

**POTENSI ISOLAT BAKTERI PEREDUKSI NITRAT
DARI WADUK SUTAMI**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Biologi

oleh

**Ricke Isnaini Rachmania
0410910043-91**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2009**

LEMBAR PENGESAHAN

**POTENSI ISOLAT BAKTERI PEREDUKSI NITRAT
DARI WADUK SUTAMI**

oleh

**Ricke Isnaini Rachmania
0410910043-91**

**Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 16 Pebruari 2009
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Biologi**

Pembimbing I

Pembimbing II

**Dra. Umi Marwati M.Si.
NIP. 132 061 193**

**Dr. Suharjono MS.
NIP. 131 759 584**

**Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi**

**Dr. Sri Rahayu M. Kes.
NIP. 131 652 677**

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Ricke Isnaini Rachmania
NIM : 0410910043-91
Jurusan : Biologi
Penulis skripsi berjudul : Potensi isolat bakteri pereduksi nitrat dari Waduk Sutami

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari Skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam Skripsi ini.
2. Apabila di kemudian hari ternyata Skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala risiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 16 Pebruari 2009

Yang menyatakan,

(Ricke Isnaini Rachmania)

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipannya hanya dapat dilakukan seijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



POTENSI ISOLAT BAKTERI PEREDUKSI NITRAT DARI WADUK SUTAMI

ABSTRAK

Bakteri pereduksi nitrat berperan penting dalam menurunkan kadar nitrat penyebab pencemar di perairan. Salah satu perairan yang mengalami pencemaran tersebut adalah Waduk Sutami. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pola pertumbuhan, kemampuan mereduksi nitrat, dan karakteristik fenotip bakteri pereduksi nitrat dari Waduk Sutami. Penelitian ini dilakukan menurut rancangan acak kelompok. Langkah penelitian meliputi determinasi, isolasi, seleksi dan uji penurunan kadar nitrat menggunakan medium *Tryptone Soya Broth* dengan variasi 5, 10, 20 mg/L dan kontrol. Kultur diinkubasikan secara aerobik pada suhu ruang, agitasi 120 rpm selama 24 jam. Parameter yang diamati meliputi densitas sel bakteri dan kadar nitrat medium. Data tersebut dianalisis ragam (ANOVA) dengan tingkat kepercayaan 95% serta analisis korelasi *Pearson's*. Sejumlah 22 isolat bakteri yang diperoleh berpotensi mereduksi nitrat (10,70% hingga 97,11%). Dua isolat bakteri pereduksi nitrat terpilih adalah DR-14 dan DU-27-1. Isolat DR-14 mampu menurunkan kadar nitrat pada variasi medium 5, 10, 20 mg/L berturut-turut sebesar 89,02%, 86,21%, 82,46%, dan pada kontrol sebesar 69,45%. Isolat DU-27-1 mampu menurunkan kadar nitrat pada variasi medium 5, 10, 20 mg/L sebesar 60,65%, 76,33%, 83,7% dan pada kontrol sebesar 62,2%. Densitas sel tertinggi isolat DR-14 ($12,9 \times 10^8$ sel/mL) dicapai dalam medium dengan variasi kadar nitrat 10 mg/L sedangkan isolat DU-27-1 dalam medium dengan variasi kadar nitrat 20 mg/L ($12,83 \times 10^8$ sel/mL). Karakteristik fenotip isolat bakteri DR-14 dan DU-27-1 adalah berbeda.

Kata kunci : bakteri, nitrat, reduksi, Waduk Sutami

THE POTENCY OF NITRATE REDUCING BACTERIA ISOLATED FROM SUTAMI BASIN

ABSTRACT

Nitrate reducing bacteria have an important role in reduction of nitrate that cause pollution of water. One of the water that occur those pollution is Sutami Basin. The objectives of this research were studied the growth pattern, and potency of nitrate reduction also phenotype characteristics of isolates nitrate reducing bacteria from Sutami basin. This research was designed using Randomized Complete Block Design. Research steps were carried out determination, isolation, screening, assay of reduction concentration nitrate in *Tryptone Soya Broth* medium in various 5, 10, 20 mg/L and control. Culture was incubated in aerobic condition at room temperature, 120 rpm within 24 hours. Parameters observed were density of bacteria cells and nitrate concentration in the medium. The data were analyzed using analysis of variances (ANOVA) with level of confidence 95%. The correlation between cells density and reduction of nitrate concentration was analysis using *Pearson's* correlation. Twenty two isolates of bacteria had potency reduction nitrate (10.70% until 97.11%). Two selected isolates were DR-14 and DU-27-1. Isolate DR-14 had ability to reduce nitrate concentration in various 5, 10, 20 mg/L in a series 89,02%, 86,21%, 82,46%, and control 69,45%. Isolate DU-27-1 had ability to reduce nitrate concentration in various 5, 10, 20 mg/L in a series 60,65%, 76,33%, 83,7% and control 62,2%. High cell density of isolate DR-14 (12.9×10^8 cell/mL) attained in various nitrate medium 10 mg/L while isolate DU-27-1 various nitrate medium 20 mg/L (12.83×10^8 cell/mL). Phenotype characteristics of isolate bacteria DR-14 and DU-27-1 are different.

Keywords: bacteria, nitrate, reduction, Sutami Basin

KATA PENGANTAR

AlhamdulillahRabbilalamin... Segala puji syukur bagi Allah Subhanahu wa Ta'ala atas limpahan rahmat serta ilmu-Nya. Solawat serta salam senantiasa ditujukan kepada Nabi Muhammad Salawallahualaihi wa Salam. Skripsi berjudul "Potensi isolat bakteri pereduksi nitrat dari Waduk Sutami" ini merupakan sebuah karya yang hanya dapat diselesaikan dengan berbekal keikhlasan dan kesabaran serta meraih banyak hikmah dalam proses penyelesaiannya.

Banyak pihak yang telah membantu dan mendukung penyelesaian Skripsi ini, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tua penulis atas do'a dan cintanya yang tak terhingga.
2. Ibu Dra. Umi Marwati M.Si dan Bapak Dr. Suharjono MS terima kasih atas ilmu dan kesabaran selama membimbing dalam penelitian.
3. Ibu Dra. Catur Retnaningdyah M.Si atas nasihat, motivasi, serta dukungan moril.
4. Ibu Tri Ardyati, M.Agr.Sc. PhD selaku penguji atas ilmu, nasihat, motivasi dan saran yang sangat membangun.
5. Ibu Dr. Endang Arisoesilaningsih selaku penguji atas nasehat dan motivasi yang berpengaruh membentuk pribadi penulis untuk menjadi lebih baik.
6. Ibu Zulfaidah P.G. M.Si selaku penguji sekaligus sekretaris Jurusan Biologi atas dukungan dan saran yang sangat membangun.
7. Ibu Dr. Sri Rahayu M.Kes selaku ketua Jurusan Biologi atas bantuan, nasehat dan motivasi yang telah diberikan.
8. Bapak Prof. Dr. Ir. Loekito Adi Soehono M. Agr. selaku pimpinan IDP Edu. Australia atas nasehat dan kepercayaan yang diberikan.
9. Seluruh dosen, staf dan karyawan Jurusan Biologi dan staf Fakultas MIPA.
10. Kantor Kementerian Negara Riset dan Teknologi (RISTEK) atas bantuan serta kerja samanya.
11. Perum Jasa Tirta Malang atas kerja samanya.
12. Otsuka Indonesia Inc. Malang atas bantuannya.

13. Tim penelitian di Laboratorium M. Asraf A., Rovy S.E., Nur Ajjiah, Neneng Nuraini serta rekan-rekan Lab. Mikrobiologi seluruhnya atas kerja sama, dukungan serta bantuannya.
14. Rekan-rekan seperjuangan di Biologi khususnya angkatan 2004 tersayang atas kebersamaan serta dukungannya.

Semoga persembahan sederhana ini dicatat oleh-Nya sebagai amal ibadah yang ikhlas serta dapat memberikan manfaat kepada semua pihak. Ilmu pengetahuan sangat luas namun waktu sangat terbatas. Demikian halnya dengan penulisan di dalam naskah ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu dibutuhkan banyak saran dari seluruh pembaca agar menjadi lebih baik.

Malang, 19 Februari 2009

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR ISTILAH/SINGKATAN	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Perumusan Masalah.....	2
1.3. Tujuan.....	2
1.4. Manfaat.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Karakteristik perairan Waduk Sutami	4
2.2. Daur Nitrogen	5
2.3. Bakteri-bakteri pelaku denitrifikasi	7
2.4. Karakteristik dan potensi bakteri pereduksi nitrat	7
2.5. Mekanisme denitrifikasi di dalam sel bakteri pereduksi Nitrat	8
BAB III METODE PENELITIAN	10
3.1. Waktu dan tempat.....	10
3.2. Deskripsi lokasi pengambilan sampel	10
3.3. Pengambilan Sampel	10
3.4. Determinasi amonifikasi, nitrifikasi dan denitrifikasi sampel air.....	11
3.5. Isolasi bakteri pereduksi nitrat.....	12
3.6. Seleksi isolat bakteri pereduksi nitrat	12

3.7. Pertumbuhan dan potensi bakteri pereduksi nitrat (DR-14 dan DU-27-1)	14
3.8. Karakterisasi fenotip isolat bakteri pereduksi nitrat	16
3.10. Rancangan Penelitian	19
3.10. Analisis Data	19
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	20
4.1. Determinasi amonifikasi, nitrifikasi dan denitrifikasi sampel air Waduk Sutami	20
4.2. Isolat bakteri pereduksi nitrat Waduk Sutami	21
4.3. Seleksi (<i>screening</i>) isolat bakteri pereduksi nitrat	23
4.4. Pola pertumbuhan isolat DR-14 dan DU-27-1 pada medium dengan beberapa variasi kadar nitrat	25
4.5. Korelasi pertumbuhan isolat DR-14 dan DU-27-1 terhadap penurunan kadar nitrat medium	28
4.6. Karakteristik fenotip isolat DR-14 dan DU-27-1	32
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	36
5.1 Kesimpulan.....	36
5.2 Saran.....	36
DAFTAR PUSTAKA	37
LAMPIRAN.....	42

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1. Determinasi amonifikasi, nitrifikasi dan denitrifikasi sampel air Waduk Sutami	20
4.2. Karakteristik morfologi koloni isolat bakteri pereduksi nitrat Waduk Sutami	22
4.3. Seleksi kemampuan isolat bakteri Waduk Sutami dalam mereduksi nitrat	24
4.4. Karakteristik fenotip isolat DR-14 dan DU-27-1	32



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1. Daur nitrogen di perairan	5
2.2. Mekanisme denitrifikasi pada sel bakteri pereduksi nitrat	9
4.1. Pola pertumbuhan isolat DR-14 pada medium dengan beberapa variasi kadar nitrat	26
4.2. Pola pertumbuhan isolat DU-27-1 pada medium dengan beberapa variasi kadar nitrat	26
4.3. Pertumbuhan dan penurunan kadar nitrat isolat DR-14 dalam medium dengan variasi nitrat 0 mg/L (a), 5 mg/L (b), 10 mg/L (c) dan 20 mg/L (d)	28
4.4. Pertumbuhan dan penurunan kadar nitrat isolat DR-14 dalam medium dengan variasi nitrat 0 mg/L (a), 5 mg/L (b), 10 mg/L (c) dan 20 mg/L (d)	28
4.5. Korelasi densitas sel terhadap kadar nitrat dalam kultur DR-14 (A) dan DU-27-1 (B)	31

DAFTAR ISTILAH/SINGKATAN

Istilah	Keterangan
<i>Arborescent</i>	tepi menyerupai pohon yang bercabang-cabang
<i>Circular</i>	bulat
<i>Convex</i>	cembung
<i>Entire</i>	rata
<i>Effuse</i>	pertumbuhan tipis (pada umumnya merata)
<i>Fluorescent</i>	berwarna jika kena sinar atau pantulan sinar
<i>Haemocytometer</i>	alat berupa gelas dengan bilik (kotak) hitung, dapat digunakan untuk menghitung jumlah sel bakteri atau khamir
Inokulasi	menambahkan mikroba ke dalam medium
<i>Irregular</i>	bulat tidak beraturan
Isolat	mikroba satu jenis hasil isolasi
Kokus	bentuk bulat
OD (<i>optical density</i>)	kerapatan optis yang menunjukkan kerapatan materi tertentu, jumlah cahaya yang diserap
OD 600	kerapatan optis dengan panjang gelombang 600 nm
Oose	kawat berujung bulat untuk mengambil biakan bakteri
<i>Pulvinate</i>	sangat cembung seperti bantal
Sentrifugasi	memisahkan komponen larutan, suspensi, sel dan sebagainya berdasarkan berat komponennya
<i>Smooth</i>	halus
Spektrofotometri	metode pengukuran dengan menggunakan serapan cahaya

Translucent

meneruskan sinar meskipun benda dibawahnya tidak semua terlihat dengan jelas

Undulate
UV-Vis

bergelombang
ultraviolet visual

Singkatan/Lambang

atm

satuan tekanan (atmosfer)

ATP

Adenosin Triphosphate

DO

Dissolved Oxygen

rpm

rotation per minutes (putaran per menit)

TOM

Total Organic Matters

TSA

Tryptone Soya Agar

TSB

Tryptone Soya Broth

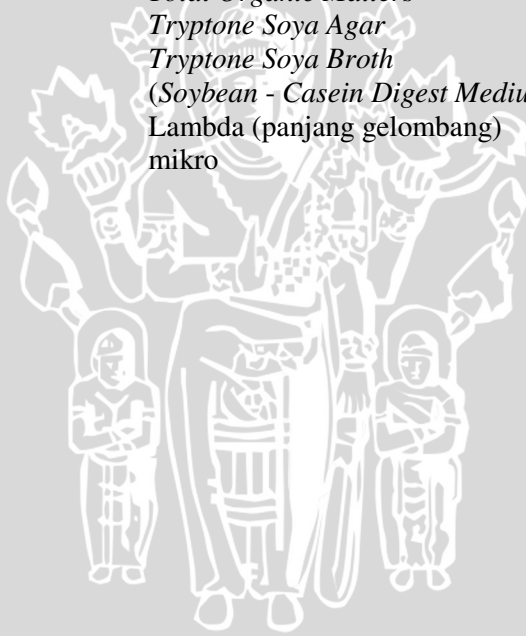
(Soybean - Casein Digest Medium)

λ

Lambda (panjang gelombang)

μ

mikro



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1.1. Tabel komposisi medium isolasi bakteri pereduksi nitrat	42
1.2. Tabel komposisi medium uji determinasi sampel air	43
1.3. Tabel komposisi reagen uji determinasi sampel air	44
2.1. Pembuatan reagen <i>Griess</i>	45
2.2. Pembuatan reagen <i>Nessler's</i>	45
2.3. Pembuatan reagen <i>Trommdorf's</i>	45
3.1. Pembuatan larutan baku nitrat	46
3.2. Pembuatan reagen dan penghitungan kadar nitrat	46
4.1. Gambar morfologi sel isolat DR-14 dan DU-27-1	47
5.2. Gambar kurva baku densitas sel DR-14	48
5.3. Gambar kurva baku densitas sel DU-27-1	48
6.4. Gambar kurva pertumbuhan sel DR-14	49
6.5. Gambar kurva pertumbuhan sel DU-27-1	49
6.6. Gambar kurva baku kadar nitrat dibuat pada selang 0,02 hingga 2 mg/L	50
7.4. Tabel penghitungan faktor fisikokimiawi sampel air	51
8.5. Tabel data penghitungan kadar nitrat pada seleksi kuantitatif	52
9.6. Tabel analisis ragam densitas sel terhadap isolat, nitrat aktual dan waktu	53
9.7. Tabel analisis ragam variasi kadar nitrat terhadap isolat, nitrat aktual dan waktu	53
10.8. Tabel analisis korelasi <i>Pearson's</i> dan regresi sederhana antarvariabel	54
10.9. Tabel analisis regresi sederhana antarvariabel	54

- 11.10. Tabel uji BNT persentase penurunan kadar nitrat medium (DR-14) 55
- 11.11. Tabel uji BNT persentase penurunan kadar nitrat medium (DU-27-1) 55
- 12.7. Gambar peta lokasi pengambilan sampel Waduk Sutami 56

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Waduk Sutami terletak sekitar 35 km ke arah selatan kota Malang, tepatnya di Desa Karangates, Kecamatan Sumberpucung Kabupaten Malang. Waduk tersebut memiliki beberapa fungsi penting antara lain sumber irigasi lahan pertanian, sumber air minum, pengendali banjir dan sumber tenaga listrik. Pembangkit tenaga listrik dengan daya terpasang sebesar 105 Megawatt di Waduk Sutami mampu memproduksi listrik sebesar 289 ribu Megawatt setiap tahun (Soekistijono, 2004).

Kualitas perairan Waduk Sutami sangat dipengaruhi oleh kualitas sumber-sumber air sungai yang mengalir ke waduk tersebut diantaranya sungai Metro, Lesti dan Brantas. Salah satu senyawa yang dapat mempengaruhi kualitas perairan tersebut adalah nitrat. Sumber utama senyawa nitrat berasal dari aktivitas domestik, industri serta pertanian (faktor antropogenik). Adanya aktivitas-aktivitas tersebut menyebabkan peningkatan kadar nitrat di Waduk Sutami setiap tahun. Menurut hasil pemantauan kualitas air oleh Samino dan Retnaningdyah pada tahun 2004 hingga 2006, kadar nitrat di Waduk Sutami berkisar dari 0,64 hingga 11,07 mg/L (tahun 2004), 0,325 hingga 10,197 mg/L (tahun 2005), dan 1,579 hingga 5,191 mg/L (tahun 2006). Kondisi tersebut menggambarkan peningkatan kadar nitrat melebihi nilai baku maksimum sebesar 10 mg/L yang telah ditetapkan oleh UNESCO/WHO/UEP (Effendi, 2003).

Peningkatan kadar nitrat di Waduk Sutami memicu terjadinya eutrofikasi. Eutrofikasi dikenal sebagai peristiwa pengayaan nutrisi di perairan terutama unsur nitrogen dan fosfor. Hal ini menjadi penyebab utama terjadinya *blooming Microcystis* spp. Mikroalga tersebut mampu memproduksi racun yang dapat memberikan dampak negatif bagi organisme perairan seperti kematian populasi ikan (Oberholster, 2003). Teknik remediasi yang dilakukan untuk mengurangi bahaya *blooming Microcystis* spp. telah diupayakan secara fisikokimiawi dan mekanis namun demikian pemilihan upaya yang tepat guna dan aplikatif masih terus diusahakan melalui teknologi bioremediasi. Bioremediasi didefinisikan sebagai mekanisme pemulihan melalui biodegradasi alamiah dengan

memanfaatkan potensi mikrobial (USEPA, 2001). Bakteri adalah mikrobial yang berperan penting dalam daur nitrogen, proses biodegradasi senyawa-senyawa organik, asimilasi dan introduksi kembali bahan organik melalui rantai makanan. Peran bakteri tersebut dapat dimanfaatkan guna menurunkan kadar nitrat berlebih di Waduk Sutami.

Oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan upaya isolasi bakteri dari Waduk Sutami, seleksi kualitatif dan kuantitatif serta uji potensi dalam mereduksi nitrat terhadap dua isolat bakteri pereduksi nitrat terpilih (DR-14 dan DU-27-1).

1.2. Perumusan Masalah

Permasalahan yang akan dijawab dalam penelitian ini adalah:

- 1) Apakah bakteri-bakteri dari Waduk Sutami memiliki kemampuan dalam proses amonifikasi, nitrifikasi, dan denitrifikasi?
- 2) Apakah bakteri pelaku denitrifikasi terdapat di dalam sampel air Waduk Sutami?
- 3) Apakah isolat DR-14 dan DU-27-1 memiliki pola pertumbuhan yang bervariasi pada beberapa variasi kadar nitrat medium?
- 4) Apakah isolat DR-14 dan DU-27-1 memiliki pola penurunan kadar nitrat yang bervariasi pada beberapa variasi kadar nitrat medium?
- 5) Apakah isolat DR-14 dan DU-27-1 memiliki karakteristik fenotip yang berbeda?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini antara lain:

- 1) Mempelajari kemampuan bakteri-bakteri dari Waduk Sutami dalam proses amonifikasi, nitrifikasi, dan denitrifikasi.
- 2) Mempelajari bakteri pelaku denitrifikasi yang terdapat di dalam sampel air Waduk Sutami.
- 3) Mempelajari pola pertumbuhan isolat bakteri pereduksi nitrat DR-14 dan DU-27-1 pada beberapa kadar nitrat medium.
- 4) Mempelajari pola penurunan kadar nitrat isolat bakteri pereduksi nitrat DR-14 dan DU-27-1 pada beberapa kadar nitrat medium.
- 5) Mempelajari karakteristik fenotip isolat DR-14 dan DU-27-1.

1.4. Manfaat Penelitian

Informasi potensi bakteri pereduksi nitrat ini mendasari penelitian lanjutan untuk menentukan formulasi bakteri yang efektif dan aplikatif guna menurunkan kadar nitrat berlebih di Waduk Sutami.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Karakteristik Perairan Waduk Sutami

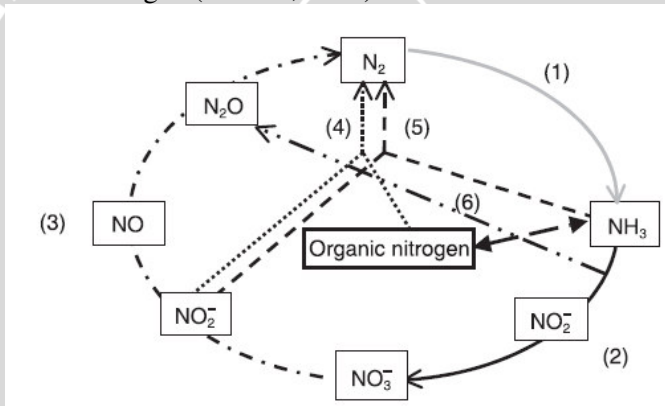
Eutrofikasi dikenal sebagai peristiwa pengayaan nutrisi diantaranya unsur nitrogen dan fosfor namun demikian komponen utama penyebab peristiwa tersebut adalah unsur nitrogen (Effendi, 2003). Berdasarkan hasil pemantauan kualitas air yang dilakukan oleh Samino dan Retnaningdyah pada tahun 2002 hingga 2006, Waduk Sutami dikategorikan ke dalam kelompok perairan eutrofik. Hal ini didasarkan pada tingginya kandungan nitrat di perairan tersebut. Kadar nitrat di Waduk Sutami pada tahun 2002 mencapai kisaran 0,639 hingga 0,966 mg/L sedangkan kadar nitrat kisaran 0,64 hingga 11,07 mg/L dicapai pada tahun 2004. Pada tahun 2005, kadar nitrat mencapai kisaran 0,325 hingga 10,197 mg/L dan pada tahun 2006 berkisar 1,579 hingga 5,191 mg/L (Samino dan Retnaningdyah, 2006). Hal ini menunjukkan bahwa kadar nitrat di Waduk Sutami telah melebihi nilai baku maksimum sebesar 10 mg/L yang ditetapkan oleh UNESCO/WHO/UEP (Effendi, 2003).

Peristiwa eutrofikasi di perairan digambarkan dengan warna air kehijauan serta kandungan fosfat rata-rata sebesar 0,035 hingga 0,1 mg/L dan klorofil rata-rata sebesar 0,008 hingga 0,025 mg/L (Palmer dan Roy, 2001). Dampak negatif yang ditimbulkan dari adanya peristiwa tersebut salah satunya adalah *blooming Microcystis* spp. Mikroalga ini mampu memproduksi racun yang bersifat toksik (mikrosistin) dan berbahaya bagi organisme di perairan. Mikrosistin dihasilkan di dalam sel *Microcystis* spp. dan dikeluarkan ketika sel mengalami lisis atau mati. Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan sel *Microcystis* spp. antara lain suhu, nutrisi (terutama fosfor dan nitrogen), dan cahaya. Menurut Haris *et al.* (2005) pertumbuhan *Microcystis* spp. berlangsung optimum pada suhu 32°C dengan intensitas cahaya sebesar 3.600-18.000 lux. Pengendalian pertumbuhan mikroalga ini dapat diupayakan dengan mengontrol faktor fisikokimiawi tersebut.

Pengelolaan dan perlindungan sumber daya air Waduk Sutami terus diupayakan guna mengurangi dampak negatif dari *blooming Microcystis* spp. Salah satu upaya efektif yang dapat dilakukan adalah dengan memanfaatkan potensi bakteri sebagai agen hayati dalam proses degradasi nitrat (Retnaningdyah *et al.*, 2002).

2.2. Daur Nitrogen

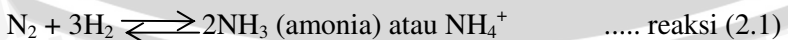
Nitrogen di perairan tersedia dalam bentuk gas N_2 , NO_2^- , NO_3^- , NH_3^+ dan NH_4^+ serta berbagai bentuk senyawa organik kompleks. Sumber nitrogen terbesar sekitar 80% berasal dari udara dan tersedia dalam bentuk nitrogen bebas yang masuk melalui sistem fiksasi biologis. Keberadaan nitrogen di perairan tersedia berupa senyawa nitrogen anorganik dan organik. Nitrogen anorganik terdiri atas ion nitrit (NO_2^-), ion nitrat (NO_3^-), ion amonia (NH_3), ion amonium (NH_4^+) dan molekul N_2 yang terlarut dalam air, sedangkan nitrogen organik berupa protein, asam amino dan urea dapat mengendap dalam air. Bentuk-bentuk nitrogen tersebut mengalami transformasi (sebagian besar melibatkan proses makrobiologis dan mikrobiologis) dalam siklus nitrogen (Effendi, 2003).



Gambar 2.1. Daur nitrogen di perairan (Hayatsu *et al.*, 2008)

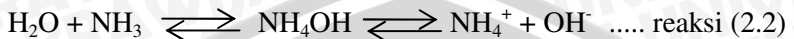
Transformasi nitrogen secara mikrobiologis melalui tahapan sebagai berikut (Li, 2007):

- 1) Asimilasi senyawa nitrogen anorganik (nitrat dan amonium) oleh tumbuhan dan mikrobia (bakteri autotrof) untuk membentuk nitrogen organik misalnya asam amino dan protein.
- 2) Fiksasi gas nitrogen menjadi amonia dan nitrogen organik oleh mikrobia berlangsung seperti pada reaksi 2.1. Fiksasi gas nitrogen secara langsung dapat dilakukan oleh beberapa jenis alga *Cyanophyta* (alga biru) dan bakteri.



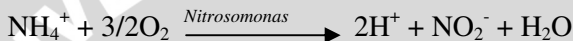
Ion amonium yang tidak berbahaya adalah bentuk nitrogen hasil

hidrolisis amonia yang berlangsung dalam kesetimbangan seperti pada reaksi 2.2.



Kondisi pH yang tinggi (suasana basa) akan menyebabkan ion amonium menjadi amonium hidroksida yang tidak berdisosiasi dan bersifat racun.

- 3) Nitrifikasi adalah proses oksidasi amonia menjadi nitrit dan nitrat yang diperankan oleh bakteri *Nitrosomonas* dan *Nitrobacter*. Nitrifikasi berlangsung pada pH 8 dan berkurang secara nyata pada pH < 7. Reaksi tersebut berlangsung seperti pada reaksi 2.3.



Hasil oksidasi ini sangat reaktif dan mudah larut sehingga dapat langsung digunakan dalam proses biologis.

- 4) Amonifikasi nitrogen organik untuk menghasilkan amonia berlangsung selama proses dekomposisi bahan organik. Proses ini banyak dilakukan oleh bakteri dan jamur yang membutuhkan O₂ untuk mengubah senyawa organik menjadi CO₂. Autolisis atau terpecahnya sel dan ekskresi amonia oleh zooplankton dan ikan juga berperan sebagai pemasok senyawa amonia.
- 5) Denitrifikasi adalah proses reduksi nitrat menjadi nitrit (NO₂⁻), dinitrogen oksida (N₂O) dan molekul nitrogen (N₂). Proses reduksi nitrat berlangsung optimal pada kondisi *anoxic* (tak ada oksigen). Dinitrogen oksida (N₂O) adalah produk utama dari denitrifikasi pada perairan dengan kadar oksigen sangat rendah, sedangkan molekul nitrogen (N₂) adalah produk utama dari proses denitrifikasi pada kondisi anaerob. Proses denitrifikasi akan berkurang atau lambat pada kondisi pH dan suhu rendah. Maier *et al.* (2000) menyatakan bahwa proses denitrifikasi dibagi menjadi dua tahapan yaitu asimilatori dan dissimilatori. Produk asimilatori senyawa nitrat (NO₃⁻) dihasilkan senyawa amonia (NH₄⁺) yang selanjutnya bergabung di dalam sel (proses tersebut tidak menghasilkan energi), sedangkan proses dissimilatori terjadi melalui reaksi oksidasi nitrat (NO₃⁻) menjadi amonium (NH₄⁺) dan di dalam proses tersebut dihasilkan energi berupa ATP. Beberapa contoh bakteri yang terlibat dalam proses tersebut adalah *Bacillus*, *Pseudomonas* dan *Paracoccus*.

2.3. Bakteri-bakteri pelaku denitrifikasi

Proses perubahan senyawa nitrat menjadi gas dinitrogen oksida (N_2O) atau nitrogen (N_2) tidak terlepas melalui tiga proses utama yaitu amonifikasi, nitrifikasi dan denitrifikasi. Proses tersebut menyediakan energi bagi bakteri dengan memanfaatkan nitrat sebagai akseptor elektron. Bakteri yang memiliki peran tersebut adalah bakteri yang juga berperan dalam siklus nitrogen. *Bacillus* adalah salah satu contoh bakteri pelaku amonifikasi, dan bakteri pelaku nitrifikasi antara lain *Nitrosomonas* dan *Nitrobacter*, sedangkan bakteri pelaku denitrifikasi diperankan oleh bakteri *Pseudomonas*, *Micrococcus denitrifican* dan *Thiobacillus thiophorus* (Carter *et al.*, 1995). Bakteri pelaku proses denitrifikasi tergolong bakteri fakultatif aerob atau anaerob. Kelompok bakteri tersebut antara lain *Alcaligenes*, *Escherichia*, *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Corynebacterium*, *Paracoccus denitrifican*, *Microvirgula aerodenitrifican*, *Pseudomonas stutzeri*, *Wolinella succinogens*, *Hyphomicrobium*, *Hydrogenomonas*, dan *Thiobacillus* (Li, 2007).

2.4. Karakteristik dan potensi bakteri pereduksi nitrat

Bakteri pereduksi nitrat secara filogenetik termasuk kelompok bakteri heterotrofik. Bakteri dengan karakteristik tersebut mampu mengoksidasi senyawa nitrat secara enzimatis. Reaksi tersebut berlangsung melalui peran beberapa jenis enzim terutama enzim nitrat reduktase dan nitrit reduktase. Enzim-enzim tersebut berada di dalam membran plasma sel dan keberadaannya menjadi ciri spesifik yang dimiliki oleh bakteri pereduksi nitrat. Beberapa bakteri yang mampu menghasilkan enzim-enzim tersebut diantaranya *Paracoccus denitrifican*, *Thiobacillus denitrifican*, *Pseudomonas stutzeri*, *Alcaligenes faecalis* dan *Wolinella succinogenes* (Enwall *et al.*, 2004).

Enzim nitrat reduktase berdasarkan letaknya dikelompokkan menjadi dua jenis yaitu *periplasmic nitrate reductase* (Nap) dan *membrane-bound nitrate reductase* (Nar). Enzim *periplasmic nitrate reductase* (Nap) adalah enzim yang berperan dalam reaksi oksidasi quinon dalam rantai pernafasan. Carter *et al.* (1995) menyatakan bahwa enzim Nap banyak ditemukan pada kelompok *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Alcaligenes entrophus*, *Paracoccus denitrifican* PD1222 dan GB17 serta *Pseudomonas*,

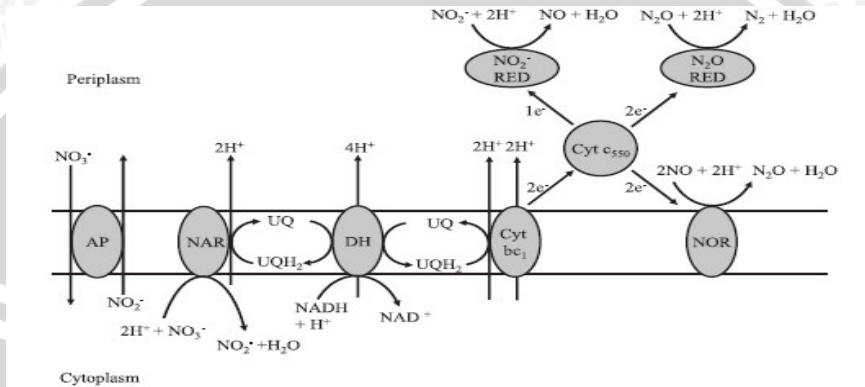
sedangkan Philippet (2005) mengemukakan bahwa enzim *membrane-bound nitrate reductase* (Nar) seringkali ditemukan pada bakteri *Escherichia coli*. Sisi aktif *membrane-bound nitrate reductase* terletak di dalam sitoplasma dari bakteri *nitrate-amonifying* dan bakteri pelaku denitrifikasi. Dalam proses reaksi oksidasi, enzim Nar menstimulasi quinon dengan mengikat nitrat sebagai proton elektrokimiawi transmembran dengan hasil akhir berupa energi. Li (2007) menyatakan bahwa karakteristik lain yang dimiliki oleh bakteri pereduksi nitrat adalah memiliki gen fungsional Nar, Nir, Nor, Nos yang masing-masing memiliki fungsi mengekspresikan enzim *nitrate reductases*, *nitrite reductases*, *nitric oxide reductases*, dan *nitrous oxide reductase*.

Bakteri pereduksi nitrat selain berperan penting dalam siklus nitrogen dalam mengubah senyawa nitrat menjadi nitrit dan gas nitrogen juga berpotensi sebagai agen biodegradasi senyawa-senyawa organik. Rudolphi *et al.* (1991) menjelaskan bahwa bakteri pereduksi nitrat strain *Pseudomonas* dan *Paracoccus* dapat mendegradasi senyawa karbon, metilfenol dan dimetilfenol pada kondisi anaerob selama proses reduksi nitrat menjadi nitrit dan gas nitrogen. Salah satu spesies bakteri yang memiliki peran besar dalam proses denitrifikasi adalah *Paracoccus denitrifican*. *Paracoccus denitrifican* ATCC35512 diketahui mampu mereduksi nitrat menjadi bentuk gas nitrogen mencapai kisaran 27% dan sebanyak 92% gas nitrogen di udara dihasilkan dalam proses tersebut (Takaya *et al.*, 2003), sedangkan bakteri yang termasuk genus *Aeromonas* BB7 dan BB66 diketahui mampu menurunkan kadar nitrat hingga kisaran 75 sampai dengan 65% (Carter *et al.*, 1995).

2.5. Mekanisme denitrifikasi di dalam sel bakteri pereduksi nitrat

Mekanisme reduksi nitrat menjadi gas nitrogen di dalam sel berlangsung melibatkan empat jenis enzim antara lain nitrat reduktase, NADH dehidrogenase, NO reduktase dan nitrit reduktase. Enzim-enzim tersebut terdapat di dalam periplasma sel (Strohm *et al.*, 2007). Proses denitrifikasi yang terjadi di dalam sel bakteri pereduksi nitrat (contohnya: *Paracoccus denitrifican*) berlangsung secara aerob dalam proses respirasi untuk menghasilkan energi berupa ATP. Reaksi berlangsung seperti pada gambar 2.2.

Enzim NADH dehidrogenase dan sitokrom bc_1 merupakan pompa aktif proton, sedangkan cincin ubiquinon berperan untuk proses penggabungan enzim nitrat reduktase atau sitokrom bc_1 sebagai proton translokasi. Reduksi dua molekul nitrat menjadi N_2 terjadi melalui transfer lima molekul NADH sebagai translokasi donor sehingga sejumlah 36 proton menembus membran.



Gambar 2.2. Mekanisme denitrifikasi pada sel bakteri pereduksi nitrat (Strohm *et al.*, 2007)

Sejumlah 4 molekul proton dibutuhkan untuk melakukan sintesis satu molekul ATP, sedangkan sembilan molekul ATP dapat disintesis dari lima molekul NADH. Reaksi oksidasi molekul hidrogen dan format dalam membran luar menyumbangkan elektron quinon dengan melepaskan dua proton setiap dua molekul elektron di dalam periplasma. Reaksi kesetimbangan proton dan ATP terhadap substrat lebih rendah dibandingkan NADH sebagai donor elektron (26 H⁺ tiap 10 e⁻ atau 1,3 ATP setiap dua elektron). Reaksi oksidasi asetat dalam siklus asam sitrat menghasilkan tiga pasang elektron pada tingkatan NADH dan satu tingkat ubiquinon. Reaksi kesetimbangan proton ubiquinon bergantung proses reduksi nitrat melalui sejumlah 16 proton translokasi dan setiap lima molekul ubiquinon yang teroksidasi. Reaksi tersebut menghasilkan sejumlah 24,8 proton dalam setiap reaksi oksidasi asetat, dan sejumlah 6,2 menghasilkan ATP melalui fosforilasi transpor elektron. Dua molekul ATP digunakan dalam aktivasi asetat dan satu molekul berikatan dalam siklus asam sitrat dalam reaksi suksinat thiokinase melepaskan 5,2 ATP tiap molekul asetat (Strohm *et al.*, 2007).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret sampai dengan Oktober 2008. Sampel air diambil dari perairan Waduk Sutami Kabupaten Malang. Isolasi dan uji potensi isolat bakteri pereduksi nitrat dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi serta Laboratorium Ekologi dan Diversitas Hewan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

3.2. Deskripsi lokasi pengambilan sampel

Waduk Sutami terletak di Daerah Aliran Sungai (DAS) Brantas dengan luas Daerah Aliran Sungai sekitar 2.052 km² dan luas genangan 7,9 km² serta daya tampung waduk sekitar 253 juta m³. Daerah di Waduk Sutami mengalami dua musim yaitu musim hujan (Nopember sampai April) dan musim kemarau (Mei sampai Oktober). Curah hujan rata-rata per tahun sebesar 2.300 mm dengan temperatur rerata harian sekitar 25°C. Kelembaban udara pada musim hujan sekitar 87% dan pada musim kemarau sekitar 74% (Soekistijono, 2004).

3.3. Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan adalah air yang diambil dari permukaan pada kedalaman ± 20 cm. Sampel air digunakan sebagai sumber isolasi isolat bakteri pereduksi nitrat. Lokasi pengambilan sampel antara lain hulu (*inlet*), tengah dan hilir (*outlet*) perairan Waduk Sutami. Pengambilan sampel air dilakukan menggunakan *water sampler vertical* volume satu liter. Sampel air dari tiap-tiap lokasi dilakukan pengambilan sebanyak 3 kali secara acak kemudian dilakukan homogenasi. Sampel air ini ditempatkan dalam botol kaca steril untuk isolasi dan uji potensi di laboratorium.

3.4. Determinasi amonifikasi, nitrifikasi dan denitrifikasi dari sampel air

Pengujian ini dilakukan untuk mengamati kemampuan bakteri pelaku amonifikasi, nitrifikasi dan denitrifikasi dalam sampel air.

3.4.1. Determinasi Amonifikasi

Uji ini dilakukan untuk mengamati kemampuan bakteri-bakteri dalam sampel air mengubah nitrat (NO_3^-) menjadi amonium (NH_4^+). Pengujian dilakukan dengan mengkulturkan sampel dalam medium pepton cair. Kultur diinkubasikan selama 24 jam dalam suhu ruang. Pengujian ada atau tidaknya amonia di dalam kultur dapat diketahui dari perubahan suspensi (1 mililiter) menjadi kuning setelah ditambahkan reagen *Nessler's* (0,5 mililiter). Jika warna suspensi berubah menjadi kuning menunjukkan adanya amonia namun jika warna suspensi tidak berubah maka menunjukkan tidak terdapat amonia (reaksi negatif). Jika suspensi berubah menjadi presipitat coklat menunjukkan adanya amonia dengan kadar tinggi dalam suspensi tersebut (Marwati, 2006).

3.4.2. Determinasi Nitrifikasi

Nitrifikasi berlangsung melalui dua tahap yaitu oksidasi amonia menjadi nitrit dan oksidasi nitrit menjadi nitrat (Marwati, 2006).

a. Determinasi Nitrit

Uji ini dilakukan untuk mengamati kemampuan bakteri-bakteri mengubah amonium (NH_4^+) menjadi nitrit (NO_2^-) dalam sampel air. Pengujian dilakukan dengan mengkulturkan sampel dalam medium amonium sulfat cair. Kultur diinkubasikan selama 24 jam dalam suhu ruang. Suspensi kultur sebanyak 1 mililiter ditambah dengan reagen *Nessler's* sebanyak 0,5 mililiter. Jika warna suspensi tidak berubah setelah ditambahkan reagen maka suspensi tersebut mengandung nitrit. Jika warna suspensi berubah menjadi kuning menunjukkan adanya amonia yang tidak dioksidasi menjadi nitrit.

b. Determinasi Nitrat

Uji ini dilakukan untuk mengamati kemampuan bakteri-bakteri mengubah nitrit (NO_2^-) menjadi nitrat (NO_3^-) dalam sampel air. Pengujian dilakukan dengan mengkulturkan sampel dalam medium amonium sulfat cair. Kultur diinkubasikan selama 24 jam dalam suhu ruang. Sebanyak 1 tetes suspensi kultur direaksikan dengan tiga tetes reagen *Trommsdorf* dan satu tetes H_2SO_4 pekat. Reaksi dikatakan positif jika dalam sampel terdapat senyawa nitrat. Hal ini ditandai dengan suspensi yang tidak mengalami perubahan warna. Jika suspensi terbentuk warna biru kehitaman maka menunjukkan adanya nitrit (reaksi negatif). Determinasi nitrat juga dilakukan dengan

mengkulturkan sampel dalam medium nitrit cair. Kultur diinkubasikan selama 24 jam dalam suhu ruang. Keberadaan nitrat dapat diketahui dengan mereaksikan suspensi kultur menggunakan reagen *Trommsdorf*.

3.4.3. Determinasi Denitrifikasi

Determinasi ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri-bakteri pelaku denitrifikasi dalam sampel air. Denitrifikasi adalah proses penguraian nitrat (NO_3^-) menjadi nitrit (NO_2^-) dengan hasil akhir berupa gas nitrogen (N_2) atau dinitrogen oksida (N_2O). Pengujian ini dilakukan dengan mengkulturkan sampel dalam medium TSB N-10 mM. Kultur diinkubasi selama 24 jam dalam suhu ruang. Suspensi kultur sebanyak 1 mililiter direaksikan dengan 1 mililiter reagen *Griess*. Reaksi dikatakan positif jika terjadi perubahan warna suspensi menjadi merah muda. Hal ini menunjukkan telah terjadi proses penguraian nitrat (NO_3^-) menjadi nitrit (NO_2^-). Reaksi positif juga ditunjukkan dari proses terbentuknya gas yang tampak di dalam tabung durham.

3.5. Isolasi bakteri pereduksi nitrat

Langkah ini bertujuan untuk memperoleh isolat bakteri murni yang berpotensi mereduksi nitrat. Isolasi bakteri dilakukan menggunakan medium selektif (komposisi pada Lampiran 1, Tabel 1). Medium selektif disterilisasikan menggunakan *autoclave* (Tomy) selama 15 menit pada suhu 121°C , tekanan satu atm. Isolasi bakteri dilakukan dengan membuat seri pengenceran mulai 10^{-1} sampai 10^{-6} . Larutan garam fisiologis 0,85% digunakan sebagai larutan pengencer. Setiap seri pengenceran diambil sebanyak 0,1 mililiter dan dipindahkan ke dalam cawan dan dilakukan teknik isolasi cawan tabur (*pour plate*). Langkah tersebut dilakukan dua kali (duplo). Kultur ini diinkubasi dalam suhu ruang sampai koloni tumbuh. Setiap koloni yang tumbuh dimurnikan dengan metode kuadran *streak* pada medium yang sama selanjutnya diinkubasi dalam suhu ruang selama 24 jam. Koloni tunggal yang tumbuh selanjutnya diinokulasikan ke dalam tabung miring (*agar slant*) sebagai stok kultur murni.

3.6. Seleksi isolat-isolat bakteri pereduksi nitrat

Seleksi dilakukan dengan dua metode yaitu secara kualitatif dan kuantitatif. Pengujian secara kualitatif dengan metode Romijn *Griess*

(Morimoto dan Hirokoba, 1964) dilakukan untuk mendeteksi perubahan nitrat (NO_3^-) menjadi nitrit (NO_2^-). Pengujian secara kuantitatif dengan metode Clesceri *et al.* (1998) dilakukan untuk menghitung kadar nitrat medium. Seleksi isolat bakteri pereduksi nitrat dipakai untuk menentukan isolat bakteri terpilih yang memiliki kemampuan tinggi dalam menurunkan nitrat. Isolat bakteri pereduksi nitrat terpilih dipakai untuk uji lanjutan. Langkah pengujian dilakukan sebagai berikut:

3.6.1. Seleksi secara kualitatif

Seleksi ini dilakukan untuk mengamati kemampuan bakteri mengubah nitrat medium menjadi nitrit. Selain hal tersebut terbentuknya gas dalam tabung durham menunjukkan bahwa bakteri memiliki kemampuan membentuk gas. Pengujian dilakukan dengan menginokulasikan satu oose isolat bakteri ke dalam lima mililiter medium N-10 mM. Kultur diinkubasikan selama 24 jam pada suhu ruang. Perbandingan kultur dan reagen *Griess* adalah 1:1. Jika kultur yang direaksikan dengan reagen *Griess* menunjukkan perubahan warna suspensi menjadi merah muda dan terbentuk gas dalam tabung durham maka isolat tersebut mempunyai kemampuan mereduksi nitrat.

3.6.2. Seleksi secara kuantitatif

Langkah ini dilakukan untuk menghitung penurunan kadar nitrat medium (mg/L). Pengujian diawali dengan peremajaan isolat bakteri pada medium miring TSA. Isolat bakteri berumur 24 jam diambil satu oose dan dikulturkan pada medium N-10 mM dalam *kuhner shaker* agitasi 120 rpm, suhu ruang selama 24 jam. Suspensi stok kultur diinokulasikan ke dalam medium stok inokulum sebanyak 15% (2×10^8 sel/mL). Suspensi stok inokulum diinokulasikan ke dalam medium perlakuan. Parameter yang diamati adalah densitas sel bakteri dan kadar nitrat pada inkubasi ke-0 jam (awal) dan ke-24 jam (akhir). Penghitungan kadar nitrat dilakukan dengan mengambil lima mililiter stok inokulum selanjutnya dilakukan sentrifugasi 8000 rpm, 15 menit suhu 4°C.

Sebanyak lima mililiter supernatan dipindahkan dalam tabung baru berisi 0,5 mililiter reagen brusin sulfat ditambahkan sebanyak 5 mL H_2SO_4 pekat. Absorbansi nitrat dibaca dengan spektrofotometer panjang gelombang 410 nm (Clesceri *et al.*, 1998). Nilai kadar nitrat

dikonversikan ke dalam persamaan regresi linier kurva baku kadar nitrat. Persentase penurunan kadar nitrat medium dihitung seperti rumus 3.1.

$$\% \text{ Penurunan} = \frac{([\text{NO}_3^- \text{ awal}] - [\text{NO}_3^- \text{ akhir}])}{[\text{NO}_3^- \text{ awal}]} \times 100\% \dots \text{ rumus (3.1)}$$

3.7. Pertumbuhan dan potensi bakteri pereduksi nitrat (DR-14 dan DU-27-1)

3.7.1. Kurva baku kadar nitrat

Pembuatan kurva baku nitrat diawali dengan membuat larutan stok nitrat: 1000 mg/L (Lampiran 3.1). Seri larutan dibuat 0 mg/L sebagai blanko; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 1,75 dan 2 mg/L. Tiap-tiap seri diambil sebanyak 5 mililiter dan direaksikan dengan sebanyak 0,5 mililiter reagen brusin sulfat dan lima mililiter H₂SO₄ pekat. Larutan ditunggu hingga dingin. Larutan selanjutnya dihomogenkan menggunakan vortek. Nilai absorbansi dibaca dengan spektrofotometer UV Vis 1240 panjang gelombang 410 nm. Persamaan regresi linier diperoleh berdasarkan korelasi antara kadar nitrat (sumbu absis:x) dengan nilai absorbansi (sumbu ordinat:y).

3.7.2. Kurva baku densitas sel

Pembuatan kurva baku sel dibuat dengan mengkulturkan isolat bakteri dalam medium N-10 mM. Larutan stok inokulum tersebut diinkubasikan menggunakan *kuhner shaker* dengan agitasi 120 rpm, pada suhu ruang selama 24 jam. Seri pengenceran dibuat 1:0; 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 1:5; 1:6. Tiap-tiap seri pengenceran dilakukan penghitungan densitas sel dengan *haemocytometer* dan kerapatan optis dengan spektrofotometer panjang gelombang 600 nm. Kurva baku densitas sel dibuat dari korelasi antara kerapatan optis dengan densitas sel bakteri. Persamaan regresi linier kurva baku densitas sel diperoleh dengan membuat grafik hubungan antara densitas sel (sumbu absis:x) dengan nilai kerapatan optis (sumbu ordinat:y).

3.7.3. Kurva pertumbuhan (pendahuluan) isolat bakteri pereduksi nitrat (DR-14 dan DU-27-1)

Langkah ini dilakukan sebagai uji pendahuluan untuk mengetahui pola pertumbuhan isolat bakteri dalam medium mengandung nitrat 10 mM. Pengujian dilakukan dengan mengkulturkan isolat DR-14 dan DU-27-1 berumur 24 jam dalam medium N-10 mM menggunakan *kuhner shaker* agitasi 120 rpm, suhu ruang (25-28°C) selama 24 jam. Suspensi stok kultur sebanyak 15% (2×10^8 sel/mL) diinokulasikan dalam medium stok inokulum. Suspensi stok inokulum sebanyak 15% (2×10^8 sel/mL) diinokulasikan dalam medium TSB N-10 mM. Nilai kerapatan optis dikonversikan ke persamaan regresi linier dari kurva baku densitas sel yang telah dibuat. Kurva pertumbuhan bakteri pereduksi nitrat diperoleh dengan membuat grafik korelasi antara waktu inkubasi (sumbu absis:x) dan densitas sel (sel/mL) (sumbu ordinat:y). Hasil tersebut menyatakan pertumbuhan isolat-isolat bakteri dalam bentuk kurva pertumbuhan. Data pertumbuhan isolat bakteri pereduksi nitrat dihitung laju pertumbuhan dan waktu generasi pada fase logaritmik seperti pada rumus 3.2 (Atlas, 1989).

$$k = (\log N_t - \log N_0) / (0,301.t)$$
$$g = 1/k \quad \dots \text{rumus (3.2)}$$

Keterangan: k: konstanta kecepatan pertumbuhan rerata (generasi/jam), Nt: densitas sel bakteri pada jam ke-t pada fase logaritmik, No: densitas sel bakteri pada awal fase logaritmik, t: waktu inkubasi ke-t, to: waktu awal pertumbuhan dalam fase logaritmik, g: waktu generasi

3.7.4. Pertumbuhan dan potensi isolat bakteri pereduksi nitrat (Clesceri *et al.*, 1998)

Pengujian dilakukan untuk mengetahui pertumbuhan dan potensi isolat DR-14 dan DU-27-1 dalam dalam medium dengan beberapa variasi kadar nitrat. Isolat berumur 24 jam dikulturkan dalam medium TSB selama 24 jam. Stok kultur sebanyak 15% (2×10^8 sel/mL) diambil dari volume total stok inokulum. Stok inokulum tersebut diambil sebanyak 15% (2×10^8 sel/mL) dan diinokulasikan ke dalam medium mengandung variasi kadar nitrat 0, 5, 10, dan 20 mg/L. Parameter yang diamati meliputi densitas sel dan kadar nitrat pada waktu 0, 6, 12, 18 dan 24 jam. Pembacaan nilai kerapatan optis densitas sel dilakukan dengan metode spektrofotometri pada panjang gelombang 600 nm.

Penghitungan kadar nitrat dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 5 mililiter suspensi kultur secara aseptis dan dilakukan sentrifugasi 8000 rpm, 15 menit, suhu 4°C. Sebanyak 5 milliliter supernatan dipindahkan dalam tabung berisi 0,5 mililiter reagen brusin sulfat kemudian ditambahkan lima mililiter H₂SO₄ pekat. Absorbansi nitrat dibaca pada panjang gelombang 410 nm. Nilai absorbansi nitrat dikonversikan ke kurva baku kadar nitrat untuk mengetahui penurunan kadar nitrat.

3.8. Karakterisasi fenotip isolat bakteri pereduksi nitrat

Setiap koloni isolat hasil isolasi dilakukan karakterisasi morfologi koloni. Langkah ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik morfologi koloni bakteri Waduk Sutami. Karakter morfologi yang diamati meliputi warna, bentuk, tepi, elevasi dan struktur dalam koloni bakteri Waduk Sutami. Karakterisasi isolat bakteri pereduksi nitrat terpilih (DR-14 dan DU-27-1) dilakukan untuk identifikasi isolat berdasarkan kemampuan metabolik sel. Langkah uji yang dilakukan sebagai berikut:

3.8.1. Pengukuran dan pengamatan bentuk sel

Metode dilakukan untuk mengetahui ukuran dan bentuk sel. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran 1000 kali. Lensa okuler diputar kedudukannya sehingga skala mikrometer okuler sejajar atau berimpit dengan skala mikrometer obyektif. Garis skala mikrometer okuler dan obyektif ditentukan yang berimpit pertama kemudian ditentukan garis skala mikrometer yang berimpit kedua. Jumlah skala mikrometer okuler dan skala mikrometer obyektif diantara kedua garis yang berimpit dihitung untuk menentukan ukuran skala mikrometer okuler. Rumus penghitungan seperti pada rumus 3.3.

$$1 \text{ skala} = \frac{\text{Skala mikrometer obyektif} \times 0,01 \text{ mm}}{\text{Skala mikrometer okuler}}$$

Keterangan:

1 skala mikrometer okuler = 0,0025 mm = 2,5 μm. Ukuran sel adalah skala yang teramati dikalikan skala mikrometer okuler.

3.8.2. Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan untuk mengetahui kelompok bakteri Gram positif atau negatif. Langkah ini dilakukan dengan cara akuades steril diteteskan pada gelas obyek yang sebelumnya telah dibersihkan dengan etanol 70%. Satu oose biakan berumur 24 jam ditambahkan lalu diratakan pada permukaan gelas obyek sekitar $1,5 \times 1,5 \text{ cm}^2$. Preparat difiksasi di atas api bunsen kemudian digenangi dengan cat Gram A (kristal violet) selama 1-3 menit. Sisa cat dibuang lalu preparat dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Preparat selanjutnya digenangi dengan cat Gram B (iodium) selama 0,5-1 menit. Selanjutnya dibuang dan preparat dialiri air mengalir. Preparat ditetesi dengan cat Gram C (alkohol) sampai warna cat tepat terlunturkan (± 30 detik). Sisa cat dibuang, preparat dialiri air mengalir lalu dikeringanginkan. Preparat kemudian digenangi dengan cat Gram D (safranin) selama 1-2 menit. Sisa cat dibuang kemudian preparat dikeringanginkan. Preparat diamati dengan mikroskop perbesaran 1000 kali (Cappucino dan Sherman, 2005).

3.8.3. Uji Katalase

Uji ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memproduksi enzim katalase. Langkah uji dilakukan dengan cara membersihkan gelas obyek dengan etanol 70% kemudian dikeringkan. Sebanyak 2 tetes hidrogen peroksida (H_2O_2 3%) diteteskan dalam obyek gelas. Selanjutnya satu oose isolat bakteri berumur 24 jam ditambahkan dalam larutan H_2O_2 3% dan didiamkan selama 5-10 menit. Reaksi positif ditandai dari terbentuknya gelembung oksigen (seperti busa) sebagai bukti terjadi produksi enzim katalase.

3.8.4. Uji Oksidase

Uji dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim oksidase. Langkah uji dilakukan dengan cara isolat bakteri digoreskan pada *Bactident-oxidase test kit* (Merck KGaA) sebagai indikator dan diamati terjadinya perubahan warna pada kertas indikator tersebut selama 5-10 menit. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna indikator menjadi biru keunguan.

3.8.5. Uji *Simon's-citrate*

Pengujian dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal. Uji ini dilakukan dengan cara mengisikan medium agar *Simon's-citrate* ke dalam tabung reaksi bersih kemudian sterilisasi medium dilakukan menggunakan *autoclave* (Tomy) pada suhu 121°C, tekanan satu atm selama 15 menit. Tabung berisi medium miring *Simon's-citrate* diinokulasikan dengan kultur bakteri berumur 24 jam. Pengamatan dilakukan setelah inokulum diinkubasikan selama 24 jam. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna medium menjadi biru karena adanya peningkatan pH (medium bersifat alkali dengan kisaran pH 7,1-7,4).

3.8.6. Uji Motilitas

Uji ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri melakukan pergerakan. Uji dilakukan dengan menyiapkan medium *Motility Indole Ornithine* (MIO-Sigma), kemudian medium diisikan ke dalam tabung reaksi sebanyak \pm 5-6 mL. Sterilisasi medium dilakukan menggunakan *autoclave* suhu 121°C, tekanan satu atm selama 15 menit. Medium tersebut dibiarkan sampai dingin. Isolat bakteri berumur 24 jam diinokulasikan ke dalam medium menggunakan jarum enten hingga $\frac{3}{4}$ tinggi medium. Reaksi positif ditandai dari pertumbuhan sel bakteri di sepanjang garis inokulasi.

3.8.7. Pewarnaan Endospora

Pewarnaan dilakukan untuk mengamati ada atau tidaknya endospora. Langkah ini dilakukan dengan membuat apusan bakteri. Apusan tersebut digenangi dengan pewarna malakit hijau. Apusan dengan pewarna tersebut dipanaskan dengan meletakkan apusan pada ram kayu yang diletakkan di atas penangas air yang mendidih. Pemanasan diatur jangan sampai mendidih atau mengering dengan menambahkan beberapa tetes malakit hijau. Preparat tersebut dibiarkan sampai 10 menit. Preparat hasil pewarnaan ditunggu sampai dingin lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Preparat digenangi dengan safranin selama 1-2 menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Sisa air dari preparat diserap dengan tisu. Struktur spora dalam sel diamati pada mikroskop perbesaran 1000 dengan minyak imersi. Endospora akan tampak berwarna hijau sedangkan sel vegetatif berwarna merah.

3.8.8. Uji penggunaan *succinate-acid*

Pengujian dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam menggunakan suksinat sebagai sumber karbon tunggal. Langkah ini dilakukan dengan cara cawan petri diisi dengan medium agar mengandung asam suksinat dan indikator bromtimol biru. Medium tersebut disterilisasikan menggunakan *autoclave* suhu 121°C, 15 menit, tekanan satu atm. Isolat bakteri diinokulasikan ke dalam cawan petri berisi medium mengandung asam suksinat. Pengamatan dilakukan setelah inkubasi 24 jam. Reaksi positif ditandai dari perubahan warna medium menjadi biru. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri mampu memanfaatkan asam suksinat sebagai sumber karbon tunggal.

3.8.9. Uji Denitrifikasi

Uji ini dilakukan untuk mengamati kemampuan isolat mengubah nitrat menjadi gas. Langkah uji dilakukan dengan cara mengkulturkan isolat berumur 24 jam dalam medium TSB N-10 mM. Pengamatan dilakukan dengan melihat terbentuknya gas dalam tabung durham.

3.9. Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan menggunakan medium *Tryptone Soya Broth* (TSB-Oxoid) dengan variasi kadar nitrat 0, 5, 10 dan 20 mg/L. Perlakuan diamati pada waktu inkubasi 0, 6, 12, 18 dan 24 jam. Pengujian dilakukan terhadap dua isolat bakteri pereduksi nitrat terpilih (DR-14 dan DU-27-1). Parameter yang diamati meliputi densitas sel dan kadar nitrat. Pengujian dilakukan dengan sistem tertutup (*batch culture*) tanpa penambahan medium.

3.10. Analisis Data

Analisis data dilakukan menggunakan ragam ANOVA (*Analysis of Variance*) *Multiple-Comparison*. Analisis korelasi *Pearson's* dan regresi digunakan untuk mengetahui keeratan hubungan antarvariabel. Program yang digunakan adalah SPSS 15 *for Windows Release* ($\alpha=0,05$). Pola peningkatan densitas sel bakteri dan penurunan kadar nitrat dibuat menggunakan program *Microsoft Excell* 2003.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Determinasi amonifikasi, nitrifikasi dan denitrifikasi sampel air Waduk Sutami

Hasil uji menunjukkan bahwa bakteri-bakteri di dalam sampel air Waduk Sutami memiliki kemampuan dalam proses amonifikasi, nitrifikasi dan denitrifikasi. Hasil tersebut tersaji pada tabel 4.1.

Tabel 4.1. Determinasi proses amonifikasi, nitrifikasi dan denitrifikasi sampel air Waduk Sutami

No.	Lokasi	Amonifikasi	Nitrifikasi		Denitrifikasi
			(A)	(B)	
1.	Hulu	++	+	++	++
2.	Tengah	+-	++	++	+
3.	Hilir	+-	++	+-	++

Keterangan:

Nitrifikasi A : deteksi perubahan amonium menjadi nitrit

Nitrifikasi B : deteksi perubahan nitrit menjadi nitrat

Tanda (++) : kemampuan tinggi

Tanda (+-) : kemampuan sedang

Tanda (+) : kemampuan rendah

Bakteri-bakteri dari sampel hulu memiliki kemampuan tinggi dalam proses amonifikasi dibandingkan dengan bakteri-bakteri dari sampel tengah atau hilir. Kemampuan bakteri pelaku proses nitrifikasi A (perubahan amonia menjadi nitrit) dari sampel tengah dan hilir lebih tinggi dibandingkan dari sampel hulu, sedangkan kemampuan bakteri dari sampel hulu dan tengah lebih tinggi dibandingkan dengan sampel hilir pada proses nitrifikasi B (perubahan nitrit menjadi nitrat). Kemampuan bakteri pelaku proses denitrifikasi dari sampel hulu dan hilir lebih tinggi dibandingkan dengan sampel tengah.

Hasil uji ini menunjukkan bahwa bakteri-bakteri dari sampel hulu memiliki kemampuan tinggi dalam mengubah senyawa nitrat

menjadi amonium (amonifikasi), senyawa nitrit menjadi nitrat (nitrifikasi) dan mengubah senyawa nitrat menjadi nitrit atau gas nitrogen (denitrifikasi), sedangkan bakteri-bakteri dari sampel tengah memiliki kemampuan tinggi dalam mengubah senyawa amonia menjadi nitrit dan mengubah senyawa nitrit menjadi nitrat (nitrifikasi). Bakteri-bakteri dari sampel hilir memiliki kemampuan tinggi dalam pengubahan senyawa nitrat menjadi gas nitrogen (denitrifikasi). Dengan demikian dapat dipahami bahwa kemampuan bakteri dari masing-masing sampel dalam proses amonifikasi, nitrifikasi dan denitrifikasi adalah berbeda. Hasil penghitungan faktor fisikokimiawi sampel air yang tercantum pada Lampiran 7 (Tabel 4) menunjukkan bahwa sampel hulu dan hilir memiliki kandungan nitrat tinggi dengan nilai sebesar 1,169 dan 0,619 mg/L, sedangkan tengah senilai 0,385 mg/L. Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan kemampuan bakteri dalam proses amonifikasi, nitrifikasi dan denitrifikasi diduga dipengaruhi oleh faktor ketersediaan senyawa nitrat (organik dan anorganik) dan kemampuan bakteri dalam memanfaatkan senyawa tersebut sebagai sumber energi.

Hayatsu *et al.* (2008) menjelaskan bahwa proses amonifikasi diperankan oleh bakteri *amonia-oxidizing bacteria* (AOB) yang mampu mengubah senyawa nitrat (NO_3) menjadi amonium (NH_4), sedangkan proses nitrifikasi berlangsung melibatkan mikroba kemolitoautotrof melalui 2 tahapan. Tahap pertama yaitu oksidasi amonia menjadi nitrit oleh *ammonia-oxidizing bacteria* (AOB) dan oksidasi nitrit menjadi nitrat oleh *nitrite-oxidizing bacteria* (NOB). Bakteri-bakteri tersebut menggunakan senyawa amonium (NH_4^+) dan nitrit (NO_2^-) sebagai sumber energi. Dalam proses denitrifikasi berlangsung karena ketersediaan senyawa nitrat (NO_3) yang selanjutnya akan diubah menjadi senyawa nitrit dan bentuk gas nitrogen (NO , N_2O atau N_2) oleh bakteri pelaku denitrifikasi.

4.2. Isolat bakteri pereduksi nitrat *indigenous* Waduk Sutami

Sebanyak 22 isolat bakteri berhasil diisolasi dari sampel air Waduk Sutami. Isolat-isolat bakteri tersebut berasal dari tiga lokasi pengambilan sampel yaitu hulu (*inlet*), tengah dan hilir (*outlet*). Karakteristik morfologi koloni isolat bakteri pereduksi nitrat Waduk Sutami tersaji pada tabel 4.1. Karakteristik tersebut bervariasi dalam bentuk, tepi, elevasi dan struktur dalam. Sebagian besar koloni berbentuk *circulair* (sejumlah 20 isolat) sedangkan dua isolat yang

lain berbentuk *irreguler*. Koloni dengan elevasi *pulvinate* sejumlah 19 isolat, sedangkan yang lain adalah *convex* (sejumlah 3 isolat). Koloni dengan tepi *entire* dimiliki oleh sebagian besar isolat (sejumlah 21 isolat) dan hanya satu isolat memiliki tepi *ramose*. Sebagian besar isolat memiliki struktur dalam *translucent* (sejumlah 15 isolat), *smooth* (sejumlah 6 isolat), dan hanya satu isolat memiliki struktur dalam *arborescent*. Sebagian besar koloni berwarna kuning (sejumlah 10 isolat), sedangkan yang lain berwarna krem (sejumlah 9 isolat) dan putih (sejumlah 3 isolat). Dengan demikian diduga sejumlah 22 isolat bakteri pereduksi nitrat Waduk Sutami secara morfologis memiliki karakteristik berbeda.

Tabel 4.2. Karakteristik morfologi koloni isolat bakteri pereduksi nitrat Waduk Sutami

No	Kode	Lokasi	Karakteristik morfologi koloni				
			Warna	Bentuk	Elevasi	Tepi	Struktur dalam
1.	DU-27-1	Hulu	Kuning	<i>Circular</i>	<i>Pulvinate</i>	<i>Entire</i>	<i>Smooth</i>
2.	DU-30-2	Hulu	Kuning	<i>Irreguler</i>	<i>Pulvinate</i>	<i>Entire</i>	<i>Translucent</i>
3.	DU-27-4	Hulu	Kuning	<i>Circular</i>	<i>Pulvinate</i>	<i>Entire</i>	<i>Translucent</i>
4.	DU-27-2	Hulu	Krem	<i>Circular</i>	<i>Pulvinate</i>	<i>Entire</i>	<i>Smooth</i>
5.	DU-27-5	Hulu	Krem	<i>Circular</i>	<i>Pulvinate</i>	<i>Entire</i>	<i>Translucent</i>
6.	DU-30-1	Hulu	Krem	<i>Circular</i>	<i>Pulvinate</i>	<i>Entire</i>	<i>Translucent</i>
7.	DU-30-5	Hulu	Putih	<i>Circular</i>	<i>Pulvinate</i>	<i>Entire</i>	<i>Smooth</i>
8.	DU-30-4	Hulu	Kuning	<i>Circular</i>	<i>Pulvinate</i>	<i>Entire</i>	<i>Smooth</i>
9.	NU-10	Hulu	Krem	<i>Circular</i>	<i>Pulvinate</i>	<i>Entire</i>	<i>Translucent</i>
10.	DU-30-3	Hulu	Putih	<i>Circular</i>	<i>Pulvinate</i>	<i>Entire</i>	<i>Translucent</i>
11.	NU-9	Hulu	Krem	<i>Circular</i>	<i>Pulvinate</i>	<i>Entire</i>	<i>Translucent</i>
12.	DR-30	Hilir	Putih	<i>Circular</i>	<i>Pulvinate</i>	<i>Entire</i>	<i>Translucent</i>
13.	DR-14	Hilir	Kuning	<i>Circular</i>	<i>Pulvinate</i>	<i>Entire</i>	<i>Smooth</i>
14.	AR-11	Hilir	Krem	<i>Circular</i>	<i>Convex</i>	<i>Entire</i>	<i>Translucent</i>
15.	NR-13	Hilir	Krem	<i>Circular</i>	<i>Pulvinate</i>	<i>Entire</i>	<i>Translucent</i>
16.	NR-9	Hilir	Kuning	<i>Circular</i>	<i>Pulvinate</i>	<i>Entire</i>	<i>Translucent</i>
17.	AT-6	Tengah	Krem	<i>Circular</i>	<i>Convex</i>	<i>Entire</i>	<i>Translucent</i>
18.	NT-14	Tengah	Kuning	<i>Circular</i>	<i>Pulvinate</i>	<i>Entire</i>	<i>Translucent</i>
19.	AT-7	Tengah	Kuning	<i>Circular</i>	<i>Pulvinate</i>	<i>Entire</i>	<i>Translucent</i>
20.	AT-8	Tengah	Krem	<i>Circular</i>	<i>Pulvinate</i>	<i>Entire</i>	<i>Translucent</i>
21.	DT-24	Tengah	Kuning	<i>Irreguler</i>	<i>Convex</i>	<i>Ramose</i>	<i>Arborescent</i>
22.	NT-13	Tengah	Kuning	<i>Circular</i>	<i>Pulvinate</i>	<i>Entire</i>	<i>Smooth</i>

Sejumlah 11 isolat diperoleh dari lokasi hulu (*inlet*), enam isolat dari lokasi tengah dan lima isolat didapatkan dari lokasi hilir (Tabel 4.1). Perolehan isolat dari lokasi hulu lebih banyak dibandingkan lokasi tengah dan hilir. Perbedaan perolehan isolat antara hulu, tengah, dan hilir dipengaruhi oleh beberapa faktor

terutama kandungan bahan organik terlarut dan oksigen (O_2). Hal ini didukung berdasarkan penghitungan faktor fisikokimiawi yang tercantum pada Lampiran 7 (Tabel 4) yang menunjukkan bahwa nilai kandungan organik terlarut (TOM) sampel hulu sebesar 1.056 mg/L sedangkan sampel tengah dan hilir masing-masing sebesar 575 dan 569 mg/L, sedangkan penghitungan nilai oksigen terlarut (DO) sampel hulu, tengah dan hilir masing-masing senilai 13; 12,7; dan 12,4 mg/L. Effendi (2003) menyatakan bahwa dua komponen utama yang sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan mikrobial di perairan adalah bahan-bahan organik dan oksigen (O_2). Nilai kandungan bahan organik terlarut dinyatakan sebagai *Total Organic Matter* (TOM) sedangkan *Dissolved Oxygen* (DO) didefinisikan sebagai nilai kandungan oksigen terlarut. Mokbel dan Yamakanamardi (2008) menjelaskan bahwa kelimpahan mikrobial (bakteri-bakteri heterotrof) di perairan dipengaruhi oleh ketersediaan materi organik terlarut sebagai sumber nutrisi dan oksigen sebagai asektor elektron dalam proses respirasi, selain itu faktor pendukung yang lain adalah lingkungan termasuk suhu dan intensitas cahaya.

4.3. Seleksi (*screening*) isolat bakteri pereduksi nitrat

Isolat bakteri pereduksi nitrat yang akan diujikan adalah isolat bakteri yang memiliki kemampuan tinggi dalam menurunkan kadar nitrat. Pemilihan isolat bakteri tersebut dilakukan secara kualitatif dengan metode Romijn *Griess* (Morimoto dan Hirokoba, 1964) dan secara kuantitatif dengan menghitung penurunan kadar nitrat (Clesceri *et al.*, 1998). Hasil seleksi isolat bakteri pereduksi nitrat yang tersaji pada Tabel 4.3. menunjukkan bahwa sejumlah 18 isolat dari 22 isolat bakteri Waduk Sutami seluruhnya mampu mereduksi nitrat menjadi nitrit. Tidak semua isolat-isolat tersebut secara kualitatif mampu membentuk gas. Hal ini menunjukkan bahwa tidak semua isolat mampu mengubah nitrat menjadi bentuk gas.

Isolat bakteri yang memiliki kemampuan membentuk gas antara lain DR-14, DU-27-1, DU-30-2, AT-8, DU-27-4, DU-27-2, dan DU-30-3. Beberapa jenis bakteri diketahui hanya mampu memproduksi salah satu jenis enzim yaitu nitrat reduktase, enzim tersebut berperan dalam pengubahan nitrat (NO_3^-) menjadi nitrit (NO_2^-) yang berlangsung di dalam membran sel. Dengan demikian perbedaan kemampuan bakteri tersebut dan hasil akhir dalam proses denitrifikasi diduga karena karakteristik dan mekanisme enzim di

dalam sel pada setiap jenis bakteri adalah berbeda dan bersifat unik. Ramothokang *et al.* (2006) menyebutkan bahwa bakteri pereduksi nitrat dikategorikan dalam lima kelompok yaitu *true denitrifier*, *sequential denitrifier*, *nitrate respirers*, *nitrate respirers-true denitrifier* dan *non denitrifier*. Bakteri yang memiliki kemampuan mengubah nitrat (NO_3^-) menjadi nitrit (NO_2^-) termasuk kelompok *nitrate respirers-bacteria* (Ramothokang *et al.*, 2003). Bakteri pereduksi nitrat yang mampu mereduksi nitrat hanya pada kondisi aerob termasuk jenis *nitrate respirers bacteria* (Takaya *et al.*, 2003).

Tabel 4.3. Seleksi kemampuan isolat bakteri Waduk Sutami dalam mereduksi nitrat

NO.	Kode	Uji potensi reduksi nitrat	
		Kualitatif	Kuantitatif (%)
1.	DR-14	++	97,11
2.	DU-27-1	++	95,19
3.	DU-30-2	++	92,78
4.	AT-8	++	92,68
5.	DU-27-4	++	90,91
6.	DU-27-2	++	89,84
7.	DU-27-5	+-	86,90
8.	DU-30-1	+-	85,03
9.	TD-24	+-	85,03
10.	DU-30-5	+-	83,42
11.	DU-30-4	+-	80,75
12.	NU-10	+-	77,54
13.	AR-3	+-	70,32
14.	AT-7	+-	62,03
15.	AT-6	+-	54,28
16.	DR-30	+-	24,60
17.	NT-14	+-	11,50
18.	DU-30-3	++	10,70

Keterangan:

Tanda (++) : NO_3^- menjadi NO_2^- , membentuk gas

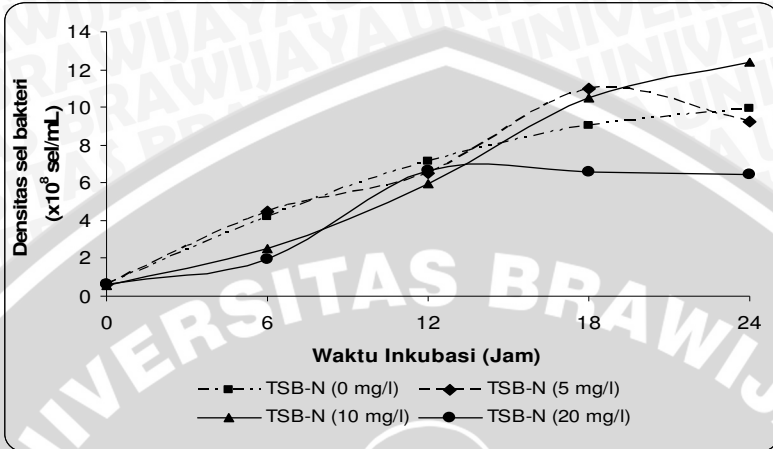
Tanda (+-) : NO_3^- menjadi NO_2^- , tidak membentuk gas

Hasil seleksi kemampuan dalam mereduksi nitrat menunjukkan bahwa penurunan kadar nitrat berkisar dari 10,17% hingga 97,11%. Isolat bakteri yang memiliki kemampuan menurunkan kadar nitrat pada kisaran 90% dari urutan tertinggi hingga terendah antara lain

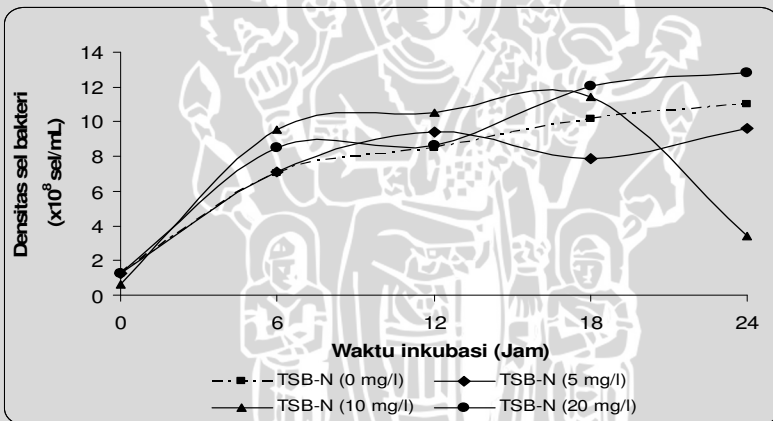
DR-14, DU-27-1, DU-30-2, AT-8, DU-27-4, dan DU-27-2. Dengan demikian, uji selanjutnya digunakan isolat DR-14 dan DU-27-1. Menurut Maier *et al.* (2003) bakteri memiliki kemampuan dalam menurunkan kadar nitrat dalam medium kultur dengan memanfaatkan nitrat sebagai sumber nitrogen untuk proses pembentukan asam-asam amino penyusun protein. Carter *et al.* (1995) menyatakan bahwa bakteri pereduksi nitrat dapat mengubah nitrat menjadi nitrit dan gas nitrogen melalui peran dua jenis enzim yaitu *membrane bound nitrate-reductase* (Nar) dan *periplasmic nitrate reductase* (Nap). Reduksi nitrat oleh enzim Nar terjadi melalui reaksi oksidasi quinon dengan mengikat nitrat sebagai proton elektrokimiaawi transmembran, sedangkan enzim Nap mengikat nitrat sebagai substrat dalam proses regulasi kesetimbangan reaksi redoks dan respirasi aerob di dalam mitokondria. Hal ini menunjukkan bahwa kedua jenis enzim tersebut memiliki fungsi yang sama dalam mereduksi nitrat namun melalui proses yang berbeda (Carter *et al.*, 1995). Enzim nitrat reduktase dan nitrit reduktase adalah komponen penting dalam proses reduksi nitrat menjadi nitrit dan gas di dalam membran sel. Keberadaan enzim-enzim tersebut menjadi karakteristik spesifik yang dimiliki oleh bakteri pereduksi nitrat.

4.4. Pola pertumbuhan isolat DR-14 dan DU-27-1 pada medium dengan beberapa variasi kadar nitrat

Uji pola pertumbuhan (pendahuluan) isolat DR-14 dan DU-27-1 dilakukan dengan mengkulturkan isolat DR-14 dan DU-27-1 pada medium N-10 mM (Lampiran 6, gambar 4 dan 5). Hasil penghitungan laju pertumbuhan menunjukkan bahwa isolat DU-27-1 mencapai fase logaritmik lebih cepat jika dibandingkan isolat DR-14. Laju pertumbuhan isolat DU-27-1 dalam medium tersebut sebesar 0,52 generasi/jam dengan waktu generasi 1 jam 92 menit, sedangkan laju pertumbuhan isolat DR-14 adalah sebesar 0,33 generasi/jam dengan waktu generasi sebesar 3 jam 3 menit. Madigan *et al.* (2003) menjelaskan bahwa pertumbuhan sel bakteri dipengaruhi oleh beberapa faktor terutama nutrisi, suhu, pH dan kelembaban. Laju pertumbuhan yang cepat atau waktu generasi yang relatif singkat dicapai dengan memanfaatkan nutrisi sebagai sumber energi dalam jumlah besar (Mitakda *et al.*, 2000).



Gambar 4.1. Pola pertumbuhan isolat DR-14 pada medium dengan beberapa variasi kadar nitrat



Gambar 4.2. Pola pertumbuhan isolat DU-27-1 pada medium dengan beberapa variasi kadar nitrat

Menurut Trimmer *et al.* (2005) cepat atau lambatnya pertumbuhan sel bakteri pereduksi nitrat dalam medium kultur dipengaruhi oleh aktivitas enzim nitrat reduktase dalam mendegradasi nitrat menjadi bentuk lebih sederhana sebagai sumber energi, adanya peningkatan aktivitas enzim dapat mengoptimalkan proses degradasi nitrat menjadi sumber nutrisi untuk pertumbuhan. Philippot (2005) menjelaskan bahwa enzim nitrat reduktase yang

berperan dalam proses degradasi nitrat pada konsentrasi tinggi adalah enzim Nap. Pola pertumbuhan kultur DR-14 dan DU-27-1 dalam medium dengan beberapa variasi kadar nitrat menunjukkan pola berbeda. Pertumbuhan isolat DR-14 pada medium N-0 dan N-10 berlangsung hingga inkubasi 24 jam (Gambar 4.1) dengan densitas sel tertinggi sebesar $9,96 \times 10^8$ sel/mL pada medium N-0, sedangkan densitas sel sebesar $12,9 \times 10^8$ sel/mL dicapai dalam medium N-10.

Densitas sel tertinggi isolat DR-14 pada medium N-5 dicapai pada inkubasi 18 jam ($10,98 \times 10^8$ sel/mL), sedangkan pada medium N-20 dicapai pada inkubasi 12 jam ($6,58 \times 10^8$ sel/mL). Dengan demikian dapat dipahami bahwa, isolat DR-14 pada medium N-0 dan N-10 menunjukkan kecenderungan untuk terus mengalami pertumbuhan, sedangkan pertumbuhan isolat DR-14 pada medium N-5 cenderung menyebabkan sel mengalami fase kematian (*death phase*), dan lebih cepat mengalami fase stasioner pada medium N-20 (Gambar 4.1). Kematian sel DR-14 dalam medium N-5 diduga terjadi karena kompetisi antarsel di dalam medium karena kadar nitrat terbatas, sedangkan fase stasioner dalam medium N-20 pada inkubasi 12 jam terjadi karena nitrat pada kadar yang tinggi menyebabkan akumulasi senyawa metabolit primer yang bersifat toksik bagi sel DR-14.

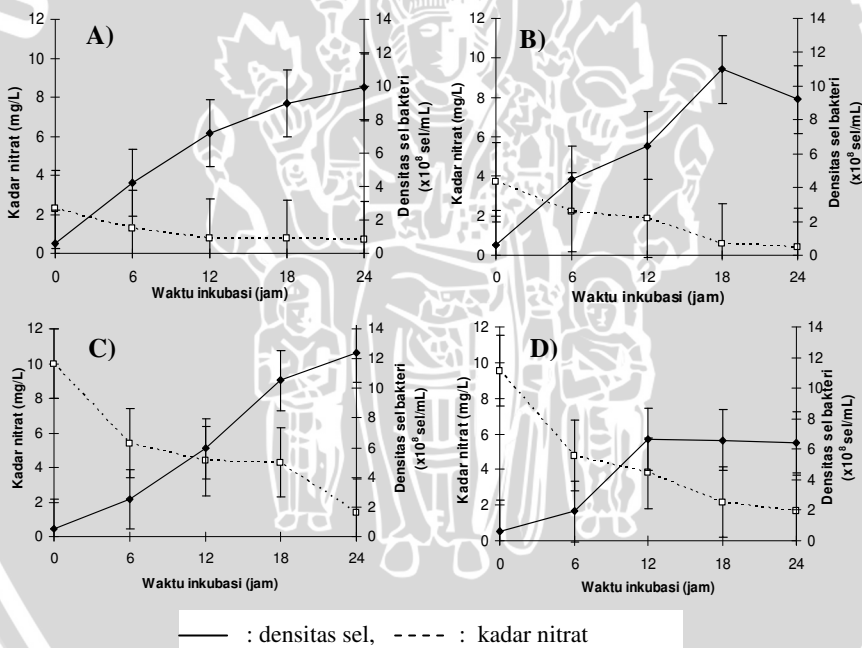
Madigan *et al.* (2003) menyatakan bahwa fase kematian sel terjadi karena adanya kompetisi antarsel dalam mendapatkan nutrisi (terutama karbon dan nitrogen) sebagai komponen penting dalam pertumbuhan, sedangkan fase stasioner ditandai dengan tidak terjadi peningkatan densitas sel. Hal ini dapat terjadi karena keterbatasan sumber nitrogen untuk sintesis protein guna pembentukan sel-sel baru. Menurut Madigan *et al.* (2003) nutrisi yang penting bagi pertumbuhan mikroba di lingkungannya terdiri atas makronutrien dan mikronutrien. Makronutrien yang dimaksudkan adalah unsur karbon (termasuk karbon organik), nitrogen, fosfor, sulfur, kalium, magnesium, kalsium dan natrium, sedangkan mikronutrien yang dibutuhkan dalam jumlah kecil terdiri atas berbagai unsur logam.

Gambar 4.2. menunjukkan bahwa pertumbuhan isolat DU-27-1 dengan densitas sel tertinggi ($12,83 \times 10^8$ sel/mL) dicapai pada inkubasi 24 jam pada medium N-20, sedangkan pada medium N-0 dicapai pada inkubasi 24 jam ($11,03 \times 10^8$ sel/mL). Densitas sel tertinggi isolat DU-27-1 pada medium N-10 dicapai pada inkubasi 18 jam ($11,44 \times 10^8$ sel/mL), sedangkan densitas sel tertinggi pada

medium N-5 dicapai pada inkubasi 12 jam ($9,43 \times 10^8$ sel/mL). Dari gambar 4.2. dapat dipahami bahwa densitas sel tertinggi isolat DU-27-1 dicapai dalam medium N-20, sedangkan isolat DR-14 dicapai dalam medium N-10 pada inkubasi 24 jam. Menurut Urukawa *et al.* (2006), medium kultur mengandung sumber N pada konsentrasi minimum $100 \mu\text{g/L}$ atau setara dengan $0,1 \text{ mg/L}$ mampu mengoptimalkan pertumbuhan sel bakteri pereduksi nitrat dengan mengaktifasi enzim *nitrate reductase* untuk melakukan degradasi nitrat menjadi energi (ATP).

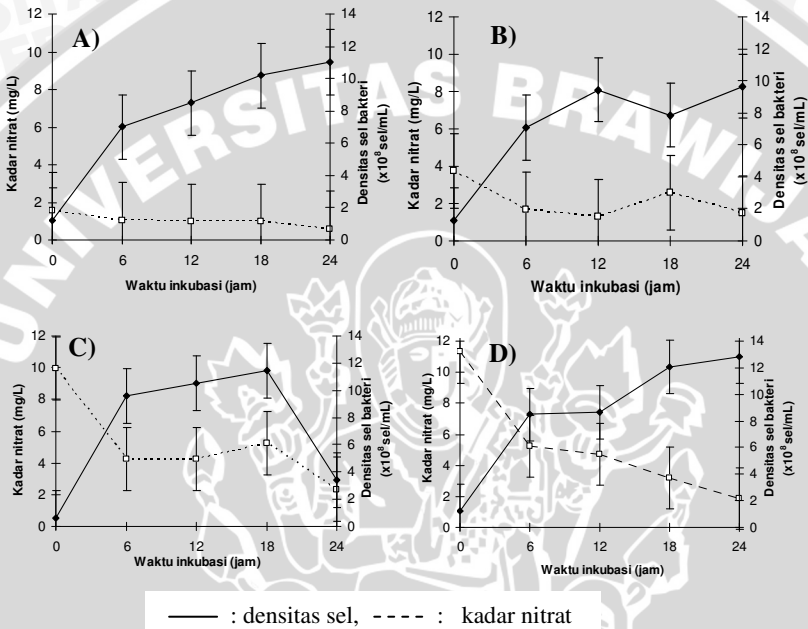
4.5. Korelasi pertumbuhan isolat DR-14 dan DU-27-1 terhadap penurunan kadar nitrat medium

Pertumbuhan isolat bakteri pereduksi nitrat DR-14 dan DU-27-1 di dalam medium kultur terkait erat dengan pemanfaatan nitrat sebagai sumber nitrogen.



Gambar 4.3. Pertumbuhan dan penurunan kadar nitrat isolat DR-14 dalam medium dengan variasi nitrat 0 mg/L (a), 5 mg/L (b), 10 mg/L (c) dan 20 mg/L (d)

Gambar 4.3 menunjukkan bahwa isolat DR-14 mampu menurunkan kadar nitrat dari 2,26 menjadi 0,69 mg/L pada medium N-0 (potensi reduksi sebesar 69,48%), sedangkan penurunan kadar nitrat dari 3,71 menjadi 0,41 mg/L dicapai dalam medium N-5 (potensi reduksi sebesar 89,02%).



Gambar 4.4. Pertumbuhan dan penurunan kadar nitrat isolat DU-27-1 dalam medium dengan variasi nitrat 0 mg/L (a), 5 mg/L (b), 10 mg/L (c) dan 20 mg/L (d)

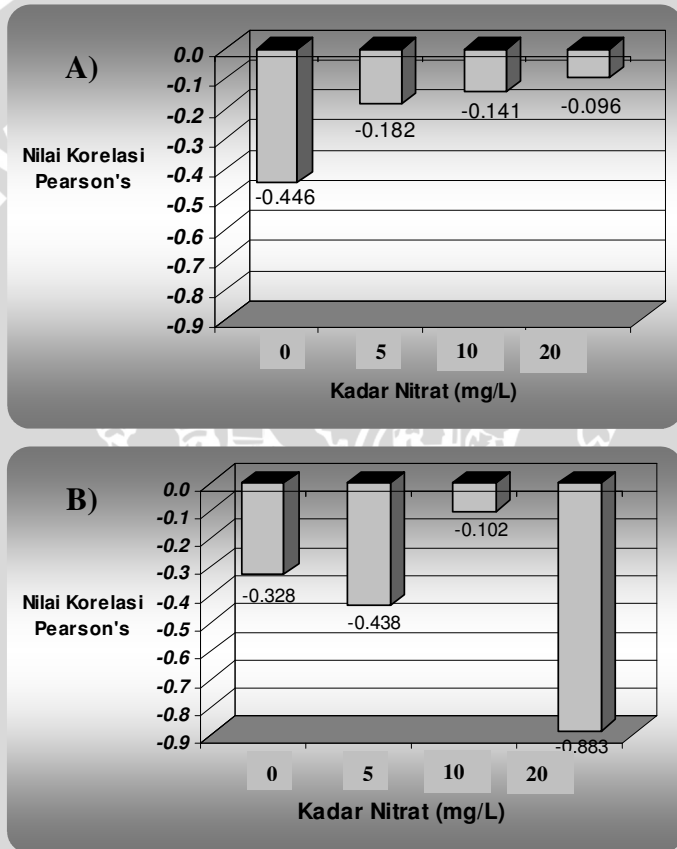
Isolat DR-14 mampu menurunkan kadar nitrat dari 9,97 menjadi 1,38 mg/L pada medium N-10 (potensi reduksi sebesar 86,16%), sedangkan penurunan kadar nitrat dari 9,55 menjadi 1,55 mg/L (potensi reduksi sebesar 82,46%) dicapai dalam medium N-20 (Gambar 4.3). Isolat DU-27-1 mampu menurunkan kadar nitrat dari 1,58 menjadi 0,60 mg/L pada medium N-0 (potensi reduksi sebesar 62,02%), sedangkan penurunan kadar nitrat dari 11,31 menjadi 1,84 mg/L dicapai pada medium N-20 (potensi reduksi sebesar 83,7%). Isolat DU-27-1 mampu menurunkan kadar nitrat dari 3,71 hingga 1,46 mg/L pada medium N-5 (potensi reduksi sebesar 60,65%),

sedangkan penurunan kadar nitrat dari 9,94 menjadi 2,35 mg/L (potensi reduksi sebesar 83,7 %) dicapai pada medium N-10. Dengan demikian dapat dipahami bahwa penurunan kadar nitrat tertinggi isolat DU-27-1 dicapai dalam medium N-20 (83,7%), sedangkan isolat DR-14 dicapai dalam medium N-5 (potensi reduksi sebesar 89,02%) pada inkubasi 24 jam. Trimmer *et al.* (2005) mengemukakan bahwa kemampuan setiap bakteri dalam menggunakan nitrat sebagai sumber nitrogen bergantung dari kebutuhan sel. Kebutuhan yang utama digunakan dalam proses pembentukan protein (asam-asam amino) sebagai penyusun struktur sel.

Hasil analisis ragam ($\alpha=0,05$) dan uji BNT yang tercantum pada Lampiran 9 (Tabel 6) menunjukkan bahwa densitas sel antarisolat dipengaruhi oleh lama inkubasi ($P<0,05$). Dengan demikian dapat dipahami bahwa perbedaan densitas sel pada pola pertumbuhan isolat DR-14 dan DU-27-1 dipengaruhi oleh lama inkubasi. Waktu inkubasi yang semakin lama menyebabkan peningkatan densitas sel antarisolat (DR-14 dan DU-27-1). Variasi kadar nitrat tidak berpengaruh secara signifikan ($P>0,05$) terhadap isolat bakteri pereduksi nitrat (DR-14 dan DU-27-1). Hal ini didasarkan pada hasil analisis ragam ($\alpha=0,05$) dan uji BNT yang tercantum pada Lampiran 9 (Tabel 7). Dengan demikian diduga kedua isolat bakteri pereduksi nitrat yang diujikan memiliki kemampuan yang relatif sama dalam menurunkan kadar nitrat medium pada beberapa variasi kadar nitrat.

Hubungan antara densitas sel (DR-14 dan DU-27-1) terhadap variasi kadar nitrat menunjukkan korelasi negatif. Korelasi negatif menunjukkan adanya hubungan yang berlawanan antarvariabel. Nilai korelasi densitas sel DR-14 terhadap kadar nitrat berturut-turut sebesar -0,446 (N-0), -0,182 (N-5), -0,141 (N-10), dan -0,096 (N-20), sedangkan nilai korelasi densitas sel DU-27-1 berturut-turut sebesar -0,328 (N-0), -0,438 (N-5), -0,102 (N-10), dan -0,883 (N-20). Hasil analisis tersebut menunjukkan bahwa peningkatan densitas sel DR-14 yang diikuti dengan penurunan kadar nitrat tertinggi dicapai dalam medium kultur N-0, sedangkan signifikansi peningkatan densitas sel DU-27-1 yang diikuti dengan penurunan kadar nitrat berlangsung di dalam medium N-20. Hasil tersebut tercantum pada Lampiran 10 (Tabel 8). Dengan demikian dapat dipahami bahwa peningkatan densitas sel berlangsung seiring dengan penurunan kadar nitrat dalam medium.

Trihendradi (2005) menjelaskan bahwa korelasi negatif menyatakan adanya hubungan yang berlawanan antarvariabel. Nilai korelasi negatif yang semakin besar menunjukkan hubungan antarvariabel semakin erat atau peningkatan densitas sel terjadi seiring dengan penurunan kadar nitrat yang semakin besar. Menurut Uyanto (2009) korelasi menyatakan hubungan linear antara variabel dependen dengan variabel independen.



Gambar 4.5. Korelasi densitas sel terhadap kadar nitrat dalam kultur DR-14 (A) dan DU-27-1 (B)

Persamaan regresi yang diperoleh dari hubungan antara densitas sel DR-14 terhadap kadar nitrat N-5 adalah $KN = 1,955 - 6,2 \times 10^{10} X$. Nilai tersebut menunjukkan pengaruh penurunan kadar nitrat tertinggi terhadap densitas sel DR-14,

sedangkan persamaan regresi yang diperoleh dari hubungan antara densitas sel DU-27-1 terhadap kadar nitrat N-20 adalah $KN = 11,824 - 7,6 \times 10^9 X$ (Lampiran 10, Tabel 9). Nilai tersebut menunjukkan pengaruh hubungan yang signifikan antara penurunan kadar nitrat tertinggi terhadap densitas sel DU-27-1. Uyanto (2009) menyatakan bahwa pengaruh nilai suatu variabel dependen (kadar nitrat) terhadap nilai variabel independen (densitas sel) dapat dinyatakan dari persamaan garis regresi. Dengan demikian dapat diketahui bahwa penurunan kadar nitrat berpengaruh terhadap peningkatan densitas sel isolat bakteri DR-14 dan DU-27-1. Alexander (2000) menyatakan bahwa sel bakteri pereduksi nitrat secara umum memiliki kemampuan memanfaatkan nitrat pada konsentrasi berbeda untuk pertumbuhan sel. Perbedaan kemampuan bakteri dalam memanfaatkan substrat organik (nitrat) dipengaruhi oleh metabolisme secara enzimatik dan genetik (Suharjono, 2008).

4.6. Karakteristik fenotip isolat DR-14 dan DU-27-1

Karakterisasi yang dilakukan menunjukkan bahwa isolat DR-14 dan DU-27-1 secara fenotip adalah berbeda (Tabel 4.4). Sel DU-27-1 berukuran $4,75 \times 1 \mu\text{m}$, berbentuk batang dan termasuk Gram positif sedangkan sel DR-14 berukuran lebih kecil yaitu $2,25 \times 0,98 \mu\text{m}$, berbentuk batang dan termasuk Gram negatif. Ramothokang *et al.* (2003) menjelaskan bahwa uji pewarnaan Gram secara umum dilakukan guna mengetahui karakteristik isolat bakteri secara morfologi serta kemurnian isolat bakteri yang diujikan.

Berdasarkan hasil uji katalase yang dilakukan menggunakan larutan uji H_2O_2 3%, diketahui bahwa isolat DR-14 dan DU-27-1 keduanya memiliki kemampuan menghasilkan enzim katalase. Hal ini ditandai dari terbentuknya gas setelah kultur direaksikan dengan larutan uji tersebut. Enzim katalase diproduksi oleh sel dalam proses metabolisme dan berfungsi untuk mengkatalisis hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi H_2O dan O_2 . Menurut Alexander dan Dennis (2000) sel bakteri secara fisiologis menghasilkan hidrogen peroksida selama proses respirasi aerob. Adanya akumulasi hidrogen peroksida di dalam sel bersifat toksik. Dengan demikian, bakteri yang memiliki kemampuan dalam memproduksi enzim katalase memiliki kemampuan dalam mereduksi H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 untuk keseimbangan reaksi kimiawi di dalam sel.

Tabel 4.4. Karakteristik fenotip DR-14 dan DU-27-1

NO.	KARAKTER	ISOLAT DR-14	ISOLAT DU-27-1
1.	Ukuran Sel	2,25x0,98 µm	4,75x1 µm
2.	Bentuk Sel	Basil	Basil
3.	Pewarnaan Gram	-	+
4.	Uji Katalase	+	+
5.	Uji Oksidase	+	+
6.	Uji <i>simon's citrate</i>	+	+
7.	Uji Motilitas	+*	+*
8.	Uji penggunaan asam suksinat	+	+
9.	Pewarnaan Endospora	-	-
10.	Uji Denitrifikasi	+	+

Keterangan:

Tanda +* : menunjukkan kemampuan motilitas

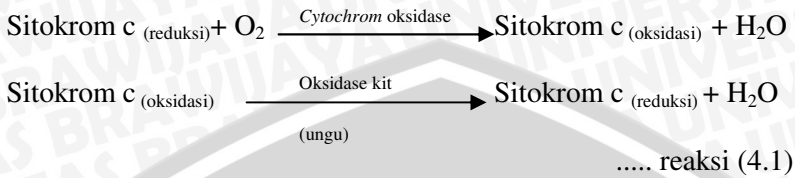
Tanda + : pada pewarnaan Gram menunjukkan bahwa bakteri termasuk Gram positif

Tanda - : pada pewarnaan Gram menunjukkan bahwa bakteri termasuk Gram negatif

Tanda + : pada uji-uji di atas menunjukkan terjadi reaksi positif

Tanda - : pada uji-uji di atas menunjukkan terjadi reaksi negatif

Hasil uji oksidase terhadap kedua isolat yang diujikan yaitu DR-14 dan DU-27-1 menunjukkan bahwa keduanya memiliki kemampuan mengubah warna indikator *Bactident-oxidase test kit* (Merck KGaA) menjadi ungu. Hal ini menunjukkan bahwa kedua isolat bakteri tersebut mampu menghasilkan enzim oksidase. Produksi enzim tersebut di dalam sel mengindikasikan bahwa sel dapat melakukan reaksi oksidasi sitokrom c menjadi H₂O. Sitokrom merupakan protein pembawa proton dan elektron yang tersusun atas gugus prostetik, sitokrom ini berfungsi dalam regulasi sistem keseimbangan reaksi oksidasi-reduksi (Purwoko, 2009). Reaksi oksidase positif berlangsung seperti pada reaksi 4.1. (Alexander dan Dennis, 2000).

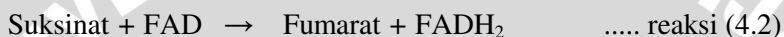


Isolat DR-14 dan DU-27-1 mampu memanfaatkan sitrat sebagai sumber karbon tunggal yang terkandung di dalam medium kultur *Simon's citrate*. Hal ini dibuktikan dari adanya reaksi kimiawi perubahan warna hijau pada medium menjadi biru. Perubahan warna tersebut menunjukkan bahwa reaksi kimiawi berpengaruh terhadap peningkatan pH medium (bersifat alkali). Takaya *et al.* (2003) menyatakan bahwa bakteri pereduksi nitrat yang memiliki kemampuan memanfaatkan sitrat sebagai sumber karbon dapat dilihat dari perubahan warna indikator bromtimol biru di dalam medium kultur menjadi biru. Hasil uji ini mengindikasikan bahwa kedua isolat bakteri mampu memproduksi enzim sitrase. Enzim tersebut digunakan dalam proses metabolisme dengan mengkatalisis sitrat sebagai substrat menjadi bentuk energi, selain itu sitrat berfungsi sebagai prekursor dalam proses biosintesis asam-asam amino (Purwoko, 2007).

Hasil uji motilitas menunjukkan bahwa kedua isolat (DR-14 dan DU-27-1) memiliki kemampuan melakukan pergerakan (motilitas). Hal ini terlihat dari pertumbuhan sel mengikuti garis inokulasi dan memperlihatkan adanya turbiditas sel-sel tersebut di dalam medium. Turbiditas sel-sel tersebut menunjukkan kemampuan sel dalam melakukan pergerakan (motilitas). Carter *et al.* (1995) menyatakan bahwa bakteri pereduksi nitrat memiliki kemampuan melakukan pergerakan secara aktif karena sebagian besar bakteri pereduksi nitrat memiliki flagel.

Hasil uji denitrifikasi menunjukkan bahwa isolat bakteri pereduksi nitrat terpilih mampu mengubah nitrat menjadi gas. Proses ini berlangsung secara bertahap karena keberadaan enzim *nitrate reductase* yang mengkatalisis nitrat menjadi nitrit. Tahap selanjutnya enzim *nitrite reductases* (NirK dan NirS) mengkatalisis nitrit menjadi *nitric oxide* dan enzim *nitric oxide reductases* (cNor dan qNor) mengubah *nitric oxide* menjadi *nitrous oxide*. Enzim *nitrous oxide reductase* adalah enzim yang mengkatalisis *nitrous oxide* menjadi gas dinitrogen (N₂) sebagai hasil akhir dalam proses denitrifikasi (Maier *et al.*, 2003).

Hasil uji penggunaan asam suksinat yang dilakukan menunjukkan bahwa kedua isolat memiliki kemampuan dalam mengubah suksinat sebagai sumber karbon tunggal menjadi fumarat dalam siklus asam sitrat. Suksinat digunakan sebagai elektron donor dalam siklus asam sitrat, komponen ini sangat berperan dalam siklus respirasi untuk menghasilkan nutrisi pertumbuhan bagi bakteri. Proses perubahan suksinat menjadi fumarat tersebut berlangsung oleh adanya enzim suksinat dehidrogenase (Maier *et al.*, 2000). Reaksi perubahan asam suksinat dalam siklus asam sitrat berlangsung seperti pada reaksi 4.2.



Berdasarkan hasil karakterisasi fenotip yang telah dilakukan dapat dipahami bahwa isolat bakteri pereduksi nitrat terpilih yaitu DR-14 dan DU-27-1 adalah berbeda. Kedua isolat bakteri tersebut diduga spesies yang berbeda. Holt *et al.* (2000) menyatakan bahwa karakteristik bakteri pereduksi nitrat secara umum tergolong Gram negatif, bersifat motil dan memiliki flagel. Bakteri pereduksi nitrat pada kondisi aerob memanfaatkan oksigen (O_2) sebagai aseptor elektron dan menggunakan nitrat guna proses pembentukan protein.

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, didapatkan kesimpulan bahwa:

- 1) Bakteri-bakteri Waduk Sutami dari sampel hulu, hilir, dan tengah memiliki kemampuan dalam proses amonifikasi, nitrifikasi, dan denitrifikasi.
- 2) Sejumlah 22 isolat bakteri pereduksi nitrat yang diperoleh dari Waduk Sutami terpilih dua isolat bakteri yaitu DR-14 dan DU-27-1 yang memiliki kemampuan tinggi dalam mereduksi nitrat.
- 3) Isolat DU-27-1 mencapai fase logaritmik lebih cepat jika dibandingkan dengan isolat DR-14. Densitas sel tertinggi isolat DR-14 sebesar $12,9 \times 10^8$ sel/mL pada medium N-10 dan isolat DU-27-1 sebesar $12,83 \times 10^8$ sel/mL pada medium N-20 dicapai pada inkubasi 24 jam.
- 4) Isolat DR-14 memiliki kemampuan mereduksi nitrat tertinggi sebesar 89,02 % dalam medium N-5, sedangkan DU-27-1 sebesar 83,7% dalam medium N-20 pada inkubasi 24 jam.
- 5) Secara fenotip isolat DR-14 dan DU-27-1 merupakan spesies yang berbeda.

5.2 Saran

- 1) Isolat bakteri yang memiliki potensi tinggi dalam mereduksi nitrat diperlukan uji aktivitas enzim nitrat reduktase untuk mengetahui keterkaitan terhadap pola pertumbuhan dan potensi mereduksi nitrat.
- 2) Gas yang terbentuk pada reaksi denitrifikasi diperlukan analisis lebih lanjut dengan metode kromatografi.
- 3) Isolat bakteri yang diperoleh dari Waduk Sutami diperlukan identifikasi lebih lanjut menggunakan teknik *Ribosome Intergenic Spacer* (RIS).

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, S., K. dan D. Strete. 2001. **Microbiology: A Photographic Atlas for The Laboratory**. Benjamin Cumming: Addison Wesley Longman, Inc. USA
- Atlas, R. M. 1989. **Microbiology: Fundamentals and Applications. 2nd Edition**. McMillan Publ. Co. New York
- Cappucino, J. G., dan N. Sherman. 2005. **Microbiology: A Laboratory Manual**. Pearson Benjamin Cumming. San Fransisco
- Carter, J. P., Y.H Hsiao, S. Spiro, dan D. J. Richardson. 1995. Soil and Sediment Bacteria Capable of Aerobic Nitrate Respiration. *J. Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2852 - 2858
- Clesceri, L.S., E.G. Arnold, dan Trussel. 1998. **Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water**. American Public Health Association. American Water Works Association. Water Environment Federation. Washington DC. 1:1-6:187
- Effendi, H. 2003. **Telaah Kualitas Air bagi Pengelolaan Sumber Daya Lingkungan Perairan**. Kanisius. Yogyakarta
- Enwall, K., L. Philippot, dan S. Hallin. 2005. Activity and Composition of The Denitrifying Bacterial Community Respond Differently to Long-Term Fertilization. *J. Appl. Environ. Microbiol.* **71**(12): 8335-8343
- Kurniawan, L.H, M. A. Ahmed, dan R. I. Rachmania. 2005. Bahaya *Blooming* Cyanobacteria *Microcystis* spp. dan Cara Penanggulangannya. Karya Tulis Ilmiah Mahasiswa. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya Malang.
- Hayatsu, M., K. Tago, dan M. Saito. 2008. Various Players in the Nitrogen Cycle: Diversity and Functions of the Microorganisms Involved in Nitrification and Denitrification. *Soil Sci. Plant Nutr* . **54**: 33–45
- Heylen, K., B. Vanparys, L. Wittebolle, W. Verstraete, N. Boon, dan P. D. Vos. 2006. Cultivation of Denitrifying Bacteria:

- Optimization of Isolation Conditions and Diversity Study. *J. Appl. Environ. Microbiol.* **72**(4): 2637-2643
- Horn, M. A., H. L. Drake, dan A. Schramm. 2006. Nitrous oxide Reductase Genes (*nosZ*) of Denitrifying Microbial Populations in Soil and The Earthworm Gut are Phylogenetically Similar. *J. Appl. Environ. Microbiol.* **72**(2): 1019-1026
- Holt, J.G., N.R Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, S.T. Williams. 2000. **Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology Ninth Edition**. Lyppincott Williams & Wilkins. USA
- Li, Y. 2007. Denitrification Capacity and Denitrifying Bacteria in A Restored BottomLand Hardwood Forest, Mississippi River Alluvial Valley: Hydrological Impacts. Thesis. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College
- Madigan, M., T., J.M. Martinko dan J. Parker. 2003. **Brock Biology of Microorganism**. Pearson Education, Inc. New York
- Maier, R.M, Ian L. P. dan Charles P. G. 2000. **Environmental of Microbiology**. Elsevier. USA
- Marwati, U. 2006. Pedoman Praktikum Mikrobiologi Lingkungan. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya, Malang
- Mitakda, B., Prayitno dan Suharjo. 2000. **Perancangan dan Pemodelan Usaha Peningkatan Kemampuan Purifikasi Sungai Brantas Hilir**. Laporan Riset Unggulan Terpadu V Bidang Teknologi Perlindungan Lingkungan. Kantor Menteri Negara Riset dan Teknologi. Dewan Riset Nasional
- Mokbel, W., A dan S.M. Yamakanamardi. 2008. Temporal Variations in The Abundance of Heterotrophic Bacteria In Ground Water According to Land Use Patterns In Mysore District, India. *Afr. J. Environ. Sci. Technol.* **2**(4): 059-067
- Morimoto, M. dan A. Hirakoba. 1964. Destruction of Nitrite Ion by Sulfanilic Acid and Detection of Nitrate Ion by The Griess Romijn Nitrate Reagent. *Japan Analyst.* **13**: 466-468
- Mulyono. 2006. **Membuat Reagen Kimia di Laboratorium**. Penerbit: PT. Bumi Aksara. Jakarta

- Oberholster, P.J., Botha A. M., dan Grobbelaar J.U. 2003. *Microcystis aeruginosa*: Source of Toxic Microcystins in Drinking Water. *Afr. J. Biotech.* **3**: 159-168
- Palmer, M.A. dan D.B.Roy. 2001. An Estimate of The Extent of Dystrophic, Oligotrophic, Mesotrophic, and Eutrophic Standing Fresh Water in Great Britania. Joint Nature Conservation Committee Report. Peterborough
- Philippot, L. 2005. Use of Functional Genes to Quantify Denitrifiers in The Environment. UMR Microbiologie et Ge´ochimie des Sols, INRA-Universite´ de Bourgogne. France
- Purwoko, T. 2007. **Fisiologi Mikroba**. PT. Bumi Aksara. Jakarta
- Ramothokang, T.R, S.C. Simelane dan F. Bux. 2003. Isolation and Cultivation of Filamenous Bacteria Implicated in Actived Sludge Bulking. *Water SA.* **29**(4): 405-410
- Ramothokang, T.R, S.C. Simelane dan F. Bux. 2006. Biological Nitrogen and Phosphorus Removal By Filamentous Bacteria In Pure Culture. *Water SA.* **32**(5): 305-306
- Retnaningdyah, C. , Prayitno, Y. Rosyitawati, M.Y.C Dewi, A.N. Hartini, 2002. **Potensi Mikroalga sebagai Bioindikator Tingkat Pencemaran Bahan Organik di Perairan Waduk**. National Seminar on Research and Studies Research Grant conducted by Ministry of National Education, Directorate General of Higher Education. TPSDP. Jakarta
- Retnaningdyah, C. dan S. Samino. 2005. **Laporan Akhir : Evaluasi Sifat Toksik *Microcystis* Spp. Terhadap Beberapa Ikan dari Waduk Sutami untuk Pengembangan *Early Warning System* dalam *Blooming* Mikroalga**. Laporan Penelitian Kerjasama Perum Jasa Tirta I dengan Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Sertifikat No. ID03 / 0127
- Retnaningdyah, C. dan S. Samino. 2006. **Laporan Akhir: Evaluasi Sifat Toksik *Microcystis* Spp. Terhadap Beberapa Ikan dari Waduk Sutami untuk Pengembangan *Early Warning System* dalam *Blooming* Mikroalga**. Laporan Penelitian Kerjasama Perum Jasa Tirta I dengan Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas

Brawijaya Sertifikat No. ID03/0127

- Rudolphi, A., A. Tschuch, dan G. Fuchs. 1991. Anaerobic Degradation of Cresols by Denitrifying Bacteria. *Arc. of Microbiol.* **155**(3): 238-248
- Samino, S. dan C. Retnaningdyah. 2005. *Monitoring* Dinamika Komunitas Fitoplankton dan Zooplankton di Waduk Sutami Malang. Laporan Penelitian Kerjasama Perum Jasa Tirta I dengan Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Sertifikat No. ID03/0127
- Samino, S. dan C. Retnaningdyah. 2006. *Monitoring* Dinamika Komunitas Fitoplankton dan Zooplankton di Waduk Sutami Malang Periode Bulan Januari–Maret 2006. Laporan Penelitian Kerjasama Perum Jasa Tirta I dengan Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Sertifikat No. ID03/0127
- Soekistijono. 2004. Eutrofikasi di Waduk Sutami *Monitoring*, Evaluasi dan Upaya Penanganannya. Kolokium Hasil Penelitian dan Pengembangan Sumber Daya Air. Perum Jasa Tirta I
- Strohm, T. O., B. Griffin, W. G. Zumft, B. Schink. 2007. Growth Yields in Bacterial Denitrification and Nitrate Ammonification. *J. Appl. Environ. Microbiol.* **3**(5): 1420-1424
- Suharjo. 2008. Keanekaragaman dan Potensi *Pseudomonas* Strain *Indigenous* Pendegradasi Surfaktan Anionik di Ekosistem Sungai Tercemar Deterjen. Disertasi. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta
- Takaya, N., M. A. B. Catalan-Sakairi, Y. Sakaguchi, I. Kato, Z. Zhou, dan H. Shoun. 2003. Aerobic Denitrifying Bacteria that Produce Low Levels of Nitrous Oxide. *J. Appl. Environ. Microbiol.* **69**(6): 3152-3157
- Trihendradi, C. 2005. **Step by Step SPSS 13 Analisis Data Statistik**. Penerbit Andi. Yogyakarta
- Trimmer, M. J.C. Nicholls, N. Morley, C. A. Davies dan J. Aldridge. 2005. Biphasic Behavior of Anammox Regulated by Nitrite

and Nitrate in an Estuarine Sediment. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 7(4):1923-1930

Urakawa, H, H.Maki, S. Kawabata, T.Fujiwara, H.Ando, T. Kawai, T.Hiwatari, K.Kohata, M.Watanabe. 2006. Abundance and Population Structure of Ammonia-Oxidizing Bacteria that Inhabit Canal Sediments Receiving Effluents from Municipal Wastewater Treatment Plants. *72*(10): 6845–6850

United States Environmental Protection Agency. 2001. Use of Bioremediation at Superfund Sites. U.S. Environmental Protection Agency. Cincinnati. OH 45268

Uyanto, S. S. 2009. **Pedoman Analisis Data dengan SPSS**. Graha Ilmu. Yogyakarta



Lampiran 1. Komposisi medium isolasi bakteri pereduksi nitrat, uji determinasi dan reagen uji determinasi sampel air

Tabel 1. Komposisi medium isolasi (Heylen *et al.*, 2006)

Medium	Komposisi (g/L)	
a. <i>Ammonia-Oxidizing</i>	1 M MgSO ₄	120
	1 M CaCl ₂ 30 mM FeSO ₄	54
	50 mM EDTA	3,66
	50 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	14,6
	50 mM K ₂ HPO ₄	6,6
	50 mM CuSO ₄	0,41
	KH ₂ PO ₄	54,44
	NaH ₂ PO ₄	4,8
	Na ₂ CO ₃	1
b. Nitrit	Glukosa	10
	Pepton	10
	NaNO ₂	0,06
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1
	K ₂ HPO ₄	1
c. Nitrat	Glukosa	0,33
	Pepton	0,06
	KNO ₃	0,14
	NaHCO ₃	0,67
	Bacto Agar	15
d. Denitrifikasi pH 7,3	TSB	
	komposisi:	
	- <i>pancreatic digest casein</i>	17
	- <i>papaic digest of soybean meal</i>	3
	- sodium <i>chloride</i>	5
	- di- <i>basic</i> potasium fosfat	2,5
	- glukosa	2,5
	KNO ₃	1
Bacto Agar	15	

Keterangan: medium TSB sebanyak 30 gram dilarutkan dalam 1 liter akuades

Tabel 2. Komposisi medium uji determinasi sampel air
(Marwati, 2006)

Medium	Komposisi (g/L)	
a. Nitrit <i>broth</i> pH 7,3	1. Sodium nitrit	2
	2. MgSO ₄ .2H ₂ O	2
	3. FeSO ₄ .7H ₂ O	0,03
	4. Sodium klorida	0,3
	5. Sodium karbonat	1
	6. K ₂ HSO ₄	1
b. Amonium sulfat <i>broth</i> pH 7,3	1. NH ₄ SO ₂	2
	2. MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
	3. FeSO ₄ .7H ₂ O	0,03
	4. Sodium klorida	0,3
	5. Sodium karbonat	1
	6. K ₂ HPO ₄	1
c. Pepton <i>broth</i> pH 7,2	Pepton	4
d. Nitrat <i>broth</i> pH 7,2	1. Pepton	5
	2. <i>Beef</i> ekstrak	3
	3. Potasium nitrat	5

Tabel 3. Komposisi reagen uji determinasi sampel air
(Mulyono, 2006)

Reagen	Komposisi (dibuat dalam 100 mL)
a. <i>Nessler's</i>	<ul style="list-style-type: none"> - KI 2 g - HgI₂ 1,1 g - NaOH 5 N 10 mL
b. <i>Griess</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Larutan A 0,1% α-naftietilendiamin dihidroklorid - Larutan B 1% Sulfanilamid dalam 5% H₃PO₄
c. <i>Trommdorf</i>	<ul style="list-style-type: none"> - ZnCl₂ 8 g - Starch 1,6 g - KI (Kalium iodida) 0,8 g
d. <i>Brucine Sulfat</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Brusin sulfat 1 g - Asam sulfanilat 0,1 g - HCl pekat 4,8 mL - Akuades ditambahkan hingga mencapai volume 100 mL

Lampiran 2. Pembuatan reagen uji determinasi sampel air (Mulyono, 2006)

1. Pembuatan reagen *Griess*

Larutan A dan B dibuat secara terpisah. Larutan A dibuat dahulu dengan mencampurkan 0,02 gram α -naftietilendiamin-dihidroklorid dengan akuades sebanyak 50 mL. Larutan B dibuat dengan melarutkan 0,5 gram sulfanilamid dengan stok 5% H_3PO_4 . Larutan A dan B kemudian dicampurkan secara bersamaan dan dilakukan inkubasi selama 24 jam untuk selanjutnya digunakan.

2. Pembuatan reagen *Nessler's*

Larutan A dan larutan B dibuat secara terpisah. Larutan A: bahan KI sebanyak 25 gram dilarutkan dalam akuades (25 mL). Larutan B: bahan HgI_2 sebanyak 11 gram dilarutkan dalam akuades 185 mL. Larutan B ditambahkan sambil dilakukan pengadukan secara perlahan ke dalam larutan A hingga terbentuk endapan, kemudian ditambahkan NaOH 5 N. Akuades ditambahkan sampai volume larutan menjadi 500 mL kemudian didiamkan beberapa lama, dan diambil cairan yang jernih. Tempat penyimpanan reagen harus terbungkus aluminum foil dan batas penggunaan reagen hanya 1 minggu.

3. Pembuatan reagen *Trommdorf's*

Larutan Zinc chloride 20% sebanyak 100 mL dicampurkan kedalam 4 gram *starch* di dalam air. Larutan *starch* dipanaskan hingga larut kemudian ditambahkan 2 gram potasium iodida dan ditambahkan air hingga volume 100 mL. Larutan tersebut selanjutnya disaring menggunakan filter kemudian disimpan ke dalam botol.

Lampiran 3. Metode penghitungan kadar nitrat

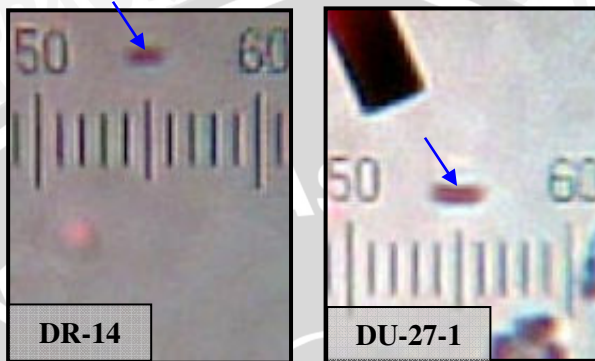
1. Pembuatan larutan baku nitrat (Clesceri *et al.*, 1998)

Larutan baku nitrat (1000 mg/L) dibuat dengan cara mengeringkan potasium nitrat (KNO_3) dalam oven pada suhu 105°C selama 24 jam. Bahan tersebut ditimbang sebanyak 7,218 gram dan dilarutkan ke dalam akuades sehingga volume menjadi 1000 mL dengan menggunakan labu ukur 1000 mL (keterangan: sebanyak 1 mililiter larutan baku nitrat setara dengan $100\ \mu\text{g}\ \text{NO}_3^-$).

2. Pembuatan reagen dan penghitungan kadar nitrat (Clesceri *et al.*, 1998)

Bahan brusin sulfat dan asam sulfanilat (*sulfanilic acid*) masing-masing ditimbang sebanyak 1 gram dan 0,1 gram. Sebanyak 70 mililiter akuades dipanaskan diatas penangas kemudian ditambahkan brusin sulfat dan asam sulfanilat serta 4,8 mililiter larutan HCl pekat. Larutan diaduk hingga larut kemudian didinginkan dan dimasukkan dalam labu takar 100 mililiter. Pengukuran kadar nitrat dilakukan dengan cara 5 mililiter sampel ditambahkan 0,5 mililiter reagen kemudian ditambahkan sebanyak 5 mililiter H_2SO_4 pekat. Larutan ditunggu hingga dingin kemudian dilakukan homogenasi dengan vortek. Absorbansi kadar nitrat dibaca pada panjang gelombang 410 nm (Clesceri *et al.*, 1998).

Lampiran 4. Morfologi sel bakteri pereduksi nitrat DR-14 dan DU-27-1 hasil pewarnaan gram

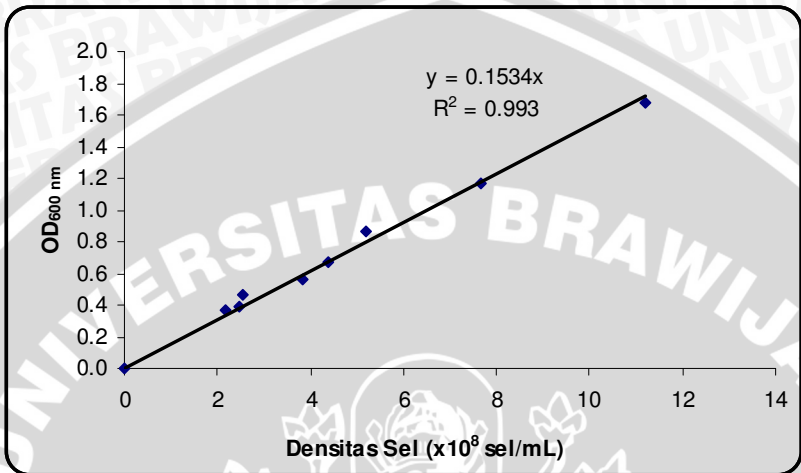


Keterangan: 1 skala = 1 μm

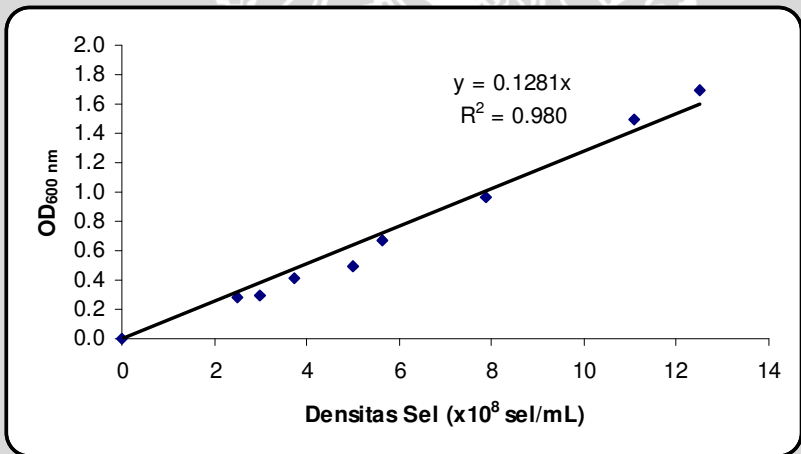
Gambar 1. Morfologi sel isolat DR-14 dan DU-27-1



Lampiran 5. Kurva baku densitas sel DR-14 dan DU-27-1

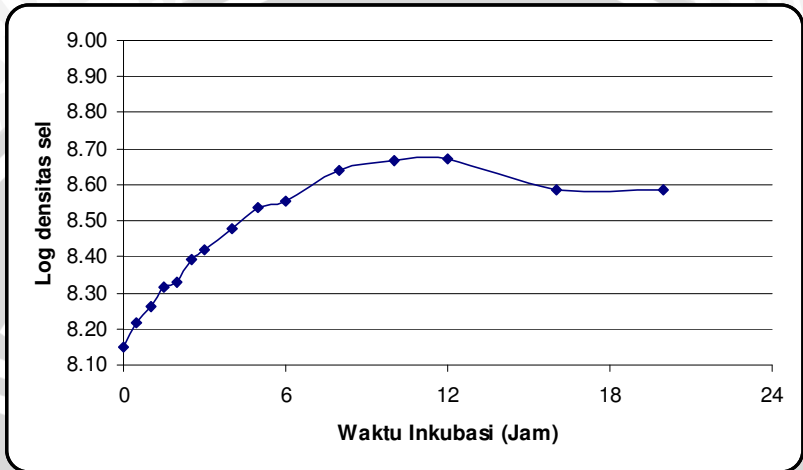


Gambar 2. Kurva baku densitas sel DR-14

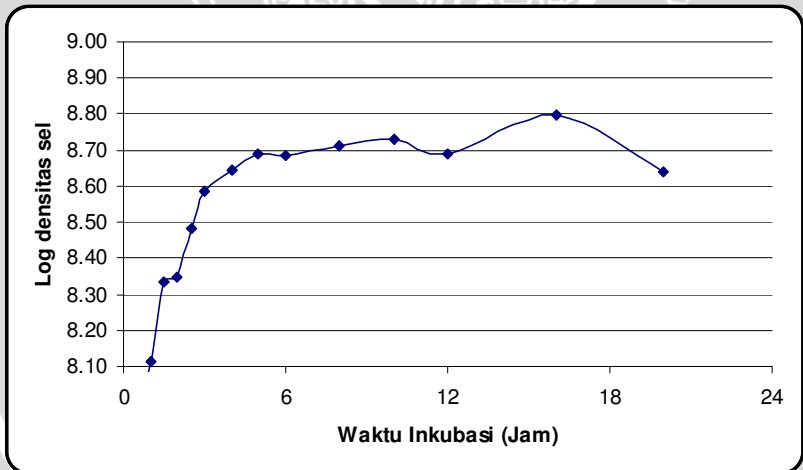


Gambar 3. Kurva baku densitas sel DU-27-1

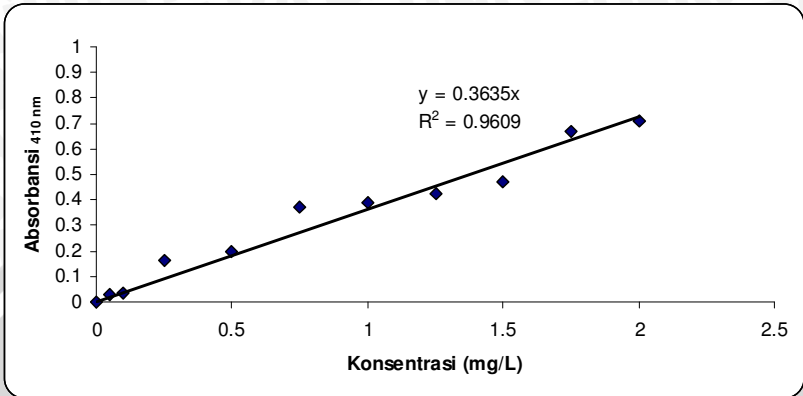
Lampiran 6. Kurva pertumbuhan (Uji Pendahuluan) sel DR-14 dan DU-27-1 dalam medium N-10 mM dan kurva baku kadar nitrat



Gambar 4. Kurva pertumbuhan sel DR-14



Gambar 5. Kurva pertumbuhan sel DU-27-1



Gambar 6. Kurva baku kadar nitrat dibuat pada selang 0,02 hingga 2 mg/L



Lampiran 7. Data rerata penghitungan faktor fisikokimiawi sampel air Waduk Sutami

Tabel 4. Penghitungan faktor fisikokimiawi sampel air

No.	Parameter	Hulu	Tengah	Hilir
1.	Suhu air (°C)	28,4	28,4	28,4
2.	Konduktivitas	0,2	0,2	0,2
3.	pH	9,2	9,3	9,3
4.	Kecerahan (cm)	75,0	81,0	82,7
5.	Nitrat (mg/L)	1,169	0,385	0,619
6.	DO (mg/L)	13	12,7	12,4
7.	TOM (mg/L)	1.056,23	575,12	569,59

Keterangan: nilai pada setiap parameter merupakan rerata tiga kali penghitungan



Lampiran 8. Data penghitungan kadar nitrat pada seleksi kuantitatif**Tabel 5.** Data penghitungan kadar nitrat pada seleksi kuantitatif

No.	Kode	Konsentrasi $y=0,3635x$	Residu Nitrat (Akhir)	Penurunan kadar nitrat (%)
1.	DR-14	0,02	6,19	97,59
2.	DU-27-1	0,03	6,88	97,33
3.	DU-30-2	0,07	18,57	92,78
4.	AT-8	0,07	18,57	92,78
5.	DU-27-4	0,09	23,38	90,91
6.	DU-27-2	0,10	26,13	89,84
7.	DU-27-5	0,13	33,70	86,90
8.	DU-30-1	0,15	38,51	85,03
9.	TD-24	0,15	38,51	85,03
10.	DU-30-5	0,17	42,64	83,42
11.	DU-30-4	0,20	49,52	80,75
12.	NU-10	0,23	57,77	77,54
13.	AR-3	0,31	76,34	70,32
14.	AT-7	0,39	97,66	62,03
15.	AT-6	0,47	117,61	54,28
16.	DR-30	0,78	193,95	24,60
17.	NT-14	0,91	227,65	11,50
18.	DU-30-3	0,92	229,71	10,70
19.	NU-9	0,65	323,25	-25,67*
20.	AR-11	0,66	331,50	-28,88*
21.	NT-13	-	-	-
22.	NR-9	1,30	326,00	-26,74*

Keterangan: kadar nitrat (awal) sebesar 257,22 mg/L, tanda (-): tidak dilakukan penghitungan kadar nitrat, tanda (*) : terjadi peningkatan kadar nitrat

Lampiran 9. Analisis ragam ANOVA

Tabel 6. Analisis ragam densitas sel terhadap isolat, nitrat aktual dan waktu

Sumber	JK	db	KT	F _{hit.}	Sig.
Isolat	4,2E+18	1	4,2E+18	26,618	0,000
Waktu	4,8E+18	4	1,2E+18	7,547	0,000
Nitrat Aktual	1,3E+16	3	4,4E+15	0,028	0,994
Isolat*waktu	7,5E+17	4	1,9E+17	1,193	0,329
Waktu*kadar	4,5E+17	12	3,7E+16	0,237	0,995
Kadar*isolat	2,3E+17	3	7,6E+16	0,483	0,696
Isolat*kada*waktu	9,6E+17	12	8,0E+16	0,508	0,897
Galat	6,3E+18	40	1,6E+17		
Total	4,0E+19	80			

Keterangan: Nilai sig. 0,000 ($P < 0,05$) menunjukkan ada beda nyata pada tingkat kepercayaan 95%

Tabel 7. Analisis ragam variasi kadar nitrat terhadap isolat, nitrat aktual dan waktu

Sumber	JK	db	KT	F _{hit.}	Sig.
Isolat	2,019	1	2,019	0,565	0,457
Waktu	243,762	4	60,940	17,057	0,000
Nitrat Aktual	248,368	3	82,789	23,172	0,000
Waktu*isolat	4,216	4	1,054	0,295	0,879
Waktu*kadar	100,128	12	8,344	2,335	0,022
Kadar*isolat	2,574	3	0,858	0,240	0,868
Waktu*kadar*isolat	5,704	12	0,475	0,133	1,000
Galat	142,913	40	3,573		
Total	1595,920	80			

Keterangan: Nilai sig. 0,000 ($P < 0,05$) menunjukkan ada beda nyata pada tingkat kepercayaan 95%

Lampiran 10. Analisis korelasi dan regresi sederhana antarvariabel

Tabel 8. Analisis korelasi *Pearson's* dan regresi sederhana antarvariabel

Variabel	Kadar Nitrat (mg/L)		DR-14	DU-27-1
DS terhadap KN	0	Korelasi	-0,446	-0,328
		Sig.	0,197	0,354
	5	Korelasi	-0,182	-0,438
		Sig.	0,615	0,205
	10	Korelasi	-0,141	-0,102
		Sig.	0,697	0,780
	20	Korelasi	-0,096	-0,883**
		Sig.	0,793	0,001

Keterangan:

Tanda (*) menunjukkan korelasi yang signifikan pada tingkat kepercayaan 99%, DS: densitas sel, KN: kadar nitrat

Tabel 9. Analisis regresi sederhana antarvariabel

Variabel	Kadar Nitrat (mg/L)	Sig.	Persamaan Regresi
DS terhadap KN (DR-14)	0	0,793	KN = 1,517 - 1,2x10 ⁹ X
	5	0,615	KN = 1,955 - 6,2x10 ¹⁰ X
	10	0,697	KN = 5,424 - 1,0x10 ⁹ X
	20	0,793	KN = 4,658 - 1,2x10 ⁹ X
DS terhadap KN (DU-27-1)	0	0,354	KN = 1,470 - 5,7x10 ¹⁰ X
	5	0,205	KN = 2,990 - 1,2x10 ⁹ X
	10	0,780	KN = 5,673 - 6,5x10 ¹⁰ X
	20	0,001	KN = 11,824 - 7,6x10 ⁹ X

Keterangan:

DS : densitas sel

KN : kadar nitrat

Sig. : signifikansi

Lampiran 11. Data penghitungan statistika uji BNT

Tabel 10. Persentase penurunan kadar nitrat medium (DR-14)

Waktu inkubasi (jam)	Penurunan kadar nitrat medium (%)			
	0	5	10	20
0	0 ^a ±0	0 ^a ±0	0 ^a ±0	0 ^a ±0
6	44,21 ^a ±34,7	40,98 ^b ±11,7	45,76 ^{ab} ±26,3	49,82 ^a ±36,3
12	65,52 ^a ±71,1	49,54 ^b ±10,0	56,14 ^{ab} ±12,3	60,23 ^a ±38,7
18	67,07 ^a ±97,4	83,97 ^c ±0,9	57,10 ^{ab} ±18,1	77,23 ^a ±15,2
24	69,45 ^a ±88,5	89,02 ^c ±10,4	86,21 ^c ±2,3	82,46 ^a ±3,8

Keterangan:

Nilai adalah rerata penurunan dan standar deviasi (SD), Huruf yang berbeda dibelakang angka pada kolom yang sama menunjukkan ada beda nyata pada uji BNT dengan tingkat kepercayaan 95%

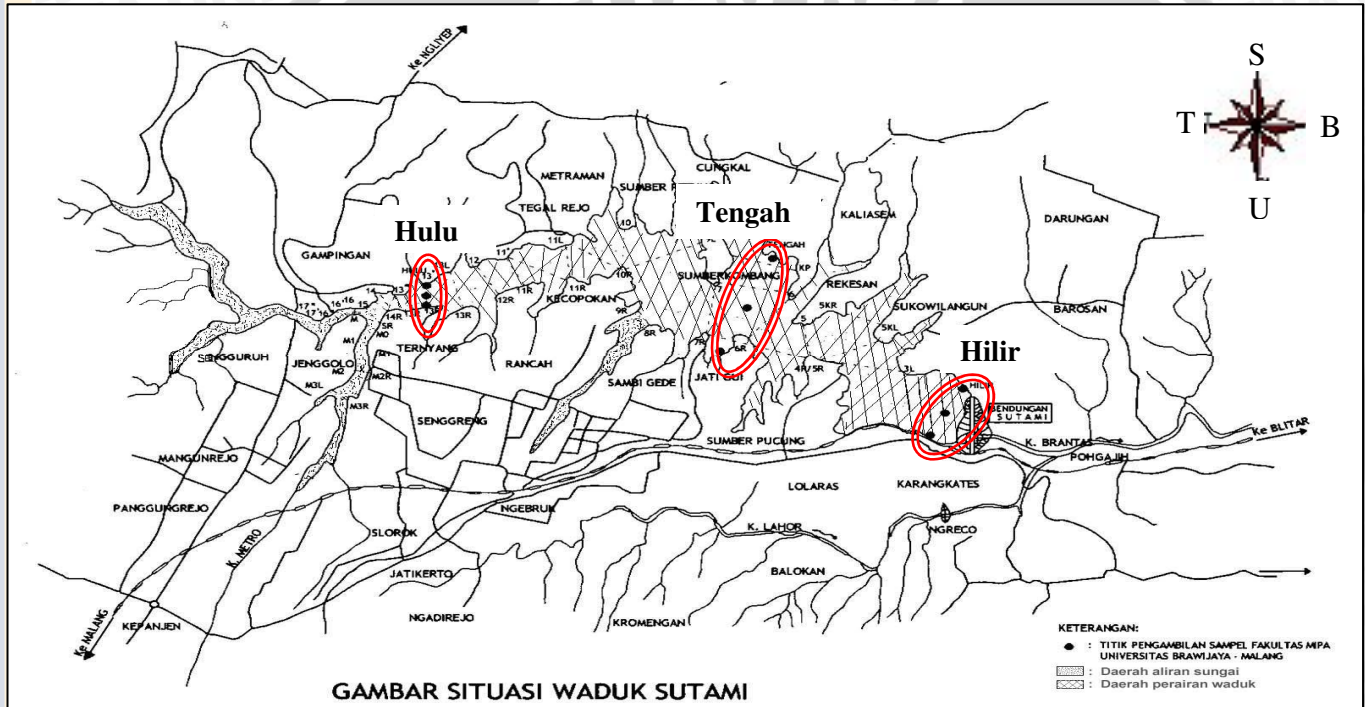
Tabel 11. Persentase penurunan kadar nitrat medium (DU-27-1)

Waktu inkubasi (jam)	Penurunan kadar nitrat medium (%)			
	0	5	10	20
0	0 ^a ±0	0 ^a ±0	0 ^a ±0	0 ^a ±0
6	33,5 ^a ±140,1	53,98 ^a ±8,1	57,16 ^a ±43,9	53,69 ^{ab} ±0
12	37,8 ^a ±38,7	65,19 ^a ±0,4	57,37 ^a ±34,8	58,39 ^{ab} ±42,8
18	39,5 ^a ±8,9	31,11 ^a ±75,4	47,20 ^a ±25,4	71,90 ^{ab} ±2,1
24	62,2 ^a ±45,9	60,65 ^a ±6,4	76,33 ^a ±12,2	83,70 ^b ±9,1

Keterangan:

Nilai adalah rerata penurunan dan standar deviasi (SD), Huruf yang berbeda dibelakang angka pada kolom yang sama menunjukkan ada beda nyata pada uji BNT dengan tingkat kepercayaan 95%

LAMPIRAN 12. Peta lokasi pengambilan sampel Waduk Sutami (Retnaningdyah, *et al.*, 2002)



Gambar 7. Peta Lokasi Sampling Waduk Sutami