

RESEARCH ARTICLE

Characteristics and Potential Activity of Aerobic Denitrifying Bacteria from Fish Farming Ponds

(Karakteristik dan Potensi Aktivitas Bakteri Denitrifikasi Aerob Asal Kolam Budidaya Ikan)

Rizal Khoirun Alfisah^{1*)}, Meyta Pratiwi², Adinda Kurnia Putri³, Mazidah Noer Inayah⁴

¹Program Studi Mikrobiologi Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman, Jl. Dr. Soeparno 63 Grendeng Purwokerto, Indonesia

²Program Studi Biologi Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman, Jl. Dr. Soeparno 63 Grendeng Purwokerto, Indonesia

³Program Studi Manajemen Sumberdaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Jenderal Soedirman,
Jl. Prof. Dr. HR Boenyamin 708 Purwokerto, Indonesia

⁴Program Studi Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Yakpermas Banyumas, Jl. Raya Jompo Kulon Sokaraja Banyumas, Indonesia

ABSTRACT

The presence of inorganic nitrogen in the aquaculture environment is inseparable from the nitrogen cycle. The nitrogen cycle always involves microbiological processes, including the activity of microorganisms. Denitrification is one of the main processes to reduce inorganic nitrogen content. This study aims to isolate, characterize, and measure the activity of aerobic denitrifying bacteria in eliminating inorganic nitrogen in waters. Denitrifying bacteria isolated from fish farm pond water samples by enrichment and specific medium. The nitrate reduction activity of denitrifying bacterial isolates was analyzed through the measurement of nitrate, nitrite, and gas levels. Denitrifying bacterial isolates were characterized based on colony morphology, cell shape, and Gram type. Analysis of nitrate reduction rate determined based on Michaelis-Menten kinetics. A total of 7 isolates of aerobic denitrifying bacteria were successfully isolated from enrichment medium with diverse characteristics. The percentage of nitrate reduction activity of the seven denitrifying bacterial isolates ranged from 50.48 - 87.08%. Two selected denitrifying bacterial isolates namely isolates BP8 and BP11 showed the best nitrate reduction activity of 90.14% and 88.45%. Isolates BP8 and BP11 had a maximum speed of nitrate reduction (V_{max}) of 0.08 mM/hour and 0.03 mM/hour. The Michaelis-Menten constant (K_m) values of isolates BP8 and BP11 were 0.35 mM and 0.44 mM. The denitrifying bacterial isolates obtained have potential as bioremediation agents for inorganic nitrogen compounds in aquaculture.

Kehadiran senyawa nitrogen anorganik pada lingkungan akuakultur tidak terlepas dari siklus nitrogen. Siklus nitrogen selalu melibatkan proses mikrobiologis termasuk aktivitas mikroorganisme. Denitrifikasi salah satu proses utama untuk mengurangi kandungan nitrogen anorganik. Penelitian ini bertujuan mengisolasi, mengkarakterisasi, dan mengukur aktivitas bakteri denitrifikasi aerob dalam mengeliminasi nitrogen anorganik di perairan. Bakteri denitrifikasi diisolasi dari sampel air kolam budidaya ikan dengan medium pengkayaan dan spesifik. Aktivitas reduksi nitrat isolat bakteri denitrifikasi dianalisis melalui pengukuran kadar nitrat, nitrit, dan gas. Isolat bakteri denitrifikasi dikarakterisasi berdasarkan morfologi koloni, bentuk sel, dan jenis Gram. Analisis laju reduksi nitrat ditentukan berdasarkan kinetika Michaelis-Menten. Sebanyak 7 isolat bakteri denitrifikasi aerob berhasil diisolasi dari medium pengkayaan dengan karakteristik yang beragam. Persentase aktivitas reduksi nitrat dari 7 isolat bakteri denitrifikasi berkisar antara 50.48 – 87.08%. Dua isolat bakteri denitrifikasi terpilih yaitu isolat BP8 dan BP11 menunjukkan aktivitas reduksi nitrat terbaik sebesar 90.14% dan 88.45%. Isolat BP8 dan BP11 memiliki kecepatan maksimum reduksi nitrat (V_{max}) sebesar 0.08 mM/jam dan 0.03 mM/jam. Nilai konstanta Michaelis-Menten (K_m) isolat BP8 dan BP11 yaitu 0.35 mM dan 0.44 mM. Isolat bakteri denitrifikasi yang diperoleh berpotensi sebagai agen bioremediasi senyawa nitrogen anorganik di lingkungan akuakultur.

Keywords: Aerob denitrifying, Inorganic nitrogen, Kinetics, Nitrate reduction.

^{*)}Corresponding author:
Rizal Khoirun Alfisah
E-mail: rizal.khoirun@unsoed.ac.id

PENDAHULUAN

Pencemaran senyawa nitrogen anorganik dalam ekosistem perairan semakin menjadi permasalahan lingkungan yang serius akibat meningkatnya kegiatan

antropogenik seperti pembuangan limbah industri dan domestik, limbah kotoran hewan dari industri pertanian [1], dan penggunaan pupuk yang berlebihan di bidang pertanian [2], [3], dan [4]. Polusi nitrogen anorganik dalam ekosistem perairan tidak hanya dapat

menyebabkan penurunan kualitas air tetapi juga memiliki efek berbahaya secara langsung pada hidrobion [5]. Salah satu polutan nitrogen anorganik di lingkungan perairan yaitu senyawa nitrat. Dalam badan air alami, konsentrasi polutan seperti nitrat dan bahan organik seringkali lebih rendah dari 10 mg/L yang disebut mikropolutan badan air [6]. Senyawa nitrat (NO_3^-) yang berlebih di ekosistem sungai, danau, tambak, dan waduk tidak hanya menyebabkan eutrofikasi dan *blooming algae*, tetapi dapat juga mengancam kehidupan organisme akuatik dan kesehatan manusia [7].

Salah satu upaya menghilangkan polutan senyawa nitrat pada perairan melalui pendekatan bioremediasi dengan pemanfaatan aktivitas bakteri denitrifikasi. Pendekatan bioremediasi lebih ekonomis, efisien, dan ramah lingkungan dibandingkan dengan metode fisik dan kimia [8]. Proses denitrifikasi akan mentransformasi senyawa nitrat menjadi bentuk nitrogen lain yang tidak toksik seperti gas dinitrogen oksida (N_2O) dan gas dinitrogen (N_2) dalam kondisi anaerob maupun aerob melalui aktivitas bakteri denitrifikasi [9]. Secara konvensional, proses denitrifikasi anaerob telah menjadi solusi untuk menghilangkan senyawa nitrogen anorganik. Namun, denitrifikasi anaerob memiliki faktor pembatas yaitu oksigen. Oksigen merupakan faktor penting yang mempengaruhi proses transformasi nitrogen dalam perairan [10]. Tanpa adanya oksigen sebagai penerima elektron terakhir dalam proses denitrifikasi menyebabkan laju konversi senyawa nitrogen kurang efisien. Selain itu, tingginya kebutuhan sumber karbon tambahan sebagai sumber energi menjadi kendala dalam proses denitrifikasi anaerob. Dengan demikian, proses denitrifikasi anaerob tidak sesuai untuk pemurnian badan air secara *in situ*.

Saat ini bakteri denitrifikasi aerob menjadi alternatif utama dalam proses menghilangkan polutan senyawa nitrat di ekosistem perairan. Beberapa keunggulan penggunaan bakteri denitrifikasi aerob diantaranya memiliki laju pertumbuhan yang tinggi, kemampuan beradaptasi yang lebih baik terhadap lingkungan, serta mampu memanfaatkan berbagai substrat karbon sebagai sumber energinya [11]. Denitrifikasi aerob merupakan proses transformasi senyawa nitrat yang secara bersamaan dapat menggunakan oksigen dan nitrat sebagai akseptor elektron [12]. Beberapa bakteri denitrifikasi aerob telah berhasil diisolasi dari berbagai macam ekosistem

berbeda dan menunjukkan kemampuan dalam menghilangkan polutan nitrat diantaranya *Bacillus methylothrophicus* L7 yang diisolasi dari air limbah [13], *Acinetobacter junii* dan *Klebsiella pneumonia* yang berasal dari lumpur aktif [14]-[15], *Paracoccus denitrificans* berasal dari air limbah [16], *Pseudomonas stutzeri* strain AD-1 berhasil diisolasi dari instalasi pengolahan air limbah [17], dan *Zoogloea* sp. N299 asal tempat penampungan air [18]. Namun, hingga saat ini informasi mengenai bakteri denitrifikasi aerob yang berasal dari lingkungan akuakultur masih sedikit sehingga perlu dilakukan penelitian eksplorasi lebih lanjut terhadap bakteri denitrifikasi aerob yang potensial. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, mengkarakterisasi, dan mengukur aktivitas bakteri denitrifikasi aerob potensial dalam mentransformasi senyawa polutan nitrogen di lingkungan akuakultur.

METODE PENELITIAN

Koleksi Sampel dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2023 hingga April 2024 di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman. Sampel air diambil dari kolam budidaya perikanan di Desa Beji Kecamatan Kedungbanteng Kabupaten Banyumas. Lokasi pengambilan sampel air ditentukan dengan metode *purposive sampling*. Pengambilan sampel air dilakukan pada beberapa titik area kolam yaitu area tengah kolam dan pinggir kolam dengan botol steril di kedalaman air 30 cm. Sampel air yang telah diambil kemudian disimpan dalam *ice box* untuk analisis lebih lanjut di laboratorium.

Isolasi Bakteri Denitrifikasi Aerob

Bakteri denitrifikasi diisolasi dengan teknik pengkayaan pada kondisi aerob dan menggunakan medium spesifik denitrifikasi. Medium pengkayaan untuk bakteri denitrifikasi aerob memiliki komposisi (per liter) sebagai berikut: 0.5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.36 g/L KNO_3 , 4 g/L sodium sitrat, 0.05% (rasio volume) *trace element solution* yang mengandung 6.5 g/L $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 2.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.5 g/L NaCl , 0.05 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.04 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Medium spesifik denitrifikasi yang digunakan memiliki komposisi (per liter) yaitu 0.36 g/L KNO_3 , 10.55 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1.5 g/L KH_2PO_4 , 0.1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4 g/L sodium sitrat, 0.2% (rasio

volume) *trace element solution* yang mengandung 50.0 g/L EDTA- Na_2 , 2.2 g/L ZnSO_4 , 5.5 g/L CaCl_2 , 5.06 g/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 5.0 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.57 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1.61 g/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [19].

Sampel air ditransferkan pada 200 mL medium pengkayaan denitrifikasi kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 7 hari. Sebanyak 1 mL suspensi diambil dari medium pengkayaan dan dilakukan pengenceran bertingkat hingga 10^{-5} . Sebanyak 0.1 mL dari tiga pengenceran terakhir dituangkan pada medium spesifik denitrifikasi kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 3-4 hari. Koloni bakteri tunggal dimurnikan dan diinokulasikan pada medium kultivasi denitrifikasi. Isolat murni hasil isolasi diamati morfologi koloninya yang meliputi bentuk, warna, ukuran, elevasi, dan tepian. Penentuan Gram bakteri isolat denitrifikasi dilakukan dengan pewarnaan Gram.

Seleksi Aktivitas Bakteri Denitrifikasi Terpilih

Pengujian tahap awal dilakukan untuk melihat pola pertumbuhan isolat bakteri denitrifikasi terpilih dengan aktivitas reduksi nitrat terbaik. Sebanyak 1 mL kultur bakteri terpilih hasil isolasi diinokulasikan pada 50 mL medium denitrifikasi. Inkubasi dilakukan selama 4 hari secara aerob pada suhu 30 °C. Pengukuran pertumbuhan sel isolat bakteri terpilih dilakukan setiap 12 jam melalui analisis *Optical Density* (OD) dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu, Japan) pada panjang gelombang 600 nm. Profil nilai OD digunakan sebagai dasar penentuan waktu pada uji aktivitas reduksi nitrat isolat denitrifikasi terseleksi.

Inokulum untuk pengujian aktivitas reduksi nitrat disiapkan dengan menumbuhkan isolat bakteri terpilih pada 50 mL medium cair denitrifikasi, kemudian diinkubasi secara aerob pada suhu 30 °C selama 3 hari. Sebanyak 1 mL inokulum diinokulasikan pada 50 mL medium denitrifikasi dengan konsentrasi nitrat ± 45

mM. Inkubasi dilakukan selama 4 hari di atas inkubator berpenggoyang pada kecepatan 120 rpm dan suhu 30 °C. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak tiga kali. Kontrol masing-masing perlakuan dibuat tanpa diinokulasi kultur bakteri. Pengukuran aktivitas reduksi nitrat dilakukan setiap 12 jam melalui analisis kadar nitrat, nitrit, dan estimasi gas yang terbentuk [20].

Analisis Kinetika Reduksi Nitrat Bakteri Denitrifikasi Terpilih

Inokulum disiapkan dengan menumbuhkan isolat bakteri terpilih pada 50 mL medium denitrifikasi dan diinkubasi di atas inkubator berpenggoyang pada kecepatan 120 rpm di suhu 28-30 °C selama 3 hari. Kultur bakteri dibuat pelet dengan cara disentrifugasi pada 5000 rpm selama 10 menit. Pelet dipisahkan dan diresuspensi dengan medium denitrifikasi tanpa nitrat. Sebanyak 5 mL kultur bakteri diinokulasikan ke dalam botol yang berisi 50 mL medium denitrifikasi dengan konsentrasi nitrat: 0, 0.1, 0.5, 1, dan 2 mM [20]. Inkubasi dilakukan selama 9 jam. Pada setiap interval 3 jam dilakukan analisis kadar nitrat. Analisis kinetika reduksi nitrat ditentukan dengan kinetika Michaelis-Menten [21].

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Isolat Bakteri Denitrifikasi Aerob

Isolasi bakteri denitrifikasi asal kolam budidaya perikanan menghasilkan 7 isolat bakteri dengan ciri morfologi yang berbeda yaitu isolat BP2, BP3, BP5, BP6, BP8, BP9, dan BP11. Ketujuh isolat tersebut adalah isolat yang berhasil tumbuh cepat dan tahan terhadap kontaminan pada medium denitrifikasi. Karakter morfologi secara makroskopis dan mikroskopis ketujuh isolat bakteri denitrifikasi dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik morfologi koloni dan sel isolat bakteri denitrifikasi terseleksi

Karakter	Kode Isolat						
	BP2	BP3	BP5	BP6	BP8	BP9	BP11
Ukuran	sedang	sedang	besar	sedang	sedang	sedang	sedang
Bentuk	sirkular	sirkular	sirkular	sirkular	sirkular	sirkular	sirkular
Elevasi	rata	cembung	rata	konveks	rata	rata	cembung
Warna	krem	putih	putih	putih	putih	kuning	krem
Tepi	rata	bergeligi	mengombak	rata	rata	rata	rata
Bentuk Sel	batang	batang	bulat	bulat	batang	bulat	batang
Gram	negatif	positif	positif	positif	positif	negatif	positif

Isolasi bakteri denitrifikasi menggunakan medium pengkayaan dengan kondisi inkubasi secara aerob. Hal tersebut bertujuan untuk mendukung pertumbuhan bakteri denitrifikasi dan menghambat pertumbuhan bakteri lain. Selain itu, adanya kandungan senyawa sitrat pada medium pertumbuhan akan dimanfaatkan oleh bakteri denitrifikasi sebagai sumber karbon.

Isolat bakteri denitrifikasi yang diperoleh berasal dari medium dengan konsentrasi nitrat tinggi. Hal tersebut menunjukkan bahwa isolat-isolat yang diperoleh diduga memiliki enzim nitrat reduktase yang berada di membran plasma (Nar). Ratja, dkk. [22] menyatakan bahwa terdapat isoenzim yang mampu mereduksi senyawa nitrat menjadi nitrit yaitu enzim nitrat reduktase yang berada di membran plasma (Nar) dan di periplasma (Nap). Enzim Nar akan lebih kompetitif pada konsentrasi nitrat yang tinggi daripada enzim Nap.

Kelompok bakteri denitrifikasi sangat sensitif terhadap keberadaan oksigen [23]. Hal tersebut berkaitan juga dengan lokasi enzim nitrat reduktase.

Kelompok bakteri denitrifikasi aerob akan menggunakan enzim nitrat reduktase yang berada di bagian periplasma untuk proses denitrifikasi. Dengan demikian, kelompok bakteri denitrifikasi aerob melakukan korespirasi yang berarti mikroba tersebut mampu secara simultan menggunakan oksigen dan nitrat sebagai penerima elektron dalam proses denitrifikasi.

Aktivitas Isolat Bakteri Denitrifikasi Terpilih

Seleksi awal aktivitas bakteri denitrifikasi dilakukan dengan melihat kemampuan isolat bakteri denitrifikasi dalam mereduksi nitrat selama 4 hari. Hasil menunjukkan bahwa ketujuh isolat bakteri memiliki kemampuan dalam mereduksi nitrat yang beragam dengan persentase berkisar antara 50.48% hingga 87.08% (Tabel 2). Berdasarkan seleksi awal, isolat BP8 dan BP11 terpilih sebagai bakteri denitrifikasi potensial karena memiliki aktivitas reduksi nitrat terbaik, konsentrasi nitrit yang rendah, dan tingginya estimasi gas yang dihasilkan.

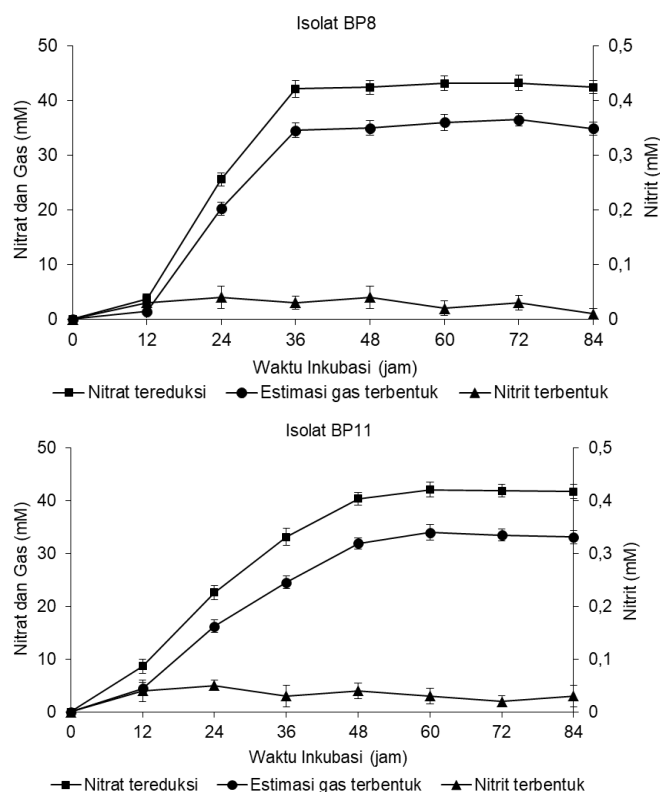
Tabel 2. Aktivitas reduksi nitrat tahap awal isolat bakteri denitrifikasi dengan inkubasi selama 4 hari di suhu 30 °C

Kode Isolat	Nitrat tereduksi		Nitrit terbentuk		Estimasi gas	
	mM	%	mM	%	mM	%
BP2	12.20	70.32	0.18	1.59	9.85	80.21
BP3	13.35	76.36	0.15	1.20	10.80	81.12
BP5	10.68	60.46	0.16	1.43	8.52	79.85
BP6	10.21	58.14	0.22	2.17	5.68	56.20
BP8	15.10	87.08	0.13	0.90	13.20	86.44
BP9	8.79	50.48	0.35	3.81	5.36	60.88
BP11	14.52	84.17	0.12	0.83	12.48	85.36

Hasil uji aktivitas reduksi nitrat terhadap 2 isolat bakteri denitrifikasi terpilih menunjukkan bahwa aktivitas reduksi nitrat mulai terjadi setelah 12 jam masa inkubasi. Laju aktivitas reduksi nitrat tertinggi pada isolat BP8 terjadi pada jam ke-72 waktu inkubasi dengan konsentrasi jumlah nitrat tereduksi sebanyak 42.78 mM (90.14%) sedangkan kemampuan isolat BP11 dalam mereduksi nitrat tertinggi terjadi pada jam ke-60 dengan konsentrasi nitrat tereduksi sebesar 40.06 mM (88.45%) (Gambar 1). Aktivitas reduksi nitrat yang tinggi oleh kedua isolat terpilih disebabkan oleh tingginya aktivitas enzim Nar. Pada kondisi ini, nitrat akan digunakan juga sebagai akseptor elektron untuk menghasilkan energi. Enzim Nar menginduksi gaya dorong proton melalui membran yang diikuti oleh sintesis ATP [24].

Akumulasi pembentukan nitrit oleh isolat BP8 dan BP11 mengalami peningkatan seiring dengan meningkatnya aktivitas reduksi nitrat. Pada isolat BP8, pembentukan nitrit meningkat pada saat inkubasi jam ke-24 yaitu sebesar 0.03 mM (0.15%) kemudian mengalami penurunan pada jam ke-36. Di sisi lain, pembentukan nitrit pada isolat BP11 mulai meningkat pada waktu inkubasi 12 jam yaitu sebesar 0.05 mM (0.35%) dan mengalami penurunan setelah 24 jam masa inkubasi (Gambar 1). Penurunan konsentrasi nitrit mengindikasikan bahwa terjadinya proses reduksi nitrit. Selain itu, tinggi atau rendahnya akumulasi nitrit disebabkan oleh beberapa faktor antara lain adanya kompetisi dalam memanfaatkan nitrat maupun nitrit sebagai akseptor elektron terakhir [22]. Selain itu, proses induksi enzim nitrit reduktase

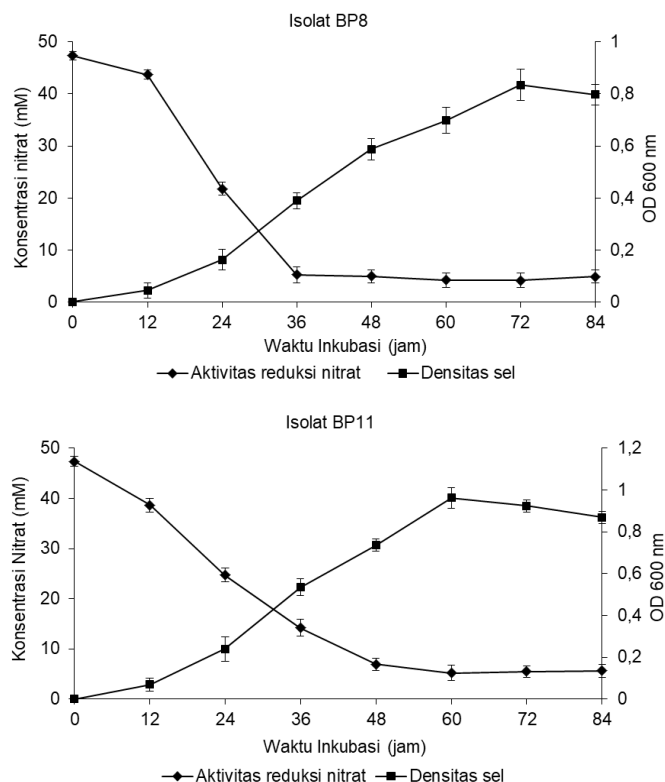
yang terlambat dapat menjadi penyebab akumulasi nitrit. Isolat BP8 menghasilkan gas tertinggi pada jam ke-72 dengan persentase sebesar 82.48% sedangkan isolat BP11 terjadi pada jam ke-60 dengan persentase sebesar 80.25% (Gambar 1). Estimasi gas yang dihasilkan meningkat seiring dengan menurunnya konsentrasi nitrit, hal tersebut diduga karena adanya aktivitas enzim nitrit reduktase yang mampu mereduksi nitrit menjadi gas NO , N_2O , atau N_2 .



Gambar 1. Profil senyawa nitrat tereduksi, akumulasi nitrit, dan estimasi gas yang terbentuk dengan interval waktu inkubasi 12 jam oleh isolat BP8 dan BP11.

Profil pertumbuhan isolat BP8 dan BP11 dengan aktivitas reduksi nitrat menunjukkan bahwa penurunan konsentrasi nitrat terjadi saat fase eksponensial (Gambar 2). Pada kondisi tersebut, jumlah sel isolat BP8 dan BP11 mengalami peningkatan. Penurunan konsentrasi nitrat karena digunakan sebagai penerima elektron dalam proses denitrifikasi secara korespirasi. Di sisi lain, tingkat pertumbuhan sel bakteri yang tinggi tidak selalu diikuti oleh kemampuan aktivitas enzim yang dimilikinya. Densitas sel isolat BP8 lebih rendah dibandingkan dengan isolat BP11, namun memiliki aktivitas reduksi nitrat yang lebih tinggi. Hal tersebut dapat terjadi karena

dipengaruhi oleh faktor luar lingkungan seperti sumber karbon, ketersediaan mikronutrien, suhu, dan pH.



Gambar 2. Pola pertumbuhan dan penurunan konsentrasi nitrat dari isolat BP8 dan BP11.

Kinetika Reduksi Nitrat Isolat BP8 dan BP11

Isolat BP8 dan BP11 menunjukkan laju reduksi nitrat yang berbeda. Berdasarkan hasil analisis kinetika aktivitas reduksi nitrat, Isolat BP8 memiliki kecepatan maksimum (V_{max}) reduksi nitrat sebesar 0.08 mM/jam dengan nilai K_m sebesar 0.35 mM, sedangkan isolat BP11 memiliki nilai V_{max} sebesar 0.03 mM/jam dengan nilai K_m sebesar 0.44 mM. Nilai V_{max} isolat BP8 lebih tinggi dibandingkan dengan isolat BP11, hal ini mengindikasikan bahwa pada kondisi optimum setiap jamnya laju aktivitas reduksi nitrat oleh enzim-enzim reduktase yang dimiliki isolat BP8 akan lebih cepat mengubah substrat (nitrat) menjadi senyawa produk. Nilai K_m merupakan tetapan kecepatan reaksi pembentukan kompleks enzim substrat. Isolat BP8 mempunyai nilai K_m yang lebih rendah dibandingkan dengan isolat BP11, hal ini mengindikasikan bahwa afinitas enzim terhadap substrat pada isolat BP8 lebih kuat daripada isolat BP11. Nilai K_m yang rendah menunjukkan kecepatan

reaksi pembentukan kompleks enzim substrat atau afinitas enzim terhadap substrat sangat baik.

Hasil penelitian ini sesuai dengan beberapa penelitian lain yang telah melaporkan kemampuan bakteri denitrifikasi aerob dalam menurunkan polutan senyawa nitrogen anorganik. Chen, dkk. [25] melaporkan bakteri *Acinetobacter* sp. T1 yang diisolasi dari lumpur aktif pengolahan air limbah peternakan cukup efisien dalam memanfaatkan nitrat atau nitrit sebagai satu-satunya sumber nitrogen dengan laju aktivitas reduksi nitrat mencapai 5.53 mg/L/jam. Penelitian yang dilakukan oleh Huang, dkk. [26] juga menunjukkan potensi bakteri denitrifikasi aerob berperan dominan dalam mengeliminasi polutan nitrat dengan efisiensi >90%. Selain itu, Sang, dkk. [27] melaporkan bahwa kelompok bakteri denitrifikasi *Bacillus* sp. strain SC16 yang diisolasi dari lingkungan akuakultur mampu menghilangkan polutan nitrat hingga 97% selama 24 jam dalam kondisi aerob. Dengan demikian, isolat bakteri denitrifikasi aerob dari penelitian ini mempunyai nilai aplikasi yang sangat penting dalam perbaikan kualitas air lingkungan akuakultur.

KESIMPULAN

Tujuh isolat bakteri denitrifikasi berhasil diisolasi dengan karakteristik morfologi koloni dan sel yang berbeda. Isolat BP8 dan BP11 termasuk isolat denitrifikasi aerob potensial dengan aktivitas reduksi nitrat terbaik. Kemampuan isolat BP8 dan BP11 dapat dimanfaatkan sebagai agen bioremediasi senyawa nitrogen anorganik di lingkungan akuakultur.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM) Universitas Jenderal Soedirman yang telah memberikan dukungan finansial melalui skema Riset Peningkatan Kompetensi BLU UNSOED.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] R. Infascelli, R. Pelorosso, and L. Boccia, "Spatial assessment of animal manure spreading and groundwater nitrate pollution," *Geospat. Health*, vol. 4, no. 1, pp. 27-38, April 2009.
- [2] S. Peña-Haro, C. Llopis-Albert, M. Pulido-Velazquez, and D. Pulido-Velazquez, "Fertilizer standards for controlling groundwater nitrate pollution from agriculture: El Salobral-Los Llanos case study, Spain," *J. Hydrol.*, vol. 392, no. 3-4, pp. 174-187, August 2010.
- [3] S. Savci, "An Agricultural Pollutant: Chemical Fertilizer," *Int. J. Environ. Sci. Dev.*, vol. 3, no. 1, pp. 73-80, February 2012.
- [4] Y. Sun and M. Nemat, "Evaluation of sulfur-based autotrophic denitrification and denitrification for biological removal of nitrate and nitrite from contaminated waters," *Bioresour. Technol.*, vol. 114, no. 6, pp. 207-216, March 2012.
- [5] H. Zhang, Z. Zhao, S. Li, S. Chen, T. Huang, N. Li, S. Yang, Y. Wang, L. Kou, and X. Zhang, "Nitrogen removal by mix-cultured aerobic denitrifying bacteria isolated by ultrasound: Performance, co-occurrence pattern and wastewater treatment," *Chem. Eng. J.*, vol. 372, pp. 26-36, April 2019.
- [6] W. Zhou, X. Liu, X. Dong, Z. Wang, Y. Yuan, H. Wang, and S. He, "Sulfur-based autotrophic denitrification from the micro-polluted water," *J. Environ. Sci.*, vol. 44, pp. 180-188, January 2016.
- [7] H. Zhang, B. Ma, T. Huang, and Y. Shi, "Nitrate reduction by the aerobic denitrifying actinomycete *Streptomyces* sp. XD-11-6-2: Performance, metabolic activity, and micro-polluted water treatment," *Bioresour. Technol.*, vol. 326, no. 1, pp. 1-9, January 2021.
- [8] S. Li, H. Zhang, T. Huang, B. Ma, Y. Miao, Y. Shi, L. Xu, K. Liu, and X. Huang, "Aerobic denitrifying bacterial communities drive nitrate removal: Performance, metabolic activity, dynamics and interactions of core species," *Bioresour. Technol.*, vol. 316, no. 3, pp. 1-13, July 2020.
- [9] X. Zhou, Z. Zhang, X. Zhang, and Y. Liu, "A novel single-stage process integrating simultaneous COD oxidation, partial nitrification-denitrification and anammox (SCONDA) for treating ammonia-rich organic wastewater," *Bioresour. Technol.*, vol. 254, pp. 50-55, April 2018.
- [10] F. Ye, X. Huang, X. Zhang, D. Zhang, Y. Zeng, and L. Tian, "Recent oxygen depletion in the Pearl River Estuary, South China: Geochemical and microfaunal evidence," *J. Oceanogr.*, vol. 68, no. 3, pp. 387-400, March 2012.
- [11] D. Li, X. Liang, Y. Jin, C. Wu, and R. Zhou, "Isolation and Nitrogen Removal Characteristics of an Aerobic Heterotrophic Nitrifying-Denitrifying Bacterium, *Klebsiella* sp. TN-10," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 188, no. 2, pp. 540-554, December 2019.
- [12] B. Zhao, D. Y. Cheng, P. Tan, Q. An, and J. S. Guo, "Characterization of an aerobic denitrifier *Pseudomonas stutzeri* strain XL-2 to achieve efficient nitrate

- removal,” *Bioresour. Technol.*, vol. 250, pp. 564–573, February 2018.
- [13] Q. L. Zhang, Y. Liu, G. M. Ai, L. L. Miao, H. Y. Zheng, and Z. P. Liu, “The characteristics of a novel heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium, *Bacillus methylotrophicus* strain L7,” *Bioresour. Technol.*, vol. 108, pp. 35–44, March 2012.
- [14] S. K. Padhi, S. Tripathy, R. Sen, A. S. Mahapatra, S. Mohanty, and N. K. Maiti, “Characterisation of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Klebsiella pneumoniae* CF-S9 strain for bioremediation of wastewater,” *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 78, pp. 67–73, January 2013.
- [15] Y. X. Ren, L. Yang, and X. Liang, “The characteristics of a novel heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium, *Acinetobacter junii* YB,” *Bioresour. Technol.*, vol. 171, pp. 1–9, August 2015.
- [16] K. Medhi, A. Singhal, D. K. Chauhan, and I. S. Thakur, “Investigating the nitrification and denitrification kinetics under aerobic and anaerobic conditions by *Paracoccus denitrificans* ISTOD1,” *Bioresour. Technol.*, vol. 242, pp. 334–343, October 2017.
- [17] H. Qing, O.O. Donde, C. Tian, C. Wang, X. Wu, S. Feng, Y. Liu, and B. Xiao, “Novel heterotrophic nitrogen removal and assimilation characteristic of the newly isolated bacterium *Pseudomonas stutzeri* AD-1,” *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 126, no. 3, pp. 339–345, September 2018.
- [18] T. L. Huang, S. L. Zhou, H. H. Zhang, S. Y. Bai, X. X. He, and X. Yang, “Nitrogen removal characteristics of a newly isolated indigenous aerobic denitrifier from oligotrophic drinking water reservoir, *Zoogloea* sp. N299,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 5, pp. 10038–10060, May 2015.
- [19] P. Lv, J. Luo, X. Zhuang, D. Zhang, Z. Huang, and Z. Bai, “Diversity of culturable aerobic denitrifying bacteria in the sediment, water and biofilms in Liangshui River of Beijing, China,” *Scientific Reports.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–12, August 2017.
- [20] R. K. Alfisah, I. Rusmana, T. Widiyanto, and R. Affandi, “The Abundance and Potential Activity of Nitrifying, Denitrifying, and Nitrate-ammonifying Bacteria in the Vanamae Shrimp Culture in Karawang,” *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 1062, no. 1, October 2022.
- [21] J. E. Dowd and D. S. Riggs, “A Comparison of Estimates of Michaelis-Menten Kinetic Constants from Various Linear Transformations,” *J. Biol. Chem.*, vol. 240, no. 2, pp. 863–869, August 1965.
- [22] A. Rajta, R. Bhatia, H. Setia, and P. Pathania, “Role of heterotrophic aerobic denitrifying bacteria in nitrate removal from wastewater,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 128, no. 5, pp. 1261–1278, December 2019.
- [23] S. Papaspyrou, C. J. Smith, L. F. Dong, C. Whitby, A. J. Dumbrell, and D. B. Nedwell, “Nitrate reduction functional genes and nitrate reduction potentials persist in deeper estuarine sediments why?,” *PLoS One*, vol. 9, no. 4, pp. 1–13, April 2014.
- [24] M. M. M. Kuypers, H. K. Marchant, and B. Kartal, “The microbial nitrogen-cycling network,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 16, no. 5, pp. 263–276, February 2018.
- [25] S. Chen, S. He, C. Wu, and D. Du, “Characteristics of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacterium *Acinetobacter* sp. T1 and its application for pig farm wastewater treatment,” *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 127, no. 2, pp. 201–205, February 2019.
- [26] G. Huang, Y. Huang, H. Hu, F. Liu, Y. Zhang, and R. Deng, “Remediation of nitrate-nitrogen contaminated groundwater using a pilot-scale two-layer heterotrophic-autotrophic denitrification permeable reactive barrier with spongy iron/pine bark,” *Chemosphere*, vol. 130, pp. 8–16, July 2015.
- [27] C. G. Sang, Y. W. Fu, S. Q. Guo, J. J. Luo, and Q. Z. Zhang, “Isolation and characterization of an aerobic denitrifier *Bacillus* sp. SC16 from an intensive aquaculture pond,” *Water*, vol. 12, no. 12, pp. 1–14, December 2020.