

STRUKTUR KOMUNITAS BAKTERI PENGOKSIDASI AMONIA BERDASARKAN GEN *amoA* DI SITU SAWANGAN-BOJONGSARI, JAWA BARAT

Lena Novita ^{a,c}, Iman Rusmana ^b, dan Tri Widiyanto ^c

^a Mahasiswa Pascasarjana IPB

^b Staf Dosen Departemen Biologi –IPB

^c Pusat Penelitian Limnologi-LIPI

E-mail: lena_ipb@yahoo.com

Diterima redaksi : 4 November 2013, disetujui redaksi : 18 Maret 2014

ABSTRAK

Salah satu permasalahan dalam pengelolaan perairan darat adalah penurunan kualitas air yang disebabkan oleh polusi senyawa nitrogen. Mekanisme transformasi senyawa nitrogen oleh bakteri indigenous menjadi langkah penting untuk mengatasi permasalahan tersebut. Aktivitas antropogenik di sekitar Situ Sawangan-Bojongsari memungkinkan terjadinya polusi senyawa nitrogen seperti amonia. Penelitian bertujuan untuk mengetahui struktur komunitas bakteri pengoksidasi amonia serta faktor fisika dan kimia yang mempengaruhinya di Situ Sawangan-Bojongsari. Kelimpahan dan keragaman bakteri pengoksidasi amonia dipengaruhi oleh faktor fisika dan kimia perairan. Kelimpahan tertinggi bakteri pengoksidasi amonia terdapat pada strata 0 cm (270 sel/mL) dan kelimpahan terendah terdapat pada strata 230 cm (73 sel/mL). Bakteri pengoksidasi amonia tidak ditemukan pada bagian sedimen. Gen *amoA* hanya teramplifikasi dari contoh air. Sebanyak 10 pita gen *amoA* dengan posisi yang berbeda dapat terdeteksi pada gel DGGE. Sebanyak enam isolat gen *amoA* memiliki kemiripan sekuen nukleotida dengan *amoA* dari uncultured bacterium (86-97%). Sekuen asam amino dari keenam isolat gen *amoA* menunjukkan kemiripan dengan protein ammonia monooxygenase (56-93%). Sebanyak lima isolat gen *amoA* teridentifikasi sebagai ammonia monooxygenase dari uncultured bacterium dan satu isolat sebagai ammonia monooxygenase dari *Nitrosospira* sp. III7. Berdasarkan analisis filogenetik, keenam isolat gen *amoA* termasuk ke dalam genus *Nitrosospira*.

Kata kunci : amonia monooksigenase, *amoA*, DGGE

ABSTRACT

COMMUNITY STRUCTURE OF AMMONIA OXIDIZING BACTERIA BASED ON *amoA* GENE AT SITU SAWANGAN-BOJONGSARI, WEST JAVA. *One of problems in freshwater management is declining of water quality due to nitrogen compounds pollution. Mechanisms of nitrogen transformation by indigenous bacteria are an important action to solve this problem. Anthropogenic activities on Situ Sawangan-Bojongsari may cause nitrogen pollution like ammonia. The aim of this research is to find out the structure community of ammonia oxidizing bacteria and the physical and chemical factors that influence the community. Abundance and community structure of ammonia oxidizing bacteria at Situ Sawangan-Bojongsari influenced by physical and chemical factors. The most abundance of ammonia oxidizing bacteria was found in the depth of 0 cm (270 cell/mL) and the less was found in the depth of 230 cm (73 cells/mL). There was no ammonia oxidizing bacteria found in the sediment. Fragment of *amoA* gene was amplified by PCR from water samples. There was no fragment *amoA* gene amplified product from sediment samples. Total of 10 bands *amoA* genes with different positions can be detected on the DGGE gel. Total of six isolates of *amoA* gene had nucleotide sequence similarity with *amoA* from uncultured bacterium (86-97 %). Amino acid sequences of the six isolates of *amoA* gene showed similarity with protein of ammonia monooxygenase (56 and 93 %). Total of five isolates of *amoA* gene was identified as ammonia monooxygenase from uncultured bacterium and one isolate was as ammonia monooxygenase from *Nitrosospira* sp.III7. Based on phylogenetic analysis, the 6 isolates of *amoA* gene was belong to the genus *Nitrosospira*.*

Keywords : ammonia monooxygenase, *amoA*, DGGE

PENDAHULUAN

Permasalahan yang sering dihadapi ekosistem perairan darat pada umumnya adalah rendahnya kualitas air yang disebabkan polusi senyawa nitrogen seperti amonia. Aktivitas antropogenik sangat berperan dalam pemasukan senyawa nitrogen pada lingkungan perairan darat. Pemasukan senyawa nitrogen ini sebanding dengan meningkatnya populasi manusia dan pemanfaatan ekosistem perairan tersebut (Carpenter *et al.*, 1998). Aktivitas yang dapat menyebabkan meningkatnya kadar senyawa nitrogen dalam perairan antara lain budidaya perikanan, pembuangan limbah industri dan limbah domestik.

Polusi senyawa nitrogen pada lingkungan perairan menimbulkan efek negatif baik secara langsung maupun tidak langsung. Efek negatif secara langsung di antaranya disebabkan oleh toksisitas senyawa nitrogen anorganik seperti amonia (NH_3), nitrit (NO_2) dan nitrat (NO_3) (Alonso & Camargo, 2006). Senyawa NH_3 , NO_2 dan NO_3 merupakan bentuk-bentuk nitrogen anorganik terlarut yang pada umumnya terdapat di sistem perairan. Senyawa tersebut secara alami diperoleh dari deposisi atmosfer, disolusi dari deposit geologi yang kaya nitrogen, fiksasi gas nitrogen (N_2) oleh mikroorganisme tertentu dan degradasi senyawa organik secara biologis (Rabalais *et al.*, 2002). Konsentrasi tertentu senyawa NH_3 , NO_2 dan NO_3 dapat menyebabkan kematian pada hewan akuatik (Alonso & Camargo, 2006) dan senyawa NH_3 bersifat toksik terutama terhadap ikan (Richardson, 1997; Augspurger *et al.*, 2003). Senyawa ini dapat menyebabkan gangguan secara fisiologis, neurologis, dan sitologis sehingga pada akhirnya dapat menyebabkan berkurangnya aktivitas konsumsi makanan, fekunditas, dan ketahanan tubuh pada organisme akuatik (Richardson, 1997; Constable *et al.*, 2003). Senyawa NO_3 memiliki aktivitas toksik yang sama dengan NO_2 akan tetapi NO_3 harus diubah menjadi

NO_2 terlebih dahulu pada jaringan tubuh sehingga toksisitas ion NO_3^- sangat erat kaitannya dengan permeabilitas jaringan tubuh dari organisme akuatik (Jensen, 1996; Cheng & Chen, 2002).

Efek negatif secara tidak langsung di antaranya menyebabkan eutrofikasi (Rabalais *et al.*, 2002). Eutrofikasi dapat menjadi permasalahan yang besar dalam upaya konservasi perairan darat. Eutrofikasi merupakan status tropik perairan yaitu tingginya konsentrasi unsur hara. Peningkatan konsentrasi senyawa NH_4 , NO_2 dan NO_3 dapat memicu pertumbuhan, ketahanan dan proliferasi produsen primer seperti fitoplankton, alga, dan makrofit (Anderson *et al.*, 2002).

Upaya pelestarian dan pengelolaan perairan darat terhadap permasalahan tersebut dapat dilakukan melalui pengendalian faktor luar dan juga perlu memperhatikan kemampuan ekosistem itu sendiri. Mekanisme tersebut melalui transformasi senyawa nitrogen yang terjadi pada badan air yaitu proses oksidasi. Reaksi oksidasi NH_3 pada umumnya diketahui sebagai bagian dari proses nitrifikasi dengan melibatkan enzim amonia monooksigenase (AMO) yang disandikan oleh gen *amo* dimana memiliki 3 subunit yaitu *amoA*, *amoB*, dan *amoC* (Sayavedra *et al.*, 1998). Gen *amoA* seringkali digunakan sebagai marker untuk mengetahui keragaman bakteri pengoksidasi NH_3 (Rotthauwe *et al.*, 1997).

Pemahaman yang baik mengenai mikroba yang berperan dalam proses oksidasi NH_3 akan sangat diperlukan untuk mengetahui sekaligus memberikan solusi dalam menangani permasalahan polusi senyawa NH_3 di perairan. Selain itu, dapat memberikan informasi dasar dalam studi kelayakan ekosistem tersebut sebagai usaha dalam produksi perikanan yang berkaitan dengan peningkatan ketahanan pangan.

Situ Sawangan - Bojongsari merupakan situ terluas di Kota Depok, Jawa Barat. Adanya peralihan fungsi sempadan Situ Sawangan-Bojongsari menjadi lahan

pertanian dan lahan terbangun, serta pembuangan limbah domestik ke perairan situ, maka diperkirakan menyebabkan perubahan yang bersifat kurang menguntungkan bagi perairan. Purnama (2008) melaporkan bahwa Situ Sawangan-Bojongsari telah mengalami pendangkalan 3-5 m akibat adanya sedimentasi dari limbah domestik yang meningkat seiring dengan meningkatnya pemukiman penduduk di sekitar situ. Selain itu, hampir setiap tahun perairan Situ Sawangan-Bojongsari ditumbuhi eceng gondok (*Eichhornia crassipes*), bahkan pertumbuhan *Salvinia* sp. dapat menutupi hampir 60% perairan (Efendi et al., 1996; Purnama, 2008).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui struktur komunitas bakteri yang berperan dalam proses oksidasi NH_3 di Situ Sawangan-Bojongsari serta untuk mengetahui berbagai faktor fisika dan kimia perairan yang mempengaruhinya.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Pengambilan contoh dilakukan pada tanggal 7 Januari 2012 di Situ Sawangan-Bojongsari Kota Depok, Jawa Barat. Analisis kimia dan kelimpahan bakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiota, Pusat Penelitian Limnologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). Analisis keragaman bakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Institut Pertanian Bogor (IPB).

Pengambilan Contoh

Pengambilan contoh air dan sedimen dilakukan pada tiga titik (Gambar 1). Titik pengambilan contoh pertama merupakan wilayah perairan yang memiliki Karamba Jaring Apung (KJA), titik pengambilan contoh kedua merupakan wilayah *outlet* dan titik pengambilan contoh ketiga merupakan wilayah *inlet*. Contoh air diambil di masing-masing titik pada tiga strata kedalaman yaitu air permukaan, kedalaman Secchi, dan dasar perairan. Contoh air ditampung

menggunakan botol steril (250 ml). Contoh sedimen diambil menggunakan *sediment core* pada kedalaman 0-10 cm dengan strata kedalaman 0-2 cm, 2-5 cm, dan 5-10 cm. Komposit dilakukan terhadap contoh dari masing-masing titik sesuai dengan strata kedalaman.

Analisis Parameter Fisika dan Kimia Perairan Situ

Analisis parameter fisika perairan dilakukan pada saat pengambilan sampel yang meliputi parameter suhu, pH, dan oksigen (O_2) terlarut. Pengukuran dilakukan menggunakan *Water Quality Checker* (WQC). Selain itu dilakukan pengukuran kedalaman Secchi menggunakan keping Secchi.

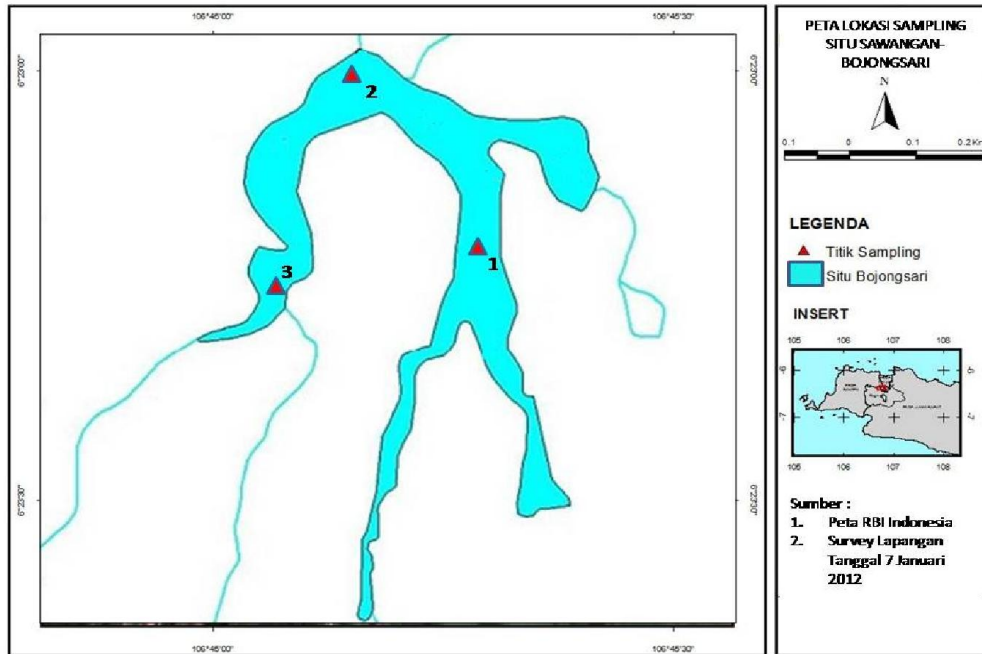
Analisis kimia air dan air pori sedimen meliputi parameter *Total Nitrogen* (TN), bahan organik total (TOM, *Total Organic Matter*), bahan organik terlarut (DOM, *Dissolved Organic Matter*), karbon organik total (TOC, *Total Organic Carbon*), N-NH_4 , N-NO_3 , dan N-NO_2 . Kadar TOM dan DOM diukur dengan titrimetri, TN dan N-NO_3 diukur dengan spektrofotometri-*brucine*, N-NH_4 diukur dengan spektrofotometri-phenate, dan N-NO_2 diukur dengan spektrofotometri-*sulphanilamide* (APHA, 1995)

Analisis Kelimpahan Bakteri Pengoksidasi NH_3

Sebanyak 1 ml contoh air atau 1 g sedimen diencerkan dengan NaCl fisiologis (0,85%) melalui beberapa pengenceran berseri. Selanjutnya sebanyak 1 ml hasil pengenceran dari tiga pengenceran terakhir diinokulasikan pada 9 ml medium cair yang terdiri dari (per liter akuades) 0,9 g Na_2HPO_4 , 0,2 g KH_2PO_4 , 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,005 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,0184 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g Yeast Ekstrak, dan 1 g NH_4Cl . Sebagai sumber karbon digunakan 5 g Na_2CO_3 . Inkubasi dilakukan pada suhu ruang selama tujuh hari. Kelimpahan bakteri dihitung melalui metode *Most Probable*

Number (MPN) (Cappucino & Sherman, 1983). Uji positif pengoksidasi NH_3 dinyatakan apabila kultur bakteri mengandung senyawa NO_2 setelah masa inkubasi yaitu dengan terdeteksinya warna merah muda hingga keunguan setelah diberi pereaksi sulfanilamid 1 % dan NED (Naftalena Etilena Diamina) 0,1 % (APHA, 1995).

template, 5 μL buffer, 5 μL dNTP, 3 μL MgSO_4 , 1 unit primer, 0,5 μL KOD *Hot Start DNA Polymerase* (Novagen) dan akuades steril hingga volume 50 μL . Amplifikasi gen *amoA* dilakukan pada kondisi denaturasi awal 94 °C selama 5 menit, diikuti 35 siklus pada suhu denaturasi 94 °C selama 1 menit, *annealing* 58 °C selama 1 menit, pemanjangan 72 °C selama



Gambar 1. Lokasi pengambilan contoh

Ekstraksi DNA dan Amplifikasi Gen *amoA*

Sebanyak 250 ml sampel air disaring menggunakan membran filter GFF (\varnothing pori 0,22 μm). Ekstraksi DNA menggunakan *Ultraclean Water DNA Extraction Kit* MOBIO. Sebanyak ± 1 g sedimen digunakan untuk ekstraksi DNA menggunakan *Ultraclean Soil DNA Extraction Kit* MOBIO. Kuantitas dan kualitas DNA hasil ekstraksi diukur menggunakan Nanodrop.

Amplifikasi gen *amoA* dilakukan menggunakan primer AmoA-1F dan AmoA-2R serta primer AmoA-1F-GC clamp (Chu et al., 2007). Reaksi amplifikasi menggunakan komposisi : 2 μL DNA

1 menit, selanjutnya pemanjangan akhir pada suhu 72 °C selama 5 menit. Hasil amplifikasi DNA dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa 1,5 % dan visualisasi dengan UV transluminator.

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

Sebanyak 20 μL DNA hasil amplifikasi yang telah dicampurkan dengan 4 μL *loading dye* dimigrasikan pada gel poliakrilamid 6% (b/v) dalam buffer TAE 1x (pH 7, 10 mM sodium asetat, 0,5 mM Na₂-EDTA) dengan gel yang dibuat dari 40% (b/v) larutan stok acrylamide (acrylamide-N,N'-methylenebisacrylamide, 37:1) dan

denaturasi yang dibuat antara 35-65% (100% denaturasi : 7 M urea dan 40% (v/v) formamide). Elektroforesis dilakukan pada suhu 60°C dan 130 Volt selama 4 jam. Setelah elektroforesis, gel direndam selama 15 menit dengan larutan pewarna Ethidium Bromide (EtBr 0,5 mg/L). Analisis hasil denaturasi dilakukan menggunakan *Gel Doc System*.

Analisis Urutan Nukleotida dan Filogenetik

Fragmen DNA pada gel elektroforesis DGGE yang sudah dipotong direndam dengan 40 µL akuades dan diinkubasi pada *shaker* dengan suhu 37 °C selama 2 jam. Selanjutnya larutan tersebut diinkubasi pada suhu 4 °C selama 24 jam. Larutan digunakan sebagai DNA cetakan untuk diamplifikasi ulang menggunakan primer tanpa GC-Clamp. Produk amplifikasi dianalisis urutan nukleotidanya melalui proses sekuensing menggunakan jasa perusahaan *First Base Malaysia* dengan protokol standar DNA sekuenser (ABI PRISM 3100). Analisis kemiripan sekuen dilakukan menggunakan program BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Analisis filogenetik dilakukan menggunakan piranti lunak MEGA 5.0 berdasarkan metode *Neighbour-Joining* (NJ) dan nilai bootstrap 1000x.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Profil Parameter Fisika dan Kimia Perairan Situ Sawangan-Bojongsari

Kondisi fisik lokasi pengambilan contoh pada saat pengukuran masing-masing memiliki kedalaman Secchi yang sama yaitu 110 cm dan kedalaman dasar rata-rata 230 cm. Nilai suhu kolom air Situ Sawangan-Bojongsari menurun seiring dengan bertambahnya kedalaman (Gambar 2), yaitu dari 26,1-31,1 °C (strata 0 cm), 24,2-29,1 °C (strata 110 cm) hingga nilai yang paling rendah yaitu 23,4-24,9 °C (strata 230 cm). Stratifikasi suhu yang terjadi pada kolom air Situ Sawangan-Bojongsari diduga

disebabkan oleh berkurangnya intensitas cahaya matahari yang masuk ke perairan seiring dengan bertambahnya kedalaman. Cahaya matahari yang masuk ke perairan akan diubah menjadi energi panas sehingga lapisan permukaan air akan memiliki suhu yang lebih tinggi (Vassilis & Soutana, 2003).

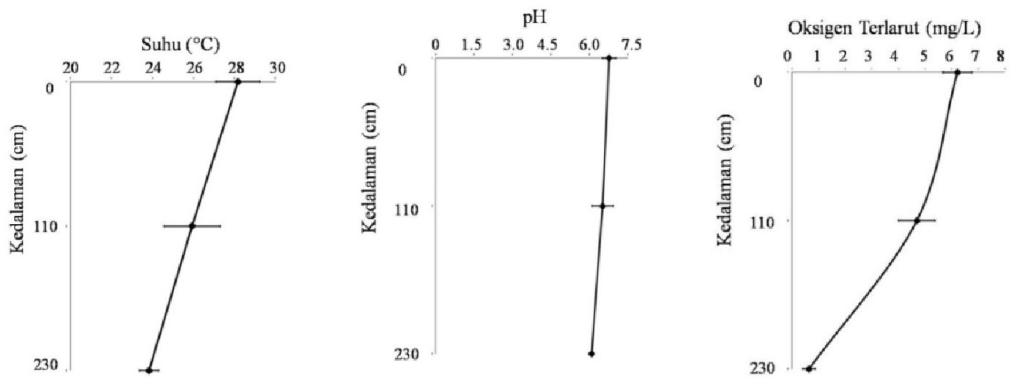
Parameter nilai pH juga cenderung menurun dengan bertambahnya kedalaman pada kolom air (Gambar 2), yaitu 6,40-6,98 9 (strata 0 cm), 4,01-5,20 (strata 110 cm) dan 6,04-6,14 (strata 230 cm). Adapun terjadinya penurunan pH pada kolom air Situ Sawangan-Bojongsari diduga berkaitan erat dengan konsentrasi O₂ terlarut pada kolom air yang menurun seiring dengan bertambahnya kedalaman. Sigeo *et al.* (2005) menyatakan bahwa pada kondisi O₂ terlarut rendah, konsentrasi karbondioksida (CO₂) yang bersifat asam akan meningkat sehingga perairan akan memiliki nilai pH yang rendah. Nilai pH pada sistem perairan merupakan informasi yang penting dikarenakan dapat mempengaruhi toksisitas kimia diperairan, salah satunya adalah NH₃ yang dapat terionisasi pada nilai pH rendah (Wurst, 2003).

Begitupun juga dengan konsentrasi O₂ terlarut yang cenderung menurun dengan bertambahnya kedalaman pada kolom air, yaitu 5,37-7,90 mg/L (strata 0 cm), 4,01-5,20 mg/L (strata 110 cm), dan 0,37-0,84 mg/L (strata 230 cm). Penurunan konsentrasi O₂ terlarut disebabkan oleh kadar senyawa organik yang memerlukan O₂ dalam proses dekomposisinya (Salmin, 2005). Hal ini dapat ditunjukkan dengan adanya penurunan konsentrasi O₂ terlarut seiring dengan peningkatan akumulasi senyawa organik pada kolom air Situ Sawangan-Bojongsari. Selain itu, penurunan O₂ terlarut juga seiring dengan peningkatan senyawa NH₄ pada kolom air. Hal ini diduga akibat adanya pemanfaatan O₂ dalam proses mineralisasi yang juga berkaitan dengan proses dekomposisi dimana menghasilkan senyawa NH₄ (Zaman *et al.*, 1999).

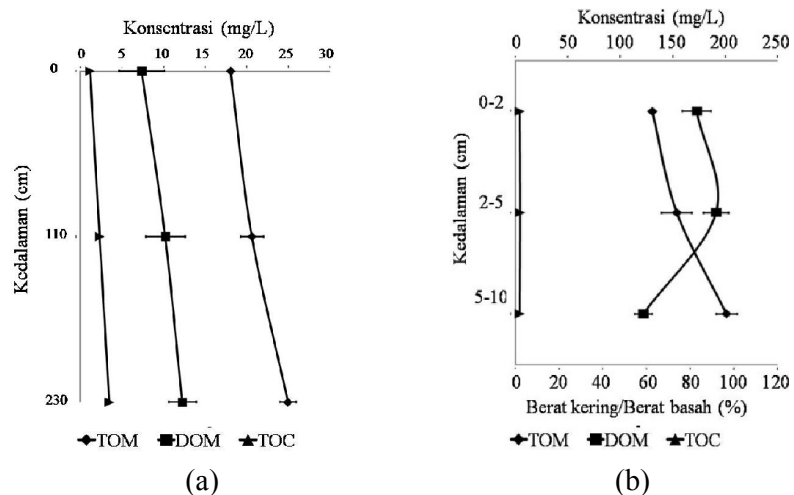
Hasil pengukuran kadar senyawa organik yang terdapat di kolom air menunjukkan bahwa kadar TOM, DOM, dan TOC semakin meningkat seiring dengan bertambahnya kedalaman yaitu kadar TOM antara 18,11-25,0 mg/L, kadar DOM antara 7,42- 12,29 mg/L dan kadar TOC antara 1,17 -3,51 mg/L (Gambar 3).

Profil kadar senyawa organik pada sedimen menunjukkan bahwa hanya TOM yang meningkat seiring dengan bertambahnya kedalaman. Kadar TOM berkisar antara 62-55-96,67% berat kering, kadar DOM antara 121,85 191,29 mg/L) dan kadar TOC antara 1,96-2,22%.

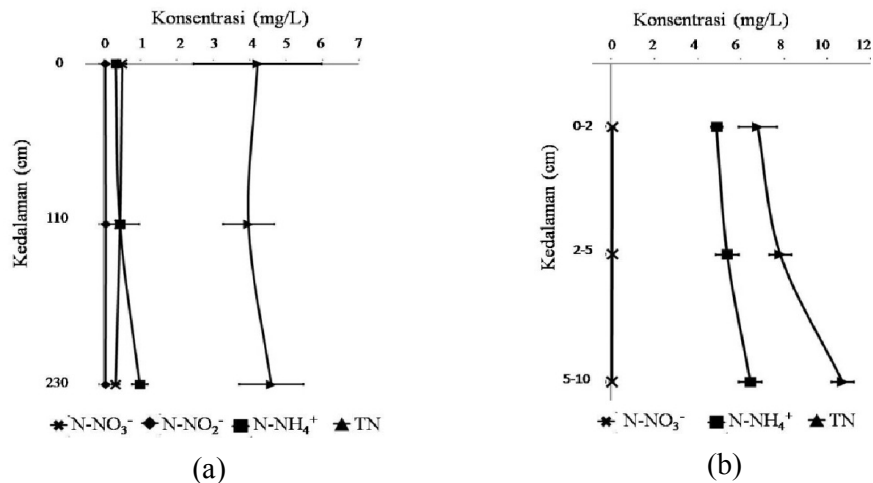
Kadar TN pada sedimen lebih tinggi dibandingkan kolom air, akan tetapi kadar senyawa nitrogen inorganik pada masing-masing strata menunjukkan nilai yang bervariasi. Kadar TN pada sedimen antara 6,791- 10,721 mg/L dan pada kolom air antara 3,980-4,602 mg/L. Kadar senyawa NO₃ cenderung menurun seiring dengan bertambahnya kedalaman dan berkurangnya konsentrasi O₂ terlarut (Gambar 4). Kadar NO₃ antara 0,042-0,509 mg/L, kadar NO₂ berkisar antara 0,048- 0,061 mg/L, dan kadar NH₄ antara 0,338-6,449 mg/L).



Gambar 2. Profil parameter suhu, pH, dan O₂ terlarut pada kolom air Situ Sawangan-Bojongsari



Gambar 3. Konsentrasi TOM, DOM, TOC pada kolom air (a) serta konsentrasi DOM pada air pori sedimen dan persentase TOM dan TOC pada sedimen (b) di Situ Sawangan-Bojongsari



Gambar 4. Kelimpahan senyawa nitrogen pada kolom air (a) dan air pori sedimen (b) di Situ Sawangan-Bojongsari.

Kelimpahan Bakteri Pengoksidasi NH₃ di Situ Sawangan-Bojongsari

Bakteri pengoksidasi NH₃ di Situ Sawangan-Bojongsari hanya ditemukan pada bagian kolom air dengan kelimpahan yang semakin menurun seiring dengan bertambahnya kedalaman (Gambar 5). Hal ini juga menunjukkan bahwa kelimpahan bakteri tersebut juga menurun seiring menurunnya suhu, pH dan konsentrasi O₂ terlarut di kolom air Situ Sawangan-Bojongsari. Kelimpahan tertinggi bakteri pengoksidasi NH₃ terdapat pada strata 0 cm (270 sel/mL) dan kelimpahan terendah terdapat pada strata 230 cm yaitu 73 sel/mL. Lapisan air pada strata 0 cm merupakan lapisan yang memiliki konsentrasi O₂ terlarut paling tinggi. Bakteri pengoksidasi NH₃ memerlukan O₂ untuk melakukan aktivitasnya (Bothe *et al.*, 2000), sehingga lingkungan yang kaya akan O₂ akan sangat mendukung kehidupan bakteri tersebut. Bakteri pengoksidasi NH₃ tidak ditemukan pada lapisan sedimen Situ Sawangan-Bojongsari diduga erat kaitannya dengan adaptasi bakteri tersebut terhadap keterbatasan O₂ terlarut. Meskipun di lain pihak hasil penelitian Qiu *et al.* (2010) menunjukkan bahwa bakteri pengoksidasi NH₃ dapat ditemukan pada sedimen kedalaman 0-3 cm.

Kelimpahan bakteri pengoksidasi NH₃ tidak meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi NH₄ dikolom air (Gambar 4). Meskipun NH₄ berperan sebagai substrat dalam oksidasi NH₄ tetapi keterbatasan O₂ merupakan faktor penghambat dalam proses oksidasi sehingga mempengaruhi pertumbuhan bakteri pengoksidasi NH₃. Bakteri pengoksidasi NH₃ memanfaatkan proses oksidasi NH₃ untuk mendapatkan energi bagi pertumbuhannya. Avrahami *et al.* (2003) menyebutkan bahwa faktor utama yang mempengaruhi oksidasi NH₃ adalah ketersediaan NH₃ dan O₂. Perbedaan ketersediaan NH₃ dan O₂ di Situ Sawangan-Bojongsari disebabkan oleh perbedaan kondisi fisika, kimia, dan biologi pada masing-masing strata.

Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa di kolom air kelimpahan bakteri pengoksidasi NH₃ tidak terkait dengan senyawa organik (Gambar 3). Bakteri pengoksidasi NH₃ merupakan bakteri autotrofik yang memanfaatkan senyawa CO₂ sebagai sumber C dan memperoleh energi melalui proses oksidasi NH₃ (Bothe *et al.* 2000). Meskipun terdapat bakteri pengoksidasi NH₃ yang bersifat heterotrofik akan tetapi diduga adanya penurunan O₂ terlarut seiring dengan

peningkatan senyawa organik menyebabkan bakteri yang bersifat heterotrofik anaerobik lebih kompetitif.

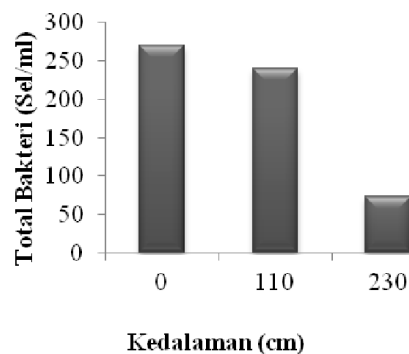
Keragaman Bakteri Pengoksidasi NH₃ di Situ Sawangan-Bojongsari

Gen *amoA* hanya dapat teramplifikasi dari sampel air yaitu dengan terdeteksinya pita DNA berukuran ~490 *base pair* (bp) pada gel elektroforesis (Gambar 6). Hal ini sejalan dengan hasil pengukuran kelimpahan bakteri pengoksidasi amonium yang hanya terdapat pada contoh air (Gambar 5). Visualisasi hasil amplifikasi yang menunjukkan pita DNA dengan ketebalan pita DNA yang lebih tipis pada contoh air strata 230 sejalan dengan hasil penghitungan kelimpahan bakteri pengoksidasi NH₃ yang menunjukkan kelimpahan terendah pada strata tersebut. Adapun pada contoh sedimen tidak terdeteksi kelimpahan bakteri pengoksidasi NH₃ maupun gen *amoA*.

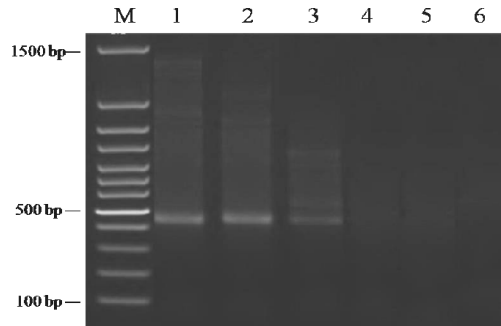
Sebanyak 13 pita DNA terdeteksi pada gel DGGE dan 10 pita DNA terletak pada posisi berbeda pada gel (Gambar 7).

Hal ini menunjukkan bahwa di Situ Sawangan-Bojongsari terdapat 10 keragaman bakteri pengoksidasi NH₃. Keragaman tertinggi bakteri pengoksidasi NH₃ terdapat pada strata 0 cm yaitu sebanyak tujuh. Pada strata 110 cm dan 230 cm terdapat masing-masing sebanyak tiga keragaman.

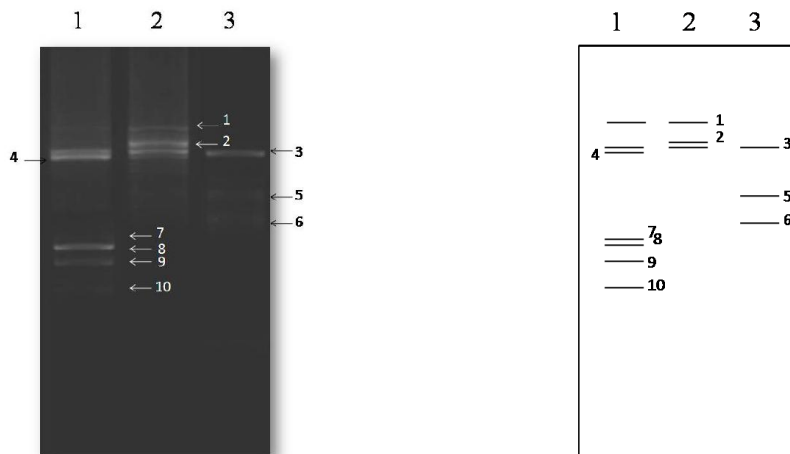
Kelimpahan tertinggi bakteri pengoksidasi NH₃ pada contoh air strata 0 cm sejalan dengan hasil DGGE yang menunjukkan adanya tingkat keragaman tertinggi pada strata tersebut. Keragaman jenis bakteri pada strata tersebut pun berbeda dengan keragaman jenis pada dua strata lainnya. Meskipun tingkat keragaman pada strata 110 dan 230 sama akan tetapi keduanya memiliki keragaman jenis yang berbeda. Terdapat satu keragaman jenis bakteri pengoksidasi NH₃ yang konsisten berada pada ketiga strata contoh air (pita DNA no.3). Hal ini menunjukkan bahwa bakteri yang membawa gen *amoA* tersebut dapat beradaptasi baik terhadap perubahan suhu, pH maupun O₂ terlarut.



Gambar 5. Profil kelimpahan bakteri pengoksidasi NH₃ pada kolom air Situ Sawangan-Bojongsari



Gambar 6. Visualisasi hasil amplifikasi gen *amoA* dari contoh air dan sedimen (b). Lajur M: Marker, Lajur 1: air kedalaman 0 cm, Lajur 2: air kedalaman 110 cm, Lajur 3: air kedalaman 230 cm, Lajur 4: sedimen kedalaman 0-2 cm, Lajur 5: sedimen kedalaman 2-5 cm, Lajur 6: sedimen kedalaman 5-10 cm.



Gambar 7. Profil DGGE gen *amoA* dari perairan Situ Sawangan-Bojongsari. Lajur 1: air kedalaman 0 cm, Lajur 2: air kedalaman 110 cm, dan Lajur 3: air kedalaman 230 cm.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa dengan penggunaan gen *amoA* sebagai marker dapat mengungkapkan perubahan komposisi komunitas bakteri pengoksidasi NH_3 sebagai respon terhadap perubahan lingkungan seperti konsentrasi NH_3 (Kowalchuk & Stephen, 2001) dan pH (De Boer & Kowalchuck, 2001). Perbedaan kedalaman seiring dengan adanya perbedaan suhu pada kolom air Situ Sawangan-Bojongsari. Adanya perbedaan suhu telah menunjukkan perbedaan keragaman bakteri pengoksidasi NH_3 baik pada tingkat jumlah maupun jenis. Keragaman bakteri pengoksidasi NH_3 menurun seiring dengan

menurunnya suhu di kolom air. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Avrahami dan Conrad (2003) yang menunjukkan bahwa perbedaan suhu dapat menyebabkan perbedaan komposisi komunitas pada bakteri pengoksidasi NH_3 . Penurunan suhu juga dapat mengurangi keragaman komunitas bakteri pengoksidasi NH_3 . Urakawa *et al.* (2008) menunjukkan bahwa tingkat keragaman bakteri pengoksidasi NH_3 lebih rendah pada akuarium dengan biofiltrasi suhu rendah (5.5 °C) dibandingkan pada akuarium dengan suhu lebih tinggi (19.9 °C).

Sebanyak 13 pita DNA yang terdapat pada gel DGGE telah dapat diisolasi. Akan tetapi hanya sebanyak enam pita DNA yang dapat diamplifikasi ulang. Sebanyak enam isolat gen *amoA* yaitu pita DNA no. 1,3,4, 6,7, dan 8 dari gel DGGE yang telah diamplifikasi ulang dianalisis kemiripannya melalui perbandingan dengan sekuen nukleotida yang terdapat di *GenBank*. Hasilnya menunjukkan bahwa sekuen nukleotida keenam gen *amoA* memiliki kemiripan tertinggi dengan *uncultured bacterium* (86-97%) (Tabel 1).

Adapun hasil analisis kemiripan sekuen asam amino dari keenam isolat gen *amoA* tersebut menunjukkan kemiripan dengan *ammonia monoxygenase* (56-93%). Sebanyak lima isolat gen *amoA* yaitu pita DNA no. 3, 4, 6, 7, dan 8 memiliki kemiripan tertinggi dengan *ammonia monoxygenase* dari *uncultured bacterium* dan satu isolat gen *amoA* yaitu pita DNA no. 1 memiliki kemiripan tertinggi dengan *ammonia monoxygenase* dari bakteri *Nitrosospira* sp. III7 (Tabel 2).

Tabel 1. Homologi sekuen nukleotida dari gen *amoA* hasil DGGE (BlastN)

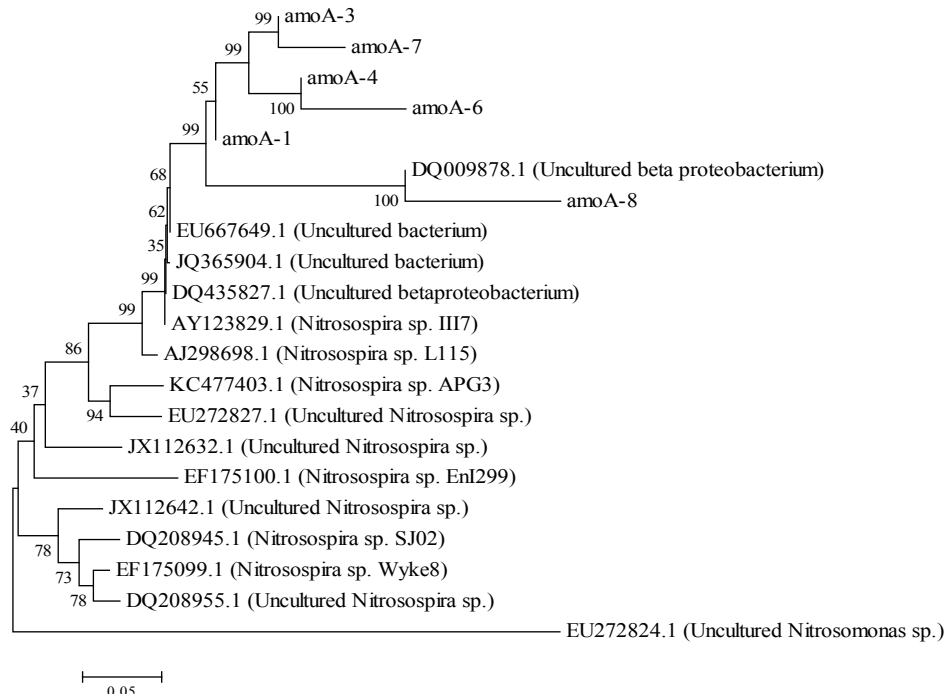
No. pita DNA	Sekuen yang homolog	Identitas (%)	No. Akses Di GenBank
3	<i>Uncultured beta proteobacterium clone Wekeromm pHN 126 AmoA (amoA) gene, partial</i>	93	DQ435827.1
4	<i>Uncultured ammonia-oxidizing bacterium isolate DGGE bands BS AOB 4 putative ammonia monoxygenase subunit A (AmoA) gene, partial</i>	93	EU667649.1
6	<i>Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone E AOB 24 putative ammonia monoxygenase subunit a(AmoA) gene, partial</i>	87	JQ365904.1
7	<i>Uncultured ammonia-oxidizing bacterium isolate DGGE bands BS AOB 4 putative ammonia minooxygenase subunit A (amoA) gene, partial</i>	86	EU667649.1
8	<i>Uncultured beta proteobacterium clone pm-amoA-1 AmoA (amoA) gene, partial</i>	94	DQ009878.1

Tabel 2. Homologi sekuen asam amino dari gen *amoA* hasil DGGE (BlastX)

No. pita DNA	Sekuen yang homolog	Identitas (%)	No. Akses Di GenBank
1	<i>Ammonia monoxygenase (Nitrosospira sp. III7)</i>	93	AAM77413
3	<i>Ammonia monoxygenase (uncultured ammonia oxidizing bacterium)</i>	86	AAP88532.1
4	<i>Ammonia monoxygenase subunit A, partial (uncultured ammonia-oxidizing beta proteobacterium)</i>	83	CBL43085.1
6	<i>Ammonia monoxygenase subunit A, partial (uncultured ammonia-oxidizing beta proteobacterium)</i>	79	CBL43085.1
7	<i>Ammonium monoxygenase alpha subunit (uncultured bacterium)</i>	56	AEU16981.1
8	<i>Ammonia monoxygenase subunit A (uncultured bacterium)</i>	84	BAE93361.1

Berdasarkan analisis filogenetik dari keenam isolat gen *amoA* hasil DGGE menunjukkan bahwa keenam isolat gen termasuk ke dalam kelompok *beta-proteobacteria* dan memiliki kekerabatan paling dekat dengan genus *Nitrosospira* (Gambar 8). Hasil analisis ini menunjukkan bahwa jenis bakteri pengoksidasi NH₃ di Situ Sawangan-Bojongsari sebesar 60% sudah dapat diketahui termasuk ke dalam genus *Nitrosospira*.

isolat gen *amoA* hasil DGGE teridentifikasi sebagai *uncultured bacterium* (86-97%). Sekuen asam amino dari lima isolat gen *amoA* hasil DGGE teridentifikasi sebagai *ammonia monoxygenase* dari *uncultured bacterium* (56-86%) dan satu isolat gen *amoA* teridentifikasi sebagai *ammonia monoxygenase* dari bakteri *Nitrosospira* sp. III7 (93%). Berdasarkan analisis filogenetik keenam isolat gen *amoA* termasuk ke dalam genus *Nitrosospira*.



Gambar 8. Konstruksi pohon filogenetik berdasarkan sekuen nukleotida hasil DGGE (kode : *amoA*) dan sekuen-sekuen nukleotida yang terdapat di *Genbank*.

KESIMPULAN

Kelimpahan dan keragaman bakteri pengoksidasi NH₃ di Situ Sawangan-Bojongsari dipengaruhi oleh faktor fisika dan kimia. Kelimpahan tertinggi bakteri pengoksidasi NH₃ terdapat pada strata 0 cm yaitu 270 sel/ml dan terendah terdapat pada strata 230 cm yaitu 73 sel/mL. Komposisi komunitas bakteri pengoksidasi NH₃ di Situ Sawangan-Bojongsari terdiri dari 10 keragaman. Sekuen nukleotida dari enam

DAFTAR PUSTAKA

- Alonso, A., & J.A. Camargo, 2003, Short-Term Toxicity of Ammonia, Nitrite, and Nitrate to the Aquatic Snail *Potamopyrgus antipodarum* (Hydrobiidae, Mollusca), Bull Environ Cont Toxicol, 70:1006–1012.
- Anderson, D.M., P.M. Glibert, & J.M. Burkholder, 2002, Harmful Algal

- Alooms and Eutrophication: Nutrient Sources, Composition, and Consequences, *Estuaries* 25: 704-26.
- APHA, 1995, Standard Methods. For Examination of Water and Waste Water, By M.C.Rand: A.E. Greenberg and M.J. Taras (Eds).9th Edition, APPA-AWWA/WEFW, USA, 1193p.
- Avrahami, S., W. Liesack, & R. Conrad, 2003, Effects of Temperature and Fertilizer on Activity and Community Structure of Soil Ammonia Oxidizers, *Environ Microbiol*, 5: 691–705.
- Avrahami, S., & R. Conrad, 2003, Patterns of Community Change among Ammonia Oxidizers in Meadow Soils Upon Long-Term Incubation at Different Temperatures, *Appl and Environ Microbiol*, 69(10): 6152-6164.
- Bothe, H., G. Jost, M. Schloter, B.B. Ward, & K.P. Witzel, 2000, Molecular Analysis of Ammonia Oxidation and Denitrification in Natural Environments, *FEMS Microbiol Rev*, 24: 673-690.
- Cappucino, G.J., & N. Sherman, 1983, *Microbiology : A Laboratory Manual*. Addison-Wesley Publishing Company Inc, California, USA, 31p.
- Carpenter, S.R., N.F. Caraco, D.L. Correll, R.W. Howarth, A.N. Sharpley, & V.H. Smith, 1998, Nonpoint Pollution of Surface Waters with Phosphorus and Nitrogen, *Ecol Appl*, 8: 559-568.
- Cheng, S.Y., & J.C. Chen, 2002, Study on the Oxyhemocyanin, Deoxyhemocyanin, Oxygen Affinity and Acid–base Balance of *Marsupenaeus japonicus* Following Exposure to Combined Elevated Nitrite and Nitrate, *Aquatic Toxicol* 61:181-193.
- Chu, H., T. Fujii, S. Morimoto, X. Lin, K. Yagi, J. Hu, & J. Zhang, 2007, Community Structure of Ammonia-Oxidizing Bacteria Under Long-Term Application of Mineral Fertilizer and Organic Manure in a Sandy Loam Soil, *Appl Environ Microbiol*, 73(2): 485-491.
- Constable, M., M. Charlton, F. Jensen, K. McDonald, G. Craig, & K.W. Taylor, 2003, An Ecological Risk Assessment of Ammonia in the Aquatic Environment, *Hum Ecol Risk Assess* 9: 527-548.
- De Boer, W., & G.A. Kowalchuk, 2001, Nitrification in Acid Soils: Microorganisms and Mechanisms, *Soil Biol Biochem*, 33: 853-866.
- Efendi H., D.I. Hartoto, & Erwin, 1996, Telaah Lanjutan Karakteristik Kualitas Air di Situ Bojongsari, Bogor, JIPI Vol 6(1): 11-14.
- Jensen, F.B., 1996, Uptake, Elimination and Effects of Nitrite and Nitrate in Freshwater Crayfish (*Astacus astacus*), *Aquat Toxicol* 34: 95-104.
- Kowalchuk, G.A., & J.R. Stephen, 2001, Ammonia-Oxidizing Bacteria: a Model for Molecular Microbial Ecology, *Ann Rev Microbiol*, 55: 485-529.
- Purnama, N.E., 2008, Pendugaan Erosi dengan Metode USLE (Universal Soil Loss Equation) di Situ Bojongsari, Depok, Tesis, Institut Pertanian Bogor.
- Qiu, S., G. Chen, & Y. Zhou, 2010, Abundance and Diversity of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Relation to Ammonium in a Chinese Shallow eutrophic Urban Lake, *Brazilian J of Microbiol*, 41: 218-226.
- Rabalais, N.N., R.E. Turner, & W.J. Wiseman Jr, 2002, Gulf of Mexico Hypoxia, a.k.a. “The Dead Zone”, *Ann Rev of Ecol and System*, 33:235-263.

- Richardson, J., 1997, Acute Ammonia Toxicity for Eight New Zealand Indigenous Freshwater Species, NZ J Mar Freshw Res 31: 85-90.
- Rotthauwe, J.H., K.P. Witzel, & W. Liesack, 1997. The Ammonia Monooxygenase Structural Gene *amoA* as a Functional Marker: Molecular Fine-Scale Analysis of Natural Ammonia-Oxidizing Populations, Appl Environ Microbiol, 63(12): 4704-4712.
- Salmin, 2005, Oksigen Terlarut (DO) dan Kebutuhan Oksigen Biologi (BOD) sebagai Salah Satu Indikator untuk Menentukan Kualitas Perairan, Oceana 3: 21-26.
- Sayavedra-Soto, L.A. *et al.*, 1998, Transcription of The *amoC*, *amoA* and *amoB* Genes in *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosospira* sp. NpAV, FEMS Microbiol Lett, 167: 81-88.
- Sigee, D.C., 2005, Freshwater Microbiology; Biodiversity and Dinamic Interaction of Microorganism in The Aquatic Environment, John Wiley & Son, England.
- Urakawa, H., Y. Tajima, Y. Numata, & S. Tsuneda, 2008, Low Temperature Decreased the Phylogenetic Diversity of Ammonia-Oxidizing Archaea and Bacteria in Aquarium Biofiltration Systems, Appl Environ Microbiol, 74(3): 894.
- Vasilis, Z.A., & K.G. Soutana, 2003, Simulation of Water Temperature and Dissolved Oxygen Distribution in Lake Verogitis, Greece, Ecol Model 160: 39-53.
- Wurts, W.A., 2003. Pond pH Cycle and Ammonia Toxicity, World Aquacult, 34(2): 20-21.
- Zaman, M., H.J. Di, & K.C. Cameron, 1999, Gross N-mineralization and nitrification rates and their relationships to enzyme activities and soil microbial biomass in soils treated with dairy shed effluent and ammonium fertilizer in the field, Soil Use and Management 15: 188-194.