

X. KAJIAN SUKSESI DAN DISTRIBUSI MIKROBA DEKOMPOSER SERTA AGEN BIOREMEDIASI SENYAWA METABOLIT TOKSIK PADA PERAIRAN

Oleh:

Tri Widiyanto, Iman Rusmana, M. Badjoeri, Widi Riyanto, Wawan Darmawan,
Ester Rosita, Vidya Indarwati

ABSTRAK

Sistem perairan sungai, danau, waduk dan budidaya merupakan tempat akumulasi limbah organik. Khusus dalam sistem perairan budidaya banyak memanfaatkan bahan organik sebagai sumber energi untuk pertumbuhan hewan yang dibudidayakan. Sisa bahan organik yang terakumulasi akan menimbulkan terbentuknya senyawa metabolit toksik (amonias, nitrit, nitrat dan hidrogen disulfida). Proses pembersihan terhadap senyawa metabolit tersebut hanya dapat dilakukan melalui proses degradasi oleh mikroorganisme. Kegiatan penelitian ini bertujuan untuk menganalisis profil mikroba pada sistem perairan budidaya dan mencari mikroba potensial untuk pengendalian senyawa metabolit toksik. Sampel air dan sedimen diambil dari perairan tambak udang di Karang Hantu, Serang Banten. Profil kelimpahan bakteri dengan bertambahnya waktu budidaya adalah sebagai berikut : pada bulan pertama jumlah total koloni bakteri sebesar , bulan kedua cfu, bulan ketiga cfu/ml dan bulan ke 4 sebesar cfu/ml. Hasil isolasi kelompok bakteri pengoksidasi amonia (nitrifikasi) didapatkan sebanyak 12 isolat, 2 isolat bersifat gram positif dan 10 isolat bersifat gram negatif, dengan bentuk sel bulat, batang dan spiral. Sedangkan kelompok bakteri pereduksi nitrit dan nitrat (denitrifikasi) sebanyak 8 isolat, semua isolat bersifat gram negatif, dengan bentuk sel batang dan bulat. Sebanyak 4 isolat nitrifikasi (ASRT2, ASRT3, ASLT2, dan ASLT3) dapat mengoksidasi amonia dengan pola pertumbuhan yang relatif baik. Sebanyak 3 isolat denitrifikasi (SDTT5, KDTMT10, dan KDTST3) juga dapat mereduksi nitrat dan nitrit dengan baik. Aktivitas remediasi senyawa metabolit toksik terbaik dilakukan oleh gabungan bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi dengan komposisi KDTST3, dan SDTT5 dengan ASRT2, ASRT3, ASLT2, dan ASLT3. Sedangkan untuk absorpsi logam berat dilakukan oleh isolat bakteri fotosintetik anoksigenik (BFA) yang berasal dari perairan estuari daerah Lampung.

Kata kunci : *limbah organik, Sukseksi, bakteri nitrifikasi, denitrifikasi, fotosintetik anoksi genik, remediasi, sistem perairan budidaya, senyawa metabolit toksik.*

1. PENDAHULUAN

Sistem perairan budidaya, khususnya daerah sedimen merupakan bagian yang mempunyai kondisi ekstrim. Pada sistem tersebut mempunyai : kandungan oksigen yang rendah atau bahkan anoksik, penetrasi cahaya kurang dan kandungan senyawa metabolit toksik yang tinggi serta akumulasi logam berat dari segala macam limbah industri dan pertanian. Kondisi tersebut merupakan faktor pembatas bagi perkembangan beberapa kelompok mikroba dekomposer, yang

secara ekologis berfungsi mendegradasi polutan senyawa metabolit toksik (organik).

Disisi lain kondisi ekstrim tersebut akan menyebabkan terjadinya seleksi secara alami terhadap mikroba dekomposer yang potensial sebagai pengendali polutan. Kandungan bahan organik yang optimal untuk pertumbuhan mikroorganisme adalah sekitar 50 –100 mg/L. Sedangkan kelompok mikroba oligotrofik dapat hidup pada konsentrasi senyawa organik yang tinggi, yaitu sekitar 500 – 1000 mg/L (Semenof dan Stanley, 1992). Dalam penerapannya kelompok mikroorganisme oligotrofik tersebut dapat digunakan kembali sebagai salah satu agen pengendalian senyawa organik yang terakumulasi pada dasar perairan. Sistem sedimen dengan kondisi yang reduktif menyebabkan mekanisme dekomposisi senyawa organik hanya akan dapat dilakukan oleh kelompok mikroba yang bersifat mikroaerofilik/hidup pada kandungan oksigen yang rendah (Atlas dan Bartha, 1998).

Proses dekomposisi senyawa organik tersebut merupakan tahapan pengembalian nutrien ke dalam lingkungan. Terpotongnya mekanisme tersebut akan menimbulkan terganggunya keseimbangan ekologis (Atlas dan Bartha, 1998). Kondisi ini banyak terjadi pada sistem perairan yang berada di daerah pemukiman ataupun kawasan industri. Beban masukkan limbah organik yang tinggi sudah tidak dapat diimbangi oleh mekanisme dekomposisi atau degradasi secara alamiah. Sehingga akan menimbulkan polusi. Kondisi tersebut menyebabkan terganggunya pemanfaatan sistem perairan, baik untuk kegiatan budidaya, industri, air minum maupun pertanian. Pemanfaatan perairan tersebut menjadi membutuhkan biaya tinggi, karena terdapat unit pengelolaan tambahan untuk purifikasinya.

Sampai saat ini data ataupun informasi mengenai masalah suksesi dan distribusi horizontal mikroba dekomposer pada sistem perairan yang tercemar limbah organik masih jarang. Keberadaan kelompok dekomposer pada sedimen mempunyai peranan penting untuk melakukan purifikasi melalui mekanisme degradasi senyawa organik (McLatchey dan Reddy, 1994). Penelitian ini menitik beratkan pada sistem perairan yang relatif tinggi kandungan polutan senyawa organiknya, yaitu : bagian hilir tengah sungai Cisadane dan sistem perairan

budidaya. Penelitian ini banyak menekankan kepada kegiatan analisis sample sedimen, dan analisis kandungan polutan senyawa organik pada sistem sedimen dan badan airnya.

Distribusi, suksesi dan kelimpahan mikroba dekomposer sangat dipengaruhi oleh kondisi nutrien dan lingkungan perairan. Dekomposer merupakan salah satu kelompok pendegradasi senyawa organik terlarut atau yang terakumulasi pada sedimen. Secara alamiah perkembangan kelompok dekomposer akan beradaptasi dengan kondisi lingkungannya. Pada sistem dasar perairan yang mengandung deposit senyawa organik tinggi dan sistem perairan budidaya akan ditumbuhi oleh kelompok mikroba dekomposer yang bersifat oligotrofik. Suksesi, kelimpahan dan distribusi kelompok mikroba tersebut pada sistem sedimen perairan yang tercemar dapat digunakan sebagai salah satu acuan pengelolaan perairan yang tercemar senyawa organik. Salah satu cara pengelolannya adalah melalui mekanisme bioaugmentasi (introduksi agen) mikroba terseleksi yang mampu mendegradasi senyawa organik dan menurunkan senyawa metabolit toksik secara optimum. Selain itu komposisi dan kelimpahan mikroba dekomposer tersebut akan menentukan tingkat laju degradasi dan polusi senyawa organik dan senyawa metabolit toksik.

Tujuan dari kegiatan penelitian ini adalah untuk : melihat pola suksesi mikroba dekomposer pada perairan sistem perairan budidaya yang tercemar senyawa organik, menganalisis kemampuan kelompok mikroba dekomposer dalam menghilangkan senyawa metabolit toksik, dan menganalisis kemampuan BFA dalam mereduksi logam berat pada sistem perairan budidaya, serta menganalisis profil senyawa organik dalam sedimen perairan budidaya. Sasaran yang akan dicapai adalah untuk : mendapatkan isolat mikroba dekomposer yang potensial untuk pengelolaan pencemaran senyawa organik (senyawa metabolit toksik), dan mereduksi logam berat, serta membuat model pengelolaan perairan yang terpolusi senyawa organik. Selain itu akan dapat membuat acuan pengelolaan sistem perairan budidaya yang berkelanjutan.

2. METODOLOGI

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiota dan Laboratorium Hidrodinamika Puslit Limnologi LIPI. Sampel air dan sedimen diambil dari perairan tambak dachra Serang, yaitu tambak di PT. Indokor dan tambak Sekolah Tinggi Perikanan di Karang Hantu. Pengambilan sampel dilakukan pada bulan Juni sampai dengan Oktober 2004. Tahapan kegiatan yang dilakukan meliputi : identifikasi dan seleksi mikroba dekomposer (nitrifikasi dan denitrifikasi), karakterisasi mikroba dekomposer yang dominan, analisis kemampuan isolat tersleksi dalam menurunkan senyawa metabolit toksik (ammonia, nitrit, nitrat), dan analisis kemampuan dan karakterisasi reduksi logam berat oleh kelompok BFA.

Isolasi mikroba dekomposer (nitrifikasi)

Media yang digunakan untuk isolasi dan seleksi terdiri dari dua macam, yaitu yang berifat autotrof (tanpa sumber karbon organik) dan media heterotrof (glukosa sebagai sumber karbon) dengan amonia sebagai satu-satunya sumber nitrogen. Komposisi media nitrifikasi adalah sebagai berikut : 13,5 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$; 0,7 g KH_2PO_4 ; 0,1 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,5 g $NaHCO_3$; 0,014 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$; 0,18 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,1 g NH_4Cl ; 0,2 g EDTA, 0,5 g Glukosa (untuk media heterotrof), dan 15 g agar bakto (untuk media padat) dalam 1000 ml aquades, untuk media autotrof tidak ditambah dengan glukosa (Rodina, 1975).

Masing-masing sebanyak 5 ml untuk contoh air dan 1 gram untuk contoh sedimen yang homogen diinokulasi kedalam 25 ml medium pengkayaan pada Erlenmeyer 250 ml. Inkubasi dilakukan selama 21 hari pada suhu ruang ($29 - 31^\circ C$) diatas inkubator berpenggoyang BIGBill Max. rpm 450, Barnstead / Termolyne, DUBUQUE IOWA Amerika, dengan kecepatan 75 rpm. Kultur yang tumbuh diindikasikan dengan perubahan tingkat kekeruhan suspensi. Selanjutnya pada suspensi yang positif terjadi pertumbuhan dilakukan proses pengkayaan.

Sebanyak 5 ml suspensi diinokulasikan pada media cair amonium klorida dengan jumlah dan kondisi inkubasi yang sama dengan pada saat awal isolasi. Sebanyak 1 lup kultur hasil pengkayaan digoreskan dengan metode kuadran pada media agar nitrifikasi, kemudian diinkubasi pada suhu ruang, selama 6 hari.

Koloni yang terpisah dimurnikan kembali dengan menggores ulang pada media agar nitrifikasi tersebut (Cappucino dan Sherman, 1983).

Isolasi mikroba dekomposer (denitrifikasi)

Isolasi bakteri denitrifikasi dilakukan dengan menggunakan teknik pengkayaan pada kondisi aerobik atau mikroaerofilik menggunakan media cair kalium nitrat. Komposisi media pengkayaan tersebut adalah sebagai berikut : 10 g Na asetat; 5,0 g KNO_3 ; 3,0 g yeast ekstrak; 0,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,9 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 0,5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g KH_2PO_4 ; 0,1 g CaCl_2 dan 15 g agar bakto untuk media padat dalam 1000 ml aquades (Rodina, 1975). Media disterilisasi pada suhu 121°C , selama 15 menit.

Sebanyak 20 ml media dimasukkan dalam tabung reaksi berulir volume 22 ml. Kondisi mikroaerofilik atau anaerobik dilakukan dengan cara menghembuskan gas nitrogen bebas oksigen melalui jarum/syringe steril ke dalam tabung reaksi tersebut selama 5 menit. Sebelum masuk tabung reaksi gas disaring dengan filter steril diameter 47 mm mess $0,45 \mu\text{m}$.

Masing-masing sebanyak 5 ml contoh air dan 1 ml lumpur sedimen (campuran sedimen dan air = 1:1) ditumbuhkan ke dalam media cair anaerobik dengan menggunakan syringe steril. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang ($29-31^\circ\text{C}$), selama 5 – 7 hari. Bakteri denitrifikasi diisolasi menggunakan metode gores kuadran pada media agar dan diinkubasi pada kondisi anaerobik dalam *Anaerobic Jar* BBL (Oxoid Ltd. Hampshire. England) Volume 3,5 l dengan AnaeroGenTM Vol. 3,5 l. selama 7 hari (Cappucino dan Sherman, 1983). Koloni sel yang terpisah dimurnikan kembali dengan metode penggoresan kuadran pada media agar cawan yang baru dan diinkubasi pada kondisi anaerobik di dalam *anaerobic jar*.

Sebagai uji selanjutannya, untuk memastikan isolat bakteri denitrifikasi hasil isolasi bukan merupakan bakteri fermentatif dilakukan uji fermentatif / oksidatif seperti yang dijabarkan oleh Hugh dan Leifson (1953). Sebanyak 5 ml semi solit steril yang mengandung biru methilin dengan sumber karbon glukosa dituang dalam tabung reaksi berpenutup ulir volume 12 ml. Isolat bakteri hasil isolasi diinokulasi satu lup penuh. Sebelum tabung ditutup dengan tutup ulir diatas

permukaan media ditutup vaselin steril dengan ketebalan sekitar 1 cm. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang ($29 - 31^{\circ}\text{C}$) selama 7 hari. Kelompok bakteri fermentatif akan menghasilkan asam, sehingga akan merubah warna biru menjadi kuning.

Seleksi dan Karakterisasi Aktivitas Bakteri Nitrifikasi Hasil Isolasi

Seleksi tahap awal dilakukan untuk mencari isolat bakteri nitrifikasi yang mempunyai aktivitas oksidasi senyawa amonia paling baik. Masing-masing isolat bakteri hasil isolasi ditumbuhkan pada media cair nitrifikasi pada suhu ruang ($29 - 31^{\circ}\text{C}$) selama 2 hari. Sebanyak 1 ml biakan starter diinokulasikan ke dalam 25 ml media nitrifikasi baru dengan konsentrasi amonia sekitar 70 mg/l di dalam Erlenmeyer 150 ml. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang di atas inkubator berpenggoyang dengan kecepatan 75 rpm, selama 14 hari. Sebagai kontrol digunakan media yang sama yang tidak diinokulasi.

Analisis sampel kultur diambil pada waktu inkubasi 7 hari dan 14 hari. Suspensi bakteri uji dipisahkan terlebih dahulu dengan cara disaring dengan kertas saring steril Whatman *Cellulose nitrate* nomor 7140 104 tipe WCN, Jepang dengan mesh 0,45 μm , diameter 47 mm, pada pompa vakum *Nalgene filter holder* PSF diameter 47 mm Volume 500 ml Rochester, New York Amerika Serikat dan digunakan Aspirator EYELA Tipe A-3S No. Series 10228392, Tokyo Rikakikai Co. Ltd. Jepang. Konsentrasi amonia, nitrat dan nitrit dalam filtrat diukur dengan metode spektrofotometri (Cleseri *et.al.* 1989). Kemudian dianalisis persentase jumlah amonia yang teroksidasi dan senyawa nitrat atau nitrit yang terbentuk dihitung dalam satuan mMol.

Uji aktivitas nitrifikasi lebih lanjut dari isolat bakteri nitrifikasi hasil isolasi dilakukan dengan metode yang sama seperti sebelumnya dengan interval waktu pengamatan yang lebih pendek, yaitu pada hari ke 0, 2, 3, 5 dan 7. Parameter yang diamati meliputi : konsentrasi amonia, nitrat, nitrit dan nilai

densitas sel (OD) yang diamati pada spektrofotometer UV VIS – 120-20 Shimadzu pada panjang gelombang 550 nm.

Seleksi dan Karakterisasi Aktivitas Bakteri Denitrifikasi Hasil Isolasi

Inokulan uji isolat bakteri denitrifikasi hasil isolasi ditumbuhkan pada media cair dalam kondisi aerobik selama 7 hari. Dalam uji ini inkubasi dilakukan pada kondisi aerobik. Dibuat media uji denitrifikasi cair yang mengandung senyawa nitrat sekitar 0,5 – 2,5 mM dituang dalam tabung reaksi berpenutup ulir volume 22 ml, masing-masing sebanyak 15 ml. Masing-masing isolat diinokulasi dalam media uji sebanyak 1 ml dengan nilai OD 0,5. Kemudian diinkubasi selama 21 hari pada suhu ruang (29–31°C). Sebagai kontrol digunakan media yang tidak diinokulasi bakteri. Analisis konsentrasi senyawa nitrat, nitrit dan amonia dilakukan dalam interval waktu 7 hari, selama 21 hari. Tiga isolat yang mempunyai kemampuan mereduksi senyawa nitrat paling baik dipilih untuk uji selanjutnya, yaitu uji sinergisme aktivitas bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi dalam menghilangkan senyawa amonia, nitrat dan nitrit skala Laboratorium.

Sinergisme Aktivitas Bakteri Nitrifikasi dan Denitrifikasi Pada Skala Laboratorium

Tiga isolat bakteri pereduksi nitrat dan empat isolat bakteri nitrifikasi terbaik dan bakteri *Klebsiella pneumoniae*. yang berasal dari estuarin (Rusmana, 2003) digunakan pada percobaan ini.

Rancangan percobaan yang digunakan adalah faktorial dengan dua faktor perlakuan, yaitu isolat bakteri denitrifikasi sebagai perlakuan utama sebanyak tiga jenis isolat dan ditambah satu bakteri *Klebsiella pneumoniae* serta isolat bakteri nitrifikasi sebagai sub-perlakuan, sebanyak empat jenis. Masing-masing perlakuan dilakukan tiga kali ulangan dan sebagai kontrol digunakan media yang tidak diinokulasi. Parameter yang diamati meliputi kandungan senyawa amonia, nitrat dan nitrit serta densitas selnya (kerapatan optik) dari setiap perlakuan.

Masing-masing isolat uji terlebih dahulu ditumbuhkan pada media cair dan diinkubasi pada suhu ruang (29 – 31)°C, selama 2 hari untuk isolat nitrifikasi dan 5 hari untuk isolat denitrifikasi. Media yang digunakan komposisinya sama dengan media sebelumnya, hanya dilakukan modifikasi pada konsentrasi nitrat dan amonia.. Konsentrasi nitrat dalam media dibuat sebesar 2,5 mM, sedangkan

konsentrasi amonia sebesar sekitar 5,5 mM. Sebanyak 15 ml media uji dimasukkan dalam tabung reaksi berulir volume 22 ml. Kemudian isolat nitrifikasi dan denitrifikasi diinokulasikan masing-masing sebanyak 1 ml ke dalam tabung media uji dengan OD 0,2 pada panjang gelombang 550 untuk isolat nitrifikasi dan OD 0,5 untuk isolat denitrifikasi. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang (29 – 31)°C. Pengamatan kandungan senyawa amonia, nitrat dan nitrit serta densitas sel dilakukan setiap 2 hari sekali selama 14 hari. Dua komposisi isolat yang paling baik akan digunakan untuk uji bioremediasi skala pilot pada bak-bak percobaan pemeliharaan udang.

Karakterisasi Isolat BFA dalam Mereduksi Logam Berat

Delapan isolat BFA diseleksi dengan menumbuhkannya pada medium SWC 50% cair yang masing-masing mengandung ion logam Cd^{2+} (konsentrasi: 0,01 ppm, 0,5 ppm, dan 1 ppm), Zn^{2+} (konsentrasi: 0,02 ppm, 0,5 ppm, dan 1 ppm), dan Pb^{2+} (konsentrasi: 0,03 ppm, 0,5 ppm, dan 1 ppm). Selama inkubasi, tabung kultur diletakkan di dekat lampu pijar 40 watt. Setelah 4 hari, dilakukan pengukuran *optical density* (OD) pada tiap kultur. Isolat yang digunakan adalah tiga isolat yang memiliki nilai tertinggi.

Tahap selanjutnya adalah karakterisasi penyerapan logam pada isolat terpilih. Isolat ditumbuhkan dalam media uji dalam medium yang mengandung 1 ppm ion logam Cd^{2+} , Zn^{2+} , dan Pb^{2+} selama fase pertengahan pertumbuhan isolat. Selanjutnya dilakukan analisis kadar logam total pada sel, kadar logam pada dinding sel, kadar logam dalam sitoplasma, dinding sel, dan kemampuan penyisihan logam.

Analisis kadar logam total pada sel dilakukan dengan mendestruksi biomasa sel kering (oven, 60°C) dalam HNO_3 13%, selama 15 menit dalam otoklaf. Cairan jernih dianalisis menggunakan AAS. Analisis kadar logam pada dinding sel dilakukan dengan mengekstrak pelet BFA menggunakan EDTA 5 mM (pH 8) pada suhu rendah, selanjutnya supernatan dianalisis menggunakan AAS. Kadar logam pada sitoplasma diketahui secara perhitungan. Kemampuan penyisihan logam diketahui dari selisih kadar logam pada medium awal dengan kadar logam medium setelah inkubasi. Logam dalam medium kultur yang telah

disaring, didestruksi menggunakan HNO_3 pekat pada suhu 200°C selanjutnya dianalisis menggunakan AAS.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi mikroba dekomposer (nitrifikasi)

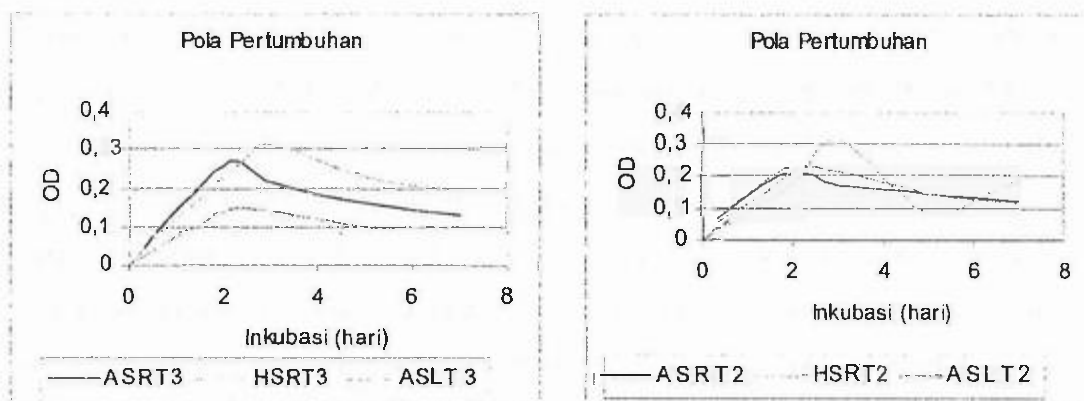
Jumlah isolat kelompok bakteri nitrifikasi yang berhasil diisolasi dari beberapa tambak udang sebanyak 8 isolat. Lima isolat berasal dari tambak PT. Indokor, yang terdiri dari tiga isolat bersifat autotrof dan dua isolat bersifat heterotrof. Tiga isolat berasal dari tambak tradisional di Tangerang, yang bersifat autotrof sebanyak dua isolat dan heterotrof satu isolat. Secara morfologis isolat-isolat tersebut memperlihatkan koloni berwarna putih, putih susu, kuning keputihan dan kuning kehijauan, dengan tiga ukuran koloni yang berbeda, yaitu kecil ($\leq 0,2$ mm, sedang ($0,2 - 0,5$ mm) dan besar ($\geq 0,5$ mm).

Semua isolat dapat memanfaatkan senyawa amonia untuk aktivitas metabolismenya, baik sebagai sumber energi maupun sebagai sumber nitrogen organik untuk pembentukan biomassa sel. Bock, dkk. (1992) mengemukakan bahwa bakteri yang banyak menggunakan nitrogen anorganik dari amonia sebagai sumber energinya kebanyakan berasal dari famili *Nitrobacteriaceae*. Selain itu juga terdapat kelompok bakteri yang mampu memanfaatkan amonia untuk aktivitasnya, sebagai sumber nitrogen organik seperti pada organisme eukaryota.

Beberapa karakter isolat-isolat kelompok bakteri nitrifikasi dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil pewarnaan Gram memperlihatkan bahwa 6 isolat bersifat Gram negatif dan 2 isolat bersifat Gram positif. Sebanyak 6 isolat berbentuk batang, 6 isolat berbentuk bulat dan 1 isolat berbentuk spiral. Buaccanan, dkk (1980) mengemukakan bahwa pada umumnya kelompok bakteri nitrifikasi bersifat Gram negatif, dengan habitat yang menyebar, yaitu di air laut, air tawar maupun tanah dan kelompok bakteri tersebut bersifat aerobik.

Tabel 1. Karakteristik Morfologi Beberapa Isolat Bakteri Nitrifikasi Yang Diisolasi Dari Tiga Perairan Tambak (Tangerang, Serang dan Kendari)

No.	Kode Isolat	Asal	Media isolasi, Kenampakan koloni	Bentuk sel	Gram
1.	ASRT1	Indokor	Autotrof, kecil, kuning kutih	bulat	Negatif
2.	ASRT2	Indokor	Autotrof, sedang, kuning tua	bulat	Positif
3.	ASRT3	Indokor	Autotrof, sedang, kuning tua	Batang pendek	Negatif
4.	HSRT4	Indokor	Heterotrof, kecil, merah tua	Spiral	Positif
5.	HSRT5	Indokor	Heterotrof, besar, tengah kuning, pinggir bening	Batang	Negatif
6.	ATRT1	Tangerang	Autotrof, kecil, putih susu	Batang pendek	Negatif
7.	ATRT2	Tangerang	Autotrof, sedang, putih susu kekuningan	Batang pendek	Negatif
8.	HSRT3	Tangerang	Heterotrof, sedang, putih susu	Bulat	Negatif



Gambar 1. Pola Pertumbuhan Beberapa Isolat Bakteri Nitrifikasi Pada Media Cair Amonium Klorida Heterotrof Suhu Ruang (29 – 31)°C

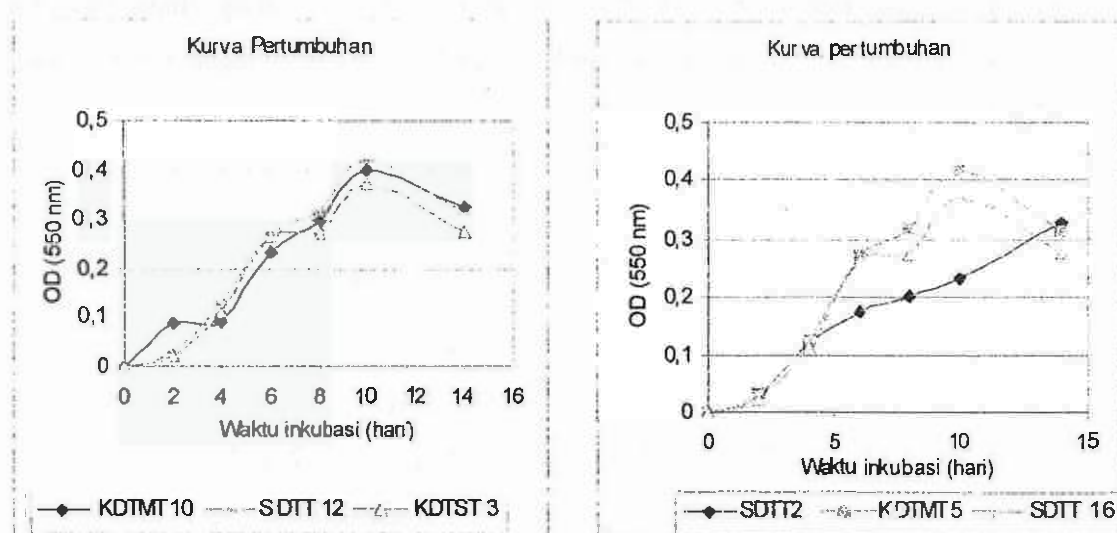
Isolasi mikroba dekomposer (denitrifikasi)

Terisolasi 4 isolat yang termasuk dalam kelompok bakteri denitrifikasi (Tabel 2). Hasil pengamatan morfologis menunjukkan bahwa semua isolat terkoleksi bersifat Gram negatif, motil, berbentuk batang dan bulat. Kelompok bakteri tersebut memanfaatkan senyawa nitrat dan nitrit sebagai oksidan dalam transport elektronnya. Sebagai produk akhir dari metabolisme tersebut adalah gas nitrogen (nitrit oksida, nitrous oksida dan nitrogen. Buccanan dan Gibbon (1974) mengemukakan bahwa kelompok bakteri denitrifikasi pada umumnya bersifat Gram negatif, berbentuk bulat dan batang. Distribusi kelompok bakteri denitrifikasi

tersebar hampir di semua habitat, termasuk air laut, air tawar, tanah, sawah, tumbuhan dan di dalam tubuh organisme. Beberapa genus yang hidup pada sistem perairan laut atau payau antara lain : *Alteromonas*, *Pseudomonas*, *Erythrobacter*, *Alcaligenes*, dan *Aquaspirillum*. Kelompok bakteri tersebut bersifat Gram negatif, bentuk coccus dan batang (Zumft, 1992). Lebih lanjut Gregory, dkk. (2003) melaporkan bahwa hasil identifikasi kelompok bakteri respirasi nitrat dengan mengisolasi DNA langsung dari sedimen pada kedalaman: 5, 10, 15, dan 20 cm dengan menggunakan metode amplifikasi gen nitrat reduktase (*narG*) memperlihatkan banyak sekuen hasil amplifikasi yang termasuk dalam kelompok bakteri gram negatif. Tidak satupun sekuen yang masuk dalam kelompok bakteri gram positif.

Tabel 2. Karakteristik Sel Isolat Bakteri Denitrifikasi yang Diisolasi Dari Perairan Tambak Udang di Serang, Tangerang, dan Kendari

No.	Isolat	Bentuk	Gram	Asal
1.	SDTT2	Bulat, motil	Negatif	Tambak Indokor Serang
2.	SDDT5	Basil, motil	Negatif	Tambak Tangerang
3.	SDTT 12	Basil, motil	Negatif	Tambak Indokor Serang
4.	SDTT 13	Bulat, motil	Negatif	Tambak Indokor Serang

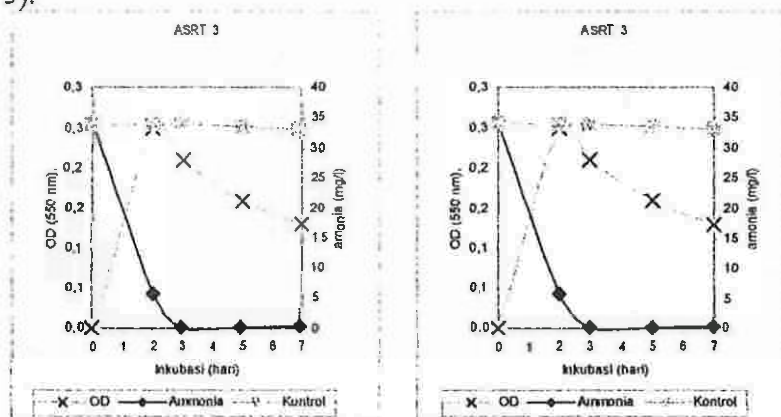


Gambar 2. Pola Pertumbuhan Beberapa Isolat Bakteri Denitrifikasi Pada Media Cair Kalium Nitrat Kondisi Aerobik Suhu Ruang (29–31)°C

Seleksi dan Karakterisasi Aktivitas Bakteri Nitrifikasi Hasil Isolasi

Hasil seleksi awal kemampuan isolat bakteri nitrifikasi dalam mengoksidasi senyawa amonia selama tujuh hari inkubasi menunjukkan bahwa isolat-isolat tersebut mempunyai kemampuan oksidasi amonia yang berbeda, yaitu sebesar 20,69%- 99,02%. Sebanyak tiga isolat mampu melakukan oksidasi cukup tinggi, yaitu dapat mengoksidasi sebesar 89,59 - 99,02% dari amonia yang ditambahkan sebesar 4,65 mM. Isolat-isolat tersebut terdiri dari 3 isolat yang berasal dari media yang bersifat autotrof (ASRT1, ASRT2, ASRT3)

Sedangkan senyawa nitrit sebagai senyawa antara dari proses oksidasi amonia dalam waktu inkubasi 7 hari juga tidak terdeteksi. Kemungkinan senyawa nitrit dioksidasi menjadi nitrat secara spontan karena inkubasi dilakukan diatas inkubator berpenggoyang, sehingga kandungan oksigen pada media uji cukup tinggi. Weiner (2000), Stumm dan Morgan (1981) mengemukakan bahwa pada sistem senyawa nitrit akan dioksidasi dengan cepat menjadi nitrat. Oleh karena itu pada sistem perairan permukaan atau yang relatif tinggi kandungan oksigennya senyawa tersebut sangat jarang ditemukan. Boyd (1990) menyebutkan bahwa dalam sistem perairan senyawa nitrit banyak terakumulasi pada sistem sedimen atau bagian air yang menggenang. Lebih lanjut Roberson dan Kuenen (1988) dalam Bock, dkk (1992) mengemukakan bahwa pada kultur organisme kelompok nitrifikasi yang bersifat heterotrofik, senyawa nitrit hanya akan dihasilkan jika aktivitas enzim nitrit reduktase dihambat oleh kandungan oksigen yang rendah (Gambar 3).

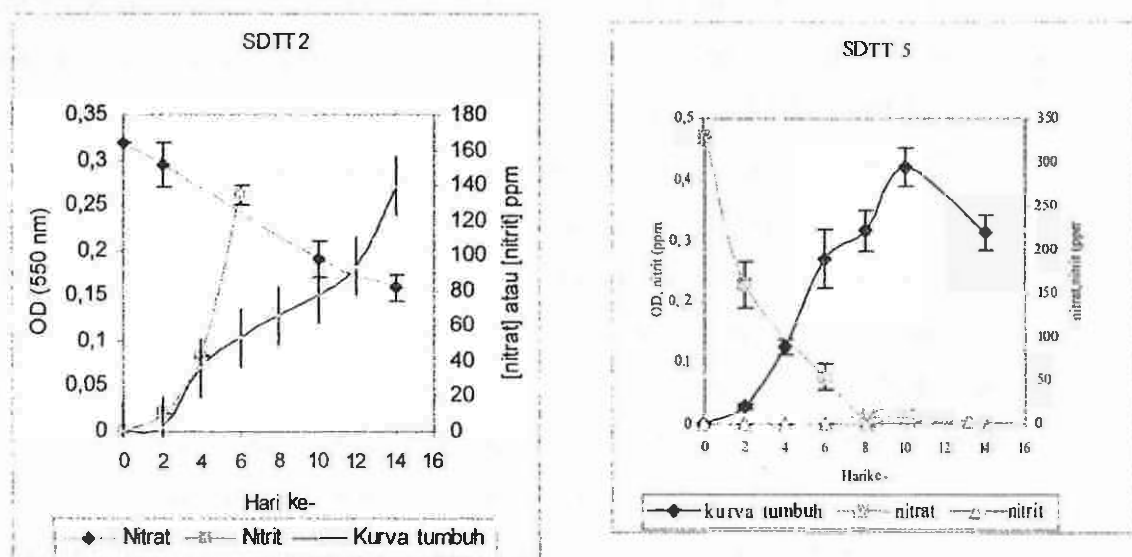


Gambar 3. Profil Hubungan Penurunan Senyawa Amonia dan Tingkat Kerapatan (OD) dari Isolat ASRT2 dan ASRT3 pada Uji Seleksi Dalam Inkubasi 7 Hari

Seleksi Bakteri denitrifikasi

Isolat yang potensial sebagai agen bioremediasi merupakan isolat yang mampu mereduksi senyawa nitrat menjadi nitrit dan dilanjutkan menjadi nitrogen gas. Sebagai pusat proses denitrifikasi adalah perubahan senyawa nitrit menjadi nitrogen gas : nitrit oksid, nitrous oksid dan gas nitrogen (Zumft, 1992). Sebagai langkah seleksi selanjutnya adalah dianalisis kemampuan beberapa isolat terpilih (SDTT 2 dan SDDT5 dalam mereduksi senyawa nitrat, dan nitrit pada kurun waktu inkubasi 14 hari dengan interval pengamatan 2 hari sekali.

Hasil analisis profil penurunan konsentrasi senyawa nitrat memperlihatkan bahwa semua isolat bakteri denitrifikasi mampu mereduksi senyawa nitrat, dengan kemampuan yang berbeda. Isolat-isolat yang dapat mereduksi senyawa nitrat dengan baik adalah SDDT5, sedangkan isolat SDTT2 mempunyai kemampuan reduksi senyawa nitrat yang relatif rendah. Isolat SDDT5 dengan mempunyai kemampuan reduksi senyawa nitrat sebesar 100%, pada inkubasi 12 hari (Gambar 4).



Gambar 4. Profil Penurunan Senyawa Nitrat dan Nitrit Yang Dihasilkan, Serta Nilai Pertumbuhan Bakteri Pada Uji Seleksi Reduksi Senyawa Nitrat Oleh Kelompok Bakteri Denitrifikasi (SDTT2 dan SDDT5)

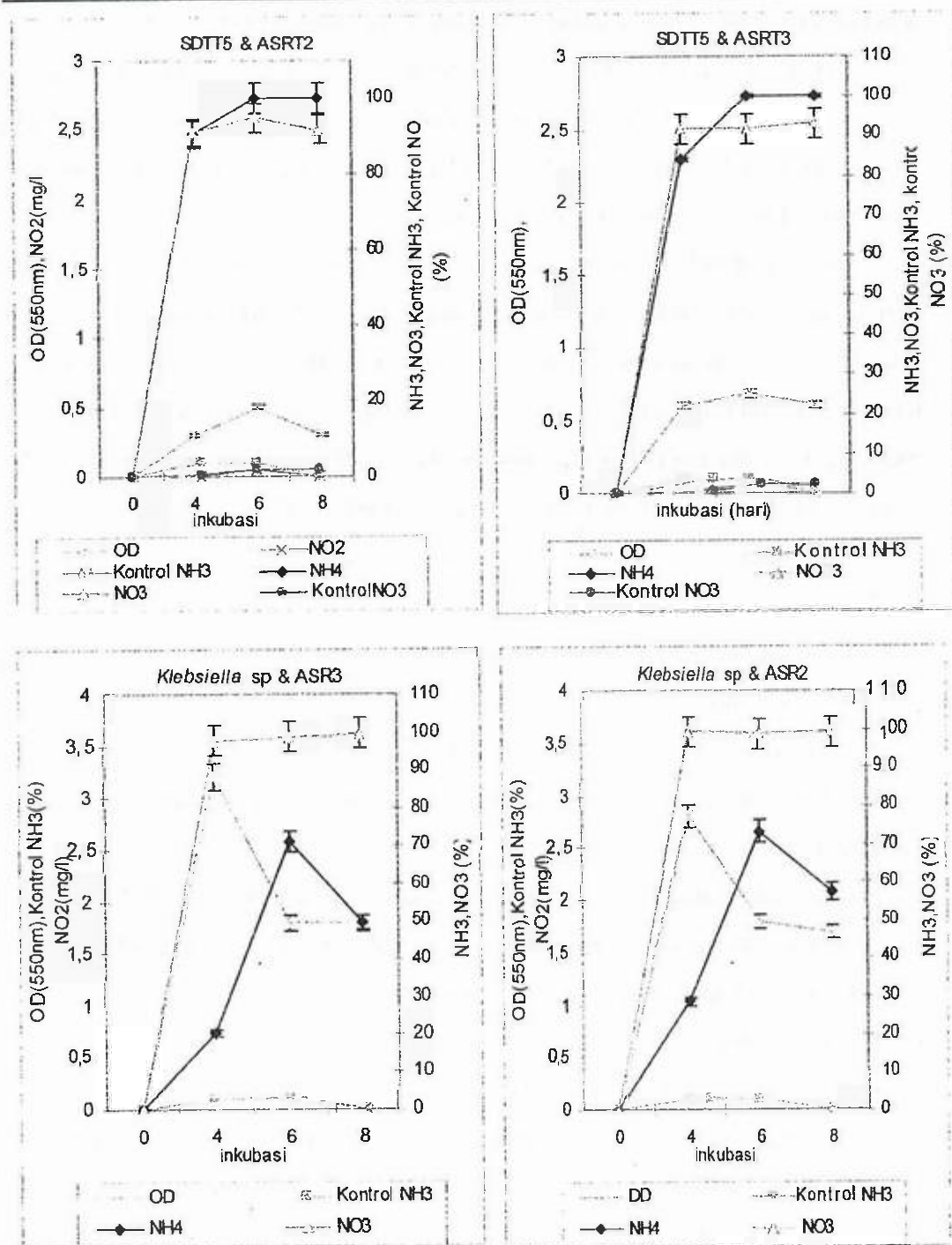
Sinergisme Aktivitas Bakteri Nitrifikasi dan Denitrifikasi Pada Skala Laboratorium

Setiap perlakuan dalam uji ini adalah merupakan gabungan antara isolat bakteri nitrifikasi dan bakteri denitrifikasi. Isolat bakteri nitrifikasi yang digunakan dalam adalah : ASR 2 dan ASR 3. Sedangkan isolat denitrifikasi yang digunakan adalah SDDT5 dan *Klebsiella* sp. sebagai kontrol positif dari kelompok bakteri fermentatif atau amonifikasi nitrat. Oleh karena itu dalam uji tersebut terdapat 8 perlakuan dengan tiga kali ulangan. Pemilihan isolat tersebut berdasarkan hasil uji seleksi sebelumnya, yaitu merupakan isolat-isolat yang potensial dalam memanfaatkan senyawa amonia, nitrit, dan nitrat.

Komposisi perlakuan dalam uji sinergisme aktivitas tersebut adalah sebagai berikut : SDDT5 - ASRT2, SDDT5 - ASRT 3, SDDT5 - ASLT 2, SDDT5 - ASLT3, *Klebsiella* sp.- ASRT2, *Klebsiella* sp.- ASRT 3, *Klebsiella* sp.- ASLT 2, *Klebsiella* sp.- ASLT3.

Hasil uji sinergisme aktivitas bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi menunjukkan bahwa komposisi isolat bakteri denitrifikasi dan nitrifikasi yang paling optimal dalam menghilangkan senyawa amonia dalam waktu yang singkat (inkubasi 4 hari) adalah gabungan antara isolat : SDDT5 – ASRT2 dan SDDT5 – ASRT 3, yaitu masing-masing mampu mengoksidasi amonia sebanyak 100%. Sedangkan kontrol positif (*Klebsiella* sp dan isolat nitrifikasi) mempunyai kemampuan oksidasi amonia yang relatif rendah, yaitu sekitar 61,78% - 75,795. Kandungan amonia pada media kontrol yang tidak diinokulasi bakteri memperlihatkan konsentrasi yang relatif tidak berubah, yaitu hanya terjadi oksidasi sebanyak 2,10%. Hasil tersebut memperlihatkan bahwa penurunan kandungan amonia pada perlakuan dan kontrol sangat nyata (Gambar 5).

Dalam aktivitas sinergisme ini kelompok isolat bakteri denitrifikasi juga ikut mempengaruhi laju oksidasi amonia. Dalam proses tersebut tidak terdeteksi adanya senyawa nitrit dan nitrat. Senyawa nitrit maupun nitrat hasil aktivitas oksidasi amonia oleh bakteri nitrifikasi langsung direduksi oleh kelompok bakteri denitrifikasi menjadi bentuk nitrogen gas. Komposisi isolat yang paling baik dalam mengoksidasi senyawa amonia adalah SDDT5 – ASRT2 dan SDDT5 – ASRT3.



Gambar 5. Profil Penurunan Konsentrasi Nitrat, Amonia dan Pola Pertumbuhan Pada Uji Sinergisme Dari Isolat SDTT5, *Klebsiella* sp Dengan Kelompok Bakteri Nitrifikasi (ASRT2 dan ASRT3)

Karakterisasi Isolat BFA dalam Mereduksi Logam Berat

Dari hasil analisis kemampuan mengabsorpsi logam berat menunjukkan bahwa : Isolat Naga 2, Lp Psr dan IR 3 adalah isolat yang lebih tahan terhadap ion Cd(II), Zn (II), dan Pb (II) dari kedelapan isolat BFA koleksi Laboratorium Mikrobiota Puslit Limnologi LIPI, Cibinong.

Fase pertumbuhan isolat Naga 2 lebih singkat dari isolat Lp Psr dan IR3. Pertengahan fase pertumbuhan isolat Naga 2 adalah 4 hari, sedangkan isolat Lp Psr dan IR 3 memiliki pertengahan fasa pertumbuhan 7 hari. Tiap isolat BFA terpilih memiliki karakteristik penyerapan logam yang berbeda. Isolat Lp Psr memiliki kemampuan penyisihan ion Cd(II) dan Pb (II) paling tinggi. Sedangkan kemampuan penyisihan logam zink tertinggi dimiliki oleh isolat Naga 2.

Karakter penyerapan tiap logam adalah sebagai berikut:

a. Logam Kadmium

Kadar kadium paling besar ditemukan pada isolat Naga 2. Isolat Naga 2 dan terutama

Lp Psr cenderung mengakumulasi Cd dalam sitoplasma. Sedangkan pada isolat IR3 proses akumulasi dan biosorpsi terjadi dalam intensitas yang setara.

b. Logam Zink

Kadar zink paling besar ditemukan pada isolat Naga 2. Isolat Naga 2 cenderung mengakumulasi zink dalam sitoplasma, sedangkan Lp Psr dan IR 3 cenderung melakukan proses biosorpsi dalam menyerap zink.

c. Logam Timbal

Kadar timbal terbesar ditemukan juga pada isolat Naga 2. Isolat Naga 2 cenderung mengakumulasi timbal, sebaliknya IR3 cenderung melakukan proses biosorpsi. Sedangkan pada Lp Psr, proses akumulasi dan biosorpsi terjadi dalam intensitas yang sama.

DAFTAR PUSTAKA

- Atlas, R.M. and R. Bartha. 1998. Microbial Ecology. Fundamental and Applications. The Benjamin/Cumming Publ. Co. California.
- Boyd, A.W. 1990. Water Quality in Pond for Aquaculture. Auburn University. Birmingham Publishing Co. Alabama. p. 147.
- Boyd, A.W. and A.W. Fast. 1992. Pond monitoring and management *In*. Fast, A.W. and Lester L.J. (Eds). Marine Shrimp Culture: Principles and Practices, pp. 497-514.
- Brock, T.D. and M.T. Madigan. 1991. Biology of Microorganisms. Prentice Hall. New Jersey.
- Buccanan, E.R. and N.E. Gibbon. 1974. Bergeys Manual of Determinative Bacteriology. Wiiliems and Welkins Co. Baltimore.
- Cappuccino, G.J. and Natalie S. 1983. Microbiology: A Laboratory Manual. Addison - Wesley Publishing Company Inc. California. USA. pp. 31-35.
- Cleseri, L.S., A.E. Greenberg and R.R. Trussel. 1989. Standard methode for the examination of water and wastewater. Port city Press. Baltimore.
- Richardson, D.J. 2000. Bacterial respiration : a flexible process for a changing enveronment. Microbiol. 146 : 551 – 571.
- Richardson, D.J., B.C. Berks, D.A. Ressel, S. Spiro, and C.J. Taylor. 2001. Functional biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. Cell Mol. Life. Sci. 58 : 165 – 178.
- Rodina, G.A. 1972. Methode in Aquatic Microbiology. Rita, R.C and Machael, S. (Eds). University Park Press. Baltimore. USA. 461 p
- Rusmana, I. 2003. Physiology of nitrous oxide production in estuarune dissimilative nitrate reducing. Thesis submite for Doctor of Philosophy. Deparment of Biology. Univ. of Essex. 207 pp
- Zumft, G.W. 1992. The denitrifying prokaryote. p. 554 – 582. *In* Balows, A., Truper, G.H., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K-Z. (Eds). The Prokaryote. A Handbook on the Biology of Bacteria : Ecophysiology, Isolation, Identification, Application. Springer-Verlag. New York

