan dengan menumbuhkan isolat pada medium denitrifikasi anaerob. Kondisi anaerob dibuat dengan metode *Oxygen-Free Nitrogen* (OFN). Gas N₂ dialirkan ke dalam medium dengan *flowrate* 250 mL/jam menggunakan *syringe* steril selama 10 menit.

Sebanyak 1 ml kultur isolat dari masing-masing pertumbuhan aerob dan anaerob ditumbuhkan pada 50 ml medium denitrifikasi yang sesuai dengan kondisi aerasinya. Perlakuan sumber karbon yang diberikan adalah glukosa, asetat, suksinat, dan gliserol dengan konsentrasi nitrat ± 5000 µM. Masing-masing perlakuan sumber karbon diulang tiga kali dan kontrol masing-masing perlakuan dibuat tanpa inokulasi kultur bakteri. Isolat bakteri kemudian diinkubasi selama tujuh hari di atas inkubator berpenggoyang pada kecepatan 80 rpm dan suhu ruang untuk pengujian pada kondisi aerob. Sedangkan untuk pengujian pada kondisi anaerob, isolat bakteri diinkubasi pada suhu ruang. Pengukuran aktivitas denitrifikasi dilakukan melalui analisis kadar nitrat yang direduksi dan nitrit yang terbentuk pada kultur bakteri tersebut pada hari ke 7 dengan metode merujuk pada Greenberg *et al.*⁷

Analisa Data Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap Faktorial terdiri atas dua faktor yaitu jenis sumber karbon yang

terdiri dari 4 jenis (asetat, suksinat, glukosa dan gliserol) dan kondisi aerasi yang terdiri dari 2 kondisi (aerob dan anaerob). Data dianalisis sidik ragam (ANOVA) menggunakan piranti lunak SAS 9.1 (2003) dan perbedaan antar perlakuan diuji menggunakan uji Duncan⁸ pada taraf 5% ($p < 0,05$).

HASIL DAN PEMBAHASAN

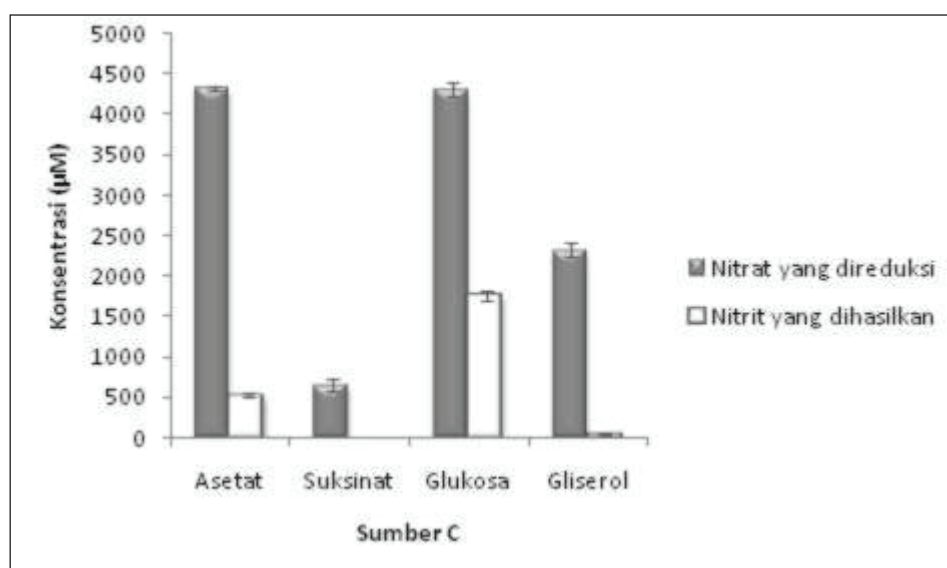
Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa terdapat interaksi yang nyata ($p < 0,01$) antara jenis sumber karbon dan kondisi aerasi terhadap aktivitas denitrifikasi isolat bakteri ASLT2. Hasil uji lanjut Duncan menunjukkan bahwa pada kondisi aerob dengan sumber karbon asetat dan glukosa tidak signifikan. Akan tetapi kedua sumber karbon tersebut signifikan ($p < 0,05$) terhadap sumber karbon lainnya dan masing-masing kondisi inkubasi lainnya. Sedangkan perlakuan sumber karbon suksinat pada kondisi anaerob dan perlakuan sumber karbon gliserol pada kondisi aerob tidak signifikan. Akan tetapi kedua perlakuan tersebut signifikan ($p < 0,05$) terhadap sumber karbon lainnya dan masing-masing kondisi inkubasi yang lainnya.

Isolat bakteri ASLT2 dapat melakukan proses denitrifikasi pada kondisi aerob dengan semua perlakuan sumber karbon. Kemampuan isolat dalam mereduksi nitrat ditunjukkan

oleh adanya senyawa nitrat yang tereduksi dari medium dan terbentuknya senyawa nitrit pada medium pertumbuhan setelah tujuh hari inkubasi (Gambar 1). Isolat bakteri ASLT2 dapat mereduksi nitrat paling tinggi dengan perlakuan asetat sebagai sumber karbon yaitu sebesar 82,28 % dari nitrat yang terdapat dalam medium pertumbuhan. Aktivitas reduksi nitrat yang paling rendah terjadi dengan perlakuan suksinat sebagai sumber karbon yaitu sebesar 12,33%.

Pada kondisi aerob, aktivitas reduksi nitrat disertai dengan pembentukan senyawa nitrit pada medium pertumbuhan, tetapi tidak terjadi pembentukan senyawa nitrit pada perlakuan suksinat sebagai sumber karbon (Gambar 1). Rendahnya senyawa nitrit yang terbentuk menunjukkan bahwa telah terjadinya reaksi reduksi nitrit menjadi gas nitrogen (N_2O dan N_2). Richardson² mengemukakan bahwa bakteri denitrifikasi dapat menggunakan nitrat dan nitrit sebagai akseptor elektron terakhir dalam proses transfer elektron, dimana senyawa karbon organik berperan sebagai donor elektron. Rius *et al.*⁹ melaporkan bahwa bakteri *P. stutzeri* merupakan bakteri denitrifikasi yang mampu mereduksi nitrat dengan menghasilkan gas nitrogen.

Proses denitrifikasi isolat bakteri ASLT2 yang terjadi pada kondisi anaerob dengan semua perlakuan sumber karbon diindikasikan



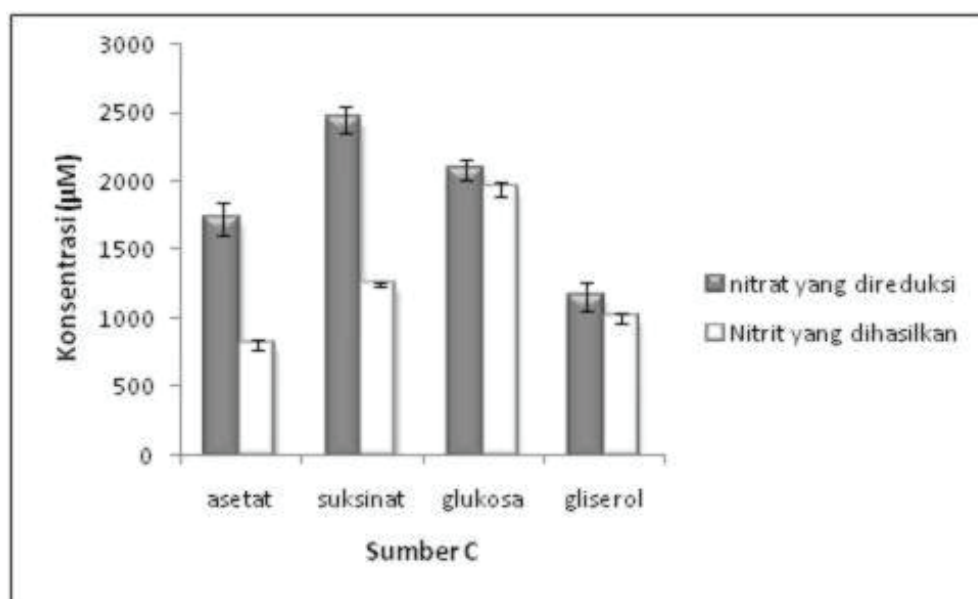
Gambar 1. Senyawa nitrat yang direduksi dan nitrit yang dihasilkan oleh isolat bakteri ASLT2 pada proses denitrifikasi dengan kondisi aerob setelah tujuh hari inkubasi.

dengan adanya senyawa nitrat yang tereduksi dari medium pertumbuhan yang disertai terbentuknya senyawa nitrit (Gambar 2). Isolat bakteri ASLT2 dapat mereduksi nitrat paling tinggi dengan perlakuan suksinat sebagai sumber karbon, yaitu sebesar 47,98% dari nitrat yang terdapat dalam medium pertumbuhan. Aktivitas reduksi nitrat yang paling rendah terjadi dengan perlakuan gliserol, yaitu sebesar 24,15%. Senyawa nitrit yang terakumulasi pada kondisi anaerob (Gambar 2) lebih tinggi dibandingkan kondisi aerob (Gambar 1). Pada kondisi ini, senyawa nitrit yang terbentuk dua kali lipat lebih tinggi dengan sumber karbon asetat. Senyawa nitrit yang terbentuk dengan sumber karbon suksinat dan gliserol mencapai 1000 kali lebih tinggi.

Richardson² mengemukakan bahwa setiap tahapan reaksi dalam proses denitrifikasi dikatalisis oleh enzim yang berbeda. Reduksi nitrat menjadi nitrit dikatalisis oleh enzim nitrat reduktase. Ada dua macam nitrat reduktase yaitu nitrat reduktase terikat membran (NAR) dan nitrat reduktase pada periplasmik (NAP). Aktivitas enzim NAP terjadi pada kondisi aerob dan anaerob, sedangkan aktivitas enzim NAR hanya terjadi pada kondisi anaerob. Hal ini disebabkan adanya penghambatan sistem transfer nitrat ke dalam sel oleh oksigen. Proses reduksi nitrat oleh

enzim NAR berhubungan dengan konservasi energi, yaitu sebagai akseptor elektron terakhir dalam rantai respirasi pada kondisi anaerob, sedangkan aktivitas enzim NAP cenderung untuk mengontrol keseimbangan energi pereduksi. Bakteri heterotrofik memperoleh energi dari serangkaian proses oksidasi sumber karbon organik. Hasil oksidasi sumber karbon yang lebih tereduksi pada kondisi aerob sangat memungkinkan terjadinya kelebihan energi pereduksi. Oleh karena itu, untuk menjaga keseimbangan energi pereduksi diperlukan lintasan untuk mengalirkan elektron-elektron hasil oksidasi tersebut, tetapi dengan tujuan bukan untuk konservasi energi, yaitu melalui reduksi nitrat oleh enzim NAP.

Hasil penelitian Sears *et al.*¹⁰ menunjukkan bahwa jenis sumber karbon memengaruhi aktivitas reduksi nitrat. Pada kondisi aerob, aktivitas reduksi nitrat dan aktivitas enzim NAP bakteri *Paracoccus denitrificans* Pd1222 10 kali lebih rendah dengan sumber karbon yang lebih teroksidasi (malat) dibandingkan dengan sumber karbon yang lebih tereduksi (butirat). Sebaliknya, pada kondisi anaerob aktivitas reduksi nitrat dan aktivitas enzim NAP dua kali lebih tinggi dengan sumber karbon yang lebih teroksidasi (malat) dibandingkan dengan sumber karbon yang lebih tereduksi (butirat).



Gambar 2. Senyawa nitrat yang direduksi dan nitrit yang dihasilkan oleh isolat bakteri ASLT2 pada proses denitrifikasi dengan kondisi anaerob setelah tujuh hari inkubasi.

Ellington *et al.*¹¹ melaporkan bahwa pada kondisi pertumbuhan aerob ekspresi *nap* dan aktivitas enzim NAP pada bakteri *Paracoccus pantotrophus* lebih tinggi dengan sumber karbon yang lebih tereduksi dibandingkan dengan sumber karbon yang lebih teroksidasi (suksinat < asetat < butirat). Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Sears *et al.*¹² yang menunjukkan bahwa pada kondisi aerob aktivitas enzim NAP dari bakteri *P. pantotrophus* lebih tinggi delapan kali lipat dengan penambahan sumber karbon yang lebih tereduksi (butirat) dibandingkan dengan penambahan sumber karbon yang lebih teroksidasi (suksinat). Pada penelitian ini aktivitas reduksi nitrat dengan menggunakan sumber karbon suksinat memiliki hasil yang paling rendah dibandingkan dengan sumber karbon asetat, glukosa, dan gliserol.

Sumber karbon yang berbeda juga dapat memengaruhi aktivitas reduksi nitrat bakteri pada skala pilot pengolahan limbah dengan kondisi aerob seperti yang dilaporkan oleh Gomez *et al.*¹³ Aktivitas reduksi nitrat pada pengolahan limbah lebih tinggi dengan pemberian etanol sebagai sumber karbon dibandingkan dengan metanol dan sukrosa. Penambahan etanol menyebabkan terjadinya penurunan senyawa nitrat sebesar 40%. Penambahan metanol menyebabkan penurunan senyawa nitrat sebesar 30% dan penambahan sukrosa hanya menyebabkan penurunan sebesar 17,5%.

Firth dan Edwards¹⁴ melaporkan bahwa bakteri *P. stutzeri* dapat tumbuh dan mereduksi nitrat dengan maksimal pada medium mikroaerofil yang mengandung nitrat dengan penambahan suksinat dibandingkan penambahan glukosa, gliserol, dan piruvat. Sears *et al.*¹² melaporkan bahwa pada kondisi anaerob aktivitas reduksi nitrat dari bakteri *P. pantotrophus* lebih tinggi dengan penambahan sumber karbon yang lebih teroksidasi (suksinat) dibandingkan dengan penambahan sumber karbon yang lebih tereduksi (butirat).

Hasil penelitian Weier *et al.*¹⁵ menunjukkan bahwa pemberian sumber karbon glukosa meningkatkan aktivitas reduksi nitrat pada bakteri tanah dengan kondisi anaerob. Begitu juga hasil penelitian Kelso *et al.*¹⁶ yang menunjukkan bahwa aktivitas reduksi nitrat bakteri pada sedi-

men perairan air tawar dengan kondisi anaerob lebih tinggi dengan penambahan sumber karbon glukosa (90,6%) dibandingkan dengan penambahan asetat (72%). Pada penelitian ini diperoleh hasil yang serupa, di mana aktivitas reduksi nitrat pada kondisi anaerob yang menggunakan glukosa lebih tinggi kedua setelah suksinat dan lebih tinggi daripada asetat.

KESIMPULAN

Pemberian sumber karbon dan aerasi yang berbeda memberikan pengaruh yang signifikan terhadap aktivitas denitrifikasi isolat bakteri ASLT2. Aktivitas reduksi nitrat yang paling tinggi pada kondisi aerob terjadi dengan pemberian asetat sebagai sumber karbon dibandingkan glukosa, suksinat dan gliserol, sedangkan pada kondisi anaerob aktivitas paling tinggi terjadi dengan pemberian suksinat sebagai sumber karbon.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Tri Widiyanto dan Dr. Iman Rusmana yang telah memberikan bimbingan selama pelaksanaan penelitian serta kepada Prof. Dr. Gono Semiadi yang telah memberikan bimbingan penulisan serta masukan dan saran dalam penulisan karya ilmiah ini.

DAFTAR PUSTAKA

- ¹Sigee, D.C. 2005. *Freshwater Microbiology; Biodiversity and Dinamic Interactions of Microorganism in The Aquatic Environment*. England: John Wiley & Sons.
- ²Richardson, D.J. 2000. Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiology*, 146: 551–571.
- ³Zumft, W.G. 1997. Cell Biology and Molecular Basic of Denitrification. *Microbiol and Mol Biol Rev*: 533–616.
- ⁴Widiyanto, T. 2005. *Seleksi Bakteri Nitrifikasi dan Denitrifikasi untuk Bioremediasi di Tambak Udang*. Laporan Teknis Hasil Penelitian. Puslit Limnologi LIPI. Cibinong. Bogor.
- ⁵Rodina, G.A. 1972. *Methods in Aquatic Microbiology*. Rita RC, Machael S. (Ed). USA: University Park Press Baltimore.
- ⁶Cappucino, G.J. dan N. Sherman. 1983. *Microbiology: A Laboratory Manual*. California: Addison-Wesley Publishing Company Inc.

- ⁷Greenberg, A.E., L.S. Clesceri, dan A.D. Eaton. 1992. *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*. 18th Edition. Publication Office American Public Health Association, Washington DC.
- ⁸Mattjik, A.A. dan I.M. Sumertajaya. 2002. *Perancangan Percobaan*. Jilid I. Edisi Kedua. IPB Press, Bogor.
- ⁹Rius, N., M.C. Fuste, C. Guasp, J. Lalucat, dan J.G. Loren. 2001. Clonal population structure of *Pseudomonas stutzeri*, a species with exceptional diversity. *J of Bacteriol*, 183: 736–744.
- ¹⁰Sears, H.J., S. Spiro, dan D.J. Richardson. 1997. Effect of Carbon Substrate and Aeration on Nitrate Reduction and Expression of The Periplasmic and Membrane-bound Nitrate Reductases in Carbon-limited Continuous Cultures of *Paracoccus denitrificans* Pd1222. *Microbiol*, 143: 3767–3774.
- ¹¹Ellington, M.J.K., K.K. Bhakoo, G. Sawers, D.J. Richardson, dan S.J. Ferguson. 2002. Hierarchy of Carbon Sources Selection in *Paracoccus pantotrophus*: Strict Correlation Between Reduction State of The Carbon Substrate and Aerobic Expression of The *nap* Operon. *J of Bacteriol*, 184: 4767–4774.
- ¹²Sears, H.J., G. Sawers, B.C. Berks, J.S. Ferguson, dan D.J. Richardson. 2000. Control of Periplasmic Nitrate Reductase Gene Expression (*napEDABC*) from *Paracoccus pantotrophus* in Response to Oxygen and Carbon Substrates. *Microbiol*, 146 : 2977–2985.
- ¹³Gomez, M.A., J. González-López, dan E. Hontoria-García. 2000. Influence of Carbon Source on Nitrate Removal of Contaminated Groundwater in a Denitrifying Submerged Filter. *J of hazard material*: 69–80.
- ¹⁴Firth, J.R., and C. Edwards. 2000. Analysis of Denitrification by *Pseudomonas stutzeri* Under Nutrient-limited Condition Using Membran Inlet Mass Spectrometry. *J of Appl Microbiol*, 88: 853–859.
- ¹⁵Weier, K.L., J.W. Doran, J.F. Power, dan D.T. Walrter. 1993. Denitrification and The Dinitrogen/Nitrous Oxide Ratio as Affected by Soil Water, Available Carbon, and Nitrate. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 57: 66–72.
- ¹⁶Kelso, B.H.L., R.V. Smith, dan R.J. Laughlin. 1999. Effect of Carbon Substrates on Nitrite Accumulation in Freshwater Sediment. *Appl Environ Microbiol*, 65: 61–66.