

**POTENSI KONSORSIUM BAKTERI PEREDUKSI NITRAT  
DARI WADUK SUTAMI DALAM MEREDUKSI NITRAT**

**SKRIPSI**

oleh:

**Muhammad Asraf Ahmed**

**0410910034-91**



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

**MALANG**

**2009**

**POTENSI KONSORSIUM BAKTERI PEREDUKSI NITRAT  
DARI WADUK SUTAMI DALAM MEREDUKSI NITRAT**

**SKRIPSI**

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

oleh:

**Muhammad Asraf Ahmed**

**0410910034-91**



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

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

**POTENSI KONSORSIUM BAKTERI PEREDUKSI NITRAT  
DARI WADUK SUTAMI DALAM MEREDUKSI NITRAT**

oleh:

**MUHAMMAD ASRAF AHMED**  
**0410910034-91**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 19 Januari 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, M.S**  
**NIP. 131 759 584**

**Mengetahui,**  
**Ketua Jurusan Biologi**  
**Fakultas MIPA Universitas Brawijaya**

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

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Muhammad Asraf Ahmed  
NIM : 0410910034-91  
Jurusan : Biologi  
Penulisan Skripsi berjudul :

### **POTENSI KONSORSIUM BAKTERI PEREDUKSI NITRAT DARI WADUK SUTAMI DALAM MEREDUKSI NITRAT**

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Skripsi ini adalah benar-benar karya saya sendiri, dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. karya-karya yang tercantum dalam Daftar Pustaka Skripsi ini, semata-mata digunakan sebagai acuan atau referensi.
2. Apabila di kemudian hari diketahui bahwa isi Skripsi saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung akibat hukum dari keadaan tersebut.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 19 Januari 2009

Yang menyatakan,

(Muhammad Asraf Ahmed)

NIM. 0410910034-91

## **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 KONSORSIUM BAKTERI PEREDUKSI NITRAT DARI WADUK SUTAMI DALAM MEREDUKSI NITRAT

## ABSTRAK

Beberapa isolat bakteri yang diisolasi dari waduk sutami memiliki kemampuan dalam mereduksi nitrat. Tujuan penelitian mengetahui asosiasi antarisolat bakteri pereduksi nitrat, pola pertumbuhan dan potensi mereduksi nitrat konsorsium bakteri dari waduk tersebut. Rancangan penelitian: rancangan acak lengkap faktorial dengan tiga kali ulangan dan variabel: waktu inkubasi (0, 6, 12, 18, dan 24 jam) dan jenis medium uji (TSB (*Trypticase Soya Broth*)-N 0, 5, 10, 20 mg/L serta medium B-12 (N 100 mg/L)). Parameter yang diamati adalah densitas sel dan konsentrasi nitrat. Uji asosiasi menunjukkan tidak terbentuk zona hambat antar isolat penyusun konsorsium (DR-14, DU-27-1, DU-30-2, AT-8, DU-27-4, DU-27-2). Pola pertumbuhan konsorsium yang hampir sama diperoleh dari kultur dalam medium TSB-N 0, 5, dan 10 mg/L, densitas sel tertinggi masing-masing :  $2,5 \cdot 10^9$ ,  $2,2 \cdot 10^9$ ,  $2,0 \cdot 10^9$  sel/ml yang diperoleh pada inkubasi jam ke 18. Sedangkan pola pertumbuhan konsorsium bakteri dalam medium TSB-N 20 mg/L hampir sama dengan medium B-12, densitas sel tertinggi sebesar :  $2,0 \cdot 10^9$  sel/ml dan  $2,1 \cdot 10^9$  sel/ml yang diperoleh pada inkubasi jam ke 12. Konsorsium bakteri mampu mereduksi 98,2% nitrat dalam medium B-12 dengan inkubasi 24 jam. Potensi tertinggi (54%) Konsorium bakteri ( $10^9$  sel/ml) dalam mereduksi nitrat diperoleh dari inkubasi jam ke enam kultur pada medium B-12. Kecepatan mereduksi nitrat tertinggi (21,6mg/L) per hari diperoleh dari kultur dalam medium B-12. Korelasi antara densitas konsorsium dengan konsentrasi nitrat adalah negatif. Dengan demikian konsorsium bakteri ( $2,1 \cdot 10^{10}$  sel/ml) mampu mereduksi 98,2% nitrat dalam medium B-12 dengan kecepatan 21,6 mg/L per hari.

Kata kunci: Konsorsium bakteri, konsentrasi nitrat, Waduk Sutami.

# POTENCY OF NITRATE REDUCING CONSORTIUM BACTERIA ISOLATED FROM SUTAMI RESERVOIR IN REDUCING NITRATE LEVEL

## ABSTRACT

Some of the isolated bacteria from Sutami Reservoir has an ability to reduce nitrate. The objectives of this research are knowing the association between different isolates of nitrate reducing consortium bacteria, the growth pattern, and the potency of the consortium in reducing nitrate level in the culturation medium. Randomized completed factorial design was used with three booster and two variables : incubation time (0, 6, 12, 18, and 24 hours) and different kinds of culturation medium (TSB (*Trypticase Soya Broth* )-N 0, 5, 10, 20 mg/L also B-12 (N 100 mg/L)). Parameters that being observed are cell density and nitrate concentration. Association assay conclude the abstinence of clearing zone between consortium isolates (DR-14, DU-27-1, DU-30-2, AT-8, DU-27-4, DU-27-2). The similar consortium growth patern gained from the culturation process in medium TSB-N 0, 5, dan 10 mg/L, the highest cell density are in each of the following :  $2,5 \cdot 10^9$ ,  $2,2 \cdot 10^9$ ,  $2,0 \cdot 10^9$  cell/ml that being shown from incubation process in 18 hours. Meanwhile, the growth patern of the consortium bacteria in medium TSB-N 20 mg/L similar with medium B-12, highest cell density are :  $2,0 \cdot 10^9$  cell/ml and  $2,1 \cdot 10^9$  cell/ml that being shown from incubation process in 12 hours. Bacteria consortium can reduce 98,2% nitrat in medium B-12 in 24 hours incubation time. The highest potency (54%) of the Bacteria consortium ( $10^9$  cell/ml) in reducing nitrate levels gained from six hours incubation in a medium B-12 . The highest speed in reducing nitrate levels (21,6 mg/L) in one day gained from the culturation process in medium B-12. The correlation result between consortium density with nitrate concentration is negative. Lastly, consortium bacteria ( $2,1 \cdot 10^9$  cell/ml) can reduce 98,2% nitrat in medium B-12 with speed process 21,6 mg/L per day.

Keywords : Bacterium consortia, nitrate level, Sutami Reservoir

## KATA PENGANTAR

Segala puji syukur kehadiran Allah Subhanahu wa Ta'ala yang telah melimpahkan rahmat, hidayah, serta karunia-Nya kepada penulis sehingga skripsi yang berjudul "Potensi Konsorsium Bakteri Pereduksi Nitrat dari Waduk Sutami dalam Mereduksi Nitrat" dapat terselesaikan. Shalawat serta salam semoga senantiasa tercurah kepada Nabi Muhammad Shalallahu 'alaihi wa Sallam yang telah memberi petunjuk serta mengajarkan kepada umat manusia tentang keutamaan dan urgensi dalam berilmu.

Penyusunan skripsi ini bertujuan untuk mengetahui potensi konsorsium bakteri pereduksi nitrat sehingga dapat dimanfaatkan agen biologi dalam menyelesaikan permasalahan konsentrasi nitrat yang tinggi di Waduk Sutami.

Sehubungan dengan hal tersebut maka penulis menyampaikan penghargaan dan ucapan terima kasih kepada :

- Keluarga, khususnya Ibunda yang senantiasa mendoakan dan memberikan dukungan
- Ibu Dra. Umi Marwati, MSi dan Bapak Dr. Suharjono, MSi selaku pembimbing atas bantuan, bimbingan, nasehat, berbagai masukan serta kesabaran selama penelitian dan penulisan skripsi,
- Ibu Dra. Tri Ardyati, M.Agr.Sc.,Ph.D dan Ibu DR.Endang Arisoelaningsih selaku penguji yang telah memberikan saran serta kritik yang membangun sehingga skripsi ini menjadi lebih baik,
- Ibu Dra. Catur Retnaningdyah, MSi selaku pemilik proyek penelitian sekaligus ikut memberikan bimbingan yang sangat berharga bagi penulis,
- Bapak Dr. Agung Pramana W.M, MSi selaku pembimbing akademik,
- Ibu Dr. Sri Rahayu, MSi selaku ketua jurusan, serta Bapak Sofy Permana, MSc, DSc dan Bapak DR. Bagyo Yanuwadi atas segala dukungan, saran dan nasehatnya,
- Keluarga Bapak Bambang Wahyuono beserta Ibu Siti Purwati atas dukungan moril serta doa,
- Ricke Isnaini Rahmania, Rovy Setyo, Nur Ajjah, serta Neneng Nuraeni atas kerjasama, dukungan, dan kekompakkan selama jalannya penelitian,
- Tim Lab. Mikrobiologi, serta mbak Titis, mbak Nanik, A.S.Jamil, Lina O.R., Triani Agustin, Esti Widowati, dan Dian Susanti,
- Rekan-rekan 2004 yang senantiasa saling memberikan dukungan,
- Adi N., Novianto H.K., Antonius C., serta pihak lain yang banyak berperan dalam memperlancar penelitian dan penyelesaian skripsi ini,

Penulisan skripsi ini tentunya masih jauh dari sempurna, oleh karena itu kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan oleh penulis. Semoga hasil dari penelitian ini dapat bermanfaat bagi masyarakat.

Malang, 19 Januari 2009

Penulis

## DAFTAR ISI

|  | Halaman |
|--|---------|
| <b>HALAMAN JUDUL</b> .....   | i       |
| <b>LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI</b> .....                                 | iii     |
| <b>LEMBAR PERNYATAAN</b> .....   | iv      |
| <b>ABSTRAK</b> .....   | vi      |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | vii     |
| <b>KATA PENGANTAR</b> .....  | viii    |
| <b>DAFTAR ISI</b> .....  | ix      |
| <b>DAFTAR TABEL</b> .....  | xi      |
| <b>DAFTAR GAMBAR</b> .....   | xii     |
| <b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....   | xiii    |
| <br>   |         |
| <b>BAB I PENDAHULUAN</b>   |         |
| I.1. Latar Belakang .....  | 1       |
| I.2. Rumusan Masalah .....   | 2       |
| I.3. Tujuan Penelitian .....   | 2       |
| I.4. Manfaat Penelitian .....  | 3       |
| <br>   |         |
| <b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>   |         |
| 2.1. Waduk Sutami dan Beberapa Permasalahan Terkait.....               | 4       |
| 2.2. Bakteri Pereduksi Nitrat .....                                    | 7       |
| 2.3. Asosiasi antar Bakteri.....                                       | 11      |
| <br>   |         |
| <b>BAB III METODE PENELITIAN</b>                                       |         |
| 3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....                                  | 14      |
| 3.2. Sumber Isolat.....  | 14      |
| 3.3. Peremajaan Isolat.....  | 14      |
| 3.4. Karakterisasi Bakteri Pereduksi Nitrat .....                      | 14      |
| 3.5. Uji Asosiasi Antar isolat Bakteri Pereduksi Nitrat .....          | 18      |
| 3.6. Uji Potensi Konsorsium Bakteri Pereduksi Nitrat .....             | 18      |
| 3.7. Rancangan Penelitian dan Analisis Data .....                      | 20      |
| <br>   |         |
| <b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b>                                     |         |
| 4.1. Karakteristik Fenotip Isolat-isolat Bakteri Pereduksi Nitrat..... | 21      |
| 4.2. Asosiasi Antarisolat Konsorsium .....                             | 23      |

|  |    |
|--|----|
| 4.3. Pola Pertumbuhan Konsorsium Bakteri Pereduksi Nitrat Medium TSB-N (0, 5, 10, 20mg/L) dan dalam medium B-12 (Nitrat 100 mg/L)..... | 24 |
| 4.4. Pola Persentase Penurunan Konsentrasi Nitrat pada Berbagai Medium dengan Variasi Konsentrasi Nitrat.....                          | 28 |
| 4.5. Korelasi Pertumbuhan Konsorsium Bakteri terhadap Penurunan Nitrat Medium.....   | 30 |

## **BAB V KESIMPULAN DAN SARAN**

|                      |    |
|----------------------|----|
| 5.1. Kesimpulan..... | 35 |
| 5.2. Saran.....      | 35 |

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| <b>DAFTAR PUSTAKA</b> ..... | 37 |
|-----------------------------|----|

|                       |    |
|-----------------------|----|
| <b>LAMPIRAN</b> ..... | 42 |
|-----------------------|----|



## DAFTAR TABEL

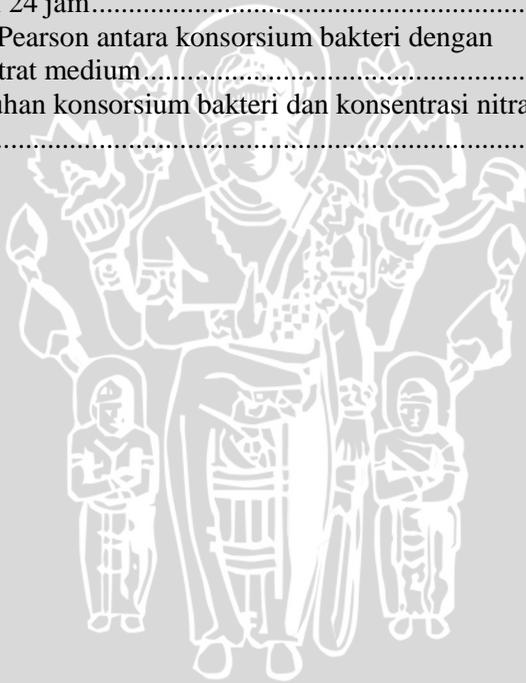
|   | Halaman |
|---|---------|
| 2.1 Klasifikasi tingkat kesuburan perairan waduk.....                               | 5       |
| 2.2 Beberapa contoh reaksi senyawa anorganik penerima elektron .....                | 9       |
| 4.1 Karakteristik fenotip isolat-isolat konsorsium bakteri<br>pereduksi nitrat..... | 21      |
| 4.2 Asosiasi antar isolat konsorsium .....  | 24      |

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



## DAFTAR GAMBAR

|   | Halaman |
|---|---------|
| 4.1 Diagram reaksi positif uji oksidase .....   | 23      |
| 4.2 Pertumbuhan antar isolat konsorsium dalam medium TSA .....  | 24      |
| 4.3 Pola Pertumbuhan Konsorsium bakteri pereduksi nitrat<br>pada berbagai medium dengan variasi nitrat..... | 25      |
| 4.4 Pola persentase penurunan konsentrasi nitrat medium kultur<br>konsorsium.....                           | 28      |
| 4.5 Potensi (%) setiap $10^9$ sel/ml konsorsium bakteri dalam<br>mereduksi nitrat .....                     | 29      |
| 4.6. Kecepatan konsorsium bakteri dalam mereduksi nitrat selama<br>masa inkubasi 24 jam.....                | 30      |
| 4.7 Nilai korelasi Pearson antara konsorsium bakteri dengan<br>konsentrasi nitrat medium.....               | 31      |
| 4.8 Pola Pertumbuhan konsorsium bakteri dan konsentrasi nitrat<br>medium .....                              | 33      |



## DAFTAR LAMPIRAN

|   | Halaman |
|---|---------|
| 1. Diagram alir metode penelitian .....   | 42      |
| 2. Peta lokasi pengambilan sampel di Waduk Sutami .....   | 46      |
| 3. Komposisi medium dan reagen yang digunakan .....   | 49      |
| 4. Potensi enam isolat bakteri pereduksi nitrat .....   | 51      |
| 5. Kurva standar densitas sel konsorsium.....   | 51      |
| 6. Kurva baku konsentrasi nitrat.....   | 52      |
| 7. Kurva pertumbuhan konsorsium bakteri pereduksi nitrat pada medium TSB-N (10mg/L) (Uji Pendahuluan).....                                    | 53      |
| 8. Kurva pertumbuhan konsorsium bakteri pereduksi nitrat pada medium B-12 (uji pendahuluan).....  | 54      |
| 9. Hasil uji pendahuluan pengukuran penurunan konsentrasi nitrat di medium TSB-N (10 mg/L) .....  | 54      |
| 10. Morfologi isolat-isolat konsorsium bakteri dengan pewarnaan Gram.....   | 55      |
| 11. Hasil analisis ragam (ANOVA) parameter penurunan konsentrasi nitrat dan peningkatan densitas sel antarperlakuan pada medium uji .....     | 56      |
| 12. Hasil uji BNJ (Beda Nyata Jujur) parameter penurunan konsentrasi nitrat dan peningkatan densitas sel antarperlakuan dalam medium uji..... | 57      |
| 13. Nilai dan persamaan regresi densitas sel terhadap penurunan konsentrasi nitrat medium .....   | 58      |

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Waduk Sutami merupakan salah satu perairan menggenang yang terletak di Desa Karangates, Kecamatan Sumberpucung, Kabupaten Malang, Jawa Timur; tepatnya di Sungai Brantas  $\pm$  14 km di hilir Bendungan Sengguruh dan  $\pm$  35 km ke selatan dari kota Malang. Waduk Sutami memiliki beberapa fungsi antara lain sebagai pengendali banjir, pembangkit tenaga listrik, irigasi, pariwisata, perikanan darat, dan sebagai bahan baku air minum; sehingga kestabilan ekosistem di perairan tersebut harus selalu terjaga (Soedarti, dkk., 2006; Jasa Tirta., 2007).

Soekistijono (2005) menjelaskan bahwa dalam beberapa tahun terakhir terdapat beberapa permasalahan yang terjadi di Waduk Sutami, khususnya adalah fenomena eutrofikasi serta peledakan populasi (*blooming*) mikroalga. Data hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Retnaningdyah dkk (2002) serta Samino dan Retnaningdyah (2006) menunjukkan bahwa pada tahun 2002 serta 2004 hingga bulan Maret 2006 kualitas perairan Waduk Sutami termasuk dalam kategori perairan eutrofik. Hal ini diindikasikan oleh data berupa konsentrasi nitrat yang terus meningkat. Pada tahun 2002 konsentrasi nitrat berkisar 0,639-0,966 mg/L. Kadar nitrat tersebut meningkat pada bulan Nopember hingga Desember 2004 (0,64-11,07 mg/L), sedangkan pada tahun 2005 berkisar 0,325-10,197 mg/L. Pada pengamatan antara bulan Januari sampai Maret 2006 konsentrasi nitrat rata-rata berkisar 1,579-5,191 mg/L .

Eutrofikasi adalah sebuah fenomena terakumulasinya konsentrasi berbagai nutrisi di suatu perairan. Hal itu menyebabkan tumbuhnya biomassa khususnya mikroalga dan makrofita ekuatik secara berlebihan, terutama karena tersedianya fosfat ( $\text{PO}_3^-$ ) dan nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) dalam konsentrasi yang tinggi (Marganof, 2007)

Konsentrasi nitrat air Waduk Sutami pada tahun 2005 berkisar 0,325-10,197 mg/L. Kisaran konsentrasi nitrat tersebut dapat menyebabkan timbulnya beberapa permasalahan seperti *blooming* mikroalga seperti *Microcystis* spp. Peledakan populasi *Microcystis* spp. dapat menyebabkan rendahnya kadar oksigen terlarut. Selain itu *Microcystis* spp. memiliki kemampuan menghasilkan senyawa toksik (microcystin). Oleh karena itu peledakan populasi *Microcystis* spp. dapat

menyebabkan organisme lain seperti beberapa jenis ikan mengalami kematian (Samino dan Retnaningdyah, 2006). Berdasarkan hal tersebut maka perlu dilakukan suatu upaya menurunkan kandungan nitrat melalui teknologi bioremediasi dengan memanfaatkan bakteri.

Teknologi bioremediasi ini dilakukan dengan memanfaatkan mikroorganisme *denitrifier* (pelaku denitrifikasi) yang diisolasi dari Waduk Sutami. Bakteri *denitrifier* hasil isolasi dari Waduk Sutami diharapkan dapat menurunkan konsentrasi nitrat dengan lebih efektif, efisien dan aman bagi ekosistem perairan tersebut. Piñar, *et.al* (1997) menjelaskan bahwa pemanfaatan bakteri *denitrifier in situ* dalam mereduksi nitrat pada ekosistem tertentu adalah cukup efektif serta aman bagi ekosistem tersebut. Cébron, *et.al* (2003) dan Heylen, *et.al* (2006) menjelaskan bahwa diversitas bakteri yang berpotensi mereduksi nitrat di lingkungan perairan adalah cukup tinggi. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pertumbuhan serta potensi konsorsium bakteri pereduksi nitrat secara *ex situ*.

## 1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka penelitian ini dirancang untuk menjawab beberapa permasalahan berikut:

1. Bagaimana asosiasi antarisolat dalam konsorsium bakteri pereduksi nitrat yang diisolasi dari Waduk Sutami ?
2. Bagaimana pola pertumbuhan konsorsium bakteri pereduksi nitrat dalam medium TSB dengan variasi konsentrasi nitrat 0, 5, 10, 20 mg/L dan dalam medium B-12 (N-100 mg/L)?
3. Bagaimana potensi konsorsium bakteri yang diisolasi dari Waduk Sutami dalam mereduksi nitrat dalam medium TSB dengan variasi konsentrasi nitrat 0, 5, 10, 20 mg/L dan dalam medium B-12 (N-100 mg/L)?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk:

1. Mengetahui asosiasi antarisolat konsorsium bakteri pereduksi nitrat yang diisolasi dari Waduk Sutami.
2. Mengetahui pola pertumbuhan konsorsium bakteri pereduksi nitrat dalam medium TSB dengan variasi konsentrasi nitrat 0, 5, 10, 20 mg/L dan dalam medium B-12 (N-100 mg/L).
3. Mengetahui potensi konsorsium bakteri pereduksi nitrat yang diisolasi dari Waduk Sutami dalam medium TSB dengan variasi

konsentrasi nitrat 0, 5, 10, 20 mg/L dan dalam medium B-12 (N-100 mg/L).

#### **1.4 Manfaat Penelitian**

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk memperoleh kombinasi terbaik dari beberapa mikroorganismenya pereduksi nitrat yang dapat diaplikasikan secara efektif dalam mereduksi nitrat di perairan tawar, sehingga pada akhirnya dapat membantu pemerintah dalam bidang teknologi perlindungan lingkungan perairan tawar. Produk tersebut diharapkan berdaya dan berhasil guna, murah serta dapat diadopsi oleh pengelola perairan.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Waduk Sutami dan Beberapa Permasalahan Terkait

Beberapa waduk di antaranya Waduk Lahor, Selorejo, Wlingi Raya, dan Sutami (Karangkates) dibangun di sepanjang sungai Brantas guna memanfaatkan potensi yang ada pada aliran air sungai tersebut (peta lokasi pada lampiran 2). Karakteristik kualitas air Waduk Sutami pada dasarnya dipengaruhi oleh sumber-sumber air yang mengalir ke waduk tersebut seperti Sungai Metro, Brantas, dan Lesti. Waduk tergolong jenis ekosistem terbuka sehingga kondisi waduk sangat dipengaruhi oleh lingkungan. Pengaruh utama lingkungan adalah pemasukan nutrisi dari luar perairan. Nutrisi dari luar yang banyak mempengaruhi kondisi waduk adalah fosfat dan nitrat (Smith, 1990; Harper, 1992; Perum Jasa Tirta I Malang, 2002 dalam Rosyidah, 2005; Soedarti, dkk., 2006; Jasa Tirta, 2007).

Hasil kajian awal Puslitbang SDA, Dep. Kimpraswil, juga menunjukkan bahwa Waduk Sutami telah mengalami eutrofikasi yang diindikasikan dengan tumbuhnya ganggang atau algae dalam jumlah melimpah akibat tingginya kandungan nutrisi (fosfat dan nitrat) yang terakumulasi di perairan waduk (Perum Jasa Tirta I Malang, 2002). Gejala eutrofikasi di perairan waduk biasanya ditunjukkan dengan melimpahnya konsentrasi unsur hara dan perubahan parameter kimiawi seperti oksigen terlarut (DO), kandungan klorofil-a, turbiditas, dan produktivitas primer. Hal ini berdampak pada terjadinya peningkatan konsentrasi biomassa di bagian epilimnion waduk serta tingginya laju pengendapan alga ke bagian dalam kolom air, sehingga menjadikan kondisi anaerob pada daerah hipolimnion. Meningkatnya unsur hara di waduk akan meningkatkan biomassa jenis produsen seperti mikroalga tetapi akan menurunkan jenis konsumen. Salah satu contohnya adalah melimpahnya alga yang biasa didominasi oleh *blue green algae* (alga biru-hijau) serta berkembangnya gulma air. Fenomena eutrofikasi juga berdampak terhadap meningkatnya jumlah kematian ikan dan sulitnya pengolahan air untuk air minum. Kondisi ini pernah terjadi di daerah sub-tropis pada alga jenis *Mycrocystis* spp. yang mensekresikan endotoksin dan eksotoksin (*Mycrocystin*) yang bersifat toksik bagi saraf serta hepar, sehingga dapat mengakibatkan kematian hewan-hewan ternak (Kurmayer *et al.*, 2003).

Marganof (2007) menjelaskan bahwa ada enam indikator utama yang dapat dipakai untuk mendeteksi terjadinya eutrofikasi di suatu perairan tawar, yakni: 1) menurunnya konsentrasi oksigen terlarut di zone hipolimnotik, 2) meningkatnya konsentrasi unsur hara, 3) meningkatnya padatan tersuspensi, terutama bahan organik, 4) bergantinya populasi fitoplankton yang dominan dari kelompok diatomeae kepada kelompok *chlorophyceae*, 5) meningkatnya konsentrasi fosfat dan nitrat, 6) menurunnya penetrasi cahaya (meningkatnya kekeruhan). Kondisi perairan tawar berdasarkan kandungan hara dapat diklasifikasikan menjadi tiga kategori, yaitu waduk eutrofik, oligotrofik, dan mesotrofik. Waduk eutrofik (kadar hara tinggi) merupakan waduk dangkal, tumbuhan litoral melimpah, kepadatan plankton lebih tinggi, sering terjadi *blooming* alga dengan tingkat penetrasi cahaya matahari umumnya rendah. Waduk oligotrofik adalah waduk dengan kadar hara rendah, merupakan waduk yang cukup dalam, dengan bagian hipolimnion lebih besar dibandingkan dengan bagian epilimnion. Semakin dalam suatu waduk maka tingkat kesuburan semakin rendah, tumbuhan litoral jarang dan kepadatan plankton rendah dengan jumlah spesies yang banyak. Waduk mesotropik merupakan waduk dengan kadar nutrien sedang, merupakan peralihan antara kedua sifat waduk eutrofik dan oligotrofik. Tingkat *trofik* (kesuburan) suatu waduk juga dapat dinyatakan berdasarkan biomassa fitoplankton, kandungan total nitrogen (TN) dan total fosfat (TP), seperti disajikan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Klasifikasi tingkat kesuburan perairan waduk

| Tipe trofik | Biomassa fitoplankton<br>(mg.C/m <sup>3</sup> ) | TN (µg/l)   | TP (µg/l) |
|-------------|---|-------------|-----------|
| Oligotrofik | 20 – 100  | < 250       | < 5       |
| Mesotrofik  | 100 – 300                                       | 250 - 600   | 5 - 10    |
| Eutrofik    | > 300   | 500 - 1100  | 10 - 30   |
| Hipertrofik | –   | 500 - 15000 | 30 - 5000 |

Keterangan : TN = Total Nitrogen; TP = Total fosfat; (-) = tersedia dalam jumlah yang melimpah (Marganof, 2007).

Menurut Palmer dan Roy (2001) ada lima kategori kondisi suatu perairan tawar berdasarkan pada kandungan fosfat dan klorofil, yaitu: 1) Ultraoligotrofik, dengan fosfat total sebesar  $\leq 0,004$  mg/L dan kandungan klorofil sebesar  $\leq 0,001$  mg/L. 2) Oligotrofik, dengan fosfat

total sebesar  $\leq 0,01$  mg/L dan kandungan klorofil sebesar  $\leq 0,0025$  mg/L. 3) Mesotrofik, dengan fosfat total sebesar  $0,01 - 0,035$  mg/L dan kandungan klorofil sebesar  $0,0025 - 0,008$  mg/L. 4) Eutrofik, dengan fosfat total sebesar  $0,035 - 0,1$  mg/L dan kandungan klorofil sebesar  $0,008 - 0,025$  mg/L. 5) Hipereutrofik, dengan fosfat total sebesar  $\geq 0,1$  mg/L dan kandungan klorofil sebesar  $\geq 0,025$  mg/L.

Ratcliffe (1977 *cit.* Palmer dan Roy 2001) menjelaskan ada empat kategori kondisi perairan tawar berdasarkan kandungan  $\text{CaCO}_3$  dan pH, yaitu: 1) Distrofik, dengan kandungan  $\text{CaCO}_3$  sebesar  $0,2$  mg/L dan pH kurang dari 6. 2) Oligotrofik, dengan kandungan  $\text{CaCO}_3$  sebesar  $0,10$  mg/L dan pH  $6 - 7$ . 3) Mesotrofik, dengan kandungan  $\text{CaCO}_3$  sebesar  $10 - 30$  mg/L dan pH sekitar 7. 4) Eutrofik, dengan kandungan  $\text{CaCO}_3$  lebih dari  $30$  mg/L dan pH lebih dari 7.

Hasil penelitian Soedarti, dkk (2006) menjelaskan bahwa, dari hasil pengukuran parameter fisikokimiawi air pada sampel perairan Waduk Sutami Malang menunjukkan rata-rata temperatur pada seluruh stasiun penelitian berkisar  $27-28,4^\circ\text{C}$  dan pH berkisar  $6,6-8$ . Temperatur yang optimum bagi produktivitas fitoplankton adalah berkisar  $25-30^\circ\text{C}$  sedangkan pH yang optimum bagi produktivitas fitoplankton adalah  $7-8$  (Soedarti, dkk., 2006).

Kadar oksigen pada sampel air Waduk Sutami di semua lokasi berkisar  $6,7$  hingga  $7,5$  mg/L (Soedarti, dkk., 2006). Menurut Hammer (1996) kadar oksigen terlarut yang optimum di perairan tawar adalah lebih dari tujuh miligram per liter. Oksigen dapat menjadi faktor pembatas bagi kehidupan organisme di suatu perairan jika kadarnya kurang dari kadar optimum. Berkurangnya kadar oksigen di suatu perairan dapat disebabkan oleh terjadinya pencemaran lingkungan di tempat tersebut. Hal ini dikarenakan kadar oksigen yang terlarut di dalam air digunakan oleh mikroorganisme untuk memecah atau mendegradasi sampah organik sehingga menjadi bahan yang mudah menguap yang biasanya ditandai oleh bau busuk seperti fenomena *Blooming Microcystis* spp.

Hasil penelitian Samino dan Retnaningdyah (2004) menunjukkan bahwa perairan Waduk Sutami telah tercemar oleh bahan organik. Hal tersebut ditandai dengan nilai BOD dan COD yang relatif tinggi. Pada tahun 2002 kadar BOD berkisar  $7,147 - 46,183$  mg/L dan kadar COD berkisar  $21,531 - 114,055$  mg/L. Kadar BOD Waduk Sutami pada waktu pantau 2004 berkisar  $4,3 - 9,6$  mg/L sedangkan kadar COD berkisar  $10,19 - 27,23$  mg/L. Pada tahun 2005 kadar BOD berkisar  $3,9 - 27,4$

mg/L dan kadar COD berkisar 12,4 - 106,4 mg/L. Pada waktu pantau bulan Januari sampai Maret 2006 kadar BOD Waduk Sutami berkisar 5,4 - 9,2 mg/L, sedangkan kadar COD berkisar 17,1-28,3 mg/L.

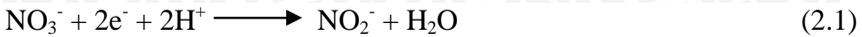
Pencemaran bahan organik juga dapat ditunjukkan dari hasil perhitungan Indeks pencemaran *Implisit Prati's* yang pada tahun 2002, 2004, dan 2005. Nilai indeks yang berkisar 1,36 - 2,80 (tahun 2004) termasuk dalam kategori dapat ditolerir (*Acceptable*). Nilai indeks berkisar 2,59 - 3,52 (tahun 2005) termasuk dalam kategori tercemar ringan (*Slightly polluted*). Sedangkan nilai indeks berkisar 1,71 - 8,24 (untuk tahun 2002) dan 1,92 - 8,37 (untuk tahun 2005- maret 2006) termasuk dalam kategori tercemar berat (*Heavily polluted*).

## 2.2 Bakteri Pereduksi Nitrat

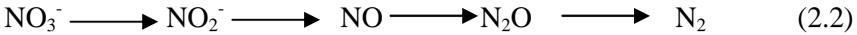
Metode reduksi kadar nutrien secara biologis telah menarik banyak perhatian dibandingkan dengan metode secara kimiawi. Hal ini disebabkan oleh mahalnya biaya metode kimiawi tersebut serta banyaknya sisa (residu) hasil proses secara kimiawi. Reduksi nutrien secara biologis dapat digolongkan menjadi tiga kategori berdasarkan habitat dari mikroorganisme pelaku, yaitu: anaerobik, *anoxic*, dan aerobik. Untuk mekanisme anaerobik, sebagai contoh adalah bakteri pengakumulasi fosfat. Fenomena denitrifikasi serta pemanfaatan fosfat dapat menjadi contoh untuk kondisi *anoxic*, sedangkan sebagai contoh untuk kondisi aerob adalah beberapa mekanisme nitrifikasi oleh sebagian bakteri pelaku denitrifikasi (Ramohtokang, *et al.*, 2006).

Pada kondisi *anoxic* nitrat merupakan senyawa yang cukup potensial untuk menggantikan peran oksigen dalam rangka menjaga keberlangsungan proses respirasi di dalam sel (Piñar, *et.al.* 1997). Paustian (2000) menjelaskan bahwa pada umumnya bakteri memiliki kemampuan untuk memfungsikan segala jenis atom maupun senyawa penerima elektron (*terminal electron acceptors*) selain dari oksigen.

Proses yang berlangsung di dalam sel bakteri pada kondisi *anoxic* dengan memanfaatkan nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) sebagai pengganti oksigen dikenal dengan proses reduksi nitrat. Dalam proses tersebut terjadi transfer sebanyak dua elektron melalui *Quinone pool* kemudian *cytochrome b/c<sub>1</sub> complex*, yang selanjutnya enzim nitrat reduktase berperan dalam transpor proton melalui membran, sehingga hasil yang diperoleh adalah perubahan nitrat menjadi nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) (Paustian, 2000).



Nitrit yang merupakan hasil dari proses reduksi nitrat masih merupakan molekul yang berpotensi tinggi teroksidasi, dan bahkan dapat menerima lebih dari enam elektron sebelum tereduksi sempurna menjadi gas nitrogen. Oleh karena itu hingga tahap ini ( $\text{NO}_3^-$  menjadi  $\text{NO}_2^-$ ) proses denitrifikasi belum berjalan sempurna.



Denitrifikasi merupakan konversi biologis senyawa nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) menjadi nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ), *nitrous oxide* ( $\text{N}_2\text{O}$ ) dan molekul nitrogen ( $\text{N}_2$ ). Proses biologis dalam reduksi konsentrasi nitrat yang tinggi (denitrifikasi) dijalankan secara teratur dan bertahap oleh beberapa bakteri fakultatif anaerob maupun bakteri aerob. Hal tersebut disebabkan oleh beberapa gas yang terbentuk antara  $\text{NO}_3^-$  hingga  $\text{N}_2$  bersifat toksik terhadap mekanisme metabolisme sel (Piñar, *et.al.* 1997; Paustian, 2000; Takaya, *et al.*, 2003; Ramothokang, *et al.*, 2006; Li, 2007).

Mekanisme denitrifikasi dapat berlangsung dengan dua tipe, tipe pertama yaitu *assimilatory* yang berarti mengambil nutrisi dari tanah kemudian ditransfer ke sel untuk dimanfaatkan dalam biosintesis makromolekul. Tipe kedua adalah *dissimilatory* yang berarti menggunakan substrat sebagai tempat untuk menampung elektron dan kemudian mengumpulkan energi (Paustian, 2000).

Total elektron yang dibutuhkan untuk proses denitrifikasi (dari  $\text{NO}_3^-$  hingga menjadi  $\text{N}_2$ ) adalah sebanyak delapan elektron. Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) merupakan wujud sumber nitrogen terbesar di biosfer setelah gas  $\text{N}_2$  di atmosfer serta sumber nitrogen yang paling banyak digunakan oleh organisme hidup termasuk tumbuhan tingkat tinggi, algae, fungi, dan bahkan bakteri. Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) merupakan senyawa yang belum stabil (masih dapat menerima elektron dalam jumlah banyak). *Nitric oxide* ( $\text{NO}$ ) merupakan gas yang belum stabil yang sewaktu-waktu dapat keluar dari sel,  $\text{NO}$  juga berkontribusi dalam hal terjadinya efek rumah kaca (*greenhouse effect*) serta dalam hal pemanasan global (*global warming*). *Nitrous oxide* ( $\text{N}_2\text{O}$ ) merupakan gas yang masih bersifat kurang stabil karena dapat merusak lapisan stratosfer maupun troposfer pada ozon dan masih berpotensi toksik walaupun tidak terlalu berbahaya sebagaimana gas  $\text{NO}$  (Hamer, 1997; Paustian, 2000; Li, 2007). Hamer (1997) menjelaskan bahwa ketersediaan  $\text{O}_2$  dan kondisi pH rendah

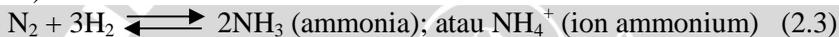
merupakan dua faktor utama yang menyebabkan terbentuknya N<sub>2</sub>O pada saat proses denitrifikasi. Beberapa jenis bakteri yang telah diketahui memiliki potensi dalam hal mereduksi nitrat adalah *Paracoccus species*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodobacter sphaeroides* (Paustian, 2000), *Paracoccus denitrificans* (Blaszczyk, 1993), *Klebsiella oxytoca* CECT860, *Klebsiella pneumoniae* 50231, *Klebsiella planticola* CECT843, *Escherichia coli* ET8000 (Piñar, *et.al.*, 1997). Beberapa contoh konsorsium bakteri pereduksi nitrat adalah *Pseudomonas stutzeri* dengan *Arthobacter* sp. (Shete, *et.al.*, 2008), *Paracoccus denitrificans* dengan isolat bakteri pendegradasi Fe(0) (Dejournal and Alvarez, 2000), *Alcaligenes* dengan *Corynebacterium*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. dan *Micrococcus* sp. (Chitra and Lakshmanaperumalsamy, 2006). Thauer, *et al.* (1977) dalam Britain, *et al.* (1992) menjelaskan (Tabel 2.2) bahwa berdasarkan jumlah energi yang dihasilkan dari reaksi penerimaan elektron, oksigen merupakan molekul yang paling besar menghasilkan energi. Kemudian reaksi reduksi nitrat menjadi N<sub>2</sub>, selanjutnya reduksi nitrat menjadi ammonia, reduksi sulfat menjadi *sulphide*, dan reduksi karbondioksida menjadi methana yang hanya menghasilkan 14% dari total reaksi penerimaan elektron oleh oksigen.

Tabel 2.2 Beberapa contoh reaksi senyawa anorganik penerima elektron

| No. | Reaksi  | Energi yang dibutuhkan (kJ/mol) | Energi dihasilkan (kJ/mol) |
|-----|---|---------------------------------|----------------------------|
| 1   | $O_2 + 2H_2 \rightarrow 2H_2O$                    | 475                             | 238                        |
| 2   | $2NO_3 + 2H^+ + 5H_2 \rightarrow N_2 + 6H_2O$     | 1125                            | 225                        |
| 3   | $NO_3^- + 2H^+ + 4H_2 \rightarrow NH_4^+ + 3H_2O$ | 602                             | 150                        |
| 4   | $SO_4^{2-} + H^+ + 4H_2 \rightarrow SH^- + 4H_2O$ | 153                             | 38                         |
| 5   | $HCO_3^- + 4H_2 + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$   | 136                             | 34                         |

Nitrogen di perairan terdapat dalam bentuk gas N<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>3</sub> dan NH<sub>4</sub><sup>+</sup> serta sejumlah N yang berikatan membentuk senyawa organik kompleks. Sumber nitrogen terbesar (sekitar 80%) berasal dari udara, dalam bentuk nitrogen bebas yang masuk melalui sistem fiksasi biologis dalam kondisi aerob. Keberadaan nitrogen di perairan dapat berupa nitrogen anorganik maupun organik. Nitrogen anorganik terdiri atas ion

nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ), ion nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ), ammonia ( $\text{NH}_3$ ), ion ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) dan molekul  $\text{N}_2$  yang terlarut dalam air, sedangkan nitrogen organik berupa protein, asam amino, dan urea akan mengendap dalam air. Bentuk-bentuk nitrogen tersebut mengalami transformasi (yang sebagian besar melibatkan mekanisme mikrobiologis) sebagai bagian dari siklus nitrogen. Transformasi nitrogen secara mikrobiologis mencakup beberapa hal berikut (Li, 2007) : 1) Asimilasi nitrogen anorganik (nitrat dan ammonium) oleh tumbuhan dan mikroorganisme (bakteri autotrof) untuk membentuk nitrogen organik misalnya asam amino dan protein. 2) Fiksasi gas nitrogen menjadi ammonia dan nitrogen organik oleh mikroorganisme. Fiksasi gas nitrogen secara langsung dapat dilakukan oleh beberapa jenis alga *Cyanophyta* (alga biru) dan bakteri.



Ion ammonium yang tidak berbahaya adalah bentuk nitrogen hasil hidrolisis ammonia yang berlangsung dalam kesetimbangan seperti reaksi berikut:



Kondisi pada pH tinggi (suasana basa) akan menyebabkan ion ammonium menjadi ammonium hidroksida yang tidak berdisosiasi dan bersifat racun. 3) Nitrifikasi yaitu oksidasi ammonia menjadi nitrit dan nitrat dapat dilakukan oleh bakteri aerob. Nitrifikasi berjalan secara optimum pada pH 8 dan berkurang secara nyata pada pH < 7.



Hasil oksidasi tersebut sangat reaktif dan mudah larut, sehingga dapat langsung digunakan dalam proses biologis. 4) Amonifikasi nitrogen organik untuk menghasilkan ammonia selama proses dekomposisi bahan organik. Proses ini banyak dilakukan oleh mikroorganisme yang membutuhkan oksigen untuk mengubah senyawa anorganik menjadi karbondioksida. Selain itu, autolisis atau pecahnya sel dan ekskresi ammonia oleh zooplankton dan ikan juga berperan sebagai pemasok ammonia. 5) Denitrifikasi yaitu proses reduksi senyawa nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) menjadi nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ), kemudian *nitrous oxide* ( $\text{N}_2\text{O}$ ) dan molekul nitrogen ( $\text{N}_2$ ) yang berjalan optimum pada kondisi *anoxic* (tak ada oksigen) maupun pada kondisi aerob (Takaya, *et al.*, 2003). *Nitrous oxide* ( $\text{N}_2\text{O}$ ) adalah produk utama dari denitrifikasi pada perairan

dengan kadar oksigen sangat rendah, sedangkan molekul nitrogen ( $N_2$ ) adalah produk utama dari proses denitrifikasi pada kondisi anaerob. Ramothokang, *et al.* (2006) menambahkan bahwa pada kondisi pH rendah proses denitrifikasi akan tetap dapat berlangsung walaupun bukan pada kondisi *anoxic*.

### 2.3 Asosiasi Bakteri

Seluruh mikroorganisme di lingkungan senantiasa berkelompok dengan sesama jenis membentuk populasi hingga membentuk suatu komunitas dari sejumlah populasi yang berbeda. Mikroorganisme dapat berasosiasi dengan organisme lain secara fisik melalui dua mekanisme, yaitu keberadaan suatu organisme yang umumnya memiliki ukuran lebih kecil (sebagai *ectosymbiont*) pada permukaan luar organisme lainnya yang umumnya berukuran lebih besar, hal tersebut biasa dikenal dengan istilah *ectosymbiosis*. Mekanisme lainnya adalah keberadaan suatu organisme yang umumnya memiliki ukuran lebih kecil (sebagai *endosymbiont*) pada bagian dalam organisme lain, yang dikenal dengan istilah *endosymbiosis* (Prescott, 2003).

Interaksi pada skala bakteri dikenal pula dengan istilah asosiasi. Istilah asosiasi dapat digunakan untuk mendeskripsikan suatu interaksi fisik diantara bakteri. Asosiasi antibakteri pada lingkungan perairan adalah cukup kompleks yang membentuk struktur yang berlapis dengan penampakan formasi yang mirip serta mekanisme fisiologis yang saling melengkapi. Mekanisme asosiasi, tidak selalu menghasilkan pertukaran informasi diantara mikroorganisme tersebut. Secara umum, asosiasi diklasifikasikan menjadi dua bagian, yakni asosiasi yang sifatnya positif (mutualisme, syntrofisme, protokooperasi, komensalisme, dan konsorsium), maupun negatif (predasi, parasitisme, amensalisme, dan kompetisi) (Prescott, 2003).

Mutualisme merupakan suatu jenis asosiasi yang akan membuahkan keuntungan (atau saling menguntungkan) bagi kedua mikroorganisme yang berinteraksi. Jenis interaksi yang berlangsung adalah interaksi yang sifatnya obligat bagi masing-masing mikroorganisme, yaitu suatu interaksi yang saling menggantungkan pada yang lain. Sebagai contoh adalah Lichens yang merupakan hasil interaksi mutualisme dari jenis Ascomycetes spesifik serta genus tertentu dari filum Cyanobacteria (alga biru hijau) (Prescott, 2003).

Syntrofisme merupakan jenis asosiasi yang pertumbuhan salah satu dari dua mikroorganisme yang saling berinteraksi tergantung atau bahkan dapat lebih tersokong dengan adanya nutrisi, substrat, maupun faktor-faktor penyokong pertumbuhan yang disediakan oleh mikroorganisme lainnya. Tipe interaksi ini termasuk kedalam tipe mutualisme dan juga dikenal sebagai tipe “*cross feeding*” serta “*satellite phenomenon*” (Prescott, 2003).

Protokooperasi merupakan jenis asosiasi yang mirip dengan tipe mutualisme, tetapi dengan tanpa adanya keterikatan/ketergantungan (obligasi) antara mikroorganisme yang saling berinteraksi. Dengan demikian jika salah satu nutrisi penting bagi masing-masing mikroorganisme telah tersedia di media (lingkungan tumbuh) maka masing-masing mikroorganisme tersebut akan melangsungkan metabolisme secara independen. Sebagai contoh dalam hal ini adalah fenomena asosiasi yang terjadiantara *Desulfovibrio* dengan *Chromatium* yang menggabungkan siklus karbon dengan siklus sulfur (Prescott, 2003).

Komensalisme merupakan jenis asosiasi yang menyebabkan untungnya salah satu mikroorganisme (commensal) sedangkan yang lainnya tidak mengalami kerugian dan tidak pula memiliki kontribusi terhadap keuntungan tersebut. Sebagai contoh adalah proses nitrifikasi, tepatnya pada proses oksidasi ion amonia menjadi nitrit oleh *Nitrosomonas* yang selanjutnya akan dimanfaatkan oleh *Nitrobacter* untuk mengoksidasi nitrit menjadi nitrat (Prescott, 2003).

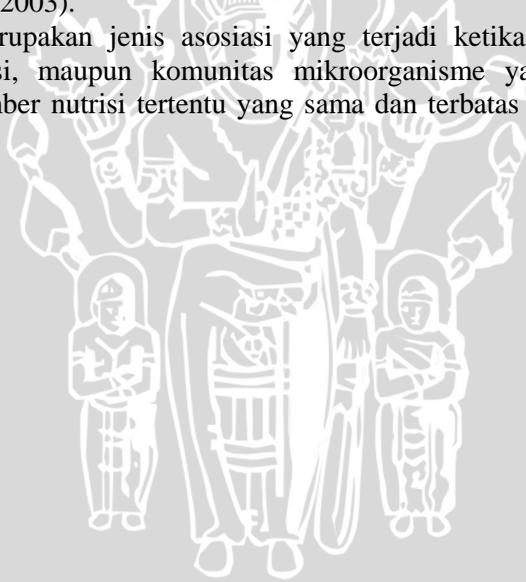
Konsorsium merupakan jenis asosiasi yang saling menguntungkan bagi mikroorganisme pelaku, serta saling bekerja sama untuk melakukan suatu aktivitas yang saling menguntungkan yang tidak dapat terwujud jika diselesaikan secara individualis. Konsorsium jauh lebih luas daripada syntrofisme, dikarenakan konsorsium tidak terbatas hanya pada kerja sama saling menguntungkan dalam hal ketersediaan nutrisi namun juga dalam hal yang lain seperti penurunan kadar suatu senyawa yang berlebih yang ada di habitat hidup mikroorganisme tersebut (Sanchez, 2006).

Predasi merupakan jenis asosiasi yang negatif dengan mekanisme memakan maupun membunuh satu mikroorganisme terhadap mikroorganisme lainnya, hal ini akan berdampak kerugian terhadap salah satu mikroorganisme dan keuntungan bagi yang lain. Diantara contoh jenis bakteri yang bersifat predator bagi bakteri lainnya adalah *Bdellovibrio*, *Vampirococcus*, serta *Daptobacter* (Prescott, 2003).

Parasitisme merupakan jenis asosiasi yang cukup kompleks dan memiliki perbedaan kecil terhadap tipe predasi. Pada tipe ini, salah satu mikroorganisme mendapatkan keuntungan dari mikroorganisme lain (bisa dengan pengambilan nutrisi maupun perawatan fisik sel) sedangkan mikroorganisme inang tersebut biasanya mengalami kerugian. Dalam tipe ini pula ada tingkatan koeksistensi organisme terhadap host, hal ini bergantung pada mekanisme pertahanan yang ada pada masing-masing mikroorganisme sehingga bagi mikroorganisme yang awalnya berstatus sebagai host tidak tertutup kemungkinan akan berbalik terus menerus memparasiti hingga bersifat patogen dan berubah status menjadi predator bagi yang lainnya. Sebagai contoh adalah *Rizhophyidium sphaerocarpum* (yang merupakan parasit bagi fungi) terhadap alga *Spyrogyra* (Prescott, 2003).

Amensalisme merupakan jenis asosiasi yang menyebabkan kerugian pada salah satu mikroorganisme yang disebabkan oleh mikroorganisme lainnya (Prescott, 2003).

Kompetisi merupakan jenis asosiasi yang terjadi ketika ada dua individu, populasi, maupun komunitas mikroorganisme yang ingin mendapatkan sumber nutrisi tertentu yang sama dan terbatas (Prescott, 2003).



## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Pebruari 2008 hingga bulan Oktober 2008. Uji karakterisasi dan asosiasi antarisolat bakteri pereduksi nitrat serta uji potensi konsorsium bakteri pereduksi nitrat dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

### 3.2 Sumber Isolat

Isolat-isolat bakteri pereduksi nitrat diperoleh dari Waduk Sutami yang diisolasi oleh peneliti terdahulu. Kode Isolat-isolat bakteri tersebut adalah DR-14, DR-27-1, DU-30-1, DU-30-2, TA-8, DU-27-4.

### 3.3 Peremajaan Isolat

Isolat-isolat bakteri yang digunakan pada penelitian ini masing-masing diremajakan dengan menggosokkan satu oose bakteri ke dalam medium TSA (*Trypticase Soy Agar*) miring. Inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu ruang. Tujuan dari langkah tersebut adalah untuk mendapatkan koloni-koloni bakteri dalam fase vegetatif.

### 3.4 Karakterisasi Bakteri Pereduksi Nitrat

Uji karakter morfologis, fisiologis, dan biokimiawi isolat-isolat untuk konsorsium ini dilakukan untuk mengetahui beberapa karakter dasar spesifik dari masing-masing isolat konsorsium. Uji-uji tersebut meliputi: Pengamatan sel, Uji Biokimiawi, serta Uji fisiologis.

#### 3.4.1 Pengamatan sel

**Pewarnaan Gram.** Akuades steril ditetaskan pada gelas obyek yang sebelumnya telah dibersihkan dengan etanol 70%. Selanjutnya ditambahkan satu oose biakan berumur 24 jam kemudian diratakan pada permukaan gelas obyek sekitar 1,5 x 1,5 cm<sup>2</sup>. Preparat difiksasi di atas

api bunsen kemudian digenangi dengan cat Gram A (kristal violet) selama 1 menit. Sisa cat dibuang kemudian preparat dialiri dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Preparat selanjutnya digenangi dengan cat Gram B (iodin) selama 0,5-1 menit. Selanjutnya suspensi cat gram B dibuang dan preparat dialiri air mengalir. Preparat ditetesi dengan cat Gram C (etanol) sampai warna cat tepat terlunturkan ( $\pm 30$  detik). Sisa cat dibuang, preparat dialiri air mengalir kemudian dikeringanginkan. Preparat kemudian digenangi dengan cat Gram D (safranin) selama 1-2 menit. Sisa cat dibuang kemudian preparat dikeringanginkan. Preparat diamati pada perbesaran mikroskop 1000x untuk mengetahui karakter morfologi sel bakteri (Cappucino dan Sherman, 2005).

**Pengukuran dan pengamatan bentuk sel (Benson, 2002).** Sel bakteri yang diamati dibawah mikroskop binokuler (OLYMPUS) pada perbesaran 1000x diukur dengan mikrometer okuler yang telah dikalibrasi dengan mikrometer objektif. Nilai kalibrasi ditentukan dengan rumus:

$$\frac{\text{Skala mikrometer obyektif} \times 0,01 \text{ mm}}{\text{Skala mikrometer okuler}} \quad (3.1)$$

**Keterangan: 1 skala mikrometer okuler = 0.0025 mm = 2,5  $\mu$ m.**

Mikrometer objektif kemudian dilepas, selanjutnya preparat pewarnaan gram diletakkan pada meja objek, kemudian diukur panjang sel pada preparat tersebut dengan menggunakan mikrometer okuler pada perbesaran 1000x. Panjang sel bakteri yang sesungguhnya dapat diketahui dengan rumus:

$$\text{Nilai Kalibrasi (mm)} \times \text{panjang sel (skala okuler)} \quad (3.2)$$

**Pewarnaan endospora.** Dilakukan dengan cara membuat apusan sel bakteri pada gelas obyek, kemudian dilakukan fiksasi. Selanjutnya apusan bakteri tersebut digenangi dengan pewarna malakit hijau serta dipanaskan diatas uap air dari hasil rebusan air yang mendidih selama sepuluh menit dan dijaga agar pewarna malakit hijau tersebut tidak mengering. Kemudian didiamkan hingga suhu pada gelas obyek kembali normal dan kelebihan pewarna malakit hijau dicuci dengan air mengalir. Preparat dikeringkan serta digenangi dengan pewarna safranin selama 1-2 menit. Selanjutnya preparat dicuci dengan air mengalir, serta dikeringanginkan. Preparat hasil pewarnaan endospora diamati dibawah mikroskop cahaya tampak dengan menggunakan perbesaran 1000 X.

### 3.4.2 Uji biokimiawi

**Uji katalase.** Dilakukan dengan cara menyediakan preparat masing-masing isolat di atas gelas objek, kemudian ditetesi 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hidrogen peroksida) sebanyak satu atau dua tetes. Selanjutnya diamati pembentukan gelembung gas yang menandakan uji tersebut adalah positif (Benson, 2002).

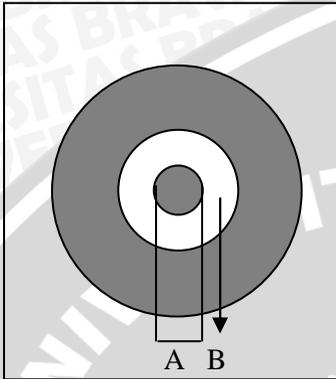
**Uji oksidase.** *Bactident oxidase* (MERCK) sebagai kit indikator aktivitas enzim oksidase ditetesi dengan kultur isolat bakteri dan diamati terjadinya perubahan warna pada kertas indikator tersebut. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna pada kertas indikator menjadi biru keunguan (Benson, 2002).

**Uji amilolitik.** Dilakukan dengan mempersiapkan medium NA (*Nutrient Agar - Oxoid*) serta 1% *starch* (pati) yang disterilisasi secara terpisah dan kemudian dicampur secara aseptis. Selanjutnya medium NA dalam keadaan cair dituang ke dalam cawan petri steril (*pour plate*) dan dibiarkan memadat. Masing-masing isolat ditotolkan pada medium yang telah memadat tersebut. Setelah isolat ditotolkan, selanjutnya medium tersebut diinkubasi pada suhu 27°C selama 24 jam kemudian diamati pertumbuhan koloni dan keberadaan zona bening di sekitar koloni yang tumbuh.

**Uji proteolitik.** Dilakukan dengan menginokulasikan masing-masing dari keenam isolat bakteri pereduksi nitrat pada medium proteolitik. Medium yang telah diinokulasikan isolat bakteri didalamnya selanjutnya diinkubasi pada suhu 27°C selama 24 jam. Visualisasi zona bening diamati di sekitar koloni yang tumbuh. Diameter zona bening yang terbentuk di sekitar koloni. Kemudian, luas koloni diukur dan dihitung nilai indeks zona bening. Indeks zona bening merupakan rasio antara luas zona bening dengan luas koloni. Isolat-isolat dengan indeks zona bening tertinggi diduga merupakan koloni yang memiliki aktivitas enzim tertinggi diantara isolat-isolat yang lain.

**Uji selulolitik.** Dilakukan dengan menginokulasikan masing-masing dari keenam isolat bakteri tersebut ke dalam medium *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) agar (Kanto Chemical Co., Inc.). Kultur selanjutnya diinkubasikan pada suhu 27°C selama 48 jam. Visualisasi zona bening dilakukan dengan menggunakan *Congo Red* (1 mg/ml) selama 15 menit, kemudian dicuci dengan NaCl 1M. Diukur diameter zona bening yang terbentuk di sekitar koloni dengan menggunakan penggaris, kemudian dihitung nilai indeks zona bening. Indeks zona bening merupakan rasio antara luas zona bening dengan luas koloni. Isolat-isolat dengan indeks

zona bening tertinggi diduga merupakan koloni yang memiliki aktivitas enzim lebih tinggi diantara isolat-isolat yang lain (Apun, *et al.* 2000).



$$\text{Indeks zona bening} = \frac{\text{Luas B}}{\text{Luas A}}$$

Keterangan :

A = koloni

B = zona bening (3.2)

**Uji Sitrat-Simon.** Dilakukan dengan mempersiapkan medium Sitrat-Simon di tabung reaksi, kemudian setelah disterilisasi masing-masing tebung reaksi tersebut dimiringkan, dibiarkan hingga memadat, dan kemudian masing-masing isolat digoreskan di medium yang telah memadat tersebut. Selanjutnya medium hasil inokulasi diinkubasi pada suhu 27°C selama 24 jam serta diamati perubahan warna medium dari hijau menjadi biru yang mengindikasikan uji positif serta kemampuan bakteri dalam menggunakan sitrat sebagai sumber karbon satu-satunya sehingga pH medium menjadi basa.

### 3.4.3 Uji fisiologis

**Uji motilitas.** Dilakukan dengan mempersiapkan medium MIO (*Motility Indole Ornithine* - SIGMA) yang merupakan jenis medium semi solid yang berfungsi untuk mengamati motilitas dari jenis bakteri tertentu. Uji motilitas dilakukan dengan menginokulasi koloni bakteri ke dalam medium MIO dengan menggunakan jarum enten yang ditusukkan kedalam medium hingga  $\pm 2/3$  dari permukaan medium, kemudian diinkubasi pada suhu ruang dan diamati pola pertumbuhan bakteri di sekitar garis jarum enten hasil inokulasi serta perubahan warna pada medium tersebut

### 3.5 Uji Asosiasi Antarisolat Bakteri Pereduksi Nitrat

Uji asosiasi antarisolat bakteri dilakukan untuk mengetahui antagonisme antarisolat bakteri pereduksi nitrat. Uji ini dilakukan dengan cara mengambil satu oose dari tiap-tiap isolat hasil peremajaan ke dalam tabung eppendorf yang berisi 0,5 ml buffer fosfat. Suspensi ini divorteks hingga homogen (komposisi tercantum pada lampiran 2, tabel 1). Sebanyak 0,1 ml suspensi tersebut diambil dan dipindahkan ke dalam cawan petri kemudian dicampur dengan medium TSA (*Trypticase Soy Agar - Oxoid*) dengan metode *metode cawan tuang* dan ditunggu hingga media memadat. Isolat bakteri lainnya yang berbeda jenis diuji interaksinya dengan cara digoreskan pada medium yang telah memadat tersebut. Medium yang telah berisi biakan tersebut selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Isolat-isolat bakteri yang dapat berasosiasi positif ditunjukkan dengan tidak terbentuknya zona hambat (antagonisme negatif) pertumbuhan antara isolat bakteri yang diinokulasikan dengan metode cawan tuang dengan isolat bakteri yang digoreskan diatas medium. Jika diantara masing-masing isolat yang digunakan untuk konsorsium tidak membentuk zona hambat maka isolat-isolat tersebut dapat digunakan untuk uji-uji berikutnya (Rahayu, 2007).

### 3.6 Uji Potensi Konsorsium Bakteri Pereduksi Nitrat

Uji potensi konsorsium bakteri pereduksi nitrat dalam mereduksi nitrat dilakukan pada dua jenis media, yaitu medium TSB (*Trypticase Soy Broth – OXOID*) +  $\text{KNO}_3$  (Li, 2007) dan medium B-12 (komposisi tercantum pada lampiran 2, tabel 3).

**Pembuatan stok nitrat.** Sumber nitrat yang digunakan pada penelitian ini adalah  $\text{KNO}_3$  (Li, 2007). Ditimbang  $\text{KNO}_3$  secukupnya, dan dimasukkan ke dalam sebuah cawan petri untuk kemudian dipanaskan pada suhu  $100^\circ\text{C}$  di oven selama 24 jam. Sebanyak 0,7218 g  $\text{KNO}_3$  tersebut dilarutkan dalam 1000 ml akuades. Pada larutan tersebut terkandung nitrat sebanyak 100 mg/L (Clesceri, *et al.*, 1989).

**Pembuatan kurva standar densitas sel bakteri konsorsium pereduksi nitrat.** Enam isolat bakteri pereduksi nitrat di remajakan pada medium TSA miring. Satu oose hasil peremajaan ini diinokulasikan ke dalam medium TSB untuk membuat stok kultur, selanjutnya diinkubasikan dalam inkubator gojog pada suhu  $27^\circ\text{C}$ ,

kecepatan 120 rpm, selama 24 jam. Sebanyak 10 % dari stok kultur diinokulasikan ke dalam medium TSB sebagai stok inokulum konsorsium. Stok inokulum ini di gojog pada kecepatan 120 rpm, 27°C, selama 24 jam. Hasil inkubasi ini selanjutnya dibuat perbandingan antara stok inokulum dengan medium TSB steril yaitu 1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, dan 1:30. Masing-masing suspensi kultur ini dilakukan perhitungan densitas sel dengan *haemocytometer* serta pengukuran kerapatan optis dengan spektrofotometer (Genesys™ 10 series) pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 600 nm dan 500 nm untuk medium B-12. Kurva standar dibuat dengan cara mencari persamaan regresi antara densitas optis dengan densitas sel bakteri. Persamaan regresi linier kurva standar diperoleh dengan membuat grafik hubungan antara densitas sel (sumbu x (absis)) dengan nilai kerapatan optis (sumbu y (ordinat)).

**Pembuatan kurva baku nitrat.** Kurva standar konsentrasi nitrat (dengan  $\text{KNO}_3$  sebagai sumber nitrat) dibuat dalam variasi konsentrasi 0 (blanko); 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 1,75; dan 2 mg/L. Masing-masing variasi konsentrasi nitrat tersebut diambil sebanyak lima mililiter untuk ditambahkan dengan reagen *brucine* sebanyak 0,5 ml dan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat sebanyak lima mililiter. Suspensi tersebut selanjutnya ditunggu hingga suhu masing-masing perlakuan mencapai suhu normal, dan kemudian dilakukan pengukuran absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer (Genesys™ 10 series) pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 410 nm. Persamaan regresi kurva standar diperoleh dengan membuat grafik hubungan antara konsentrasi nitrat mg/L (sumbu x (absis)) dengan nilai absorbansi (sumbu y (ordinat)).

**Pembuatan kurva pertumbuhan konsorsium bakteri pereduksi nitrat.** Sebanyak 10% stok kultur konsorsium di medium TSB ( $3 \times 10^7$  sel/ml) diinokulasikan ke dalam medium uji (TSB dengan penambahan nitrat 5; 10; dan 20mg/L, serta B-12). Inkubasi kultur tersebut dilakukan dengan digojog pada *rotary shaker* (Kühner) dengan kecepatan 120 rpm, 27°C, selama 24 jam. Densitas sel dan konsentrasi nitrat diukur pada jam ke-0, 6, 12, 18, dan 24. Densitas sel dihitung dengan melihat peningkatan nilai kerapatan optis kultur pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 600 nm dan 500 nm untuk medium B-12, kemudian dihitung dengan memasukkan nilai kerapatan optis kedalam persamaan regresi dari kurva standar yang telah dibuat. Kurva pertumbuhan konsorsium bakteri diperoleh dengan membuat grafik hubungan antara

waktu inkubasi (sumbu x (absis)) dengan densitas sel bakteri/ml (sumbu y (ordinat)).

**Penghitungan konsentrasi nitrat.** Dilakukan dengan mengambil kultur sebanyak 10 ml untuk disentrifugasi pada kecepatan putar 8000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang. Supernatan diambil sebanyak lima mililiter untuk dilakukan uji dengan reagen *Brucine* (dengan perbandingan antara kultur : *Brucine* :  $H_2SO_4$  pekat sebanyak 5 ml : 0,5 ml : 5 ml), setelah dilakukan penambahan reagen terhadap kultur, dilihat kerapatan optis pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 410 nm. Kemudian konsentrasi nitrat dihitung dengan mengkonversi nilai kerapatan optis ke persamaan regresi dari kurva standar nitrat yang telah dibuat (Clesceri, *et al.*, 1989). Kurva pertumbuhan konsorsium bakteri diperoleh dengan membuat grafik hubungan antara waktu inkubasi (sumbu x (absis)) dengan konsentrasi nitrat maupun amonia dari hasil spektrofotometer (sumbu y (ordinat)).

### 3.7 Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Penelitian ini dilakukan lima percobaan dengan tiga kali ulangan menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RAL-Faktorial) dengan variabel jenis medium dan waktu inkubasi:

Percobaan 1 : medium TSB tanpa penambahan nitrat, sebagai kontrol

Percobaan 2 : medium TSB dengan penambahan nitrat sebesar 5mg/L

Percobaan 3 : medium TSB dengan penambahan nitrat sebesar 10mg/L

Percobaan 4 : medium TSB dengan penambahan nitrat sebesar 20mg/L

Percobaan 5 : medium B-12 dengan penambahan glukosa sebesar 2,5 g/L dan *yeast extract* sebesar 1 mg/L.

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan analisis ragam ANOVA (*Analysis of Variance*). Hasil yang berbeda nyata antarperlakuan dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda Beda Nyata Jujur (BNJ) tingkat signifikansi 5% ( $\alpha = 0,05$ ) menggunakan *software* program SPSS for Windows Release versi 13.0. Data hasil analisis diinterpretasikan secara kuantitatif deskriptif.

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Karakteristik Fenotip Isolat-isolat Bakteri Pereduksi Nitrat

Isolat-isolat penyusun konsorsium bakteri pereduksi nitrat yang digunakan dalam penelitian ini adalah DR-14, DU-27-1, DU-30-2, AT-8, DU-27-4, DU-27-2. Keenam isolat tersebut memiliki potensi yang tergolong tinggi dalam mereduksi nitrat di antara isolat-isolat yang berhasil diisolasi pada penelitian sebelumnya. Keenam isolat tersebut mempunyai kemampuan mereduksi nitrat sebesar 90-97 % (Lampiran 4). Karakteristik morfologis, fisiologis, dan biokimiawi dari keenam isolat tersebut tercantum pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Karakteristik fenotip isolat-isolat konsorsium bakteri pereduksi nitrat

| Karakter                       | Isolat DR-14 | Isolat DU-27-1 | Isolat DU-30-2 | Isolat AT-8 | Isolat DU-27-4 | Isolat DU-27-2 |
|--------------------------------|--------------|----------------|----------------|-------------|----------------|----------------|
| Panjang sel ( $\mu\text{m}$ )  | 4,75         | 4,75           | 5              | 5           | 5              | 2,5            |
| Diameter sel ( $\mu\text{m}$ ) | 0,98         | 1              | 1,25           | 2,23        | 1,25           | 1,25           |
| Bentuk sel                     | Batang       | Batang         | Batang         | Batang      | Batang         | Batang         |
| Gram positif                   | -            | +              | +              | +           | +              | -              |
| Motilitas                      | +            | +              | +              | +           | +              | +              |
| Sitrase                        | +            | +              | -              | +           | +              | +              |
| Protease                       | -            | -              | +              | -           | -              | -              |
| Selulase                       | -            | -              | +              | -           | +              | +              |
| Amilase                        | +            | +              | -              | +           | +              | +              |
| Katalase                       | +            | +              | +              | +           | +              | -              |
| Oksidase                       | +            | +              | -              | +           | +              | +              |
| Endospora                      | -            | -              | -              | +           | +              | +              |

Keterangan : Tanda (+) menunjukkan bahwa isolat memiliki karakter yang diuji; (-) tidak memiliki karakter yang diuji.

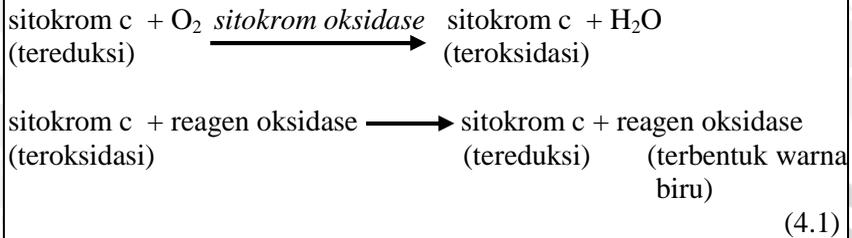
Tabel tersebut menunjukkan bahwa keseluruhan isolat memiliki bentuk sel basil (batang). Panjang sel bervariasi antara 2,25 – 5  $\mu\text{m}$ , adapun diameter sel bervariasi antara 0,98 - 2,23  $\mu\text{m}$ . Isolat DR-14 dan DU-27-2 tergolong gram negatif, sedangkan keempat isolat lainnya tergolong gram positif (gambar pada Lampiran 10). Endospora dimiliki oleh isolat AT-8, DU-27-4, dan DU-27-2 sedangkan isolat lainnya tidak memiliki. Hasil uji motilitas menunjukkan bahwa keseluruhan enam

isolat tersebut bersifat motil, hal ini mengindikasikan bahwa masing-masing isolat tersebut memiliki flagela.

Isolat DR-14, DU-27-1, AT-8, DU-27-4, dan DU-27-2 memiliki kemampuan menghasilkan enzim sitrase, sedangkan isolat DU-30-2 tidak menghasilkan enzim sitrase. Menurut Alexander dan Strete (2001) serta Benson (2002) enzim sitrase merupakan enzim yang dapat menghidrolisis asam sitrat menjadi asam piruvat, asam asetat, serta karbondioksida.

Isolat DU-30-2 menunjukkan uji proteolitik yang positif, sedangkan kelima isolat lainnya tidak. Isolat DU-30-2, DU-27-4, dan DU-27-2 menunjukkan uji selulolitik yang positif, sedangkan ketiga isolat lainnya tidak. Isolat DR-14, DU-27-1, AT-8, DU-27-4 dan DU-27-2 menunjukkan uji amilolitik yang positif, sedangkan isolat DU-30-2 menunjukkan hasil uji yang negatif. Atlas dan Bartha (1993 *cit. Maier et al.*, 2000) menjelaskan bahwa enzim amilase dapat disekresikan oleh isolat-isolat bakteri yang memiliki kemampuan dalam memecah amilum yang tergolong polisakarida menjadi gugus monosakarida. Enzim protease merupakan enzim yang dapat menghidrolisis protein menjadi asam amino. Menurut Pollack, *et al.* (2005) enzim selulase merupakan enzim pendegradasi selulosa yang merupakan gugus polisakarida menjadi gugus gula yang lebih sederhana. Dengan demikian, isolat yang mampu menghasilkan enzim protease adalah isolat DU-30-2 isolat yang mampu menghasilkan enzim selulase adalah isolat DU-30-2, DU-27-4, DU-27-2, dan isolat yang mampu menghasilkan enzim amilase adalah isolat DR-14, DU-27-1, AT-8, DU-27-4, dan DU-27-2.

Isolat DR-14, DU-27-1, DU-30-2, DU-27-4, dan DU-27-2 menunjukkan karakter oksidase positif dengan perubahan warna pada *Bactident Oxidase Kit* menjadi biru tua setelah koloni isolat diapuskan pada kit uji tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa kelima isolat bakteri diduga memiliki kemampuan mensekresikan enzim sitokrom oksidase. Isolat DU-30-1 tidak memiliki kemampuan dalam menghasilkan enzim tersebut. Menurut Pollack, *et al.* (2005) rantai transpor elektron adalah serangkaian reaksi yang menunjukkan langkah akhir dari respirasi sel bakteri. Reaksi ini dikatalisis oleh enzim sitokrom oksidase. Sitokrom oksidase mengoksidasi molekul transpor elektron (sitokrom c) yang mereduksi oksigen untuk membentuk air. Reaksi positif dari uji oksidase ditunjukkan pada persamaan reaksi 4.1.



Gambar 4.1 Diagram reaksi positif uji oksidase

Uji katalase dari keenam isolat tersebut menunjukkan hasil positif pada isolat DR-14, DU-27-1, DU-30-2, AT-8, DU-27-4, sedangkan hasil uji negatif ditunjukkan pada isolat DU-27-2. Benson (2002) menjelaskan bahwa enzim katalase merupakan enzim yang mengandung unsur besi yang dapat menghidrolisis  $\text{H}_2\text{O}_2$  (hidrogen peroksida) yang bersifat toksik menjadi  $\text{H}_2\text{O}$  dan  $\text{O}_2$ . Dengan demikian, isolat DR-14, DU-27-1, DU-30-2, AT-8, dan DU-27-4 mampu menghasilkan enzim katalase. Keanekaragaman karakter yang dimiliki oleh isolat-isolat pereduksi nitrat ini menunjukkan beragamnya isolat-isolat tersebut.

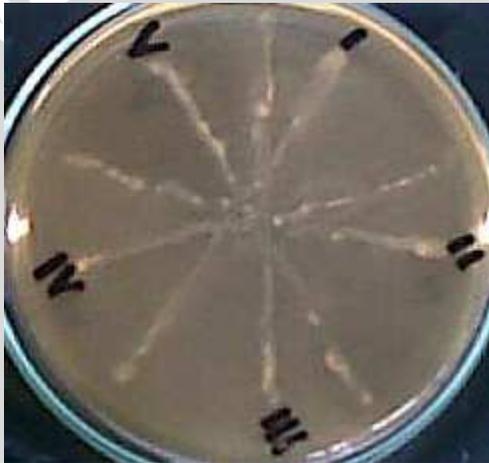
#### 4.2 Asosiasi Antarisolat Konsorsium

Uji Asosiasi ini dilakukan pada medium TSA yang merupakan medium padat untuk membiakkan bakteri denitrifikasi (Li, 2007). Uji tersebut dilakukan untuk mengetahui sifat asosiasi di antara isolat-isolat penyusun konsorsium. Hasil uji asosiasi ini tersaji pada Tabel 4.2. Dari tabel tersebut tampak bahwa antarisolat yang digunakan dalam konsorsium menunjukkan hasil uji yang positif. Uji asosiasi positif ini menunjukkan bahwa ketika isolat-isolat tersebut dikulturkan secara bersamaan tidak membentuk zona hambat. Salah satu gambar hasil uji asosiasi tersaji pada Gambar 4.2. Dengan demikian keenam isolat yang digunakan pada konsorsium ini tidak bersifat antagonis sehingga dapat digunakan secara bersamaan.

Tabel 4.2 Asosiasi antarisolat konsorsium

| Isolat  | DR-14 | DU-27-1 | DU-30-2 | AT-8 | DU-27-4 | DU-27-2 |
|---------|-------|---------|---------|------|---------|---------|
| DR-14   | x     | -       | -       | -    | -       | -       |
| DU-27-4 | -     | x       | -       | -    | -       | -       |
| DU-30-1 | -     | -       | x       | -    | -       | -       |
| DU-30-2 | -     | -       | -       | x    | -       | -       |
| TA-8    | -     | -       | -       | -    | x       | -       |
| DU-27-4 | -     | -       | -       | -    | -       | x       |

Keterangan : \*) tanda (-) menunjukkan tidak terbentuk zona hambatan



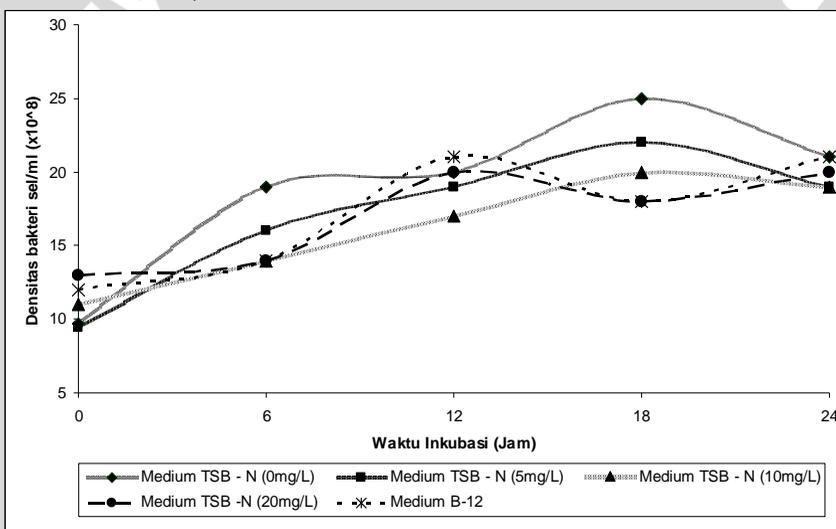
Gambar 4.2 Pertumbuhan antarisolat konsorsium pada medium TSA  
Keterangan : (I) Isolat DR-14; (II) Isolat DU-27-1; (III) Isolat AT-8;  
(IV) Isolat DU-27-4; (V) Isolat DU-27-2

#### 4.3 Pola Pertumbuhan Konsorsium Bakteri Pereduksi Nitrat Medium TSB+nitrat 0, 5, 10, 20mg/L dan dalam medium B-12

Pola pertumbuhan konsorsium bakteri pereduksi nitrat dapat dilihat pada Gambar 4.3. Gambar tersebut dihasilkan dari menghitung peningkatan densitas sel pada tiap-tiap inkubasi dari kultur konsorsium dalam medium TSB (*Trypticase Soy Broth*) dengan variasi konsentrasi nitrat yaitu 0, 5, 10, 20 mg/L serta dalam medium B-12 (Nitrat 100 mg/L). Isolat-isolat konsorsium yang diujikan pada penelitian ini merupakan hasil isolasi dari perairan tawar Waduk Sutami. Oleh karena

itu, pengulturan dilakukan dalam medium TSB dan medium B-12. Li (2007) menjelaskan bahwa TSB merupakan jenis medium artifisial standar yang paling sering digunakan untuk pengulturan bakteri denitrifikasi. Sedangkan, menurut Shirai, *et al.* (1989), medium B-12 merupakan salah satu medium sintetik bagi pertumbuhan organisme perairan tawar.

Densitas sel konsorsium pada Gambar 4.3 diperoleh dari penghitungan dengan menggunakan persamaan regresi linier hubungan antara densitas sel dengan densitas optis (OD) pada kurva standar konsorsium bakteri ( $y = 8.10^{-10} x$ ) (Lampiran 5). Nilai keterandalan korelasi tersebut ( $R^2$ ) yang diperoleh dari persamaan kurva standar adalah sebesar 0,902.



Gambar 4.3 Pola pertumbuhan konsorsium bakteri pereduksi nitrat

Gambar 4.3 menunjukkan bahwa pola pertumbuhan kultur konsorsium bakteri dalam medium TSB-N (0, 5, dan 10 mg/L) memiliki pola yang sama dan tidak terjadi fase adaptasi. Sehingga, fase logaritmik terjadi sejak awal inkubasi hingga inkubasi jam ke 18 dengan densitas sel tertinggi secara berurutan sebesar  $2,5.10^9$  sel/ml,  $2,2.10^9$  sel/ml, dan  $2,0.10^9$  sel/ml. Terbentuknya pola tersebut disebabkan oleh sumber karbon (C) yang tersedia dalam bentuk gula sederhana (glukosa) serta konsentrasi nitrat yang ditambahkan dalam medium TSB tersebut tidak melebihi batas maksimum toleransi nitrat di suatu perairan tawar.

Variasi konsentrasi nitrat dalam medium TSB tersebut cenderung sesuai dengan konsentrasi nitrat yang pernah terukur di Waduk Sutami. Samino dan Retnaningdyah (2006), melaporkan bahwa konsentrasi nitrat terukur di Waduk Sutami sejak tahun 2004 hingga 2006 berkisar antara 0,325 – 11,07 mg/L). Black (2005) menjelaskan bahwa, karbon merupakan unsur terpenting dalam proses glikolisis yang berlanjut kepada siklus asam sitrat (*krebs cycle*) untuk menghasilkan ATP. Effendi (2003) menginformasikan bahwa berdasarkan Peraturan pemerintah Republik Indonesia No. 20 Th.1990 serta ketetapan WHO/UNESCO/UNEP Th.1992 konsentrasi nitrat maksimum yang diperkenankan terkandung di suatu perairan tawar adalah sebesar 10 mg/L. Oleh karena itu, konsentrasi nitrat yang ada didalam medium TSB tidak mencapai kategori toksik serta sesuai dengan konsentrasi di Waduk Sutami sehingga tidak memerlukan fase adaptasi yang lama.

Gambar 4.3 menunjukkan bahwa pola pertumbuhan kultur konsorsium dalam medium TSB-N 20 mg/L adalah hampir sama dengan pola pertumbuhan dalam medium B-12 (Nitrat 100 mg/L). Fase adaptasi terjadi sejak awal inkubasi hingga inkubasi jam ke enam. Selanjutnya, periode fase logaritmik terjadi pada inkubasi jam ke enam hingga jam ke 12 dengan densitas sel tertinggi secara berurutan sebesar  $2,0 \cdot 10^9$  dan  $2,1 \cdot 10^9$  sel/ml yang tercapai pada akhir periode fase logaritmik. Hal tersebut diduga disebabkan oleh konsentrasi nitrat pada kedua medium tersebut melebihi toleransi maksimum bagi mikroba, sehingga diperlukan fase adaptasi terlebih dahulu. AWRA *Symposium in Puerto Rico* (1998), serta *Canadian environmental quality guidelines* (2003) menjelaskan bahwa konsentrasi nitrat di suatu perairan tawar yang melebihi 10mg/L dapat dikategorikan sebagai konsentrasi toksik. Black (2005) menjelaskan bahwa fase adaptasi diperlukan untuk penyesuaian sel terhadap kandungan senyawa kimiawi yang ada didalam medium tersebut. Dengan demikian, konsentrasi nitrat yang tergolong toksik dapat menyebabkan fase adaptasi yang berlangsung lama serta periode fase logaritmik yang tergolong singkat. Takaya, *et al.* (2003) menambahkan bahwa pertumbuhan sel-sel bakteri pereduksi nitrat terjadi karena memanfaatkan ketersediaan nitrat pada medium sebagai salah satu nutrisi penting untuk tumbuh. Brittain, *et al.* (1992) juga menambahkan bahwa secara umum hampir seluruh bakteri yang berpotensi dalam mereduksi nitrat memiliki enzim yang dapat menghidrolisis nitrat yaitu *nitrate reductase* yang umumnya bersifat ekstraselular dan terikat membran (*membrane bound*). Menurut Vivian,

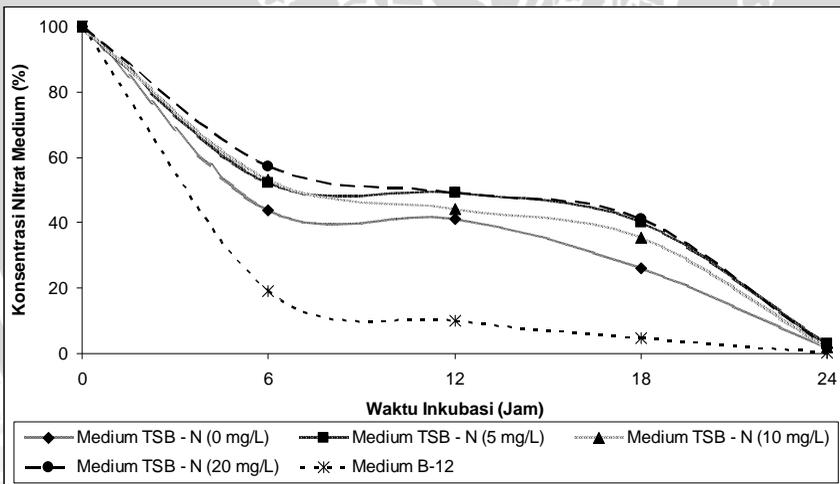
*et al.* (1999), enzim *nitrate reductase* diekskresikan oleh bakteri yang berpotensi dalam mereduksi nitrat untuk memecah senyawa nitrat guna memperoleh sumber nitrogen untuk sintesis berbagai senyawa penting terkait metabolisme sel, maupun sebagai alternatif penerima elektron selain oksigen. Oleh karena itu, ketika tersedia sumber nitrogen dalam bentuk yang sederhana maka bakteri pereduksi nitrat akan lebih sedikit mengekskresikan enzim tersebut. Dengan demikian, konsorsium bakteri mampu memanfaatkan nitrat yang tersedia dalam medium sebagai salah satu sumber nutrisi penunjang pertumbuhan.

Perhitungan laju pertumbuhan konsorsium bakteri yang dikulturkan dalam medium TSB-N (0, 5, 10, 20 mg/L) serta dalam medium B-12 (Nitrat 100 mg/L) menunjukkan hasil yang bervariasi, secara berurutan sebesar 0,154, 0,127, 0,047, 0,084, 0,097 generasi. Hasil perhitungan tersebut menunjukkan bahwa, laju pertumbuhan terbesar terjadi pada kultur dalam medium TSB tanpa penambahan nitrat, sedangkan nilai laju pertumbuhan terkecil terjadi pada kultur dalam medium nitrat 10 mg/L. Hal ini disebabkan oleh perbedaan konsentrasi nitrat yang ditambahkan kedalam medium TSB tersebut sehingga mempengaruhi pertumbuhan sel konsorsium bakteri. Paustian (2000) menjelaskan bahwa konsentrasi nitrat medium berpengaruh terhadap laju pertumbuhan bakteri pereduksi nitrat. Oleh karena itu, variasi konsentrasi nitrat dalam medium kultur menyebabkan variasi pola pertumbuhan konsorsium bakteri pereduksi nitrat, sehingga semakin tinggi konsentrasi nitrat dalam medium maka akan semakin memperlama fase adaptasi dan memperlambat laju pertumbuhan pada fase logaritmik pertumbuhan konsorsium bakteri.

Hal tersebut sesuai dengan yang dijelaskan oleh Piñar (1997) bahwa periode fase logaritmik pertumbuhan konsorsium bakteri pereduksi nitrat akan semakin panjang seiring dengan rendahnya konsentrasi nitrat dalam medium. Maier (2000) menambahkan bahwa pola pertumbuhan mikroorganisme adalah unik karena dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti ketersediaan nutrisi pada medium kultur, lama waktu inkubasi, serta faktor-faktor fisikokimiawi pada medium yang berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroorganisme tersebut.

#### 4.4 Pola Persentase Penurunan Konsentrasi Nitrat pada Berbagai Medium dengan variasi Konsentrasi Nitrat

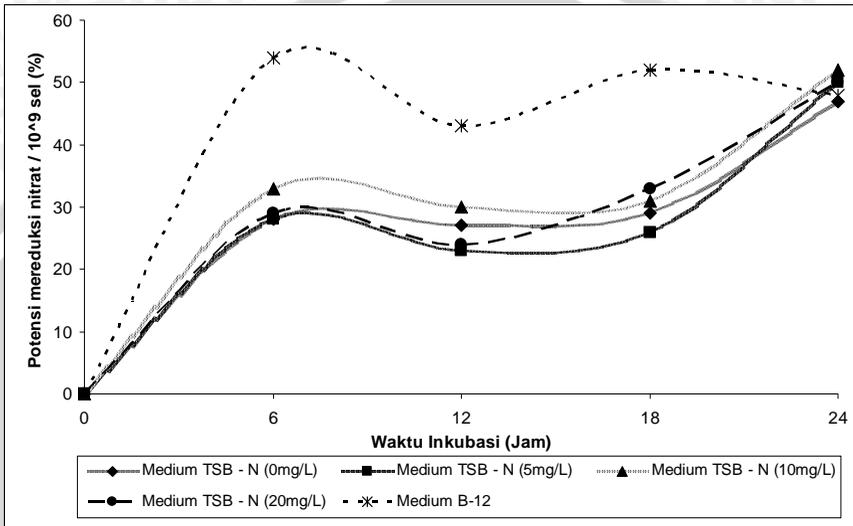
Hasil perhitungan persentase penurunan konsentrasi nitrat medium (Gambar 4.4) menunjukkan bahwa konsentrasi nitrat dalam medium TSB-N (0, 5, 10, dan 20 mg/L) maupun medium B-12 (Nitrat 100 mg/L) senantiasa menurun bersamaan dengan bertambahnya waktu inkubasi. Gambar tersebut menunjukkan bahwa persentase penurunan konsentrasi nitrat terbesar (98,2%) terjadi dalam medium B-12 (Nitrat 100 mg/L) dengan residu nitrat dalam medium tersebut pada inkubasi ke 24 jam sebesar 0,01mg/L (0,18%). Sedangkan, persentase penurunan konsentrasi nitrat dalam medium TSB-N (0, 5, 10, dan 20 mg/L) secara berurutan adalah sebesar 97,9%, 96,3%, 97,6%, dan 97,8% dengan residu nitrat dalam masing-masing medium tersebut pada inkubasi ke 24 jam sebesar 0,2 mg/L (1,6%), 0,3 mg/L (3,14%), 0,15 mg/L (1,9%), dan 0,2 mg/L (2,1%). Komposisi medium B-12 (Lampiran 3, Tabel 3) lebih lengkap dalam hal kandungan nutrisi dibandingkan dengan komposisi medium TSB (Lampiran 3, Tabel 4). Dengan demikian medium B-12 mampu mendukung pertumbuhan konsorsium paling optimal.



Gambar 4.4 Konsentrasi nitrat medium (%)

Li (2007) menjelaskan bahwa dalam medium kultur bakteri denitrifikasi konsentrasi nitrat akan tereduksi oleh bakteri tersebut menjadi senyawa yang lebih sederhana guna dimanfaatkan sebagai

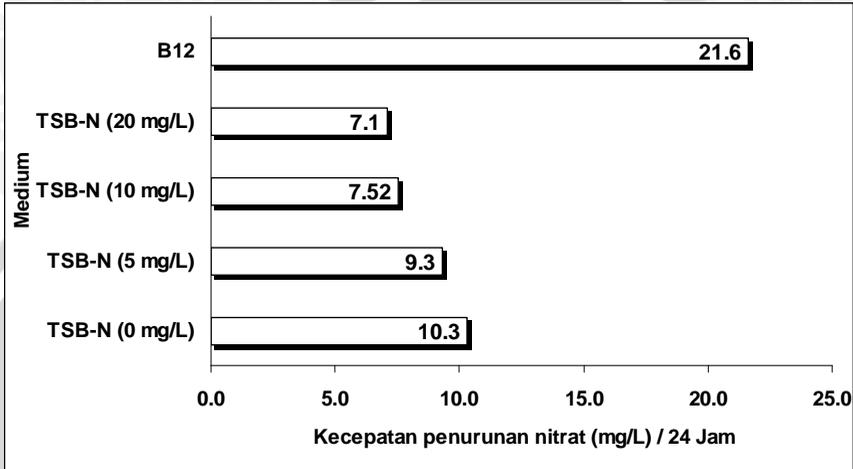
sumber nitrogen. Dengan demikian, kultur konsorsium mampu menurunkan nitrat pada lima variasi medium uji terutama pada medium B-12.



Gambar 4.5 Pola Potensi konsorsium bakteri ( $10^9$  sel/ml) dalam mereduksi nitrat (%)

Gambar 4.5 merupakan hasil perhitungan persentase potensi setiap  $10^9$  sel bakteri konsorsium dalam mereduksi nitrat. Dari gambar tersebut dapat diketahui bahwa pada inkubasi jam ke 24, setiap  $10^9$  sel/ml kultur bakteri konsorsium dalam medium nitrat 0, 5, 10, dan 20 mg/L maupun dalam medium B-12 (Nitrat 100 mg/L) memiliki potensi yang berkisar antara 47% hingga 52% dalam mereduksi nitrat. Pada gambar tersebut terdapat kemiripan pola potensi dari masing-masing kultur dalam medium TSB-N (0, 5, 10, dan 20 mg/L). Namun pola tersebut berbeda pada hasil kultur dalam medium B-12 (Nitrat 100 mg/L). Potensi tertinggi (54%) dari kultur konsorsium diperoleh pada saat inkubasi jam ke enam dalam medium B-12 (Nitrat 100 mg/L). Sedangkan, potensi tertinggi kultur konsorsium dalam masing-masing medium TSB-N (0, 5, 10, dan 20 mg/L) yang diperoleh pada saat inkubasi ke 24 jam adalah sebesar 47%, 50%, 52%, 50%. Dari hasil tersebut dapat dipahami pula bahwa, konsorsium bakteri jika dikulturkan dalam medium B-12 telah mampu mereduksi nitrat sejak inkubasi jam ke enam. Sedangkan, potensi konsorsium baru nampak optimal pada inkubasi ke 24 jam jika

dikulturkan dalam medium TSB. Hal ini disebabkan oleh komposisi nutrisi dalam medium B-12 (Lampiran 3, Tabel 3) lebih lengkap daripada kandungan nutrisi dalam medium TSB (Lampiran 3, Tabel 4).



Gambar 4.6 Kecepatan konsorsium bakteri dalam mereduksi nitrat

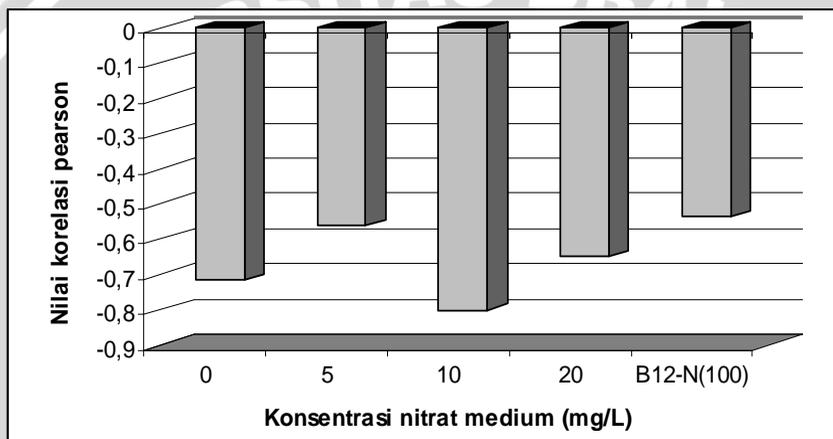
Gambar 4.6 menunjukkan bahwa konsorsium paling cepat dalam mereduksi nitrat jika dikulturkan dalam medium B-12 dengan kemampuan mereduksi 21,6 mg/L nitrat per hari, sedangkan kecepatan terendah didapatkan dari hasil kultur dalam medium TSB-N 20 mg/L dengan kecepatan reduksi hingga 7,1 mg/L nitrat per hari. Hal tersebut disebabkan oleh medium B-12 (Lampiran 3 Tabel 3) merupakan medium sintetik organisme perairan tawar sehingga sesuai dengan habitat alami (Waduk Sutami) konsorsium bakteri tersebut.

Menurut Hamer (1997) konsorsium bakteri dalam mereduksi nitrat merupakan perpaduan antara potensi masing-masing sel dalam mereduksi nitrat sehingga aktivitas reduksi nitrat akan berlangsung lebih optimal jika dilakukan bersamaan selama waktu inkubasi tertentu. Dengan demikian dapat diketahui bahwa konsorsium bakteri paling optimal dalam mereduksi nitrat terjadi pada kultur dalam medium B-12.

#### 4.5 Korelasi Pertumbuhan Konsorsium Bakteri terhadap Penurunan Nitrat Medium

Nilai korelasi antara pertumbuhan konsorsium bakteri denitrifikasi dengan konsentrasi nitrat medium TSB-N (0, 5, 10, dan 20 mg/L) dan

medium B-12 (Nitrat 100 mg/L) adalah negatif. Nilai tersebut menunjukkan bahwa semakin meningkat jumlah sel konsorsium bakteri maka konsentrasi nitrat pada medium semakin menurun. Dengan kata lain, peningkatan densitas sel menyebabkan terjadinya penurunan konsentrasi nitrat dalam medium kultur. Li (2007) menjelaskan bahwa penurunan konsentrasi nitrat pada suatu medium kultur senantiasa berhubungan erat dengan peningkatan densitas sel bakteri denitrifikasi dalam medium tersebut.



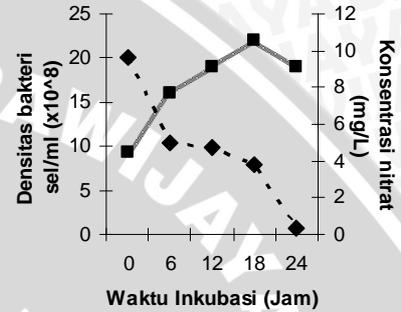
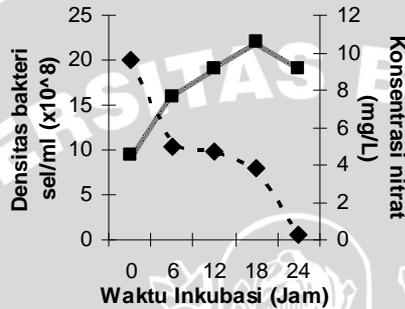
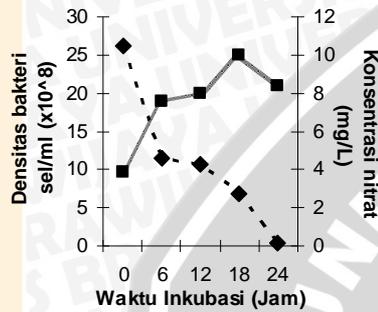
Gambar 4.7 Nilai korelasi Pearson antara konsorsium bakteri dengan konsentrasi nitrat medium

Pada Gambar 4.7 dapat diketahui bahwa nilai korelasi terbesar (-0,801) diperoleh dari kultur konsorsium dalam medium TSB-N 10 mg/L, sedangkan nilai terkecil (-0,536) diperoleh dari kultur pada medium B-12 (Nitrat 100 mg/L). Dari hasil tersebut dapat dipahami bahwa pertumbuhan konsorsium dalam medium TSB-N 10 mg/L adalah paling maksimal dalam melakukan proses reduksi nitrat, sedangkan pertumbuhan terendah ditunjukkan dari hasil inkubasi kultur konsorsium dalam medium B-12 (Nitrat 100 mg/L). Blaszczyk (1993) menjelaskan bahwa medium kultur yang berbeda dapat pula menyebabkan variasi nilai korelasi antara pertumbuhan sel bakteri denitrifikasi dengan penurunan nitrat medium. Dengan demikian dapat dipahami dari Gambar 4.7 bahwa dalam medium TSB-N 10mg/L, pertumbuhan densitas sel konsorsium berpengaruh erat terhadap penurunan konsentrasi nitrat. Berbeda halnya pada medium B-12,

walaupun diperoleh nilai korelasi yang kecil tidak berarti bahwa potensi konsorsium dalam mereduksi nitrat dalam medium tersebut adalah rendah, akan tetapi setiap pertumbuhan densitas konsorsium tidak selalu berpengaruh erat dengan penurunan konsentrasi nitrat. Namun, berdasarkan hasil sebelumnya telah diketahui bahwa konsorsium bakteri berpotensi paling besar dalam mereduksi nitrat pada medium B-12 (Nitrat 100 mg/L) dibanding jika dikulturkan dalam medium lainnya (TSB-N 0, 5, 10, 20 mg/L).

Oleh karena itu, konsorsium bakteri pereduksi nitrat pada penelitian ini dapat diaplikasikan secara efektif untuk mereduksi konsentrasi nitrat berlebih di Waduk Sutami karena memiliki potensi yang optimal untuk dapat tumbuh dalam medium kultur dengan kisaran konsentrasi nitrat sebesar 10 mg/L, serta karena memiliki potensi yang besar dalam mereduksi nitrat dengan kisaran konsentrasi mencapai 100 mg/L.

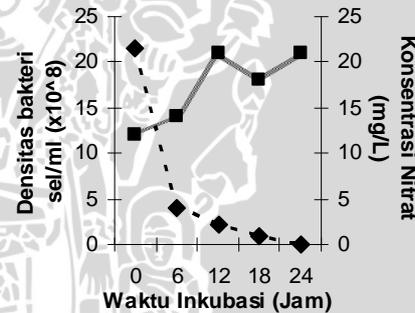
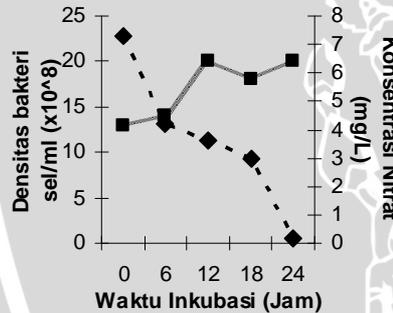




a).

b).

c).



d).

e).

.....■..... Densitas Sel - ◆ - Konsentrasi Nitrat

**Gambar 4.8 Pola pertumbuhan konsorsium bakteri dan konsentrasi nitrat medium**

Keterangan : Gambar a). Kultur dalam medium TSB-N (0 mg/L), b). Kultur dalam medium TSB-N (5mg/L), c). Kultur dalam medium TSB-N (10 mg/L), d). Kultur dalam medium TSB-N (20 mg/L), e). Kultur dalam medium B-12 (Nitrat 100 mg/L)

Pada Gambar 4.8 diketahui bahwa selama inkubasi 24 jam, semakin bertambahnya waktu inkubasi, densitas sel semakin meningkat dan konsentrasi nitrat pada medium menurun. Oleh karena itu, konsorsium bakteri pada penelitian ini mempunyai kemampuan menurunkan nitrat baik dalam medium B-12 maupun medium TSB-N (0, 5, 10, 20 mg/L).

Hasil analisis ragam (ANOVA – *Analysis of Variance*) (Lampiran 11) menunjukkan bahwa peningkatan densitas sel konsorsium baik pada medium TSB-N (0, 5, 10, 20 mg/L) maupun pada medium B-12 (Nitrat 100 mg/L) selama waktu inkubasi 24 jam menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ). Namun hasil analisis ragam dari penurunan nitrat dalam medium TSB-N (0, 5, 10, 20 mg/L) serta medium B-12 (Nitrat 100 mg/L) selama waktu inkubasi 24 jam menunjukkan hasil yang berbeda nyata ( $P < 0,05$ ). Oleh karena itu hasil analisis ragam dilanjutkan dengan uji BNJ (Beda Nyata Jujur) (Lampiran 12). Dengan demikian dapat diketahui bahwa jumlah populasi konsorsium bakteri yang sama apabila digunakan untuk mereduksi nitrat pada konsentrasi yang berbeda, akan memiliki potensi menurunkan nitrat yang juga berbeda.



## BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

1. Asosiasi antar keenam isolat penyusun konsorsium bakteri pereduksi nitrat tidak saling antagonis.
2. Pola pertumbuhan konsorsium bakteri hampir sama di medium TSB-N (0, 5, dan 10mg/L), yang memiliki fase logaritmik tertinggi pada inkubasi jam ke 18 dengan densitas sel secara berurutan sebesar  $2,5 \cdot 10^9$ ,  $2,2 \cdot 10^9$ ,  $2,0 \cdot 10^9$  sel/ml. Pola pertumbuhan konsorsium dalam medium nitrat 20 mg/L hampir sama dengan pola pertumbuhan dalam medium B-12 (Nitrat 100 mg/L) berupa fase logaritmik tertinggi pada inkubasi jam ke 12 dengan densitas sel sebesar  $2,0 \cdot 10^9$  sel/ml dan  $2,1 \cdot 10^9$  sel/ml. Periode fase logaritmik pada kultur dalam medium TSB-N 20 mg/L dan B-12 terjadi selama 18 jam sedangkan dalam medium TSB-N 0, 5, 10 mg/L selama 12 jam.
3. Konsorsium bakteri mampu mereduksi 98,2% nitrat dalam medium B-12 (Nitrat 100 mg/L) dengan residu nitrat sebesar 0,01 mg/L (0,18%) pada inkubasi 24 jam. Konsorium bakteri ( $10^9$  sel/ml) memiliki potensi mereduksi nitrat tertinggi sebesar 54% dalam medium B-12 selama enam jam masa inkubasi. Kecepatan mereduksi nitrat tertinggi ( $21,6 \text{ mg/L}$ ) per hari diperoleh dari kultur dalam medium B-12.
4. Korelasi antara densitas konsorsium dengan konsentrasi nitrat adalah negatif. Dengan demikian, selama inkubasi 24 jam semakin bertambah waktu inkubasi, densitas sel semakin meningkat namun konsentrasi nitrat pada medium menurun.

### 5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, maka sangat perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai:

1. Pembuatan pola pertumbuhan serta uji potensi konsorsium bakteri pereduksi nitrat dalam medium alami.
2. Pengujian terhadap senyawa hasil dari reduksi nitrat oleh konsorsium bakteri.

3. Identifikasi masing-masing isolat bakteri untuk memastikan nama strain bakteri secara taksonomis.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



## DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, S. K. and D. Strete. 2001. **Microbiology. A Photographic Atlas for the Laboratory.** Addison Wesley Longman, Inc. New York.
- Apun, K., B. C. Jong, dan M. A. Salleh. 2000. Screening and Isolation of A Cellulolytic and Amylolytic Bacillus from Sago Pith Waste. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **46**: 263–267.
- Atlas, R. M. and R. Bartha. 1993. **Microbial Ecology.** The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc. Kentucky.
- AWRA Third International Symposium on Tropical Hydrology. 1998. **Nitrate Contamination of the Upper Aquifer in the Manatí-Vega Baja Area.** Puerto Rico.
- Benson, H. J. 2002. **Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology.** eighth edition. McGraw-Hill Co, Inc., New York.
- Black, J. G. 2005. **Microbiology Principles and Explorations.** John Wiley and Sons, Inc. USA.
- Blaszczyk, M. 1993. Effect of Medium Composition on the Denitrification of Nitrate by *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59(11)**: 3951-3953.
- Brittain, T. R. Blackmore, C. Greenwood and A. J. Thomson. 1992. Bacterial nitrite-reducing Enzymes (Review). *Eur. J. Biochem.* **209**: 793-802.
- Canadian Council of Minister of The Environment. 2003. **Canadian Water Quality Guidelines for The Protection of Aquatic Life.** Canada.
- Cappucino, J. G. and N. Sherman. 2005. **Microbiology: A Laboratory Manual.** Pearson Benjamin Cumming. San Fransisco.

- Cébron, A., T. Berthe and J. Garnier. 2003. Nitrification and Nitrifying Bacteria in the Lower Seine River and Estuary (France). *Appl. Environmen. Microbiol.* **69(12)**: 7091-7100.
- Clesceri, L. S., Arnold E. G. and Trussel. 1989. **Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water**. American Public Health Association. Washington DC.
- Hamer, G. 1997. Microbial Consortia for Multiple Pollutant Biodegradation. *Pure Appl. Chem.* **69(11)**: 2343-2356.
- Harper, D.1992. **Eutrophication of Fresh Water**. Chapman and Hall. London.
- Heylen, K., B. Vanprays, L. Wittebole, W. Verstrete, N. Bon and P. De Vos. 2006. Cultivation of Denitrifying Bacteria: Optimalization of Isolation Conditions and Diversity Study. *Appl. Environ. Microbiol.* **72(4)**: 2637-2643.
- Jasa Tirta. 2007. Bendungan Sutami. [http://www.jasatirta1.go.id/haspem.php?subaction=showfull&id=1191737150&archive=&start\\_from=&ucat=5&](http://www.jasatirta1.go.id/haspem.php?subaction=showfull&id=1191737150&archive=&start_from=&ucat=5&). Tanggal akses 17 Maret 2008.
- Kurmayer, R., G. Christiansen and I. Chorus. 2003. The Abundance Of Microcystin-Producing Genotypes Corellates Positively with Colony Size in *Microcystis* sp. And Determines Its Microcystin Net Production in Lake Wannsee. *Appl. Environ. Microbiol.* **69 (2)**:787-795.
- Li, Y. 2007. **Denitrification Capacity and Denitrifying Bacteria In A Restored Bottomland Hardwood Forest, Mississippi River Alluvial Valley: Hydrological Impacts**. Thesis. Department of Environmental Studies. Faculty of Agricultural and Mechanical College. Lousiana State University. Lousiana.
- Maier, M., Raina, I. L. Pepper, and C. P. Gerba. 2000. **Environmental Microbiology**. Academic Press. New York.

- Marganof. 2007. **Model Pengendalian Pencemaran Perairan di Danau Mninjau Sumatera Barat**. Disertasi. Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Mitakda, B., Prayitno, Suharjo dan C. Retnaningdyah. 2000. Perancangan dan Pemodelan Usaha Peningkatan Kemampuan Purifikasi Sungai Brantas Hilir. *J. Natural* **4(2)**: 38-49.
- Paustian, T. 2000. Anaerobic Respiration. <http://dwb.unl.edu/Teacher/NSF/C11/C11Links/www.bact.wisc.edu/microtextbook/images/textbook.gif>. University of Wisconsin-Madison. Diakses tanggal 4 April 2008.
- Palmer, M. A. and D. B. Roy. 2001. An Estimate of The Extent of Dystrophic, Oligotrophic, Mesotrophic, and Eutrophic standing fresh water in Great Britania. [http://www.jncc.gov.uk/pdf/jncc317\\_text.pdf](http://www.jncc.gov.uk/pdf/jncc317_text.pdf). Tanggal Akses 31 Maret 2007.
- Perusahaan Umum Jasa Tirta. 2002. **Waduk Sutami**. BUMN Online
- Piñar, G., E. Duque, A. Haïdour, J.-M. Oliva, L. Sánchez-Barbero, V. Calvo and J. L. Ramos. 1997. Removal of High Concentrations of Nitrate from Industrial Wastewaters by Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **63(5)**: 2071-2073.
- Pollack, R. A., L. Findlay, W. Mondschein and R. R. Modesto. 2005. **Laboratory Exercises in Microbiology**. John Willey & Sons, Inc. New York
- Prescott, L., J. P. Harley, and D. A. Klein. 2003. **Microbiology** (International Edition). McGraw-Hill. New York.
- Rahayu, L. O. 2007. **Pengaruh Konsorsium Bakteri *Azospirillum* PAK-2, *Azotobacter* ZBL-05 Dan *Phosphate Solubilizing Bacteria* Terhadap Kadar IAA (*Indole Acetic Acid*) Tanaman Padi (*Oryza sativa* L.) Varietas Cihayang Fase Perkecambahannya**. Skripsi. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya. Malang.

- Ramothokang, T. R., S. C Simelane and F. Bux. 2006. **Biological Nitrogen and Phosphorus Removal by Filamentous Bacteria in Pure Culture**. Water Institute of South Africa (WISA) Biennial Conference, Durban, South Africa.
- Retnaningdyah, C., Prayitno, Y. Rosyitawati, M. Y. C. Dewi dan 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 December 27-28.
- Rosyidah, R. A. 2005. **Dinamika Komunitas Zooplankton Di Waduk Sutami Malang : Studi Kasus Awal Musim Hujan 2004**. Skripsi. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya. Malang.
- Samino, S. dan C. Retnaningdyah, 2004. **Monitoring Dinamika Komunitas Fitoplankton dan Zooplankton di Waduk Sutami Malang Periode Oktober-Desember 2004**. Laporan Penelitian Kerjasama Perum Jasa Tirta I dengan Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Sertifikat No. ID03/0127.
- Samino, S. dan C. Retnaningdyah, 2006. **Monitoring Dinamika Komunitas Fitoplankton dan Zooplankton di Waduk Sutami Malang Periode Januari-Maret 2006**. Laporan Penelitian Kerjasama Perum Jasa Tirta I dengan Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Sertifikat No. ID03/0127.
- Sanchez, O. 2006. **A Consortium of Bacteria to Degrade Petrol**. Departement de Genetica i de Microbiologia. Universitat Autònoma. Barcelona.
- Shirai, M., K. Matumaru., A. Ohotake., Y. Takamura., T. Aida., M. Nakano. 1989. Development of a Solid Medium for Growth and Isolation of Axenic *Microcystis* Strains (Cyanobacteria). *Appl. Environ. Microbiol.* **55(10)**: 2569-2571.

Smith R. L. 1990. **Ecology and Field Biology**. 4<sup>th</sup> Edition. Harper Collins Publishers.

Soedarti, T., J. Aristiana, dan A. Soegianto. 2006. Diversitas Fitoplankton Pada Ekosistem Perairan Waduk Sutami Malang. *Jurnal Penelitian Hayati* **11**: 97-103.

Soekistijono. 2005. Eutrofikasi di Waduk Sutami: Monitoring, Evaluasi, dan Upaya Penanggulangannya. <http://www.jasatirta1.go.id>. Diakses pada tanggal 17 Maret 2008.

Takaya, N., M. Antonina, C. Sakairi, Y. Sakaguchi, I. Kato, Z. Zhou and H. Shoun. 2003. Aerobic Denitrifying Bacteria That Produce Low Levels of Nitrous Oxide. *Appl. Environ. Microbiol.* **69(6)**: 3152-3157.

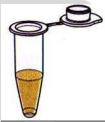
Vivian, C. M., P. Cabello, M. M. Luque, R. Blasco, F. Castillo. 1999. Prokaryotic Nitrate Reduction: Molecular Properties and Functional Distinction among Bacterial Nitrate Reductases. *J. Bacteriol.* **181(21)**: 6573-6584.

## Lampiran 1. Diagram Alir Metode Penelitian

### 1.1 Uji Asosiasi Antarisolat Bakteri Pereduksi Nitrat



- diambil 1 oose dari isolat murni
- diinokulasikan kedalam 0,5 ml buffer fosfat



Dihomogenasi dengan *vortex*



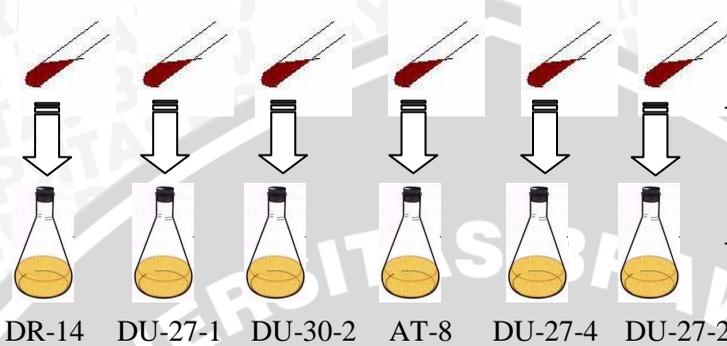
Diambil 0,1 ml



- diinokulasikan kedalam cawan petri steril
- dituang medium TSA kedalam cawan tersebut
- diratakan dan dibiarkan hingga memadat
- isolat kelima isolat lainnya digoreskan diatas medium yang telah memadat tersebut

Diinkubasi 24 jam, suhu 27°C

## 1.2 Pembuatan Kultur Konsorsium



- diinokulasikan sebanyak 1 oose kedalam medium TSB
- diinkubasi 24 Jam, 120 rpm, 27° C

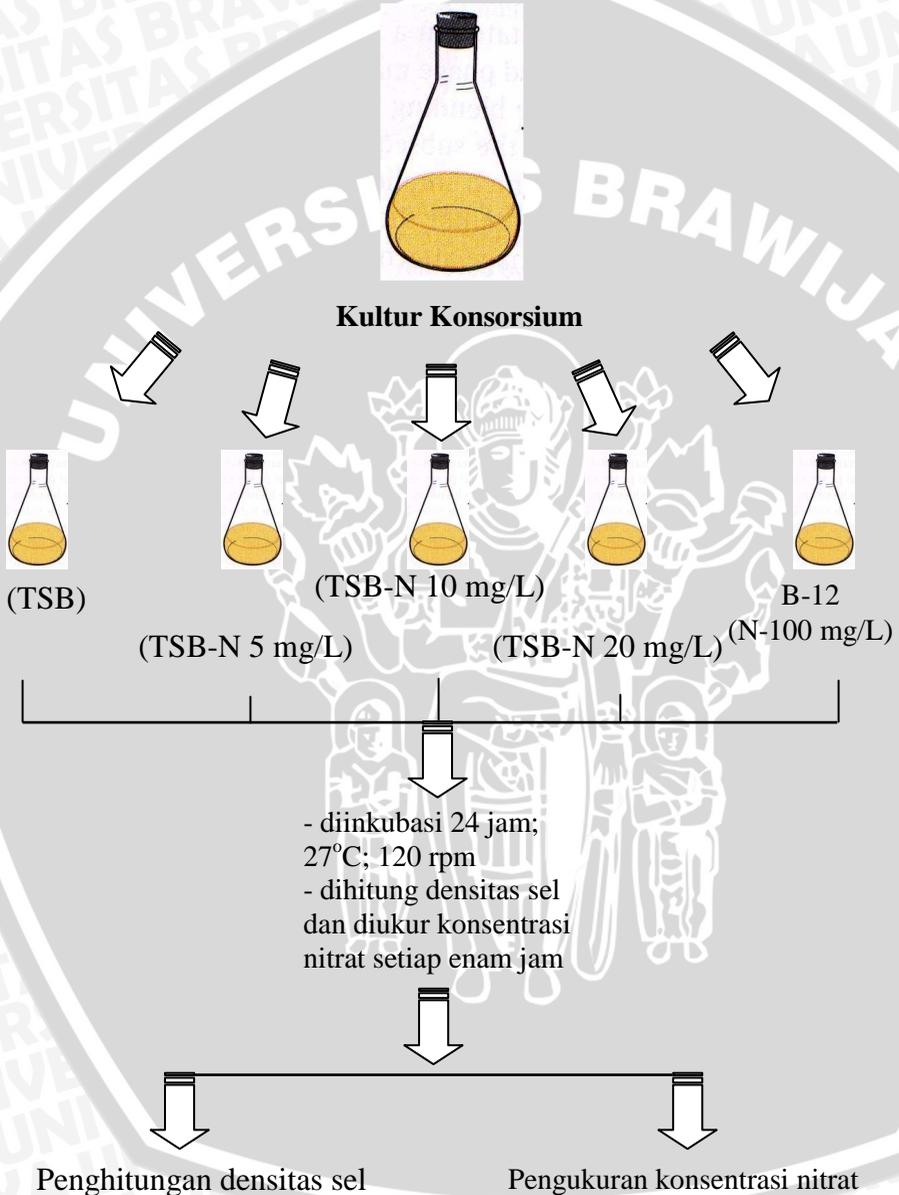


- diinokulasikan masing-masing stok inokulum sebanyak 10% dari total fermentor (medium TSB)
- diinkubasi 24 Jam, 120 rpm, 27° C

**Kultur Konsorsium**

**Pembuatan pola pertumbuhan dan Uji potensi konsorsium bakteri pereduksi nitrat**

### 1.3 Pembuatan Pola Pertumbuhan dan Uji Potensi Konsorsium Bakteri Pereduksi Nitrat





- diukur nilai kerapatan optis (OD) pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 600 nm, pada inkubasi jam ke 0, 6, 12, 18, 24



- diendapkan sel konsorsium yang ada di dalam medium kultur dengan disentrifugasi 8000 rpm; 27°C; 10 menit



- nilai OD dikonversikan kedalam persamaan  $R^2$  (regresi linear) dari kurva standar



- diambil supernatan,  
- dibuat seri perbandingan antara supernatan (medium kultur) :  $H_2SO_4$  (pekat) : Reagen *Brucine* dengan perbandingan 10 ml : 10 ml : 1 ml



Densitas (sel/ml)

Waktu Inkubasi (Jam)



- dihomogenkan,  
- dibiarkan, hingga suhu campuran tersebut sesuai dengan suhu ruang,  
- diukur absorbansi pada  $\lambda$  410 nm



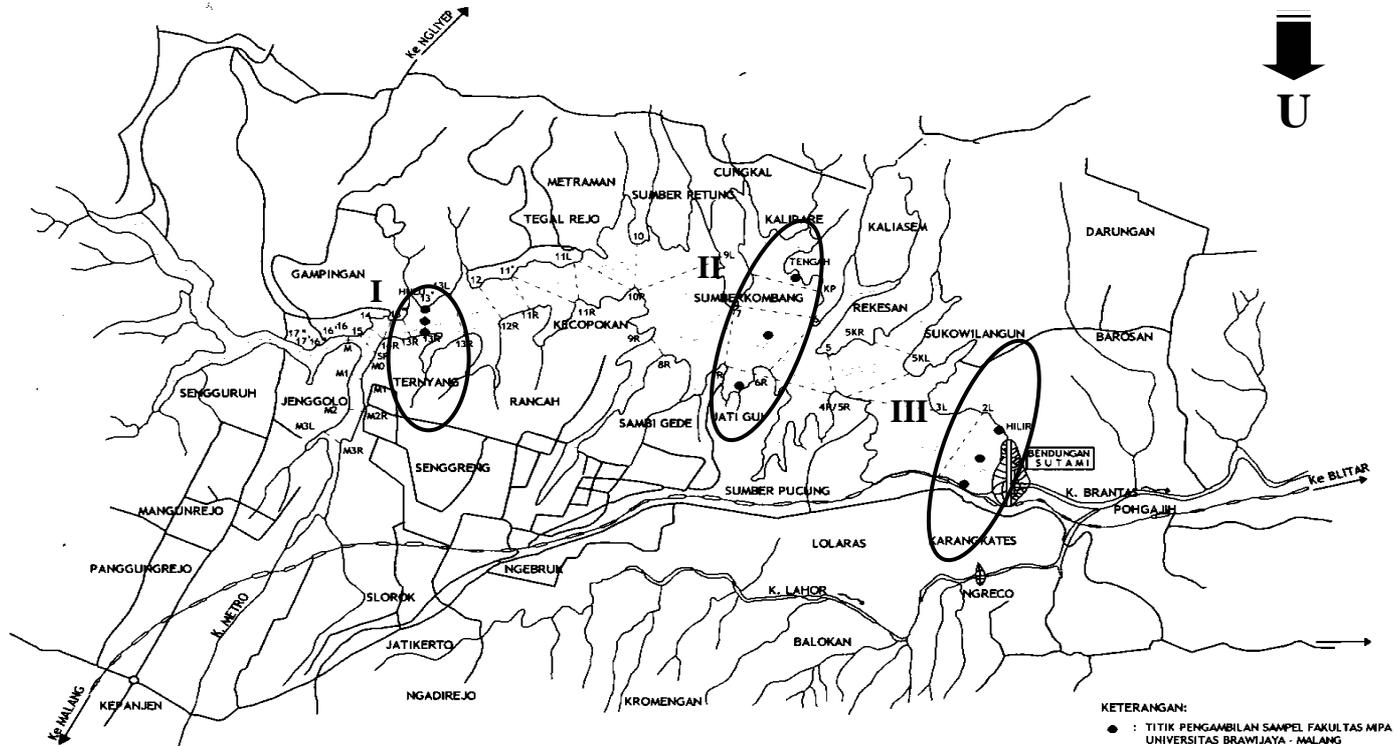
- nilai absorbansi dikonversikan kedalam persamaan  $R^2$  (regresi linier) dari kurva baku nitrat

Konsentrasi nitrat (mg/L)

Waktu Inkubasi (Jam)



Lampiran 2. Peta Lokasi Pengambilan Sampel di Waduk Sutami (I=Hulu; II=Tengah; III=Hilir)



GAMBAR SITUASI WADUK SUTAMI

### Lampiran 3. Komposisi Medium dan Reagen yang digunakan

Tabel 1. Komposisi buffer fosfat

| No. | Bahan                          | Jumlah (ml) |
|-----|--------------------------------|-------------|
| 1   | $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,2 M | 50          |
| 2   | NaOH 0,2 M                     | 29,1        |
| 3   | Akuades                        | 200         |
| pH  |                                | 7           |

Tabel 2. Komposisi konsentrasi nitrat pada medium TSB

| No. | Media | Konsentrasi Nitrat (mg/L) |
|-----|-------|---------------------------|
| 1   | TSB   | 0                         |
| 2   | TSB   | 5                         |
| 3   | TSB   | 10                        |
| 4   | TSB   | 20                        |
| pH  |       | 7                         |

Tabel 3. Komposisi medium B-12 (komposisi dalam 1L)

| No. | Bahan-bahan                               | (mg/L) |
|-----|---|--------|
| 1   | $\text{NaNO}_3$                           | 100    |
| 2   | $\text{K}_2\text{HPO}_4$                  | 10     |
| 3   | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 75     |
| 4   | $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 40     |
| 5   | $\text{Na}_2\text{CO}_3$                  | 20     |
| 6   | <i>Ferric Citrate</i>                     | 6      |
| 7   | Disodium EDTA.2H <sub>2</sub> O           | 1      |
| 8   | Vitamin B-12                              | 0,1    |
| 9   | Glukosa                                   | 2500   |
| 10  | <i>Yeast Extract</i>                      | 1      |

Tabel 4. Komposisi medium TSB (*Trypticase Soya Broth*) OXOID, LTD Basingstoke, Hampshire, England

| No. | Bahan-bahan                   | (g/L) |
|-----|-------------------------------|-------|
| 1   | Pancreatic Digest of casein   | 17,0  |
| 2   | Papaic Digest of Soybean meat | 5,0   |
| 3   | Sodium Chloride               | 5,0   |
| 4   | Di-basic potassium phosphate  | 2,5   |
| 5   | Glucose                       | 2,5   |

pH 7,3 ± 0,2

Sterilisasi 121°C; 15 menit

ket: 30g untuk dilarutkan kedalam 1 L akuades

Tabel 5. Komposisi medium TSA (*Trypticase Soya Agar*) OXOID, LTD Basingstoke, Hampshire, England

| No. | Bahan-bahan     | (g/L) |
|-----|-----------------|-------|
| 1   | Trypticase      | 15,0  |
| 2   | Soya peptone    | 5,0   |
| 3   | Sodium Chloride | 5,0   |
| 4   | Agar            | 15,0  |

pH 7,3 ± 0,2

Sterilisasi 121°C; 15 menit

ket: 40g untuk dilarutkan kedalam 1 L akuades

Tabel 6. Komposisi medium NA (*Nutrient Agar*) OXOID, LTD Basingstoke, Hampshire, England

| No. | Bahan-bahan      | (g/L) |
|-----|------------------|-------|
| 1   | Lab lemco powder | 1,0   |
| 2   | Yeast extract    | 2,0   |
| 3   | Peptone          | 5,0   |
| 4   | Sodium chloride  | 5,0   |
| 5   | Agar             | 15,0  |

pH 7,3 ± 0,2

Sterilisasi 121°C; 15 menit

ket: 28g untuk dilarutkan ke dalam satu liter akuades

Tabel 7. Komposisi bahan lainnya

| No. | Reagen  | Komposisi                                     |
|-----|---|---|
| 1   | Hydrogen peroksida (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )<br>30%, MERCK Darmstadt,<br>Germany   | 100%,<br>M = 34,01 g/mol                      |
| 2   | Emersi<br>MERCK Darmstadt, Germany  |   |
| 3   | Brucine Sulfate n-Hydrate<br>(C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> · nH <sub>2</sub> O<br>Wako Pure Chemical Industries,<br>Ltd. | M = 887,02 g/mol                              |
| 4   | Bactident Oxidase Kit<br>MERCK Darmstadt, Germany   |   |
| 5   | Asam Sulfat (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )<br>MERCK Darmstadt, Germany   | M = 98,08 g/mol                               |
| 6   | Natrium chloride (NaCl)<br>Bolab GmbH, Bonn   | M = 58,44 g/mol                               |
| 7   | MIO (Motility Indole Ornithine)<br>Medium<br>SIGMA CHEMICAL Co.<br>USA  | 31 g, untuk dilarutkan<br>kedalam 1 L akuades |
| 8   | CMC (Carboxymethyl<br>Cellulose) Medium<br>KANTO Chemical Co., Inc.<br>Tokyo, Japan   | pH 6,0 ~ 8,5                                  |

Tabel 8. Komposisi pewarna Gram

| No. | Reagen                           | Komposisi  |
|-----|----------------------------------|--|
| 1   | Gram A (Anilin crystal violet)   | Crystal violet indicator<br>( $C_{25}H_{30}ClN_3$ , $M = 407,99$ g/mol)<br>(MERCK) 5 g<br>Anilin 2 g<br>Alkohol 95% 1 ml<br>Akuades 20 ml  |
|     | Gram A (Hucker's crystal violet) | <b>Larutan A</b><br>Crystal violet indicator<br>( $C_{25}H_{30}ClN_3$ , $M = 407,99$ g/mol)<br>(MERCK) 3 g<br>Alkohol 95% 20 ml<br><b>Larutan B</b><br>Ammonium oksalat 0,8 g<br>Akuades 80 ml<br>Kedua larutan dilarutkan tersendiri, lalu dicampur |
| 2   | Gram B (Lugol's Iodine)          | $I_2$ (MERCK Darmstadt, Germany) 5 g<br>KI ( $M = 166,00$ g/mol) (Bolab GmbH, Bonn) 0,2 g<br>Akuades 100 ml<br>$I_2$ dan KI dicampur dalam mortar, kemudian dihaluskan dan ditambah akuades hingga 100 ml  |
| 3   | Gram C (Alkohol Aseton)          | Alkohol 95% (MERCK Darmstadt, Germany) 70 ml<br>Acetone 30 ml  |
| 4   | Gram D (Safranin)                | Safranin 0,5 g<br>Alkohol 95% 10 ml<br>Akuades 100 ml<br>Safranin dilarutkan dalam alkohol, kemudian ditambah akuades dan disaring dengan kertas saring  |

#### Lampiran 4. Potensi Enam Isolat Bakteri Pereduksi Nitrat

Tabel 4. Potensi enam isolat bakteri pereduksi nitrat

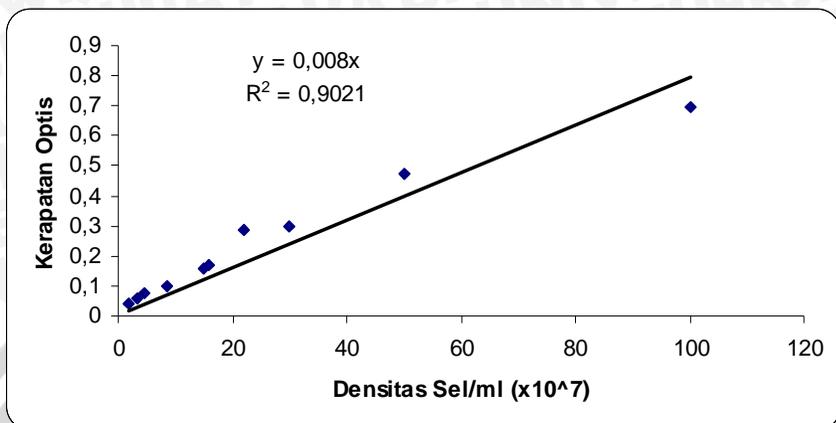
| Kode Isolat Baru | Penurunan konsentrasi nitrat (%) |
|------------------|----------------------------------|
| DR-14            | 97                               |
| DU-27-1          | 95                               |
| DU-30-2          | 93                               |
| AT-8             | 93                               |
| DU-27-4          | 91                               |
| DU-27-2          | 90                               |

Keterangan : DR = Denitrifikasi Hilir; DU = Denitrifikasi Hulu; AT = Nitrifikasi Tengah.

#### Lampiran 5. Kurva Standar Densitas Sel Konsorsium

Tabel 5. Hasil pengukuran kerapatan optis serta perhitungan jumlah sel pada pembuatan kurva standar di medium TSB + 10 mg/L NO<sub>3</sub>

| Perbandingan | Densitas bakteri (sel/ml) | OD    |
|--------------|---------------------------|-------|
| 1:30         | $1,9 \times 10^7$         | 0,042 |
| 1:25         | $3,3 \times 10^7$         | 0,056 |
| 1:20         | $4,6 \times 10^7$         | 0,078 |
| 1:15         | $8,5 \times 10^7$         | 0,101 |
| 1:10         | $1,5 \times 10^8$         | 0,155 |
| 1:08         | $1,6 \times 10^8$         | 0,168 |
| 1:06         | $2,2 \times 10^8$         | 0,288 |
| 1:04         | $3,0 \times 10^8$         | 0,3   |
| 1:02         | $5,0 \times 10^8$         | 0,472 |
| 1:01         | $1,0 \times 10^9$         | 0,697 |

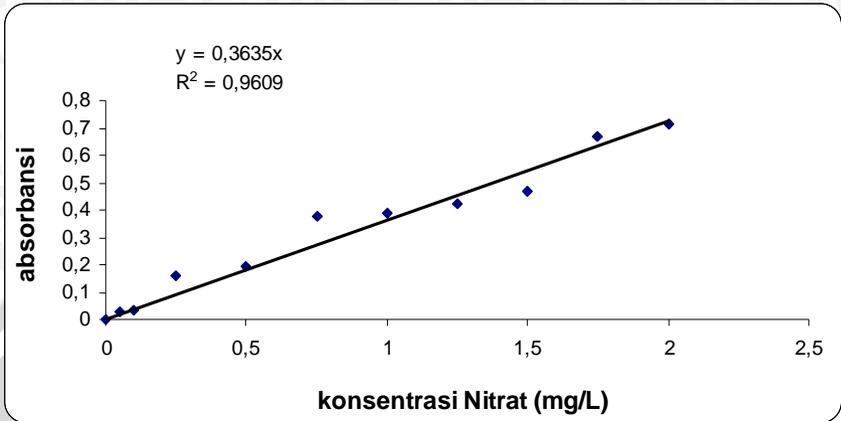


Gambar 1. Kurva standar densitas sel pada medium TSB

### Lampiran 6. Kurva Baku Konsentrasi nitrat ( $\text{NO}_3$ )

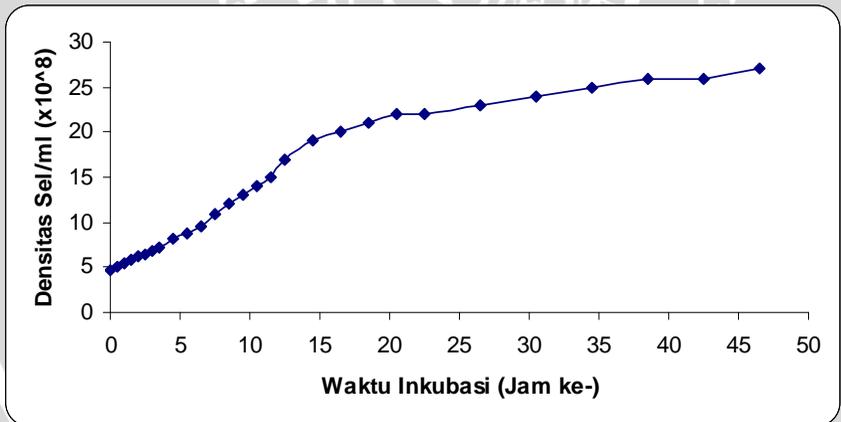
Tabel 7. Hasil pengukuran absorbansi pada pembuatan kurva baku nitrat

| No. | Konsentrasi nitrat (mg/L) | Kerapatan optis |
|-----|---------------------------|-----------------|
| 1   | 0                         | 0               |
| 2   | 0,05                      | 0,028           |
| 3   | 0,1                       | 0,037           |
| 4   | 0,25                      | 0,16            |
| 5   | 0,5                       | 0,195           |
| 6   | 0,75                      | 0,375           |
| 7   | 1                         | 0,391           |
| 8   | 1,25                      | 0,422           |
| 9   | 1,5                       | 0,469           |
| 10  | 1,75                      | 0,668           |
| 11  | 2                         | 0,712           |



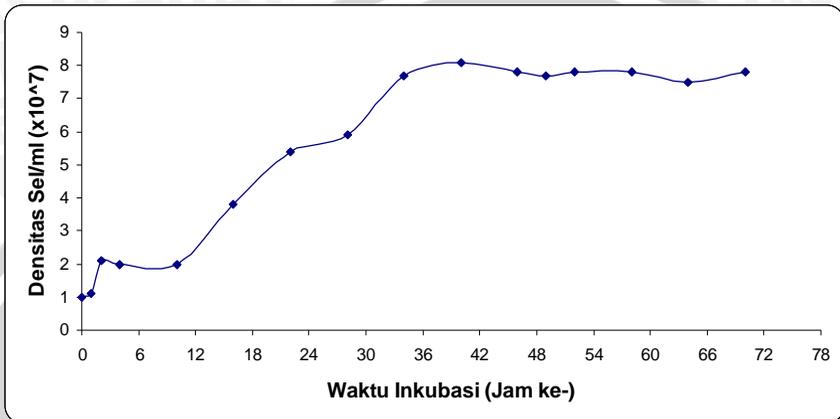
Gambar 2. Kurva baku nitrat

**Lampiran 7. Kurva Pertumbuhan Konsorsium Bakteri Pereduksi Nitrat pada Medium TSB-N (10mg/L) (Uji Pendahuluan)**



Gambar 3. Kurva pertumbuhan konsorsium bakteri pereduksi nitrat dalam medium TSB-N (10mg/L) (uji pendahuluan)

**Lampiran 8. Kurva Pertumbuhan Konsorsium Bakteri Pereduksi Nitrat pada Medium B-12 (Uji Pendahuluan)**



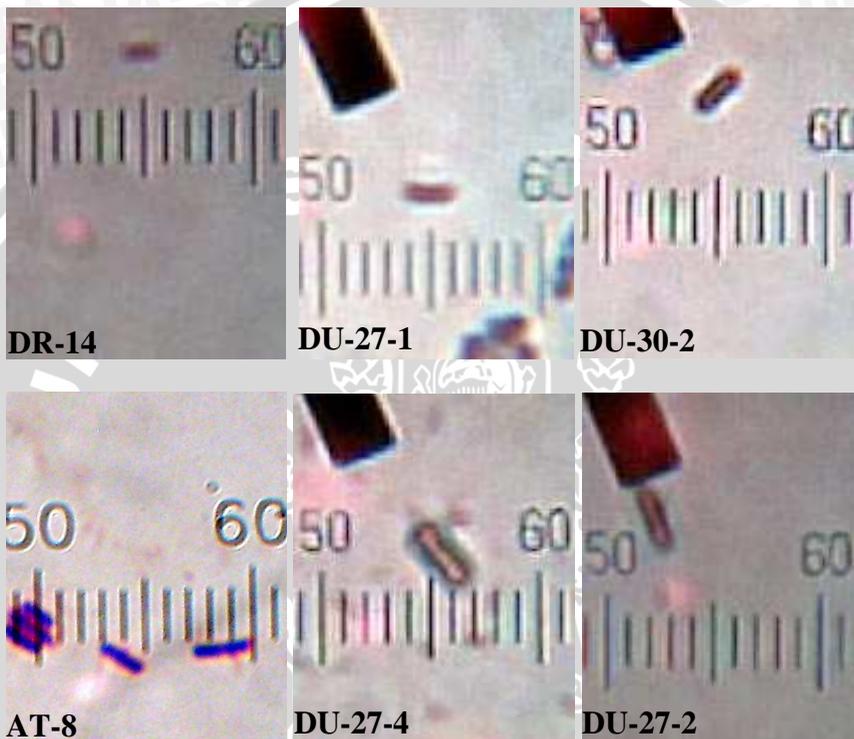
Gambar 5. Kurva pertumbuhan konsorsium bakteri pereduksi nitrat dalam medium B-12.

**Lampiran 9. Hasil Uji Pendahuluan Pengukuran Penurunan Konsentrasi nitrat di medium TSB + NO<sub>3</sub> 10 mg/L**

Tabel 8. hasil uji pendahuluan konsentrasi nitrat dalam medium TSB dengan penambahan nitrat 10mg/L

| Jam ke- | NO <sub>3</sub> (mg/L) |
|---------|------------------------|
| 0       | 11,14                  |
| 12      | 7,66                   |
| 24      | 3,34                   |
| 48      | 5,04                   |

**Lampiran 10. Morfologi Isolat-isolat Konsorsium Bakteri dengan Pewarnaan Gram (Perbesaran lensa objektif 100x)**



Gambar 6. Isolat-isolat konsorsium bakteri dengan pewarnaan Gram (1 skala = 2,5 $\mu$ m)

**Lampiran 11. Hasil analisis ragam (ANOVA) Parameter  
Penurunan Konsentrasi Nitrat dan Peningkatan  
Densitas Sel Antarperlakuan Dalam Medium Uji**

Tabel 9. Hasil analisis ragam peningkatan densitas sel konsorsium

| Source            | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F        | Sig. |
|-------------------|-------------------------|----|-------------|----------|------|
| Corrected Model   | 9.966(a)                | 24 | .415        | 4.826    | .000 |
| Intercept         | 137.778                 | 1  | 137.778     | 1601.188 | .000 |
| perlakuan         | 2.681                   | 4  | .670        | 7.790    | .000 |
| waktu             | 5.848                   | 4  | 1.462       | 16.990   | .000 |
| perlakuan * waktu | 1.437                   | 16 | .090        | 1.044    | .431 |
| Error             | 4.302                   | 50 | .086        |          |      |
| Total             | 152.046                 | 75 |             |          |      |
| Corrected Total   | 14.268                  | 74 |             |          |      |

Keterangan: berbeda nyata ( $p < 0,05$ )

Tabel 10. Hasil analisis ragam penurunan kadar nitrat (mg/L) medium

| Source            | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F       | Sig.  |
|-------------------|-------------------------|----|-------------|---------|-------|
| Corrected Model   | 1490.104(a)             | 24 | 62.088      | 10.072  | .000  |
| Intercept         | 1477.765                | 1  | 1477.765    | 239.736 | .000  |
| perlakuan         | 47.939                  | 4  | 11.985      | 1.944   | .118  |
| waktu             | 1045.560                | 4  | 261.390     | 42.405  | .000  |
| perlakuan * waktu | 396.606                 | 16 | 24.788      | 4.021   | .000* |
| Error             | 308.207                 | 50 | 6.164       |         |       |
| Total             | 3276.077                | 75 |             |         |       |
| Corrected Total   | 1798.311                | 74 |             |         |       |

Keterangan: \* berbeda nyata ( $p < 0,05$ )

## Lampiran 12. Hasil Uji BNJ (Beda Nyata Jujur) Parameter Penurunan Konsentrasi Nitrat dan Peningkatan Densitas Sel antar perlakuan dalam Medium Uji

Tabel 11. Hasil uji BNJ peningkatan densitas sel konsorsium pada setiap medium selama masa inkubasi

|      | Jam ke-0 |     | Jam ke-6 |      | Jam ke-12 |      | Jam ke-18 |      | Jam ke-24 |      |
|------|----------|-----|----------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|
| TSB  | 0,774    | a A | 1,515    | Ab A | 1,614     | ab B | 1,962     | b B  | 1,677     | ab A |
| N5   | 1,044    | a A | 1,133    | a A  | 1,627     | a B  | 1,412     | a AB | 1,563     | a A  |
| N10  | 0,797    | a A | 1,167    | Ab A | 1,720     | b B  | 1,651     | b AB | 1,820     | b A  |
| N20  | 0,956    | a A | 1,345    | Ab A | 1,685     | b B  | 1,838     | b B  | 1,621     | ab A |
| B-12 | 0,723    | a A | 1,014    | a A  | 1,006     | a A  | 0,972     | a A  | 1,247     | a A  |

Keterangan:

- huruf kecil yang sama di belakang nilai rata-rata pada baris yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata berdasarkan uji BNJ pada tingkat signifikansi 95%
- huruf besar yang sama di belakang nilai rata-rata pada kolom yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata berdasarkan uji BNJ pada tingkat signifikansi 95%

Tabel 12. Hasil uji BNJ penurunan konsentrasi nitrat dalam setiap medium selama masa inkubasi

|      | Jam ke-0 |     | Jam ke-6 |     | Jam ke-12 |     | Jam ke-18 |     | Jam ke-24 |   |
|------|----------|-----|----------|-----|-----------|-----|-----------|-----|-----------|---|
| TSB  | 10,47    | c   | 4,58     | abc | 4,30      | abc | 2,72      | abc | 0,17      | a |
| N5   | 9,56     | bc  | 4,98     | abc | 4,70      | abc | 3,85      | abc | 0,30      | a |
| N10  | 7,67     | abc | 4,09     | abc | 3,39      | abc | 2,73      | abc | 0,15      | a |
| N20  | 7,35     | abc | 4,19     | abc | 3,60      | abc | 3,02      | abc | 0,15      | a |
| B-12 | 21,64    | d   | 4,14     | abc | 2,18      | ab  | 0,98      | abc | 0,04      | a |

Keterangan:

- huruf kecil yang sama di belakang nilai rata-rata menunjukkan tidak ada beda nyata berdasarkan uji BNJ pada tingkat signifikansi 95%

**Lampiran 13. Nilai Keterandalan ( $R^2$ ) dan Persamaan Regresi Densitas Sel terhadap Penurunan Konsentrasi Nitrat Medium**

| Medium               | $R^2$  | Persamaan garis          |
|----------------------|--------|--------------------------|
| TSB + nitrat 0 mg/L  | 0,7822 | $Y = -1.10^8 X + 2.10^9$ |
| TSB + nitrat 5 mg/L  | 0,6478 | $Y = -1.10^8 X + 2.10^9$ |
| TSB + nitrat 10 mg/L | 0,7636 | $Y = -1.10^8 X + 2.10^9$ |
| TSB + nitrat 20 mg/L | 0,5911 | $Y = -1.10^8 X + 2.10^9$ |
| B-12                 | 0,6507 | $Y = -4.10^7 X + 2.10^9$ |

