

Pengaruh pH dan Substrat Organik Terhadap Pertumbuhan dan Aktivitas Bakteri Pengoksidasi Amonia

Effect of pH and organic substrate on growth and activities of ammonia-oxidizing bacteria

DWI AGUSTIYANI^{1,*}, HARTATI IMAMUDDIN¹, ERNI NUR FARIDAH², OEDJIJONO²

¹ Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Bogor 16122.

² Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto 53122.

Diterima: 15 Januari 2004. Disetujui: 17 Mei 2004.

ABSTRACT

The physiological character, especially the effect of pH and organic substrate on the growth and activity of some ammonia-oxidizing bacteria was carried out. The results show that eight out of twenty isolates have ability to reduce ammonium, two of them i.e. isolate AOB1 and AOB2 could reduce more than 90% of ammonium. The growth and activity to reduce ammonium to nitrite was attained optimum at pH 7-8. From the result also indicated that the growth and activity of both isolate AOB1 and AOB2 were higher on the organic carbon (acetate)-containing media. This finding indicated that both of isolate AOB1 and AOB2 were heterotrophic ammonia-oxidizing bacteria.

© 2004 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

Keywords: organic substrate, acetate, ammonia-oxidizing bacteria, ammonium, nitrite.

PENDAHULUAN

Bakteri pengoksidasi amonia yang bersifat autotrofik adalah kelompok bakteri yang terutama berperan dalam proses oksidasi amonia menjadi nitrit pada siklus nitrogen, juga pada proses peruraian nitrogen dalam sistem pengolahan limbah cair. Bakteri autotrofik yang berperan dalam oksidasi amonia menjadi nitrit adalah *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus*, dan *Nitrosovibrio*. Beberapa mikroorganisme yang bersifat heterotrofik juga dilaporkan mampu mengoksidasi amonia atau nitrogen organik menjadi nitrit atau nitrat (Sylvia *et al.*, 1990). Mikroorganisme yang termasuk dalam golongan tersebut diatas antara lain adalah: fungi (*Aspergillus*) dan bakteri (*Alcaligenes*, *Arthrobacter* spp., dan *Actinomycetes*). Menurut Alexander (1977), *Arthrobacter* dan *Aspergillus flavus* mampu menghasilkan nitrat dalam media yang mengandung amonia sebagai sumber nitrogen.

Bakteri autotrofik menggunakan CO₂ sebagai sumber karbon, sedangkan bakteri heterotrofik menggunakan senyawa organik, seperti asetat,

piruvat, dan oksaloasetat sebagai sumber karbon. Laju pertumbuhan bakteri yang bersifat autotrofik lebih lambat dibandingkan dengan bakteri heterotrofik. Derajat keasaman (pH) merupakan salah satu faktor lingkungan yang berpengaruh terhadap pertumbuhan dan aktivitas bakteri pengoksidasi amonia (Esoy *et al.*, 1998). Derajat keasaman (pH) optimum untuk pertumbuhan bakteri pengoksidasi amonia yang bersifat autotrofik berkisar dari 7,5 sampai 8,5 (Ratledge, 1994). Sedangkan bakteri yang bersifat heterotrofik lebih toleran pada lingkungan asam, dan tumbuh lebih cepat dengan hasil yang lebih tinggi pada kondisi dengan konsentrasi DO rendah (Zhao *et al.*, 1999).

Sampai saat ini ekologi populasi bakteri pengoksidasi amonia di alam masih belum diketahui dengan jelas. Hal ini disebabkan sulitnya mengisolasi dan mengkultivasi mikroorganisme pengoksidasi amonia. Klasifikasi bakteri pengoksidasi amonia terutama didasarkan pada morfologi sel, ultrastruktur membran dan karakter fisiologinya (Watson *et al.*, 1989). Pada penelitian ini, sifat fisiologi beberapa isolat bakteri pengoksidasi amonia dipelajari. Kajian fisiologis ditekankan pada upaya mengetahui pengaruh tingkat keasaman (pH) dan sumber organik (asetat) terhadap pertumbuhan dan aktivitas bakteri pengoksidasi amonium.

▼ Alamat korespondensi:

Jl. Ir. H. Juanda 18, Bogor 16122.

Tel.: +62-251-324006. Faks.: +62-251-325854

e-mail: atitkanti@yahoo.com

BAHAN DAN METODE

Media

Media isolasi bakteri pengoksidasi amonia (Krummel dan Harms, 1982 dalam Watson *et al.*, 1989). Komposisi: NH_4Cl (535 mg), NaCl (584 mg), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (49,3 mg), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (147,0 mg), KH_2PO_4 (54,4 mg), KCl (74,4 mg), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (973,1 μg), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (37,1 μg), $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (44,6 μg), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (25 μg), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (43,1 μg), H_3BO_3 (49,1 μg), Cresol red (0,05%, 1ml), Akuades (1 l). Bahan-bahan tersebut dilarutkan ke dalam akuades sampai volume 1000 ml, pH media 7,5-8 dengan penambahan HCl 1 N. Larutan tersebut kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit

Media pertumbuhan bakteri pengoksidasi amonia (media basal). Komposisi: KH_2PO_4 (725 mg), Na_2HPO_4 (1136 mg), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (50 mg), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (20 mg), Fe , EDTA (1 mg), Trace element (1 ml), Akuades (1 l). Trace element: $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10 mg), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (20 mg), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 mg), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,2 mg), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2 mg), Akuades (100 ml). Bahan-bahan di atas dilarutkan ke dalam akuades sampai volume 1000 ml, pH media 7,7 dengan penambahan HCl 1 N. Larutan tersebut kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Sebagai sumber nitrogen ditambahkan 200 mg/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ steril.

Media organik. Pembuatan media organik sama dengan media basal ditambah dengan sodium asetat (20 mM) sebagai sumber karbon. Sebagai sumber nitrogen ditambahkan 200 mg/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ steril.

Cara kerja

Kultivasi bakteri pengoksidasi amonia

Sumber isolat bakteri adalah lumpur (*sludge*) dari kolam aerasi pengolahan limbah industri minyak kelapa sawit, PT. Tania Selatan, Palembang. Lumpur sebanyak 1ml ditumbuhkan pada erlenmeyer (100 ml) yang berisi 50 ml media basal (pH 7,7) yang mengandung 200 mg/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Kultur tersebut kemudian diinkubasi pada suhu ruang diatas penggoyang (*shaker*). Selama inkubasi dilakukan pengamatan pertumbuhan mikroba nitrifikasi, yaitu dengan cara mengukur perubahan amonia dan pembentukan nitrit secara kualitatif, menggunakan indikator penentuan amonia dan indikator penentuan nitrit (Gerhardt *et al.*, 1994). Pengamatan dilakukan secara berkala. Derajat keasaman (pH) di dalam kultur dipertahankan pada kisaran 7-8.

Isolasi dan seleksi bakteri pengoksidasi amonia

Kultur yang menunjukkan indikasi adanya pertumbuhan bakteri pengoksidasi amonia diambil dan diisolasi secara tabur. Kultur tersebut kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 3-5 hari. Isolat yang tumbuh kemudian dimurnikan dan dipindahkan pada media agar miring. Isolat yang diperoleh diseleksi kemampuan tumbuhnya dengan cara menumbuhkannya dalam erlenmeyer yang berisi 50

ml media basal. Kultur tersebut diinkubasi pada suhu ruang diatas penggoyang (*shaker*). Pertumbuhan bakteri pengoksidasi amonia ditentukan dengan mengukur perubahan amonia dan pembentukan nitrit secara kualitatif, menggunakan indikator penentu amonium dan indikator penentu nitrit (Gerhardt *et al.*, 1994).

Pengujian pertumbuhan isolat bakteri (pada media tanpa senyawa organik dan media organik)

Isolat terseleksi ditumbuhkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 50 ml media basal tanpa bahan organik (pH 7,7). Kultur tersebut diinkubasi pada temperatur 28°C diatas penggoyang (*shaker*) dengan kecepatan 115 rpm. Pertumbuhan ditentukan dengan cara mengukur kekeruhan (*Optical density/OD*) kultur bakteri tersebut dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 430 nm dan mengukur penurunan konsentrasi amonia yang terjadi. Pengujian dengan cara yang sama juga dilakukan dengan menggunakan media organik.

Pembuatan starter

Isolat bakteri yang akan diuji diinokulasikan ke dalam erlenmeyer yang berisi 50 ml media basal. Kultur tersebut kemudian diinkubasi pada suhu ruang diatas penggoyang (*shaker*). Starter yang digunakan untuk pengujian selanjutnya ialah yang telah mencapai pertumbuhan eksponensial dengan kepadatan sel 10^7 - 10^8 sel/ml.

Pengaruh pH terhadap pertumbuhan dan aktivitas bakteri pengoksidasi amonia (pada media tanpa senyawa organik dan media organik)

Starter sebanyak 10 % v/v ditumbuhkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 50 ml media basal dalam bufer fosfat pH 5, 6, 7, 8 dan 9. Kultur tersebut kemudian diinkubasi pada suhu ruang diatas penggoyang (*shaker*) selama 72 jam. Selama inkubasi dilakukan pengamatan setiap 24 jam terhadap pertumbuhan dan kemampuannya dalam mengoksidasi amonia. Pertumbuhan ditentukan dengan menghitung jumlah sel bakteri menggunakan *haemocytometer*. Pengujian dengan cara yang sama juga dilakukan dengan menggunakan media organik.

Parameter penelitian

Parameter yang diukur adalah amonium ($\text{NH}_4\text{-N}$), nitrit ($\text{NO}_2\text{-N}$) dan nitrat ($\text{NO}_3\text{-N}$). Konsentrasi amonium dan nitrit ditentukan dengan menggunakan metode yang tercantum dalam Standard Method (APHA, 1992) yang telah dimodifikasi. Konsentrasi nitrat ($\text{NO}_3\text{-N}$) ditentukan dengan metode yang tercantum dalam SNI, (Anonim, 1990) yang telah dimodifikasi (Agustiyani dan Imamuddin, 2000).

Analisis data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis varian (ANOVA) berdasarkan uji F dengan tingkat kepercayaan 99% dan 95%. Jika ada beda nyata analisis dilanjutkan dengan uji BNT dengan taraf kesalahan 1% dan 5% (Steel dan Torrie, 1981).

Tabel 1. Hasil isolasi bakteri pengoksidasi amonia dan pengujian pertumbuhan secara kualitatif.

No	Isolat	Karakteristik Morfologi	Pengujian pertumbuhan secara kualitatif
1.	AM I ₁	Koloni berbentuk bulat sedang, tebal, putih, tepi rata	+++
2.	AM I ₂ (AOB1)	Koloni berbentuk bulat kecil, tipis, transparan, tepi rata	+++
3.	AMDA ₃	Koloni berbentuk bulat kecil, tipis, transparan, tepi tidak rata	+
4.	AMDA _{4.1}	Koloni berbentuk bulat sedang, tebal, putih, tepi rata	+++
5.	AMDA _{4.2}	Koloni berbentuk bulat kecil, tipis, transparan, tepi rata	+++
6.	AmB I ₁	Koloni berbentuk bulat kecil, tebal, putih, tepi rata	-
7.	AmB I ₂	Koloni berbentuk bulat sedang, tebal, putih, tepi rata	-
8.	AmB II ₁	Koloni berbentuk bulat kecil, tipis, putih, tepi rata	+
9.	AmB II _{2.1}	Koloni berbentuk bulat sedang, tebal, putih, tepi rata	++
10.	AmB II _{2.2}	Koloni berbentuk bulat sedang, tebal, putih, tepi tidak rata	-
11.	AmB III	Koloni berbentuk bulat kecil, tipis, putih, tepi rata	-
12.	NC I	Koloni berbentuk bulat kecil, tipis, transparan, tepi rata	+++
13.	NC II ₁	Koloni berbentuk bulat kecil, tipis, transparan, tepi tidak rata	++
14.	NC II ₂	Koloni berbentuk bulat sedang, tipis, transparan, tepi rata	++
15.	NC II ₃	Koloni berbentuk bulat kecil, tipis, transparan, tepi rata	++
16.	NL ₂	Koloni berbentuk bulat sedang, tebal, putih, tepi tidak rata	++
17.	EF ₄	Koloni berbentuk bulat sedang, tebal, putih krem, tepi tidak rata	++
18.	AmOB ₁	Koloni berbentuk bulat sedang, tebal, putih, tepi rata	+++
19.	AmOB ₂ (AOB2)	Koloni berbentuk bulat sedang, tebal, putih krem, tepi rata	+++
20.	NE	Koloni berbentuk bulat kecil, transparan, tepi rata	+++

Keterangan: +++ = nitrit yang terbentuk banyak; ++ = nitrit yang terbentuk agak banyak; + = nitrit yang terbentuk sedikit; - = tidak terbentuk nitrit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan seleksi

Hasil isolasi bakteri dari *sludge* kolam aerasi pengolahan limbah industri minyak kelapa sawit, diperoleh 20 isolat. Isolat-isolat tersebut kemudian diseleksi kemampuan tumbuhnya dalam media basal yang mengandung amonium. Dari hasil pengujian diperoleh 16 isolat yang mampu tumbuh pada media amonium dan menunjukkan kemampuannya mengoksidasi amonium menjadi nitrit yang ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah muda setelah penambahan indikator nitrit (Tabel 1.).

Dari 16 isolat, 8 isolat menunjukkan kemampuan memproduksi nitrit lebih banyak daripada isolat lainnya (Tabel 1.). Delapan isolat tersebut kemudian diuji kemampuan tumbuhnya pada dua macam media basal amonium yaitu media basal tanpa senyawa organik dan media basal dengan senyawa organik (asetat). Pertumbuhan bakteri pengoksidasi amonia pada kedua media tersebut ditentukan berdasarkan tingkat kekeruhan (*Optical Density*; OD) dan kemampuannya menurunkan konsentrasi substrat. Hasil pengujian menunjukkan bahwa isolat AOB1 dan AOB2 mempunyai pertumbuhan paling baik, ditunjukkan dengan kekeruhan yang tinggi dan kemampuannya mereduksi amonia juga cukup tinggi (Tabel 2. dan 3.). Berdasarkan hasil pengujian tersebut, maka isolat bakteri AOB1 dan AOB2 dipergunakan untuk pengujian selanjutnya.

Pengaruh pH terhadap pertumbuhan bakteri

Hasil penghitungan jumlah sel bakteri pada perlakuan berbagai variasi pH dan uji BNT dari rata-

rata jumlah sel bakteri isolat AOB1 dan AOB2 ditampilkan pada Tabel 4 dan Tabel 5. Pada Tabel 4 dan 5 ditunjukkan bahwa jumlah sel bakteri meningkat sejalan dengan meningkatnya pH. Jumlah sel isolat bakteri AOB1 mencapai nilai optimal pada pH 7-8, sedangkan isolat bakteri AOB2 mencapai optimal pada kisaran pH 7-9.

Tabel 2. Hasil pengujian pertumbuhan bakteri pengoksidasi amonia dalam media tanpa senyawa organik.

Isolat	Kekeruhan (OD)			Konsentrasi NH ₄ ⁺	
	0 hari	3 hari	7 hari	0 hari	7 hari
NE	0,046	0,080	0,050	47,35	40,72
NC1	0,014	0,100	0,102	47,35	36,64
AMDA 4-1	0,025	0,159	0,120	47,35	9,17
AMDA 4-2	0,037	0,154	0,100	47,35	8,27
AMI 1	0,034	0,133	0,090	47,35	4,77
AOB1	0,030	0,222	0,196	47,35	2,65
Am OB1	0,051	0,196	0,167	47,35	4,03
AOB2	0,038	0,290	0,270	47,35	2,08

Tabel 3. Hasil pengujian pertumbuhan bakteri pengoksidasi amonia dalam media yang mengandung senyawa organik.

Isolat	Kekeruhan (OD)			Konsentrasi NH ₄ ⁺	
	0 hari	3 hari	4 hari	0 hari	4 hari
NE	0,057	0,044	0,052	44,38	39,65
NC1	0,083	0,089	0,092	44,38	41,77
AMDA 4-1	0,023	0,838	0,830	44,38	4,11
AMDA 4-2	0,062	0,835	0,770	44,38	3,30
AMI 1	0,033	0,873	0,675	44,38	3,79
AOB1	0,032	1,068	1,050	44,38	2,81
Am OB1	0,058	0,670	0,575	44,38	3,30
AOB2	0,060	1,430	1,195	44,38	2,79

Jumlah sel rata-rata tertinggi dari kedua isolat bakteri dicapai pada perlakuan pH 8 dengan media yang mengandung senyawa organik asetat (P9) yaitu $35,20 \times 10^6$ sel per ml untuk isolat AOB1 dan $59,20 \times 10^6$ sel per ml untuk isolat AOB2. Jumlah sel bakteri cenderung menurun sejalan dengan menurunnya pH. Dari data diatas, diketahui bahwa pH sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan isolat bakteri AOB1 maupun AOB2. Pertumbuhan kedua isolat bakteri ini lebih baik pada media yang mengandung senyawa organik asetat.

Tabel 4. Rerata jumlah sel isolat bakteri AOB1 pada berbagai variasi pH.

Kombinasi perlakuan	Rataan jumlah sel AOB1 ($\times 10^6$)
P1 (pH 5, media tanpa organik)	4,16 ^b
P2 (pH 6, media tanpa organik)	4,53 ^c
P3 (pH 7, media tanpa organik)	21,97 ^f
P4 (pH 8, media tanpa organik)	22,85 ^{fg}
P5 (pH 9, media tanpa organik)	16,03 ^e
P6 (pH 5, media dengan organik)	3,15 ^a
P7 (pH 6, media tanpa organik)	13,52 ^d
P8 (pH 7, media tanpa organik)	34,67 ⁱ
P9 (pH 8, media tanpa organik)	35,20 ^{ij}
P10 (pH 9, media tanpa organik)	27,73 ^h

Keterangan: Angka-angka yang diikuti huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata pada tingkat kepercayaan 95%. BNT 0,05 = 0,0369.

Tabel 5. Rerata jumlah sel isolat bakteri AOB2 pada berbagai variasi pH.

Kombinasi perlakuan	Rataan jumlah sel AOB2 ($\times 10^6$)
P1 (pH 5, media tanpa organik)	4,35 ^{ab}
P2 (pH 6, media tanpa organik)	6,48 ^c
P3 (pH 7, media tanpa organik)	39,20 ^{efg}
P4 (pH 8, media tanpa organik)	41,60 ^{efg}
P5 (pH 9, media tanpa organik)	37,87 ^e
P6 (pH 5, media dengan organik)	4,32 ^a
P7 (pH 6, media tanpa organik)	24,29 ^d
P8 (pH 7, media tanpa organik)	58,40 ^{hi}
P9 (pH 8, media tanpa organik)	59,20 ^{hij}
P10 (pH 9, media tanpa organik)	54,93 ^h

Keterangan: Angka-angka yang diikuti huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata pada tingkat kepercayaan 95%. BNT 0,05 = 0,0345.

Pengaruh pH terhadap aktivitas bakteri

Aktivitas bakteri pengoksidasi amonium ditentukan dengan cara mengukur penurunan amonium dan pembentukan nitrit. Hasil penghitungan efisiensi penurunan amonium dan efisiensi pembentukan nitrit oleh aktivitas isolat bakteri AOB1 dan AOB2 ditampilkan pada Tabel 6 dan 7. Dari Tabel 6 dan 7 diketahui bahwa aktivitas isolat bakteri AOB1 dan AOB2 dalam mengoksidasi amonia menjadi nitrit sangat dipengaruhi oleh pH. Efisiensi penurunan konsentrasi amonia dan pembentukan nitrit mencapai optimal pada pH 7-8. Dari Tabel 6 dan 7 juga terlihat

adanya perbedaan aktivitas oksidasi amonium pada kedua media yang digunakan, pada media organik aktivitas kedua isolat bakteri lebih tinggi. Namun demikian nampak bahwa efisiensi penurunan amonium tidak linear dengan efisiensi pembentukan nitrit. Efisiensi penurunan amonium jauh lebih tinggi dibandingkan dengan efisiensi pembentukan nitrit. Isolat AOB1 mempunyai efisiensi penurunan amonium berkisar antara 9,71-99,25% dan efisiensi pembentukan nitrit berkisar antara 0,06-15,71%. Sedangkan isolat AOB2 mempunyai efisiensi penurunan konsentrasi amonia berkisar antara 14,88-98,98% dan efisiensi pembentukan nitrit berkisar antara 0,15-28,22%. Efisiensi penurunan amonia tertinggi untuk isolat AOB1 sebesar 99,25% dan AOB2 sebesar 98,98%, akan tetapi efisiensi pembentukan nitritnya rendah yaitu 15,71% untuk isolat AOB1 dan 28,22% untuk isolat AOB2. Hal ini menunjukkan rendahnya aktivitas oksidasi amonium menjadi nitrit.

Tabel 6. Efisiensi penurunan konsentrasi amonia dan pembentukan nitrit oleh aktivitas isolat bakteri AOB1 (inkubasi 72 jam).

Isolat dan media	Perlakuan	Efisiensi penurunan amonia (%)	Efisiensi pembentukan nitrit (%)
AOB1 Media tanpa organik	P1 (pH 5)	11,68 ⁱ	0,06 ^a
	P2 (pH 6)	48,56 ^h	0,25 ^{abc}
	P3 (pH 7)	87,61 ^d	1,12 ^{ef}
	P4 (pH 8)	89,82 ^c	1,30 ^{efg}
	P5 (pH 9)	81,61 ^{ef}	0,93 ^e
AOB1 Media organik	P6 (pH 5)	9,71 ^{lj}	0,15 ^{ab}
	P7 (pH 6)	59,84 ^g	1,41 ^{abcd}
	P8 (pH 7)	95,88 ^b	8,49 ^{hi}
	P9 (pH 8)	99,25 ^a	15,71 ^{ij}
	P10 (pH 9)	83,10 ^e	7,06 ^h

Keterangan: Angka-angka yang diikuti huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata pada tingkat kepercayaan 95%. BNT 0,05 = 0,0369 (untuk konsentrasi amonia) dan BNT 0,05 = 0,1050 (untuk konsentrasi nitrit).

Tabel 7. Efisiensi penurunan konsentrasi amonia dan pembentukan nitrit oleh aktivitas isolat bakteri AOB2 (inkubasi 72 jam).

Isolat	Perlakuan	Efisiensi penurunan amonia (%)	Efisiensi pembentukan nitrit (%)
AOB2 Media tanpa organik	P1 (pH 5)	19,28 ⁱ	0,06 ^a
	P2 (pH 6)	52,24 ^h	0,30 ^c
	P3 (pH 7)	89,12 ^{cd}	2,62 ^f
	P4 (pH 8)	90,14 ^c	3,05 ^g
	P5 (pH 9)	82,07 ^e	2,11 ^{de}
AOB2 Media organik	P6 (pH 5)	14,88 ^{ij}	0,15 ^{ab}
	P7 (pH 6)	62,18 ^g	7,00 ^d
	P8 (pH 7)	95,67 ^b	22,09 ^h
	P9 (pH 8)	98,98 ^a	28,22 ^j
	P10 (pH 9)	80,67 ^{ef}	22,55 ^{hi}

Keterangan: Angka-angka yang diikuti huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata pada tingkat kepercayaan 95%. BNT 0,05 = 0,2984 (untuk konsentrasi amonia) dan BNT 0,05 = 0,1155 (untuk konsentrasi nitrit).

Dari hasil pengujian, diketahui bahwa aktivitas oksidasi amonia menjadi nitrit dari isolat bakteri AOB1 dan AOB2 lebih tinggi di media yang mengandung karbon organik asetat. Hal ini menunjukkan bahwa kedua isolat tersebut bersifat heterotrofik, karena mampu memanfaatkan senyawa organik sebagai sumber karbonnya. Jenie dan Rahayu (1993) menyatakan bahwa selain bakteri nitrifikasi autotrof, juga terdapat bakteri heterotrof yang selain mampu menggunakan senyawa organik, juga mampu memanfaatkan nitrogen anorganik, misalnya amonia, sebagai donor elektron dan sumber energi. Fakta kedua yang mendukung dugaan bahwa kedua isolat bakteri tersebut adalah bakteri pengoksidasi amonia yang bersifat heterotrofik adalah rendahnya aktivitas oksidasi amonium menjadi nitrit. Seperti dikemukakan Ambarsari (1999) bahwa bakteri nitrifikasi heterotrofik mempunyai aktivitas yang jauh lebih rendah dibandingkan bakteri yang bersifat autotrofik. Berbeda dengan bakteri nitrifikasi yang bersifat autotrofik, sebagian besar bakteri heterotrofik akan mengeluarkan nitrit atau nitrat jika fase pertumbuhannya telah aktif (Doxtader dan Alexander, 1966; Obaton *et al.*, 1968; Verstraete dan Alexander, 1972). Dilaporkan juga bahwa beberapa bakteri heterotrofik, seperti *P. pantotropha* dan *Alcaligenes faecalis* hanya mampu mengoksidasi amonium menjadi *hydroxylamine* (Otte *et al.*, 1999). Reaksi biokimia peruraian amonium oleh bakteri nitrifikasi yang bersifat heterotrofik antara lain adalah sebagai berikut: $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NOH} \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ (Killham, 1986; Haynes, 1986). Dari reaksi di atas diketahui bahwa hasil akhir dari reaksi oksidasi amonium secara sempurna adalah nitrat (NO_3^-). Dalam penelitian ini nitrat tidak terdeteksi, hanya terdeteksi nitrit. Selain itu dalam penelitian ini *hydroxylamine* juga tidak diukur, sehingga belum bisa disimpulkan pola reaksi yang lengkap dari proses oksidasi amonium oleh isolat bakteri AOB1 dan AOB2. Oleh karena itu penelitian lebih lanjut masih perlu dilakukan.

Pada pH 8, pertumbuhan sel isolat bakteri AOB1 dan AOB2 sangat baik. Seperti pada umumnya bakteri nitrifikasi, bakteri pengoksidasi amonia lebih menyukai lingkungan yang basa dengan tingkat pH optimal untuk pertumbuhan berkisar antara 7,5 sampai 8,5 (Imas *et al.*, 1989 dan Ambarsari, 1999). Sedangkan pada pH 5, pertumbuhan maupun aktivitas oksidasi amonium oleh isolat bakteri AOB1 dan AOB2 menurun, hal ini menunjukkan terjadinya penghambatan. Pada pH yang rendah, membran sel menjadi jenuh oleh ion hidrogen sehingga membatasi transport membran. Keracunan yang terjadi pada pH rendah adalah karena sebagian substansi asam yang tidak terurai meresap ke dalam sel, sehingga terjadi ionisasi dan pH sel berubah. Perubahan ini menyebabkan proses pengiriman asam-asam amino dari RNA terhambat sehingga menghambat pertumbuhan dan bahkan dapat membunuh mikroba.

KESIMPULAN

Dari penelitian ini diketahui bahwa derajat keasaman (pH) berpengaruh terhadap pertumbuhan dan aktivitas isolat bakteri AOB1 dan AOB2 dalam mengoksidasi amonia. Pertumbuhan dan aktivitas oksidasi amonia mencapai optimum pada kisaran pH 7-8. Isolat bakteri AOB1 dan AOB2 memperlihatkan pertumbuhan dan aktivitas yang jauh lebih baik pada media yang mengandung asetat. Fakta ini menunjukkan bahwa kedua isolat bakteri tersebut merupakan bakteri pengoksidasi amonia yang bersifat heterotrofik. Alur reaksi oksidasi amonium secara lengkap belum diketahui.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustiyani, D dan H. Imamuddin. 2000. Pertumbuhan kultur mikroba campuran pada senyawa amonium. *Prosiding Seminar Nasional Biologi XVI dan Konggres Nasional Perhimpunan Biologi Indonesia (PBI) XII*, ITB Bandung, 25-27 Juli 2000.
- Alexander, M. 1977. *Introduction to Soil Microbiology*. 2nd edition. Toronto: John Wiley and Sons.
- Ambarsari, H. 1999. Karakteristik dan peran bakteri penitrifikasi dalam usaha minimisasi amonia yang terakumulasi di dalam sistem akuakultur. *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia* 1 (2): 43-52.
- Anonim. 1990. *Kumpulan SNI Bidang Pekerjaan Umum Mengenai Kualitas Air*. Jakarta: Departemen Pekerjaan Umum.
- American Public Health Association (APHA). 1992. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 18th edition. Washington DC.: APHA.
- Doxtader, K.G., and M. Alexander. 1966. Nitrification by growing and replacement cultures of *Aspergillus*. *Canadian Journal of Microbiology* 12: 807-815.
- Esoy, A., H. Odegaard and G. Bentzen. 1998. The Effect of Sulphide and Organic Matter on The Nitrification Activity In Biofilm Procces. *Water Science Technology* 37 (1): 115-122.
- Gerhardt, P., R.G.E. Murray, W. A. Wood and N. R. Krieg. 1994. *Methods for General Molecular Bacteriology*. Washington DC.: American Society for Microbiology.
- Haynes, R.J. 1986. *Mineral Nitrogen In the Plan-Soil System*. London: Academic Press, Inc.
- Imas, T., R.S. Hadioetomo, A.G. Gunawan, dan Y. Setiadi. 1989. *Mikrobiologi Tanah II*. Bogor: PAU IPB.
- Jenie, B.S.L. dan W.P. Rahayu. 1993. *Penanganan Limbah Cair Industri Pangan*. Bogor: PAU Pangan dan Gizi IPB.
- Killham, K. 1986. Heterotrophic nitrification. In Prosser, J.I. (ed). *Nitrification*. Oxford: IRL Press.
- Obaton, M., N. Amarger, and M. Alexander. 1968. Heterotrofik nitrification by *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Microbiology* 63: 122-132.
- Otte S, J. Schalk, J.G. Kuenen, and M.S. Jetten. 1999. Hydroxylamine oxidation and subsequent nitrous oxide production by the heterotrophic ammonia oxidizer *Alcaligenes faecalis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51: 255-261.
- Ratledge, C. 1994. *Biochemistry of Microbial Degradation*. Amsterdam: Kluwer Academic Publisher.
- Steel, R.G.D. dan J.H. Torrie. 1981. *Prinsip dan Prosedur Statistika. Suatu Pendekatan Biometrik*. Jakarta: PT. Gramedia.
- Sylvia, D. M., J. J. Furbrmann, P. G. Hartel and D. A. Zuberer. 1990. *Principles and Application of Soil Microbiology*. New Jersey: Prentice Hall, Inc.
- Verstraete, W. and M. Alexander. 1972. Heterotrophic nitrification by *Arthrobacter* sp. *Journal of Bacteriology* 110: 955-961.
- Watson, S.W., E. Bock, H. Harms, H.P. Koops, and A.B. Kooper. 1989. Nitrifying bacteria. In: Staley, J.T., M.P. Bryant, N. Hennig, and J.G. Holt (eds). *Bergey Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 3. Baltimore: Williams and Wilkins.
- Zhao, H.W., D.S. Mavinic, W.K. Oldham, and F.A. Koch. 1999. Controlling factors for simultaneous nitrification and denitrification in a two-stage intermittent aeration process treating domestic sewage. *Water Resources* 33 (4): 961-970.