

ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI DENITRIFIKASI SEBAGAI AGEN BIOREMEDIASI NITROGEN ANORGANIK

Khairul Syahputra^{*)}, Iman Rusmana^{**)}, dan Utut Widyastuti^{**)}

^{*)} Loka Riset Pemuliaan dan Teknologi Budidaya Perikanan Air Tawar
Jl. Raya 2 Sukamandi, Subang, Jawa Barat 52613
E-mail: khairul_syahputra@yahoo.com

^{**)} Institut Pertanian Bogor
Jl. Raya Darmaga, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

(Naskah diterima: 11 Juni 2010; Disetujui publikasi: 25 Juli 2011)

ABSTRAK

Denitrifikasi merupakan salah satu proses utama yang mengurangi kandungan senyawa nitrogen anorganik di lingkungan. Proses ini dapat digunakan untuk mengatasi kelebihan senyawa nitrogen anorganik yang tinggi di kolam budidaya perikanan. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi isolat bakteri denitrifikasi sebagai agen bioremediasi senyawa nitrogen anorganik. Sebanyak 21 isolat bakteri pereduksi nitrat berhasil diisolasi dari medium pengkayaan dengan konsentrasi nitrat 100 μM dan 1500 μM . Sebanyak 6 isolat merupakan kelompok bakteri denitrifikasi (fermentatif negatif) dan 15 isolat termasuk kelompok bakteri fermentatif. Berdasarkan hasil seleksi didapatkan isolat HNF5 dan LNF mempunyai kemampuan reduksi nitrat yang tinggi. Aktivitas reduksi nitrat terjadi dari awal inkubasi, di mana aktivitas paling cepat terjadi pada fase eksponensial pertumbuhan bakteri. Isolat HNF5 dan LNF memiliki kecepatan maksimum reduksi nitrat (V_{maks}) 0,17 $\text{mM}\cdot\text{h}^{-1}$ dan 0,16 $\text{mM}\cdot\text{h}^{-1}$ dengan nilai konstanta Michaelis-Menten (K_m) 0,40 mM dan 0,28 mM . Identifikasi dengan sekuen 16S-rRNA memperlihatkan bahwa isolat HNF5 dan LNF mempunyai kemiripan dengan *Pseudomonas aeruginosa*.

KATA KUNCI: denitrifikasi, nitrogen anorganik, reduksi nitrat

ABSTRACT: *Isolation and characterization of denitrifier bacteria as bioremediation agent of inorganic nitrogen. By: Khairul Syahputra, Iman Rusmana, and Utut Widyastuti*

*Denitrification is one of the major processes of inorganic nitrogen removal in the environments. This processes can be used to remove high in-organic nitrogen compounds in aquaculture ponds. The research was aimed to isolate and characterize denitrifier bacteria isolates as bioremediation agents of in-organic nitrogen compounds. Twenty one isolates of nitrate reducing bacteria isolated from enrichment medium with 100 μM and 2000 μM nitrate, 6 isolates were denitrifier and 15 isolates were dissimilative nitrate ammonifier bacteria. HNF5 and LNF isolates had the higher nitrate reducing activity. The activity of nitrate reduction was started in the first hour of incubation and the highest nitrate reducing activity occurred during the exponential phase. The V_{max} value of HNF5 and LNF isolates were 0.17 $\text{mM}\cdot\text{h}^{-1}$, 0.16 $\text{mM}\cdot\text{h}^{-1}$, respectively. While K_m values were 0.40 mM , 0.28 mM , respectively. Based on 16S-rRNA sequence similarity, HNF5 and LNF isolates were closely related to *Pseudomonas aeruginosa*.*

KEYWORDS: *denitrification, in-organic nitrogen, nitrat reducing*

PENDAHULUAN

Senyawa nitrogen di perairan alami dan kolam-kolam budidaya ditemukan dalam dua bentuk yaitu nitrogen anorganik dan organik. Pada kolam budidaya, senyawa nitrogen anorganik menjadi penting untuk dipelajari karena merupakan bagian dari parameter mutu kualitas air. Senyawa-senyawa ini dihasilkan dari transformasi nitrogen secara biologis dan abiologis, secara biologis dihasilkan dari aktivitas makrobiologi dan mikrobiologi. Senyawa nitrogen anorganik meliputi amonia, nitrit, dan nitrat bersifat toksik bagi organisme akuatik bila ditemukan dalam jumlah yang tinggi dalam perairan.

Dalam pengendalian senyawa-senyawa ini dapat memanfaatkan proses biologis dari bakteri seperti nitrifikasi dan denitrifikasi. Pengendalian dengan nitrifikasi saja tidak efektif untuk menghilangkan senyawa-senyawa tersebut dari badan perairan karena akan menghasilkan senyawa baru yang juga berupa pencemar. Nitrifikasi merupakan proses oksidasi senyawa amonia yang menghasilkan senyawa nitrit dan nitrat, seperti diketahui senyawa tersebut juga berupa pencemar yang akan tetap berada di badan perairan (Effendi, 2003). Untuk dapat menghilangkan senyawa nitrogen anorganik dari badan air dapat memanfaatkan proses lainnya yaitu denitrifikasi karena proses ini akan melepaskan senyawa-senyawa tersebut ke udara bebas. Denitrifikasi merupakan proses reduksi nitrat, melalui senyawa intermediet nitrit dan nitrik oksida, menjadi nitrous oksida atau gas dinitrogen. Proses ini melepaskan senyawa nitrogen pada lingkungan, di mana nitrat direduksi menjadi bentuk gas yang dilepas ke atmosfer (Zumft, 1997).

Meskipun dapat melepaskan senyawa nitrogen dari badan perairan ke udara, proses denitrifikasi juga dapat berakibat buruk terhadap lingkungan karena dari prosesnya berpotensi menghasilkan gas nitrit oksida (NO) dan nitrous oksida (N₂O) yang merupakan gas potensial rumah kaca. Produk yang dihasilkan selama proses denitrifikasi tersebut tergantung dari jenis bakteri yang didukung dengan kelengkapan enzim selama aktivitasnya (Burlage *et al.*, 1998). Pada penelitian ini mencoba mendapatkan bakteri denitrifikasi dengan aktivitas reduksi nitrat yang menghasilkan gas nitrogen sebagai produk akhirnya bukan berupa nitrit oksida maupun dinitrous oksida, bakteri ini nantinya dapat

digunakan sebagai agen bioremediasi senyawa nitrogen anorganik yang ramah lingkungan pada kolam-kolam budidaya perikanan. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi isolat bakteri denitrifikasi sebagai agen bioremediasi senyawa nitrogen anorganik.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan pada bulan Februari sampai dengan September 2007. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi FMIPA, Kampus IPB Baranangsiang Bogor. Sampel air dan sedimen diambil dari muara Sungai Cisadane Kabupaten Tangerang. Sampel diambil pada tiga lokasi dengan menggunakan botol sampel steril untuk sampel air dan *sedimen core* steril untuk sampel sedimen. Pada setiap lokasi dilakukan pengukuran beberapa parameter fisik dan kualitas air yang meliputi: pH, suhu, salinitas, dan kandungan oksigen terlarut dengan menggunakan *Water Quality Checker* yang dilakukan secara *in-situ*, sedangkan kandungan senyawa amonia, nitrit, dan nitrat dianalisis di Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi FMIPA, Kampus IPB Baranangsiang Bogor.

Analisis Kandungan Senyawa Amonia, Nitrit, dan Nitrat Media Inkubasi Bakteri

Penentuan kadar amonia dilakukan dengan metode phenate (Hutagalung *et al.*, 1997). Kadar nitrit ditentukan dengan metode sulfanilamide (Cleseri *et al.*, 1989). Metode yang digunakan untuk analisis senyawa nitrat adalah metode brusin (Cleseri *et al.*, 1989).

Isolasi dan Karakterisasi Morfologi Bakteri Denitrifikasi

Bakteri denitrifikasi diisolasi dengan teknik pengkayaan pada kondisi anaerobik dan menggunakan medium cair dan padat. Media yang digunakan untuk isolasi terdiri atas dua macam yaitu media yang mengandung miskin nitrat (100 µM) dan media yang mengandung kaya nitrat (1500 µM) dengan kalium nitrat sebagai sumber nitrat. Media cair denitrifikasi dibuat dengan komposisi: 10 g natrium asetat; 5,0 g KNO₃; 3,0 g yeast ekstrak; 0,5 g (NH₄)₂SO₄; 0,9 g K₂HPO₄; 0,5 g MgSO₄.7H₂O; 0,2 g KH₂PO₄; 0,1 g CaCl₂.2H₂O; dengan salinitas 2% dan pH 7. Medium padat komposisinya sama dengan medium cair, hanya ditambahkan Bacto agar

20 g per liter (Rodina, 1972). Sebanyak 40 mL medium tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berukuran 50 mL. Kondisi anaerobik dibuat dengan cara memasukkan gas nitrogen bebas oksigen melalui jarum (*syringe*) steril ke dalam tabung reaksi selama 5-10 menit.

Sebanyak 5 mL sampel air dan 1 mL lumpur sedimen (campuran sedimen dan air = 1:1) diinokulasikan dengan jarum suntik (*syringe*) steril ke dalam medium cair anaerob, kemudian diinkubasi pada suhu 28°C-30°C selama 7-10 hari. Bakteri denitrifikasi diisolasi dengan metode gores kuadran pada media agar dan kemudian diinkubasi dalam *Anaerobic Jar* (Oxoid, England). Isolat-isolat murni yang diperoleh ditumbuhkan pada medium agar miring sebagai biakan stok.

Isolat murni hasil isolasi diamati morfologi koloninya yang meliputi: bentuk, warna, dan tepiannya. Morfologi sel diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Untuk reaksi Gram dari tiap isolat ditentukan dengan teknik pewarnaan Gram (Hadjoetomo, 1993).

Untuk memastikan isolat merupakan bakteri denitrifikasi atau bakteri fermentatif dilakukan uji fermentatif/oksidatif. Isolat hasil isolasi diinokulasikan pada medium uji fermentatif dengan sumber karbonnya adalah glukosa dan biru metil sebagai indikator keasaman pada tabung reaksi. Inkubasi dilakukan selama dua minggu pada kondisi anaerob (Hugh & Leifson, 1953). Uji positif ditunjukkan dengan berubahnya warna medium dari biru menjadi bening.

Seleksi Aktivitas Bakteri Denitrifikasi

Seleksi tahap awal dilakukan untuk melihat pola pertumbuhan isolat bakteri denitrifikasi. Sebanyak 0,1 mL kultur yang berumur 3 hari dari masing-masing isolat yang terpilih diinokulasikan pada botol sampel 50 mL yang berisi 10 mL medium denitrifikasi. Inkubasi dilakukan selama 7-10 hari secara anaerob pada suhu 28°C-30°C. Setiap 2 hari diukur nilai *Optical Density* (OD) masing-masing isolat dengan menggunakan spektrofotometer UV-120-02 Shimadzu pada panjang gelombang 540 nm. Profil nilai OD tersebut memperlihatkan pola pertumbuhan isolat bakteri denitrifikasi hasil isolasi dan digunakan sebagai dasar penentuan waktu pengamatan pada uji seleksi kemampuan pemanfaatan senyawa nitrat.

Seleksi berikutnya yaitu menganalisis kemampuan isolat bakteri denitrifikasi terseleksi dalam mereduksi senyawa nitrat. Sebanyak 1 mL kultur isolat denitrifikasi yang berumur 3 hari (fase eksponensial) diinokulasikan pada 40 mL medium denitrifikasi dengan konsentrasi nitrat $\pm 1,5$ mM. Inkubasi dilakukan selama 7 hari dengan kondisi anaerob pada suhu 28°C-30°C. Isolat yang terbaik dipilih berdasarkan kemampuannya mereduksi senyawa nitrat, jumlah nitrit yang terbentuk, dan jumlah gas yang dihasilkan.

Kemampuan isolat dalam pembentukan gas dapat diketahui dengan uji pembentukan gas. Satu lup inokulan isolat denitrifikasi terseleksi diinokulasikan pada tabung yang berisi medium cair denitrifikasi di mana di dalamnya terdapat tabung durham. Inkubasi dilakukan pada suhu 28°C-30°C selama 1 minggu. Pembentukan gas diamati dengan melihat ada tidaknya gelembung gas pada tabung durham.

Kinetika Reduksi Nitrat

Untuk pengujian kinetika reduksi nitrat, inokulan disiapkan dengan menumbuhkan isolat pada 40 mL medium cair denitrifikasi dan diinkubasi pada suhu 28°C-30°C selama tiga hari. Kultur bakteri dibuat pelet dengan cara disentrifugasi pada 5.000 rpm selama 15 menit. Pelet dipisahkan dan diresuspendi dengan medium denitrifikasi tanpa nitrat. Sebanyak 4 mL kultur bakteri diinokulasi ke dalam botol yang berisi 35 mL medium denitrifikasi dengan konsentrasi nitrat: 0, 100, 500, 1.000, 2.000 μ M. Inkubasi dilakukan selama 9 jam. Pada setiap interval 3 jam dilakukan analisis kadar nitrat. Analisis kinetika reduksi nitrat dilakukan dengan menggunakan persamaan kinetika Michaelis-Menten (White, 2000).

Identifikasi dan Karakterisasi

Untuk mengidentifikasi isolat bakteri dari hasil isolasi perlu dilakukan serangkaian pengujian fisiologi kimia dan analisis sekuen gen 16S rRNA atau gen penyandi *nar* dan *nap* untuk bakteri pereduksi nitrat. Analisis sekuensing dilakukan dengan menggunakan produk PCR dan dengan sekuen tersebut dapat ditentukan kekerabatan dari isolat bakteri denitrifikasi. Dalam analisis kekerabatan dapat digunakan program EBI (European Bioinformatics Insitute) yang dapat diakses melalui situs <http://www.ebi.ac.uk>.

Tahapan awal untuk menganalisis gen-gen yang terlibat dalam proses reduksi nitrat adalah mengamplifikasi gen-gen tersebut dari semua isolat terseleksi. Sebelum mengamplifikasi gen maka terlebih dahulu dilakukan isolasi DNA genom total, kemudian hasil PCR divisualisasi dengan elektroforesis seperti yang telah dipaparkan oleh Sambrook *et al.* (1989). Amplifikasi gen dilakukan dengan PCR menggunakan primer spesifik *nar*, *nap*, dan 16S-rRNA yaitu seperti tertera pada Tabel 1.

HASIL DAN BAHASAN

Kondisi Kualitas Air Tempat Pengambilan Sampel

Kondisi kualitas air di perairan muara Sungai Cisadane tempat pengambilan sampel dapat dikatakan kurang baik bagi organisme

akuatik. Ini terlihat dari hasil pengukuran beberapa parameter kualitas air yang disajikan pada Tabel 2. Beberapa parameter kualitas yang mengindikasikan muara Sungai Cisadane tercemar adalah tingginya kandungan nitrit dan amonia terlarut.

Kondisi perairan muara Cisadane dapat dikatakan bersifat anaerob karena kandungan oksigen yang terlarutnya sangat terbatas yaitu <2 mg/L khususnya pada lokasi *sampling* II dan III. Menurut Hem (1979), bila kondisi perairan bersifat anaerobik maka terjadi proses reduksi senyawa kimia di mana hasil dari proses tersebut menghasilkan zat-zat beracun. Effendi (2003) menambahkan bahwa kadar oksigen terlarut kurang dari 4 mg/L menimbulkan efek yang kurang menguntungkan bagi hampir semua organisme akuatik.

Tabel 1. Sekuen primer yang digunakan pada amplifikasi PCR

Table 1. Primer sequence for PCR amplification

Primer Primer	Gen target Target gene	Sekuen (5' ke 3') Sequence (5' to 3')
narG 1960f	<i>narG</i>	TAY GTS GGC CAR GAR AA
narG 2659r	<i>narG</i>	TTY TCR TAC CAB GTB GC
napA V67f	<i>napA</i>	TAY TTY YTN HSN AAR ATH ATG TAY GG
napA V67r	<i>napA</i>	DAT NGG RTG CAT YTC NGC CAT RTT
63f	<i>16S-rRNA</i>	CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC
1387r	<i>16S-rRNA</i>	GGG CGG WGT GTA CAA GGC

* International Union for Bacteriology codes for bases:
Y, C or T; R, A or G; M, A or C; K, G or T; S, G or C; W, A or T; H, A, C, or T; D, A, G, or T;
and N, A, C, G, or T

Tabel 2. Kondisi kualitar air pada lokasi pengambilan sampel air dan sedimen

Table 2. Water quality condition at the location of water and sediment samplings

Parameter Parameters	Satuan Unit	Lokasi (Location)		
		I	II	III
pH		7.5	7.3	6.9
Oksigen terlarut (<i>Dissolved oxygen</i>)	mg/L	6.20	0.56	0.40
Salinitas (<i>Salinity</i>)	%	3.5	1.0	0.5
Suhu (<i>Temperature</i>)	°C	32.6	32.6	32.6
Amonia (<i>Ammonia</i>)	mg/L	1.19	0.64	0.09
Nitrit (<i>Nitrite</i>)	mg/L	0.14	0.05	0.04
Nitrat (<i>Nitrate</i>)	mg/L	0.15	0.09	0.09
N ₂ O	nM	16.9	7.1	7.7

Rendahnya kandungan oksigen terlarut salah satu di antaranya disebabkan oleh aktivitas dekomposisi bahan organik dan oksidasi bahan organik yang memanfaatkan oksigen oleh mikroba, di mana proses oksidasi bahan organik meningkat dengan meningkatnya suhu (Boyd, 1990). Suhu pada lokasi pengambilan sampel relatif hangat, tingginya suhu muara Sungai Cisadane dikarenakan kondisi perairan yang relatif dangkal.

Kandungan senyawa amonia dan nitrit di lokasi pengambilan sampel tergolong tinggi. Kadar amonia pada perairan alami biasanya kurang dari 0,1 mg/L, kadar amonia yang tinggi merupakan indikasi adanya pencemaran bahan organik yang berasal dari limbah domestik, industri, dan limpasan pupuk pertanian. Nitrit pada perairan alami sekitar 0,001 mg/L dan sebaiknya tidak melebihi 0,06 mg/L (*Canadian Environmental Quality Guidelines*, 2002).

Isolasi dan Karakterisasi Morfologi Bakteri Pereduksi Nitrat

Penggunaan media pengkayaan yang selektif diharapkan bakteri yang tumbuh merupakan bakteri denitrifikasi karena pada media isolasi nitrat digunakan sebagai sumber nitrogen tunggal dan asetat sebagai sumber karbonnya yang hanya menunjang bagi pertumbuhan bakteri denitrifikasi. Zumft (1992) mengatakan bahwa terdapat beberapa

jenis kelompok bakteri denitrifikasi yang hidup pada perairan muara dan laut antara lain: *Alteromonas*, *Pseudomonas*, *Erythrobacter*, *Alcaligenes*, dan *Aquaspirillum*. Sebanyak 21 isolat bakteri pereduksi nitrat berhasil diisolasi dari tiga lokasi *sampling* (Tabel 3).

Dalam perlakuan pemberian nitrat tinggi dan rendah diharapkan akan terisolasi bakteri pereduksi nitrat yang memiliki gen *nar* dan *nap*. Dalam kondisi nitrat tinggi bakteri yang memiliki gen *nar* akan lebih dominan, dan sebaliknya bila kondisi nitrat sedikit hanya bakteri yang memiliki gen *nap* yang akan mampu memanfaatkan nitrat sebagai penerima elektron terakhir untuk mendapatkan energi. Rusmana (2006) menyatakan bahwa beberapa bakteri denitrifikasi seperti *Paracoccus pantotrophus*, *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas denitrificans*, dan *Pseudomonas aeruginosa* memiliki nitrat reduktase terikat membran (Nar) dan periplasmik (Nap).

Karakteristik morfologi koloni isolat-isolat yang berhasil diisolasi pada umumnya berbentuk bundar cembung dan bentuk tumbol dengan warna koloni meliputi putih, krem, kuning, dan merah muda. Morfologi sel dari setiap isolat adalah sebagian sel berbentuk bulat dan sebagian lagi berbentuk batang, seluruh isolat yang didapatkan bersifat gram negatif (Tabel 4). Pada umumnya kelompok bakteri denitrifikasi bersifat gram negatif berbentuk bulat atau batang (Buchanan & Gibbon, 1974).

Tabel 3. Isolat bakteri hasil isolasi
Table 3. Isolated bacteria

Jenis sampel <i>Types of sample</i>	Media pengkayaan <i>Enrichment medium</i>	Jumlah isolat <i>Numbers of isolate</i>	Kode isolat <i>Isolate name</i>
Air <i>Water</i>	Nitrat tinggi (<i>High nitrate</i>) (1.5 mM)	5	HNF1, HF1, HF2, HF3, & HF4
	Nitrat rendah (<i>Low nitrate</i>) (0.1 mM)	4	LNF, LF1, LF2, dan LF3
Sedimen <i>Sediment</i>	Nitrat tinggi (<i>High nitrate</i>) (1.5 mM)	7	HNF2, HNF3, HNF4, HNF5, HF5, HF6, dan HF7
	Nitrat rendah (<i>Low nitrate</i>) (0.1 mM)	5	LF4, LF5, LF6, LF7, & LF8
Total (<i>Total</i>)		21	

Tabel 4. Ciri morfologi sel dan koloni isolat hasil isolasi

Table 4. Morphological characteristics of cell and colony of isolates

Kode isolat <i>Isolate name</i>	Bentuk sel <i>Shape of cell</i>	Uji fermentatif <i>Fermentative test</i>	Morfologi koloni <i>Colony morphology</i>	
			Bentuk <i>Shape</i>	Warna <i>Colour</i>
HNF1	Batang <i>Rod</i>	Negatif <i>Negative</i>	<i>Circular, Convex, Entire</i>	Putih keabu-abuan <i>Grayish-white</i>
HNF2	Bulat <i>Coccus</i>	Negatif <i>Negative</i>	<i>Circular, Umbonate, Curled</i>	Krem <i>Cream</i>
HNF3	Batang <i>Rod</i>	Negatif <i>Negative</i>	<i>Circular, Raised, Undulate</i>	Putih kemerahan <i>Reddish white</i>
HNF4	Batang <i>Rod</i>	Negatif <i>Negative</i>	<i>Circular, Umbonate, Entire</i>	Merah muda <i>Pink</i>
HNF5	Batang <i>Rod</i>	Negatif <i>Negative</i>	<i>Circular, Convex, Entire</i>	Kuning kehijauan <i>Sulfur</i>
HF1	Bulat <i>Coccus</i>	Positif <i>Positive</i>	<i>Circular, Convex, Entire</i>	Krem <i>Cream</i>
HF2	Batang <i>Rod</i>	Positif <i>Positive</i>	<i>Circular, Umbonate, Entire</i>	Krem <i>Cream</i>
HF3	Bulat <i>Coccus</i>	Positif <i>Positive</i>	<i>Circular, Convex, Entire</i>	Krem <i>Cream</i>
HF4	Bulat <i>Coccus</i>	Positif <i>Positive</i>	<i>Circular, Umbonate, Entire</i>	Putih susu <i>Milky white</i>
HF5	Bulat <i>Coccus</i>	Positif <i>Positive</i>	<i>Circular, Umbonate, Entire</i>	Kuning muda <i>Flaxen</i>
HF6	Bulat <i>Coccus</i>	Positif <i>Positive</i>	<i>Circular, Umbonate, Entire</i>	Krem <i>Cream</i>
HF7	Batang <i>Rod</i>	Positif <i>Positive</i>	<i>Circular, Convex, Entire</i>	Krem <i>Cream</i>
LNF	Batang <i>Rod</i>	Negatif <i>Negative</i>	<i>Circular, Convex, Entire</i>	Hijau muda <i>Flaxen</i>
LF1	Bulat <i>Coccus</i>	Positif <i>Positive</i>	<i>Circular, Umbonate, Entire</i>	Krem <i>Cream</i>
LF2	Batang <i>Rod</i>	Positif <i>Positive</i>	<i>Circular, Convex, Entire</i>	Krem <i>Cream</i>
LF3	Bulat <i>Coccus</i>	Positif <i>Positive</i>	<i>Circular, Convex, Entire</i>	Kuning muda <i>Flaxen</i>
LF4	Batang <i>Rod</i>	Positif <i>Positive</i>	<i>Circular, Convex, Entire</i>	Krem <i>Cream</i>
LF5	Batang <i>Rod</i>	Positif <i>Positive</i>	<i>Circular, Umbonate, Entire</i>	Krem <i>Cream</i>
LF6	Bulat <i>Coccus</i>	Positif <i>Positive</i>	<i>Circular, Convex, Entire</i>	Krem <i>Cream</i>
LF7	Bulat <i>Coccus</i>	Positif <i>Positive</i>	<i>Circular, Convex, Entire</i>	Kuning muda <i>Flaxen</i>
LF8	Batang <i>Rod</i>	Positif <i>Positive</i>	<i>Circular, Convex, Entire</i>	Krem <i>Cream</i>

Keseluruhan isolat yang didapatkan tidak semuanya merupakan kelompok bakteri denitrifikasi, ada juga kelompok bakteri fermentatif yang melakukan metabolisme respirasi secara anaerob meskipun media yang digunakan merupakan media selektif untuk kelompok bakteri denitrifikasi. Berdasarkan hasil uji fermentatif/oksidatif diketahui bahwa dari 21 isolat yang diperoleh hanya 6 isolat (28,6%) yang merupakan kelompok bakteri denitrifikasi (fermentatif negatif) sedangkan selebihnya sebanyak 15 isolat (71,4%) merupakan kelompok bakteri fermentatif. Kelompok bakteri fermentatif diketahui dari kemampuan isolat tersebut memproduksi asam pada media yang mengandung glukosa pada kondisi anaerob diindikasikan dengan berubahnya warna biru methilen pada media menjadi kuning. Jenis bakteri *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella*, dan *Sigella* merupakan kelompok bakteri fermentatif yang bersifat fakultatif anaerobik (Buchanan & Gibbon, 1974).

Bakteri denitrifikasi merupakan bakteri yang memanfaatkan senyawa nitrat sebagai penerima elektron terakhir, senyawa nitrat direduksi menjadi nitrit dan selanjutnya akan membentuk gas nitrogen. Selain itu, terdapat beberapa jenis bakteri yang memanfaatkan senyawa nitrat dan membentuk amonia yang tergolong pada kelompok bakteri reduksi nitrat menjadi amonium dissimilatif. Rusmana & Nedwell (2004) menyatakan bahwa tipe metabolisme respirasi dan reduksi nitrat menjadi amonium dissimilatif (DNRA) dilakukan oleh kelompok bakteri dengan tipe metabolisme fermentatif.

Sebagian besar bakteri yang berhasil diisolasi merupakan kelompok bakteri pereduksi nitrat menjadi amonium. Dominannya bakteri kelompok ini dipengaruhi oleh kondisi perairan muara Sungai Cisadane yang kaya akan bahan organik. Rusmana (2003c) menyatakan bahwa kemampuan kompetisi bakteri dalam mereduksi nitrat bergantung pada kondisi lingkungan, pada konsentrasi bahan organik yang tinggi bakteri pereduksi nitrat menjadi amonium lebih kompetitif daripada bakteri denitrifikasi.

Seleksi Isolat Bakteri Pereduksi Nitrat

Pada tahap awal seleksi dilakukan untuk mencari isolat bakteri denitrifikasi yang mereduksi nitrat tinggi, membentuk nitrit sedikit dan menghasilkan gas yang tinggi. Pada

proses pengendalian pencemaran diharapkan proses reduksi nitrat membentuk nitrit dan amonia yang sedikit serta menghasilkan produk samping bukan berupa N_2O , karena produksi N_2O ini berdampak terhadap pemanasan global. N_2O merupakan salah satu gas rumah kaca yang potensial (Rusmana, 2003a). Begitu juga halnya dengan nitrit dan amonia, dalam konsentrasi yang tinggi akan bersifat toksik bagi organisme akuatik (Effendi, 2003).

Berdasarkan hasil uji reduksi nitrat awal menunjukkan kemampuan yang berbeda dari setiap isolat dalam mereduksi senyawa nitrat dengan kemampuan membentuk nitrit, amonia, dan gas yang berbeda pula. HNF5, HF7, LNF, LF1, dan LF6 merupakan isolat-isolat yang mereduksi nitrat yang tinggi dengan persentase 87,3%; 88,7%; 82,4%; 85,1%; dan 95,7%. Pada isolat HNF3 dan HNF4 tidak terdeteksi adanya senyawa nitrit yang terbentuk dengan persentase 0 selama uji, beberapa isolat yang menghasilkan nitrit dengan konsentrasi rendah antara lain HNF5, HF3, LNF, dan LF6 sebesar 0,2%; 3,6%; 0,4%; dan 0,5% dari senyawa nitrat yang direduksi. Amonia yang tinggi dihasilkan oleh kelompok bakteri fermentatif atau kelompok bakteri reduksi nitrat menjadi amonium dissimilatif, sedangkan pada bakteri denitrifikasi amonia yang dihasilkan sangat rendah. Isolat HNF1, HNF3, dan HNF4 merupakan isolat-isolat yang tidak menghasilkan amonia sewaktu uji, ketiga isolat ini merupakan kelompok bakteri denitrifikasi. Kemampuan dalam menghasilkan gas juga berbeda untuk tiap isolat yang diujikan. Isolat yang menghasilkan gas yang tinggi umumnya merupakan kelompok bakteri denitrifikasi dengan persentase 48,1%-100%. Isolat HNF3 dan HNF4 merupakan bakteri yang mampu menghasilkan gas paling tinggi hingga 100%, isolat HNF5 dan LNF mampu menghasilkan gas sebesar 87,9% dan 86,4% dari senyawa nitrat yang direduksi (Tabel 5).

Sistem metabolisme reduksi nitrat dari tiap isolat sangat beragam, kondisi ini terlihat dari kemampuan bakteri mereduksi nitrat tidak berhubungan dengan kemampuan isolat dalam menghasilkan gas. Widiyanto (2006) menyatakan bahwa kemampuan masing-masing isolat bakteri denitrifikasi terseleksi mempunyai spesifikasi yang berbeda dalam mereduksi senyawa nitrat dan memproduksi gas nitrogen. Isolat HNF5 dan LNF mampu mereduksi nitrat yang tinggi (87,3% dan 82,4%) dan juga menghasilkan gas tinggi (87,9% dan

Tabel 5. Reduksi nitrat oleh isolat bakteri pereduksi nitrat pada uji reduksi nitrat tahap awal dengan inkubasi selama 3 hari pada suhu ruang 29°C-31°C

Table 5. Nitrate reduction by nitrate reducing bacteria in the early stages of nitrate reduction test during 3 days incubation at room temperature of 29°C-31°C

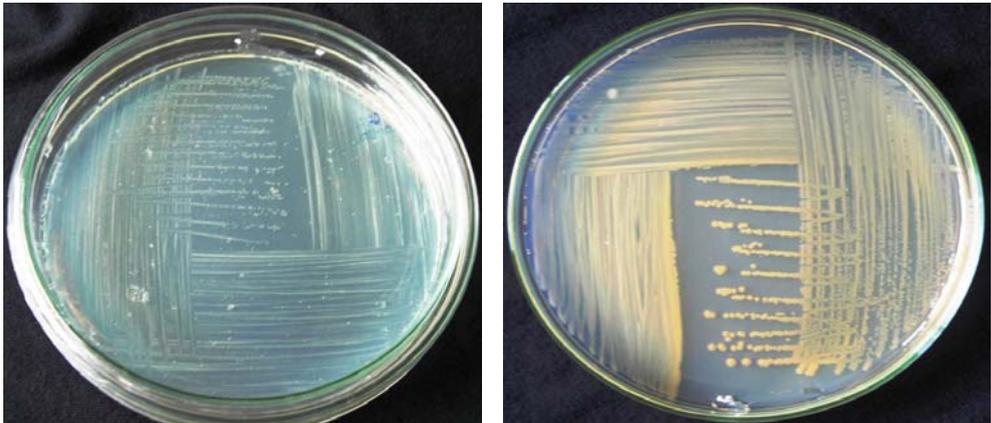
Isolat <i>Isolate</i>	Nitrat awal <i>Initial nitrate</i>	Nitrat tereduksi <i>Reduced nitrate</i>		Nitrit terbentuk <i>Produced nitrite</i>		Amonia terbentuk <i>Produced ammonia</i>		Estimasi gas terbentuk <i>Estimation of produced gas</i>	
		mM	%	mM	%	mM	%	mM	%
		HNF1	1.94	0.64	33.14	0.28	44.24	0.00	0.00
HNF2	1.94	0.88	45.24	0.20	23.25	0.25	28.69	0.42	48.06
HNF3	1.94	0.18	9.47	0.00	0.00	0.00	0.00	0.18	100.00
HNF4	1.94	0.21	10.78	0.00	0.00	0.00	0.00	0.21	100.00
HNF5	1.53	1.34	87.32	0.00	0.16	0.16	11.94	1.18	87.90
HF1	1.53	0.46	29.88	0.28	61.94	0.18	39.87	0.00	0.00
HF2	1.53	0.30	19.59	0.21	71.42	0.09	30.41	0.00	0.00
HF3	1.94	0.11	5.52	0.00	3.63	0.09	85.44	0.01	10.93
HF4	1.40	0.24	17.51	0.24	99.04	0.09	37.38	0.00	0.00
HF5	1.94	0.64	33.14	0.32	49.41	0.43	67.64	0.00	0.00
HF6	1.68	0.60	35.84	0.28	47.24	0.39	64.62	0.00	0.00
HF7	1.53	1.36	88.72	0.46	34.15	0.80	58.75	0.10	7.10
LNF	1.68	1.38	82.41	0.01	0.42	0.18	13.23	1.19	86.35
LF1	1.38	1.17	85.12	0.13	11.22	0.91	78.01	0.13	10.77
LF2	1.53	1.03	67.40	0.35	34.30	0.50	48.61	0.18	17.09
LF3	1.94	0.54	27.88	0.32	58.73	0.16	29.62	0.06	11.65
LF4	1.40	0.36	25.53	0.19	52.01	0.09	25.63	0.08	22.36
LF5	1.94	0.82	42.35	0.24	29.53	0.09	11.14	0.49	59.33
LF6	1.68	1.60	95.69	0.01	0.54	1.49	92.56	0.11	6.90
LF7	1.94	0.82	42.35	0.28	34.63	0.09	11.14	0.44	54.23
LF8	1.94	1.07	55.50	0.19	18.06	0.91	85.04	0.00	0.00

86,4%). Isolat LF6 yang dapat mereduksi nitrat paling tinggi (95,7%) hanya menghasilkan produk gas yang sedikit (6,9%). Rendahnya produksi gas dari isolat LF6 disebabkan karena bakteri ini bersifat fermentatif atau tergolong kelompok reduksi nitrat menjadi amonia dissimilatif dengan kecenderungan produk akhir berupa amonia. Pada isolat HNF3 dan HNF4 yang menghasilkan gas yang tinggi (100%), hanya mampu mereduksi nitrat relatif sedikit (9,5% dan 10,8%). Karakterisasi organisme sebagai bakteri denitrifikasi dapat ditentukan dari kemampuannya menghasilkan N₂O atau N₂ dari reduksi nitrat atau nitrit (Rusmana, 2006).

Adanya keragaman dari tiap isolat dalam mereduksi nitrat, membentuk nitrit dan amonia,

serta menghasilkan gas berhubungan erat pada sistem metabolisme dengan aktivitas enzim yang berperan dari isolat-isolat tersebut. Ada beberapa enzim yang berperan pada proses metabolisme bakteri denitrifikasi dan reduksi nitrat menjadi amonium dissimilatif antara lain: reduksi nitrat menjadi nitrit (Nap/Nar); reduksi nitrit menjadi *nitric oxide* (Nir); reduksi *nitric oxide* menjadi *nitrous oxide* (Nor); reduksi *nitrous oxide* menjadi gas N₂ (Nos) dan reduksi nitrit menjadi amonium dissimilatif (Nrf) (Zumft, 1997; Richardson, 2000).

Isolat HNF5 dan LNF merupakan dua isolat terseleksi yang digunakan untuk uji reduksi nitrat. Selain kemampuan reduksi nitrat, pembentukan nitrit, amonia, dan menghasilkan gas, isolat-isolat yang terseleksi dipilih berdasar-



Gambar 1. Morfologi isolat terseleksi HNF5 dan LNF pada media denitrifikasi
Figure 1. Morphology of HNF5 and LNF isolates on denitrification medium

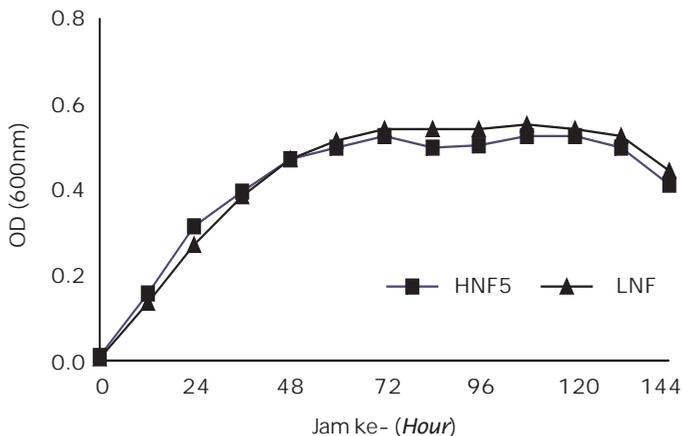
kan karakteristik dan sifat isolat. Isolat HNF5 merupakan isolat yang diisolasi dari medium kaya nitrat dan isolat LNF diisolasi dari media miskin nitrat, kedua isolat merupakan kelompok bakteri denitrifikasi (non fermentatif).

Uji Aktivitas Reduksi Nitrat

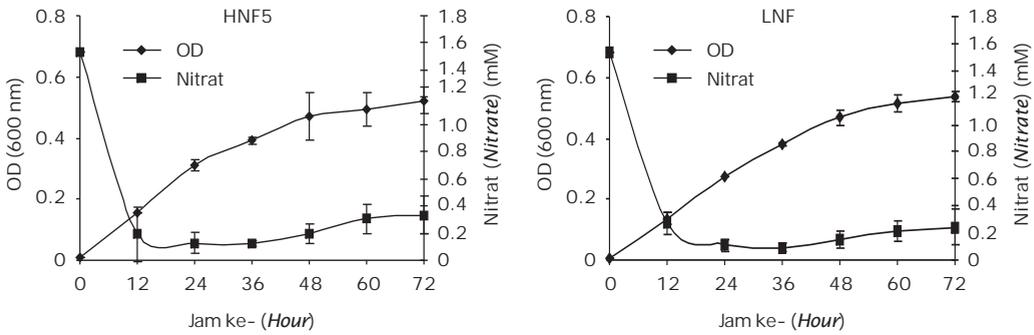
Isolat HNF5 dan LNF mempunyai pola pertumbuhan relatif sama, kedua isolat ini memerlukan waktu 6-12 jam untuk mencapai awal fase eksponensial sedangkan fase stasioner dicapai pada 72 jam inkubasi. Kepadatan sel tertinggi isolat HNF5 dan LNF juga relatif sama dengan kerapatan optik 0,5 (Gambar 2). Pertumbuhan adalah perubahan

populasi sel atau pertambahan jumlah dan atau massa sel melebihi yang ada di dalam inokulum asalnya (Pelczar & Chan, 2006).

Hubungan antara kecepatan reduksi nitrat dengan tingkat pertumbuhan jelas terlihat pada isolat (Gambar 3). Nitrat yang tereduksi berhubungan lurus terhadap peningkatan jumlah sel. Penurunan konsentrasi nitrat yang signifikan terjadi pada saat pertumbuhan isolat berada pada fase eksponensial. Pada fase ini pertumbuhan sel sangat cepat sekali sehingga membutuhkan energi yang banyak, sumber energi yang didapat berasal dari senyawa nitrat yang diberikan sebagai penerima elektron terakhir.



Gambar 2. Pola pertumbuhan isolat bakteri HNF5 dan LNF
Figure 2. Growth pattern of HNF5 and LNF isolates



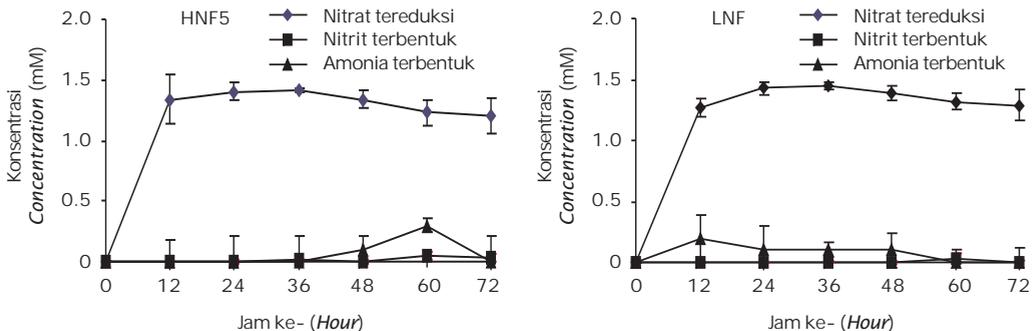
Gambar 3. Hubungan antara pertumbuhan dan aktivitas reduksi nitrat dari isolat HNF5 dan LNF. Bar merupakan standar error

Figure 3. Relationship between growth and nitrate reduction activity of HNF5 and LNF isolates. Bars are the standard error

Hasil uji reduksi nitrat pada pengamatan interval waktu 12 jam menunjukkan bahwa aktivitas reduksi nitrat mulai terjadi di bawah waktu 12 jam, karena konsentrasi nitrat yang diberikan telah mulai habis. Penurunan senyawa nitrat paling cepat terjadi pada waktu inkubasi 12 jam dengan persentase hingga 87%. Pada saat konsentrasi nitrat menipis pertumbuhan bakteri mulai memasuki fase stasioner, ini menunjukkan bahwa senyawa nitrat yang diberikan merupakan sumber energi tunggal bagi aktivitas metabolisme dari isolat yang diuji.

Selama uji aktivitas senyawa nitrit yang dihasilkan oleh isolat HNF5 dan LNF relatif kecil. Nitrit yang dihasilkan selama inkubasi relatif kecil di bawah 300 µM dari nitrat yang

direduksi (Gambar 4). Rendahnya konsentrasi nitrit yang terukur selama inkubasi dikarenakan senyawa nitrit tersebut diubah menjadi bentuk gas atau amonia dengan aktivitas enzim yang berbeda. Ini mengindikasikan bahwa bakteri memiliki kelengkapan enzim dengan kemampuan aktivitas yang seimbang sehingga nitrat yang direduksi dapat langsung direduksi menjadi gas ataupun dalam bentuk amonia. Enzim yang bertanggung jawab mereduksi nitrit menjadi gas adalah enzim Nir yang dimiliki oleh kelompok bakteri denitrifikasi, sedangkan reduksi nitrit menjadi amonia dilakukan oleh enzim Nrf yang umum dijumpai pada kelompok bakteri reduksi nitrat menjadi amonium dissimilatif (Rusmana, 2003b).



Gambar 4. Profil senyawa nitrat direduksi, nitrit dan amonia yang dihasilkan dalam uji aktivitas reduksi nitrat dengan interval pengamatan 12 jam oleh isolat HNF5 dan LNF. Bar merupakan standar error

Figure 4. Profile of reduced nitrate, produced nitrite and produced ammonia on the nitrate reduction activity test with 12-hour observation intervals of HNF5 and LNF isolates. Bars are the standard error

Senyawa amonia yang dihasilkan selama uji relatif rendah. Rendahnya konsentrasi amonia yang terukur pada uji karena isolat bakteri HNF5 dan LNF merupakan kelompok bakteri denitrifikasi yang tidak menghasilkan amonia dari aktivitas reduksi nitrat.

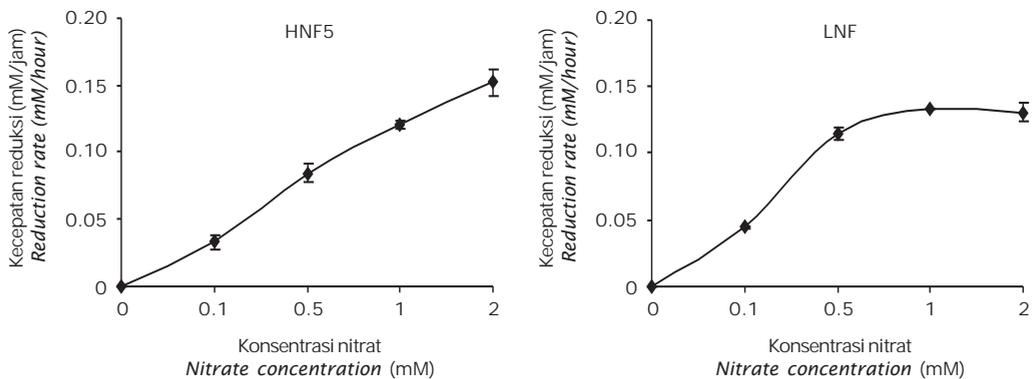
Kinetika Reduksi Nitrat

Hasil uji kinetika reduksi nitrat dari kedua isolat menunjukkan kecepatan reduksi nitrat yang berbeda dari tiap isolat pada konsentrasi yang berbeda. Pada konsentrasi nitrat yang rendah isolat LNF memiliki kecepatan reduksi nitrat yang lebih tinggi (0,044 mM/jam) dibandingkan dengan yang isolat HNF5. Kecepatan reduksi yang tinggi ini menunjukkan kemampuan kompetisinya pada sumber nitrat yang rendah, kemampuan kompetisi isolat LNF didukung dengan kecepatan maksimum (V_{maks}) enzim dalam mereduksi nitrat yang tinggi (0,16 mM/jam). Pada konsentrasi nitrat yang tinggi, isolat HNF5 mempunyai kemampuan kompetisi yang lebih baik karena memiliki kecepatan reduksi nitrat yang tinggi (0,15 mM/jam) dan kecepatan maksimum (V_{maks}) enzim dalam mereduksi nitrat yang juga tinggi (0,17 mM/jam) (Gambar 5 dan Tabel 6).

Nilai konstanta Michaelis-Menten (K_m) dari kedua isolat menunjukkan afinitas enzim yang berbeda dari tiap isolat. Nilai K_m yang paling rendah dimiliki oleh isolat LNF sedangkan isolat HNF5 mempunyai nilai K_m yang paling besar dari keempat isolat (Tabel 6). Nilai K_m merupakan tetapan kecepatan reaksi pembentukan kompleks enzim substrat (Poedjiadi, 1994). Bila harga K_m rendah berarti kecepatan reaksi pembentukan kompleks enzim substrat atau afinitas enzim terhadap substrat sangat bagus.

Karakterisasi Molekular Isolat Bakteri Terseleksi

Hasil analisis dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk gen spesifik *nap* dan *nar* pada DNA genom isolat HNF5 dan LNF belum dapat teramplifikasi. Pada hasil *runing* di gel elektroforesis (Gambar 6) terlihat bahwa kedua isolat tidak menunjukkan adanya hasil amplifikasi untuk gen *nap* dan *nar*, namun pada kontrol positif terjadi amplifikasi. Belum berhasilnya gen *nap* dan *nar* teramplifikasi diduga karena primer yang digunakan dalam penelitian ini belum sesuai dengan keempat isolat bakteri tersebut.



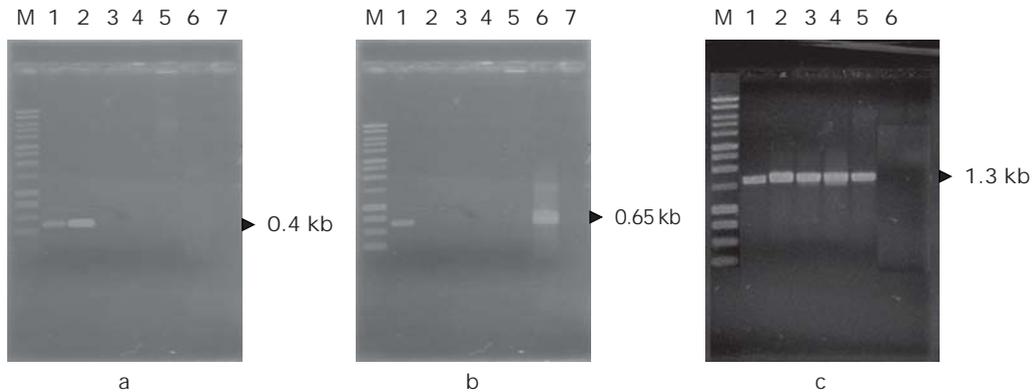
Gambar 5. Kecepatan reduksi nitrat isolat HNF5 dan LNF. Bar merupakan standar error

Figure 5. Nitrate reduction rate of HNF5 and LNF isolates. Bars are the standard error

Tabel 6. Kinetika reduksi nitrat isolat HNF5 dan LNF

Table 6. Kinetics of nitrate reduction of HNF5 and LNF isolates

Isolat <i>Isolate</i>	V_{maks} (mM/jam) <i>Vmax. (mM/hour)</i>	K_m (mM)
HNF5	0.17	0.40
LNF	0.16	0.28



Gambar 6. Hasil amplifikasi, (a) gen *nap*, M:marker; 1. kontrol positif; 2. hasil amplifikasi kontrol positif; 3. kontrol (-); 4. HNF5; 5. HF7; 6. LNF; 7. LF6. (b) Gen *nar*, M:marker; 1. kontrol positif; 2. HNF5; 3. HF7; 4. LNF; 5. LF6; 6. hasil amplifikasi kontrol positif; 7. kontrol negatif. (c) 16S-rRNA, M:marker; 1. kontrol positif; 2. HNF5; 3. HF7; 4. LNF; 5. LF6, 6. kontrol negatif

Figure 6. Amplification product, (a) *nap* gene, M: marker; 1. positive control; 2. amplification product of positive control; 3. negative control; 4. HNF5; HF7; 6. LNF; 7. LF6. (b) *nar* gene, M: marker; 1. positive control; 2. HNF5; 3. HF7; 4. LNF; 5. LF6; 6. amplification product of positive control; 7. negative control. (c) 16S-rRNA, M: marker; 1. positive control; 2. HNF5; 3. HF7; 4. LNF; 5. LF6, 6. negative control

Gen 16S-rRNA dari kedua isolat berhasil diamplifikasi, terlihat dengan adanya pita DNA yang berukuran 1,3 kb pada gel elektroforesis. Hasil sekuensing gen 16S-rRNA dianalisis kemiripannya pada database. Berdasarkan hasil analisis didapatkan bahwa isolat HNF5 dan LNF mempunyai kemiripan dengan *Pseudomonas aeruginosa* (98%). Rusmana & Nedwell (2004) mengatakan bahwa spesies *Pseudomonas* merupakan bakteri kelompok denitrifikasi dengan tipe metabolisme respirasi. *Pseudomonas* yang tergolong grup Pseudomonad umum digunakan sebagai model untuk mempelajari aspek biokimia dari proses denitrifikasi

Pseudomonas aeruginosa merupakan salah satu bakteri yang dianjurkan dalam pengendalian pencemaran senyawa nitrogen di perairan seperti kolam budidaya perikanan. Bakteri ini dapat mereduksi nitrat dengan produk akhir berupa gas nitrogen (N_2) karena didukung dengan kelengkapan enzim yang dimilikinya. Bakteri ini memiliki enzim nitrat reduktase yang terdapat pada membran (Nar) dan nitrat reduktase yang terdapat pada periplasmatik (Nap), enzim nitrit reduktase (Nir) dan enzim nitrous oxide reduktase (Nos) (Rusmana, 2006; Kawasaki *et al.*, 1997; Scala & Kerkhof, 1999).

KESIMPULAN DAN SARAN

Bakteri denitrifikasi telah berhasil diisolasi dari lokasi pengambilan sampel, isolat HNF5 dan LNF merupakan isolat yang mempunyai aktivitas reduksi nitrat tinggi, menghasilkan nitrit rendah dan produksi gas yang tinggi dibandingkan dengan isolat lainnya. Aktivitas reduksi nitrat berbanding lurus dengan laju pertumbuhan bakteri, aktivitas reduksi nitrat paling tinggi terjadi pada fase eksponensial pertumbuhan bakteri. Isolat LNF memiliki kemampuan kompetisi yang lebih baik pada konsentrasi nitrat rendah dan isolat HNF5 memiliki kemampuan kompetisi yang baik pada konsentrasi nitrat tinggi isolat HNF5 dan LNF mempunyai kemiripan dengan *Pseudomonas aeruginosa* (98%).

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan masih diperlukan penelitian lanjutan untuk mengetahui jumlah gas N_2O dan N_2 yang dihasilkan dari aktivitas reduksi nitrat bakteri terseleksi. Belum berhasilnya amplifikasi gen target, maka perlu mendesain primer baru untuk dapat menganalisis kelengkapan gen-gen yang terlibat dalam aktivitas reduksi nitrat dari bakteri denitrifikasi. Isolat bakteri HNF5 dan LNF dapat digunakan sebagai agen bioremediasi yang ramah lingkungan untuk

pengendalian pencemaran limbah nitrogen anorganik seperti nitrat dan nitrit.

DAFTAR ACUAN

- Boyd, C.E. 1990. Water Quality in Ponds for Aquaculture. Auburn Agricultural Experiment Station, Auburn University, Auburn, AL, Alabama, 482 pp.
- Buchanan, E.R. & Gibbon, N.E. 1974. Bergeys Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Welkins Co. Baltimore, 1646 pp.
- Burlage, R.S., Atlas, R., Stahl, D., Geesey, G., & Sayler, G. 1998. Techniques In Microbial Ecology. Oxford: Oxford Univ Pr., p. 14-16.
- Canadian Environmental Quality Guidelines. 2002. Summary of Existing Canadian Environmental Quality Guidelines, 12 pp.
- Clesceri, L.S., Greenberg, A.E., & Eaton, A.D. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th Edition. American Public Health Association, Washington, D.C., 1325 pp.
- Effendi, H. 2003. Telaah Kualitas Air. Penerbit Kanisius, hlm. 145-157.
- Hadioetomo, R.S. 1993. Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek. Laboratorium Mikrobiologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor. Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, 163 hlm.
- Hem, J.J. 1979. Study and Interpretation of The Chemical Characteristic of Natural Water. 2nd ed. United States Government Printing Office. Washington, 359 pp.
- Hugh, R. & Leifson. 1953. The Taxonomic Significance of Fermentative Verses Oxidative Metabolism of Carbohydrates by Various Gram Negative Bacteria. *J. Bacteriol.*, 66: 24-26.
- Hutagalung, H.P., Setiapermana, D., & Riyono, S.H. 1997. Metode Analisis Air Laut, Sedimen dan Biota. Buku 2. P3O-LIPI. Jakarta, 182 hlm.
- Kawasaki, S., Arai, H., Kodama, T., & Igarashi, Y. 1997. Gene Cluster for Dissimilatory Nitrite Reductase (*nir*) from *Pseudomonas aeruginosa*: Sequencing and Identification of a Locus for Heme *d1* Biosynthesis. *Journal of bacteriology*, p. 235-242.
- Pelczar, M.J. & Chan, E.C.S. 2006. Dasar-dasar mikrobiologi. Terjemahan. Penerbit Universitas Indonesia, 443 hlm.
- Poedjadi, A. 1994. Dasar-dasar Biokimia. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta, hlm. 140-151.
- Rodina, G.A. 1972. Methods in Aquatic Microbiology. Rita, R. C., Machael, S. Editor. USA: University Park Press Baltimore, 461 pp.
- Richardson, D.J. 2000. Bacterial Respiration: A Flexible Process For A Changing Environment. *Microbiology*, 146: 551-571.
- Rusmana, I. 2003a. Nitrous Oxide Formation In Bacteria [Komunikasi Singkat]. *J Mikrobiol Indonesia*, hlm. 63-66.
- Rusmana, I. 2003b. Physiology of Nitrous Oxide Production in Estuarine Dissimilatory Nitrat Reducing Bacteria. [Tesis]. Colchester: University of Essex, 207 pp.
- Rusmana, I. 2003c. Reduksi Nitrat Disimilatif pada Bakteri: Isu Lingkungan dan Penerapannya. *Hayati*, hlm. 158-160.
- Rusmana, I. 2006. Gaseous End Products of Nitrat and Nitrit Reduction by Denitrifying Pseudomonads Isolated from Estuarine Sediment. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*, p. 63-66.
- Rusmana, I. & Nedwell, D.B. 2004. Use of Chlorate as A Selective Inhibitor to Distinguish Membrand-bound Nitrat Reductase (Nar) and Periplasmic Nitrat Reductase (Nap) of Dissimilative Nitrat Reducing Bacteria In Sediment. *FEMS Microbiology Ecology*, p. 379-386.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Scala, D.J. & Kerkhof, L.J. 1999. Diversity of Nitrous Oxide Reductase (*nosZ*) Genes in Continental Shelf Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, p. 1681-1687.
- White, D. 2000. The Physiology and Biochemistry of Procaryotes. 2nd Edition. USA: Oxford University Press, 565 pp.
- Widiyanto, T. 2006. Seleksi Bakteri Nitrifikasi dan Denitrifikasi Untuk Bioremediasi di Tambak Udang. Disertasi (*tidak dipublikasikan*). IPB. Bogor, 120 hlm.
- Zumft, W.G. 1992. The denitrifying procaryotes, *In* A. Balows, H.G. Truiper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (Eds.), *The procaryotes*. Springer Verlag, New York, N.Y. p. 554-582.
- Zumft, W.G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 61: 533-616.