

## KEMAMPUAN BAKTERI DENITRIFIKASI ASAL TAMBAK UDANG DALAM MENURUNKAN SENYAWA NITRAT DAN NITRIT

Tri Widiyanto\*, Iman Rusmana\*\* & Tatang Hermawan\*\*

### ABSTRAK

*Pengendalian senyawa metabolit toksik (amonia, nitrat, dan nitrit) pada tambak udang dapat dilakukan melalui pendekatan bioremediasi, menggunakan aktivitas kelompok bakteri denitrifikasi dan nitrifikasi, yang pada dasarnya secara alami hidup pada perairan tambak. Oleh karena itu perlu dilakukan pengkajian pemanfaatan kelompok bakteri tersebut dalam upaya memperbaiki kondisi lingkungan perairan di tambak udang. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji isolat bakteri pereduksi nitrat (denitrifikasi) hasil isolasi dari perairan tambak udang dalam menurunkan senyawa nitrat dan nitrit serta mengkarakterisasinya. Isolasi bakteri dilakukan menggunakan medium penyuburan denitrifikasi yang diinkubasi pada kondisi anaerob. Parameter yang dianalisis adalah kandungan senyawa nitrat, nitrit, dan amonia pada medium tumbuh. Karakterisasi yang dilakukan meliputi morfologi dan uji kinetika. Jumlah isolat bakteri denitrifikasi yang berhasil diisolasi sebanyak 13 isolat. Isolat tersebut mempunyai bentuk sel batang, motil, dan bersifat Gram negatif. Hasil seleksi memperlihatkan tiga isolat yang mempunyai kemampuan mereduksi nitrat dan nitrit yang tinggi, yaitu KDTM10, KDTS3, dan SDT12. Hasil uji kinetika reduksi nitrat, isolat KDTS3 mempunyai kecepatan maksimum mereduksi nitrat sebesar  $(3,46 \times 10^{-6} \mu\text{M/jam/sel})$  lebih besar dari isolat KDTM10  $(2,44 \times 10^{-6} \mu\text{M/jam/sel})$ . Isolat-isolat tersebut mempunyai potensi yang cukup baik untuk pengendalian pencemaran senyawa nitrat dan nitrit di tambak udang.*

**Kata kunci :** denitrifikasi, seleksi, karakterisasi, bioremediasi, dan tambak udang

### ABSTRACT

**ABILITY OF DENITRIFICATION BACTERIA FROM BRACKISH SHRIMP PONDS TO REDUCE NITRATE AND NITRITE.** *The toxic metabolites (ammonia, nitrate, and nitrite) in shrimp pond was alternatively controlled by means of bioconditioner mechanisms through microorganism activities, ei group of denitrification and nitrification bacteria. This research aimed to analyse and characterize capabilities of isolated nitrate reduction bacteria from brackish shrimp ponds to decrease nitrate dan nitrite concentration in water. The isolation was carried out with denitrification enrichment media in an anaerobic condition. The observed parameter were concentration of nitrate, nitrite, and ammonia in the culture media. The characterization was by morphological and kinetic test. Twelve isolates of denitrification bacteria has been successfully collected from the shrimp ponds. The common isolates were positif Grams, bacillic, and motile. There are 3 isolates have a good capability to reduce nitrat and nitrite concentration, ei. KDTM10, KDTS3, and SDT12. Isolate KDTS3 have kinetic nitrate reduction of  $3.46 \times 10^6 \mu\text{M hour/cell}$ , higher than that of isolate KDTM10  $(2.44 \times 10^6 \mu\text{M hours/cell})$ . These isolate has been proposed as good potential bioremediation agent to control nitrate and nitrite in polluted shrimp ponds.*

**Key words :** denitrification, selectioni, characterization, bioremediation, shrimp pond

### PENDAHULUAN

Pada sistem perairan budidaya udang, akumulasi sisa pakan dan ekskresi dapat merangsang pertumbuhan

mikroorganisme dan peningkatan produksi senyawa metabolit toksik (amonia, H<sub>2</sub>S, nitrit, dan SO<sub>2</sub>). Kandungan senyawa metabolit toksik yang tinggi menyebabkan udang dan ikan mengalami stress,

\* Staf Peneliti Puslit Limnologi-LIPI

\*\* Departemen Biologi Fakultas MIPA IPB

penurunan nafsu makan, mudah terserang penyakit, gangguan pertumbuhan, dan peningkatan mortalitas (Sugama, 2002). Salah satu pengendaliannya adalah menggunakan pendekatan bioremediasi.

Bioremediasi merupakan salah satu upaya untuk memperbaiki kualitas air melalui aktivitas biologis (mikroorganisme). Senyawa kimia yang bersifat toksik akan dirubah menjadi bentuk lain yang tidak toksik. Pada proses bioremediasi senyawa nitrogen (nitrat dan nitrit) bisa digunakan oleh kelompok bakteri pereduksi nitrat, melalui proses denitrifikasi (Rusmana, 2003a). Denitrifikasi merupakan sebuah proses dimana nitrat direduksi menjadi nitrit, nitrit oksida, nitrous oksida, dan terakhir terbentuk gas dinitrogen. Enzim yang terlibat pada proses tersebut meliputi: nitrit reduktase, nitrat reduktase, nitrit oksida reduktase, dan nitrous oksida reduktase (Burlage, *et al.*, 1998).

Bakteri denitrifikasi bersifat heterotrof, memerlukan sumber karbon organik, seperti asam asetat, asam propionat, asam suksinat, gliserol, dan glukosa untuk pertumbuhannya (Teixera & Olivera, 2002). Bakteri denitrifikasi yang ideal untuk digunakan pada proses pengendalian pencemaran senyawa nitrogen adalah bakteri denitrifikasi yang menghasilkan produk akhir berupa gas  $N_2$ .

Secara alamiah kelompok bakteri denitrifikasi hidup dengan baik pada kondisi lingkungan yang mempunyai kandungan oksigen relatif rendah. Teixera & Olivera (2002) menyebutkan bahwa kelompok bakteri denitrifikasi bersifat anaerobik fakultatif dan anaerobik obligat. Oleh karena itu pada sistem perairan tambak kelompok bakteri tersebut dapat hidup dengan baik pada daerah dasar atau sedimen. Kandungan oksigen pada sediment relatif rendah dan pada kondisi tertentu (malam hari) kandungan oksigennya dapat mencapai nol ppm. Oleh karena itu pada kegiatan isolasi diambil dari tanah sediment.

Proses denitrifikasi pada spesies-spesies tertentu menghasilkan produk samping berupa gas  $N_2O$  yang berdampak terhadap pemanasan global. Oleh karena itu perlu dilakukan seleksi dari kelompok bakteri denitrifikasi yang telah diisolasi dari sistem perairan tambak udang. Hipotesa yang dikembangkan adalah species pada kelompok bakteri denitrifikasi masing-masing mempunyai kemampuan dan menghasilkan produk akhir yang berbeda dalam melakukan aktivitas metabolisme senyawa nitrogen (amonia dan nitrat). Bakteri denitrifikasi yang potensial sebagai agen bioremediasi adalah yang mempunyai kemampuan menurunkan konsentrasi senyawa nitrogen dengan baik dengan produk akhir gas nitrogen.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri denitrifikasi asal tambak udang yang potensial untuk dimanfaatkan sebagai bioremediasi untuk perbaikan kualitas air tambak.

## **BAHAN DAN METODE**

Sebanyak satu sample sedimen sekitar 500 gram diambil dari tambak udang PT. Indokor di Serang dan tiga sampel sedimen sekitar masing-masing 500 gram diambil dari tambak udang di Kendari. Media yang digunakan meliputi: media cair dan media padat denitrifikasi. Komposisi medium cair denitrifikasi adalah sebagai berikut:  $CH_3COONa$  0,12 M,  $KNO_3$  0,05 M,  $(NH)_2SO_4$  0,0038 M,  $K_2HPO_4$  0,0046 M,  $MgSO_4$  0,0042 M,  $KH_2PO$  0,0015 M,  $CaCl_2$  0,00091 M, pH 7. Sedangkan untuk media padat denitrifikasi ditambahkan agar bakto sebanyak 20 gr per liter.

Sebanyak 40 ml medium tersebut dimasukkan ke dalam botol yang berukuran 50 ml. Kondisi anaerobik dibuat dengan cara menghilangkan oksigen yang terdapat di dalam botol, dengan dimasukkannya gas nitrogen pada tekanan 250 kpa (kilopsakal), melalui jarum suntik secara aseptik ke

dalam botol secara terus-menerus selama 10 menit.

Sedimen dijadikan lumpur (*slurry*) dengan komposisi 20% sedimen dan 80% air destilata (w/v). Sebanyak 0,5 ml lumpur diinokulasi dengan jarum suntik 5 ml ke dalam medium cair anaerob, inkubasi dilakukan pada suhu 28 - 30°C, selama 10 - 14 hari. Sebanyak satu lup suspensi kultur pengkayaan diinokulasi dengan metode kuadran pada medium agar yang komposisinya sama dengan medium cair, kemudian diinkubasi pada suhu 28 - 30 °C, selama 7 - 10 hari, di dalam anaerobik jar (Oxoid, England). Koloni-koloni yang tumbuh terpisah digoreskan dan diinkubasi lagi pada medium agar yang baru dan kondisi inkubasi yang sama untuk dimurnikan. Isolat-isolat murni yang didapat disimpan pada medium agar miring sebagai biakan stok.

Isolat murni hasil isolasi diamati morfologi koloninya, meliputi: bentuk, warna dan tepiannya. Morfologi sel dan motilitasnya diamati dibawah mikroskop (Nikon YS2-H) perbesaran 400x dari preparat kultur isolat bakter. Reaksi Gram dari tiap isolat ditentukan dengan tehnik pewarnaan Gram (Hadioetomo, 1983).

Uji fermentasi dilakukan terhadap isolat-isolat hasil isolasi dengan diinokulasikan pada medium yang mengandung glukosa sebagai sumber karbonnya dan biru metil sebagai indikator keasaman pada tabung reaksi. Inkubasi dilakukan selama dua minggu dalam kondisi anaerob (Hugh & Leifson, 1953).

Seleksi isolat dilakukan terhadap kemampuan dalam mereduksi senyawa nitrat dan nitrit. Sebanyak 1 ml kultur isolat yang berumur 3 hari diinokulasikan pada 40 ml medium denitrifikasi dengan konsentrasi nitrat  $\pm$  1500  $\mu$ M. Inkubasi dilakukan selama 2 minggu, pada kondisi aerob dan anaerob, pada suhu 28 - 30 °C. Setiap dua hari contoh kultur dianalisis kadar nitrat, dan nitritnya. Kadar nitrat, amonia dan nitrit ditentukan dengan metode spektrofotometri

(Greenberg, *et al.*, 1992). Isolat terbaik dipilih berdasarkan kemampuannya dalam mereduksi nitrat, jumlah nitrit yang terbentuk, dan jumlah gas yang terbentuk. Uji kemampuan isolat dalam mereduksi nitrit juga dilakukan dengan metode yang sama, hanya mediumnya tidak menggunakan 1500  $\mu$ M nitrat tetapi menggunakan 2000  $\mu$ M nitrit dan diinkubasi dalam kondisi aerobik.

Untuk memperjelas isolat bakteri yang terisolasi berasal dari kelompok bakteri denitrifikasi dilakukan uji pembentukan gas nitrogen. Sebanyak satu lup inokulan isolat terseleksi diinokulasikan ke dalam tabung reaksi yang berisi medium cair dan tabung durham. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang 28 - 30 °C selama 7 hari. Pembentukan gas nitrogen diamati melalui ada atau tidaknya gelembung gas yang terdapat pada tabung durham.

Karakterisasi selanjutnya adalah analisis kinetika reduksi nitrat. Isolat-isolat terseleksi yang berumur 3 hari ditumbuhkan dalam 182 ml medium denitrifikasi. Inkubasi dilakukan pada suhu 28 - 30 °C selama 7 hari. Kultur bakteri dibuat pelet dengan sentrifugasi (Heraus, Labofuge 200) pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Pelet dipisahkan dan dimasukkan ke dalam botol erlenmeyer berisi 50 ml medium kemudian diencerkan sampai diperoleh nilai OD sebesar  $\pm$ 0,380 pada panjang gelombang 550 nm. Sebanyak 4 ml kultur bakteri diinokulasi kedalam botol yang berisi 35 ml medium denitrifikasi dengan konsentrasi nitrat: 0, 100, 500, 1000, dan 2000  $\mu$ M. Inkubasi dilakukan selama 9 jam. Setiap interval 3 jam dilakukan analisis kadar nitrat.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi bakteri dilakukan dari tanah sedimen yang berasal dari Tambak Udang di wilayah Serang dan Kendari. Pada umumnya kelompok bakteri pereduksi nitrat akan tumbuh baik pada lingkungan sedimen,

dengan kandungan oksigen yang relatif rendah. Medium penyuburan yang digunakan untuk bakteri denitrifikasi mengandung asam asetat sebagai sumber karbonnya dan nitrat sebagai penerima elektron terakhir. Sumber karbon untuk bakteri denitrifikasi heterotrof berupa: asam asetat, asam suksinat, asam malat, dan asam propionat (Teixera & Olivera, 2002). Bakteri denitrifikasi menggunakan nitrat sebagai penerima elektron terakhir alternatif untuk mendapatkan energi dalam keadaan anaerob (Richardson, 2000).

Sebanyak 23 koloni isolat bakteri pereduksi nitrat berhasil diisolasi. Secara morfologis isolat-isolat tersebut mempunyai bentuk koloni bundar licin, tidak beraturan dan tepi menyebar. Selain itu juga mempunyai warna putih, krem, dan bening. Hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa semua isolat termasuk Gram negatif. Secara mikroskopik, sel bakteri umumnya berbentuk batang, dan motil (Tabel 1). Hal ini mengindikasikan bahwa isolat tersebut termasuk kelompok bakteri pereduksi nitrat atau denitrifikasi. Rusmana (2003b) mengemukakan bahwa bakteri denitrifikasi mempunyai bentuk batang, motil, dan bersifat Gram negatif. Lebih lanjut Gibson, *et al.* dalam Rusmana (2003b) mengemukakan bahwa bakteri pereduksi nitrat dari kelompok *Pseudomonas* mempunyai bentuk batang, motil, dan Gram negatif. Untuk menentukan hasil isolasi, dilakukan uji fermentatif terhadap kelompok bakteri denitrifikasi.

Hasil uji fermentatif menunjukkan bahwa 10 isolat bersifat fermentatif positif dan 13 isolat fermentatif negatif (Tabel 1). Isolat yang bersifat fermentatif negatif diperkirakan merupakan kelompok bakteri denitrifikasi. Proses denitrifikasi dilakukan oleh mikroorganisme dengan menggunakan senyawa nitrat dan nitrit sebagai penerima elektron dan dihasilkan senyawa nitrogen

gas. Sedangkan kelompok bakteri yang bersifat fermentatif positif akan mereduksi nitrat menjadi amonium (Rusmana & Nedwell, 2004). Kelompok bakteri fermentatif positif tidak dapat menggunakan senyawa nitrat sebagai penerima elektron, justru sebaliknya digunakan sebagai sumber elektron. Terhadap kelompok bakteri yang bersifat fermentatif negatif dilakukan seleksi dalam kemampuan penurunan senyawa nitrat dan nitrit.

Sebagai langkah awal seleksi dilakukan uji kemampuan mereduksi nitrat terhadap 13 isolat yang bersifat fermentatif negatif. Sebanyak dua belas isolat mempunyai kemampuan dalam mereduksi nitrat, dan satu isolat mempunyai kemampuan dalam membentuk nitrit dan nitrat (SDT4; Tabel 2). Isolat yang dapat menghasilkan senyawa nitrit tidak diikuti lagi dalam seleksi tahap berikutnya. Isolat yang potensial sebagai agen bioremediasi adalah yang tidak menghasilkan nitrit, akan tetapi yang dapat menggunakan senyawa nitrit dalam aktivitas metabolismenya. Oleh karena itu isolat SDT4 sudah dikeluarkan dari langkah-langkah seleksi.

Sebanyak enam isolat, yaitu KDTM10, SDT12, KDTS3, SDT16, KDTM5, dan SDT2 mempunyai kemampuan mereduksi nitrat yang tinggi, menghasilkan nitrit yang rendah dan menghasilkan gas nitrogen yang tinggi dibandingkan isolat-isolat lainnya (Tabel 2). Isolat-isolat tersebut mempunyai potensi yang cukup baik sebagai agen bioremediasi. Oleh karena itu terhadap isolat-isolat tersebut kemudian dilakukan uji reduksi nitrat lebih lanjut pada kondisi aerob dan anerob. Pada tahapan seleksi ini dicari isolat-isolat yang mempunyai kemampuan mereduksi nitrat relatif tinggi dan menghasilkan senyawa nitrit rendah, serta hasil akhir gas nitrogen yang tinggi.

Tabel 1. Karakteristik isolat yang didapat dari sedimen tambak udang yang berasal dari wilayah Serang dan Kendari

Isolat	Bentuk koloni, warna, dan tepian	Uji fermentatif	Bentuk sel	Motilitas	Pewarnaan Gram
KDTM1	Tak beraturan dan menyebar, tengah krem dan tepian bening, dan tak beraturan	positif	Batang	motil	negatif
KDTM2	Tak beraturan dan menyebar, tengah krem dan tepian bening, dan tak beraturan	positif	Batang	motil	negatif
KDTM3	Tak beraturan dan menyebar, tengah krem dan tepian bening, dan tak beraturan	positif	Batang	motil	negatif
KDTM4	Tak beraturan dan menyebar, tengah krem dan tepian bening, dan tak beraturan	positif	Batang	motil	negatif
KDTM5	Bundar dengan tepian menyebar, putih, bercabang	negatif	Batang	motil	negatif
KDTM8	Bundar, putih, licin	positif	Batang	motil	negatif
KDTM10	Tak beraturan dan menyebar, krem kekuningan, tak beraturan	negatif	Bulat	motil	negatif
SDT1	Bundar, putih susu, licin	negatif	Bulat	non motil	negatif
SDT2	Tak beraturan dan menyebar, tengah putih susu dan tepian putih, tak beraturan	negatif	Bulat	motil	negatif
SDT4	Bundar, putih, licin	negatif	Batang	motil	negatif
SDT5	Bundar, putih, licin	negatif	Batang	motil	negatif
SDT6	Tak beraturan dan menyebar, krem, tak beraturan	positif	Batang	motil	negatif
KDTS1	Bundar, putih, licin	positif	Batang	motil	negatif
KDTS2	Bundar, putih, licin	positif	Batang	motil	negatif
KDTTP1	Bundar dengan tepian menyebar, putih, bercabang	positif	Batang	motil	negatif
KDTTP4	Bundar, putih, licin	positif	Batang	motil	negatif
KDTTP5	Tak beraturan dan menyebar, tengah krem dan tepian bening, tak beraturan	negatif	Batang	motil	negatif
KDTS3	Bundar, tengah putih susu dan tepian bening, licin	negatif	Batang	motil	negatif
SDT10	Bundar, Putih bening, licin	negatif	Batang	motil	negatif
SDT12	Bundar dengan tepian menyebar, tengah putih susu dan tepian putih, Bercabang	negatif	Batang	motil	negatif
SDT13	Bundar dengan tepian menyebar, putih, bercabang	negatif	Bulat	motil	negatif
SDT16	Tak beraturan dan menyebar, tengah putih susu dan tepian putih, tak beraturan	negatif	Batang	motil	negatif
SDT20	Tak beraturan dan menyebar, tengah putih susu dan tepian putih, tak beraturan	negatif	Batang	motil	negatif

Tabel 2. Kemampuan isolat dalam mereduksi nitrat, membentuk nitrit, dan gas yang dihasilkan

No.	Isolat	Nitrat awal (Mili Molar)	Nitrat yang direduksi		Nitrit yang dihasilkan		Gas yang dihasilkan (%)
			MM	%	MM	%	
1.	SDT1	7301,6	1347,4	18,5	495,6	36,8	31,6
2.	<b>SDT2</b>	7301,6	<b>2279,5</b>	<b>31,2</b>	<b>457,5</b>	<b>21,1</b>	<b>39,9</b>
3.	SDT4	7301,6	0	0	367,6	19,7	0
4.	SDT5	7301,6	1645,0	22,5	480,0	29,2	35,4
5.	<b>KDTS3</b>	<b>1700,6</b>	<b>1621,5</b>	<b>95,4</b>	<b>448,3</b>	<b>8,61</b>	<b>36,1</b>
6.	KDTTP5	1700,6	271,7	16,0	536,8	97,5	80,0
7.	<b>KDTM5</b>	<b>7865,5</b>	<b>1684,2</b>	<b>21,4</b>	<b>121,0</b>	<b>7,2</b>	<b>46,4</b>
8.	<b>KDTM10</b>	<b>7865,5</b>	<b>7400,2</b>	<b>94,1</b>	<b>51,1</b>	<b>0,7</b>	<b>49,7</b>
9.	SDT10	7865,5	940,0	12,0	41,1	4,3	47,8
10.	<b>SDT12</b>	<b>7865,5</b>	<b>5839,8</b>	<b>93,3</b>	<b>2,0</b>	<b>0,1</b>	<b>50,0</b>
11.	SDT13	7865,5	1175,0	15,0	5919,8	503,8	0,0
12.	<b>SDT16</b>	<b>7865,5</b>	<b>7407,1</b>	<b>94,2</b>	<b>26,1</b>	<b>0,4</b>	<b>49,82</b>
13.	SDT20	7865,5	1566,7	20,0	6419,2	409,7	0,0

Isolat KDTM5 walaupun kemampuan reduksi nitratnya tidak terlalu tinggi, akan tetapi dalam proses metabolisme berjalan relatif lebih sempurna. Hal ini dapat dilihat dari prosentase produk akhir (gas nitrogen) yang dihasilkan relatif tinggi, sehingga masih diikutkan pada tahapan seleksi berikutnya.

Kemampuan mereduksi nitrat pada kondisi aerob dan anaerob dimiliki oleh enam isolat (Tabel 3). Kondisi ini menunjukkan bahwa keenam isolat mempunyai enzim nitrat reduktase yang

terdapat di periplasma (Nap) dan enzim nitrat reduktase pada membran plasma (Nar). Menurut Moreno-Vivian, *et al.* (1999) terdapat dua jenis enzim yang mereduksi nitrat menjadi nitrit (nitrat reduktase), yaitu: 1) enzim nitrat reduktase yang terdapat di membran plasma (Nar), 2) enzim nitrat reduktase yang terdapat di periplasma (Nap). Gen penyandi Nar akan terekspresi dalam keadaan anaerob (Richardson, 2000). Nitrat yang direduksi oleh Nar akan ditransfer ke membran untuk diubah menjadi nitrit. Transfer nitrat ke

Tabel 3. Penurunan konsentrasi senyawa nitrat ( $\mu\text{M}$ ) oleh aktifitas isolat denitrifikasi selama waktu inkubasi 14 hari pada kondisi aerob dan anaerob

No	Isolat	Kondisi	Waktu (hari ke)							
			0	2	4	6	8	10	12	14
1	KDTM 10	aerob	1500	1450	950	110	0	0	0	0
		anaerob	1500	1400	620	0,0	0	0	0	0
2	SDT 12	aerob	1500	1470	1040	500	0	0	0	0
		anaerob	1500	650	600	250	150	0	0	0
3	KDTS 3	aerob	1500	1475	100	100	200	250	250	250
		anaerob	1500	1470	1000	750	0	0	0	0
4	SDT 2	aerob	1500	1500	1500	1250	1200	1000	850	650
		anaerob	1500	1500	1400	1300	1250	1000	750	500
5	KDTM 5	aerob	1500	1500	1250	1100	1000	700	0	0
		anaerob	1500	1500	1400	250	100	100	0	0
6	SDT 16	aerob	1500	1500	1400	1200	450	850	600	550
		anaerob	1500	1430	1000	500	350	200	100	80

membran dihambat oleh keberadaan oksigen (Denis, *et al.*, 1990). Nitrat diubah menjadi nitrit dalam keadaan aerob oleh Nap karena Nap berada pada bagian periplasma, sehingga nitrat tidak perlu ditransfer ke membran plasma untuk diubah menjadi nitrit.

Pertumbuhan keenam isolat pada medium dalam kondisi aerob lebih cepat dari pada di medium dalam kondisi anaerob. Hal ini dapat dilihat dari peningkatan nilai kerapatan optik dari suspensi kultur (Tabel 4). Isolat KDTM10, KDTS3, SDT2, KDTM5, SDT16 dalam kondisi anaerob dapat mereduksi senyawa nitrat lebih baik dari pada dalam kondisi aerob. Proses reduksi nitrat menjadi nitrit dikatalis oleh enzim nitrat reduktase, baik yang terikat membrane (NAR), maupun yang berada pada periplasma (NAP). Aktivitas enzim Nap terjadi pada kondisi aerob dan anaerob. Sedangkan aktivitas enzim Nar diduga hanya terjadi pada kondisi anaerob.

Lebih lanjut Bedzyk, *et al.* (1999) mengemukakan bahwa ekspresi enzim Nap meningkat pada kondisi anaerob. Nap mengkatalisis perubahan nitrat menjadi nitrit dalam keadaan aerob dan anaerob (Rusmana, 2003b). Isolat SDT12 pada kondisi aerob mereduksi nitrat lebih baik dari pada kondisi anaerob.

Isolat KDTM10, SDT12, KDTS3 adalah tiga isolat yang mempunyai kemampuan mereduksi nitrat yang tinggi dan menghasilkan nitrit yang relatif rendah. Isolat-isolat tersebut mempunyai potensi yang baik sebagai agen biokondisioner senyawa toksik di tambak udang. Akan tetapi masih perlu dilakukan tahapan seleksi lanjut tentang kelangsungan hidup isolat tersebut pada system perairan tambak dalam berkompetisi dengan mikroorganisme indigenous lainnya.

Uji reduksi nitrit dilakukan terhadap enam isolat yaitu: KDTM10, SDT12, KDTS3, SDT2, KDTM5, dan SDT16 (Tabel

Tabel 4. Nilai kerapatan optik kultur isolat-isolat terseleksi pada panjang gelombang 420 nm selama 14 hari dalam kondisi aerob dan anaerob

No	Isolat	Kondisi inkubasi	Waktu (hari ke)							
			0	2	4	6	8	10	12	14
1	KDTM 10	aerob	0,0	0.02	0.1	0.2	0.3	0.4	0.4	0.3
		anaerob	0,0	0.02	0.15	0.16	0.2	0.25	0.25	0.2
2	SDT 12	aerob	0,0	0.02	0.12	0.28	0.3	0.4	0.3	0.28
		anaerob	0,0	0.02	0.1	0.1	0.12	0.2	0.25	0.3
3	KDTS 3	aerob	0,0	0.02	0.1	0.18	0.25	0.35	0.3	0.25
		anaerob	0,0	0.01	0.1	0.2	0.25	0.3	0.25	0.2
4	SDT 2	aerob	0,0	0.01	0.1	0.15	0.18	0.2	0.25	0.3
		anaerob	0,0	0	0.01	0.05	0.1	0.16	0.18	0.2
5	KDTM 5	aerob	0,0	0.01	0.15	0.3	0.4	0.5	0.55	0.5
		anaerob	0,0	0	0.01	0.01	0.02	0.03	0.05	0.1
6	SDT 16	aerob	0,0	0.01	0.1	0.15	0.25	0.28	0.3	0.35
		anaerob	0,0	0.01	0.2	0.05	0.06	0.1	0.14	0.15

Keadaan ini terjadi karena pada kondisi aerob reduksi nitrat hanya dilakukan oleh enzim Nap, sedangkan pada kondisi anaerob reduksi dapat dilakukan oleh enzim Nap dan Nar. Meningkatnya oksigen terlarut dalam medium akan menghambat kerja enzim Nar (Moreno-Vivian, *et al.*, 1999).

5). Isolat KDTM10 dan KDTS3 mempunyai kemampuan mereduksi nitrit yang tinggi dibandingkan dengan empat isolat lainnya. Keenam isolat pada dasarnya mempunyai kemampuan dalam mereduksi senyawa nitrit pada kondisi aerob. Zumft (1997) menyatakan enzim nitrit reduktase berperan

mereduksi nitrit menjadi nitrik oksida dan enzim ini terdapat pada membran periplasma. Secara fisiologis membran periplasma terletak pada bagian sebelah luar pada kondisi aerobik. Nitrit di medium direduksi oleh isolat KDTMI0 dan KDTS3 secara berturut-turut sekitar sebesar 99% dan 98% pada hari ke delapan, sedangkan isolat lainnya SDT2 dan KDTM5 pada hari ke delapan masih menyisakan senyawa nitrit sekitar 35%, isolat SDT12 tersisa sekitar 20%, sedangkan isolat SDT16 sampai hari ke 10 masih menyisakan senyawa nitrit sebesar 45%.

menunjukkan bahwa isolat KDTS3 mempunyai kecepatan maksimum ( $V_{maks}$ ) dan tetapan Michaelis-Menten ( $K_M$ ) lebih besar dari pada KDTMI0.  $K_m$  merupakan ukuran afinitas enzim-substrat.

## KESIMPULAN

Bakteri denitrifikasi yang berhasil diisolasi dari sampel sedimen tambak udang di Serang dan Kendari sebanyak 12 isolat. Sebanyak 8 isolat didapat dari sampel sedimen tambak udang dari Serang dan 4 isolat dari sampel sedimen tambak udang

Tabel 5. Penurunan konsentrasi senyawa nitrit ( $\mu\text{M}$ ) oleh aktivitas isolat denitrifikasi selama waktu inkubasi 14 hari pada kondisi aerob

No	Isolat	Waktu (hari ke)							
		0	2	4	6	8	10	12	14
1	KDTMI0	2000	1750	500	0	0	0	0	0
2	SDT12	2000	1800	1100	1000	nd	250	0	0
3	KDTS3	2000	1200	150	100	0	0	0	0
4	SDT2	2000	1850	1500	1250	800	600	500	350
5	KDTM5	2000	nd	1250	nd	1250	nd	0	0
6	SDT16	2000	1850	1550	nd	nd	950	nd	nd

Uji pembentukan gas, memperlihatkan bahwa isolat KDTM5, KDTMI0, SDT12, KDTS3, SDT16 adalah isolat yang mempunyai kemampuan dalam pembentukan gas. Isolat SDT2 tidak mempunyai kemampuan tersebut. Uji pembentukan gas ini untuk memperkuat bahwa produk akhir dari denitrifikasi berupa gas ( $\text{N}_2\text{O}$  atau  $\text{N}_2$ ). Menurut Zumft (1997) denitrifikasi adalah proses reduksi nitrat menjadi  $\text{N}_2\text{O}$  dan  $\text{N}_2$ .

Pada uji kinetika reduksi nitrat digunakan isolat KDTMI0 dan KDTS3. Isolat KDTS3 memakai nitrat lebih besar dari pada KDTMI0 (Tabel 6). Kondisi ini

Kendari. Isolat-isolat tersebut umumnya mempunyai bentuk sel batang, motil, dan menunjukkan Gram negatif. KDTMI0, SDT12, KDTS3 adalah isolat-isolat yang potensial untuk pengendalian pencemaran senyawa nitrogen diperairan. Isolat KDTMI0 dan KDTS3 mempunyai kemampuan mereduksi nitrat lebih tinggi pada kondisi anaerob dibandingkan pada kondisi aerob, sedangkan isolat SDT12 sebaliknya. Isolat KDTS3 mempunyai kemampuan mereduksi nitrat lebih tinggi dibandingkan isolat KDTMI0. Isolat tersebut mempunyai potensi yang baik sebagai agen bioremediasi di tambak udang.

Tabel 6. Hasil uji kinetika nilai  $V_{maks}$  dan  $K_m$  dari dua isolat terseleksi

No.	Isolat	$V_{maks}$ $\mu\text{M}/\text{jam}/\text{sel}$	$K_m$ $\mu\text{M}/\text{sel}$
1.	KDTMI0	$2,4 \times 10^{-6}$	$1,3 \times 10^{-5}$
2.	KDTS3	$3,5 \times 10^{-6}$	$2,9 \times 10^{-5}$

## DAFTAR PUSTAKA

- Bedzyk, L., Wang T. & Ye R. W., 1999, The Periplasmic nitrate reductase in *Pseudomonas* sp. strain G-179 catalyzes the first step of denitrification. *J Bacteriol* 181:2802-2806.
- Burlage, R.S, Atlas, R., Stahl, D., Geesey, G., & Saylor, G., editor, 1998, *Techniques in Microbiol Ecology*. Oxford : Oxford Univ Pr. Hal: 14-16.
- Denis, K., Dias, F.M., & Rowe, J.J., 1990, Oxygen regulation of nitrate transport by diversion of electron flow in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 265:18095-18097.
- Greenberg, A.E., Clesceri, L.S., & Eaton, A. D., editor, 1992, *Standart methods for Examination of water and wastewater*. Ed ke-18. Washington DC:Publication Office American Public Health Association.
- Hadioetomo, R.S., 1983, *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek*. Jakarta; PT Gramedia Pustaka Utama.
- Hugh, R. & Leifson., 1953, The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. *J Bacteriol* 66:24-26.
- Moreno-Vivian, C., Cabello, P., Luque, M. M., Blasco, R. & Castillo, F., 1999, Prokaryot nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *J Bacteriol* 181:6573-6584.
- Richardson, D.J., 2000, Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiol* 146:551-571.
- Rusmana, I., 2003a., *Reduksi Nitrat Disimilatif pada Bakteri: Isu Lingkungan dan Penerapannya*. *Hayati* 4:158-160.
- Rusmana, I., 2003b., *Physiology of Nitrous Oxide Production in Estuarine Dissimilative Nitrate Reducing Bakteria [Disertasi]*. England : Univ of Essex.
- Rusmana, I. & Nedwell, D.B., 2004, Use of chlorate as a selective inhibitor to distinguish membrane-bound nitrate reductase (Nar) and periplasmic nitrate reductase (Nap) of dissimilative nitrate reducing bacteria in sediment. *J FEMS Microbiol Ecol* 48:379-386.
- Sugama, K., 2002, Status budi daya udang introduksi serta prospek pengembangannya dalam tambak air tawar. *Warta Penelt Perikan Indones* 8: 19-22.
- Teixeira, P. & Oliveira, R., 2002. Metabolism of *Alcaligenes denitrificans* in Bio Film vs Planktonic Cells. *J of Appl Microbiol* 92: 256-260.
- Zumfl, W., 1997, *Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 61:533-616.