Berita Biologi

Jurnal Ilmu-ilmu Hayati

BERITA BIOLOGI

Vol. 17 No. 2 Agustus 2018

Terakreditasi Berdasarkan Keputusan Kepala Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia
No. 21/E/KPT/2018, Tanggal 9 Juli 2018

Tim Redaksi (*Editorial Team*)

Andria Agusta (Pemimpin Redaksi, *Editor in Chief*)
(Kimia Bahan Alam, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Kusumadewi Sri Yulita (Redaksi Pelaksana, *Managing Editor*)
(Sistematika Molekuler Tumbuhan, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Gono Semiadi
(Mammalogi, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Atit Kanti
(Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Siti Sundari
(Ekologi Lingkungan, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Evi Triana
(Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Kartika Dewi
(Taksonomi Nematoda, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Dwi Setyo Rini
(Biologi Molekuler Tumbuhan, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Desain dan Layout (*Design and Layout*)

Muhamad Ruslan, Fahmi

Kesekretariatan (*Secretary*)

Nira Ariasari, Enok, Budiarto, Liana

Alamat (*Address*)

Pusat Penelitian Biologi-LIPI
Kompleks Cibinong Science Center (CSC-LIPI)
Jalan Raya Jakarta-Bogor KM 46,
Cibinong 16911, Bogor-Indonesia
Telepon (021) 8765066 - 8765067
Faksimili (021) 8765059
Email: berita.biologi@mail.lipi.go.id
jurnalberitabiologi@yahoo.co.id
jurnalberitabiologi@gmail.com

Keterangan foto cover depan: Struktur Morfologi Rimpang. (A, D) *Curcuma aeruginosa*, (B, E) *C. longa*, dan (C, F) *C. heyneana*. (*Morphological structure of rhizome (A, D) Curcuma aeruginosa, (B, E) C. longa, dan (C, F) C. heyneana*) sesuai dengan halaman 123. (*as in page 123*).

Berita Biologi

Jurnal Ilmu-ilmu Hayati

P-ISSN 0126-1754
E-ISSN 2337-8751
No. 21/E/KPT/2018, Tanggal 9 Juli 2018
Volume 17 Nomor 2, Agustus 2018

Berita Biologi	Vol. 17	No. 2	Hlm. 91 – 223	Bogor, Agustus 2018	ISSN 0126-1754
----------------	---------	-------	---------------	---------------------	----------------

Pusat Penelitian Biologi - LIPI

Ucapan terima kasih kepada
Mitra Bebestari nomor ini
17(2) – Agustus 2018

Prof. Dr. Ir. Yohanes Purwanto
(Etnobotani, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Ir. Siti Susiarti
(Etnobotani, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Dr. Sunaryo
(Morfologi, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Dr. Andria Agusta
(Kimia Bahan Alam, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Dr. Kusumadewi Sri Yulita
(Sistematika Molekuler Tumbuhan, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Dr. Dwi Astuti
(Genetika, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Mohammad Irham M.Sc
(Ekologi & taksonomi, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Dr. Amir Hamidy
(Herpetologi, Pusat Penelitian Biologi LIPI)

Dr. Ir. Maya Melati, MS, MSc
(Argonomi, Departemen Agronomi dan Hortikultura - IPB)

Dr. Yuyu Suryasari M.Sc.
(Genetika, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Dr. Iman Hidayat
(Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Dra. Djamhuriyah S. Said M.Si.
(Limnologi, Pusat Penelitian Limnologi- LIPI)

Prof. Dr. I Made Sudiana, M.Sc.
(Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Dr. Ireng Darwati
(Fisiologi tanaman, Balai Penelitian Rempah dan Obat - Badan Litbang Pertanian)

Ir. Yadi Suryadi, MSc.
(Hama dan Penyakit Tanaman BB Biogen, Badan Litbang Pertanian)

Dr. Ir. Chaerani, MSc.
(Hama dan Penyakit Tanaman, BB Biogen, Badan Litbang Pertanian)

Dr. Darkam Mussadad
(Teknologi Pascapanen, Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Bengkulu)

Ir. Sulusi Prabawati, MS
(Pascapanen, Pusat Penelitian dan Pengembangan Hortikultura– Badan Litbang Pertanian)

FISIOLOGI PERTUMBUHAN, POTENSI AKTIFITAS PRODUKSI N₂O DAN GEN FUNGSIONAL PENYANDINYA PADA BEBERAPA ISOLAT BAKTERI DENITRIFIKASI

[Physiological Growth, Potential Activity of N₂O Production and Their Functional Gen of Some Isolat of Denitrifying Bacteria]

Dwi Agustiyani ✉, Nur Laili dan Sarjiya Antonius

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi - LIPI Jl. Raya Bogor-Jakarta Km. 46 Cibinong 16911
email: titinagustin@yahoo.com

ABSTRACT

Physiological characters of four denitrifying bacteria (*Bacillus* sp. CPNS, *Bacillus thuringiensis* UPT1, *Brevundimonas diminuta* EA1 and *Bacillus* sp. UPSB) were studied based on the growth ability on various nitrate concentrations and the production of N₂O gas. The characters of denitrifying bacteria were also evaluated through the existence of functional genes *nirS* and *nosZ*, encoding the nitrite reduction and nitrous oxide reduction enzymes which have important role on denitrification processes. The study showed that *Bacillus* sp. UPSB and *Bacillus* sp. CPNS isolates have a linear growth with the increasing concentration of KNO₃. The N₂O gas production of *Bacillus* sp. UPSB isolate was relatively high, about 70 µl, *Bacillus* sp. CPNS isolate was 25 µl, while the *Bacillus thuringiensis* UPT1 isolate was 5 µl and *Brevundimonas diminuta* EA1 isolate was 8 µl. It was also indicated that both *Bacillus* sp. UPSB and *Bacillus* sp. CPNS had high denitrification activities. It was confirmed that all isolates were contained functional gen of *nirS* and *nosZ*.

Key words : denitrification activity, N₂O gas, *nirS*, *nosZ*

ABSTRAK

Sifat fisiologi empat isolat bakteri denitrifikasi (*Bacillus* sp. CPNS, *Bacillus thuringiensis* UPT1, *Brevundimonas diminuta* EA1 dan *Bacillus* sp. UPSB) dipelajari berdasarkan pada kemampuan tumbuh bakteri pada berbagai konsentrasi nitrat, serta aktivitas pembentukan gas N₂O. Karakter bakteri denitrifikasi juga ditentukan berdasarkan keberadaan gen fungsional *nirS* dan *nosZ* yang menyandi enzim nitrit reduktase dan nitrous oksid reduktase, yaitu enzim yang berperan penting dalam proses denitrifikasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat bakteri *Bacillus* sp. UPSB dan *Bacillus* sp. CPNS memperlihatkan pertumbuhan yang linier dengan peningkatan konsentrasi substrat KNO₃. Isolat bakteri *Bacillus* sp. UPSB menghasilkan gas N₂O sebesar 70 µl, *Bacillus* sp. CPNS sebesar 25 µl, sedangkan isolat bakteri *Bacillus thuringiensis* UPT1 hanya sekitar 5 µl dan *Brevundimonas diminuta* EA1 sebesar 8 µl. Hasil ini mengindikasikan bahwa isolat bakteri *Bacillus* sp. UPSB dan *Bacillus* sp. CPNS mempunyai aktivitas denitrifikasi yang cukup tinggi. Hasil deteksi secara molekuler menunjukkan bahwa keempat isolat bakteri mempunyai gen *nirS* dan *nosZ*.

Kata kunci : aktivitas denitrifikasi, gas N₂O, *nirS*, *nosZ*

PENDAHULUAN

Penggunaan pupuk nitrogen dalam praktek pertanian, sangatlah vital dan penggunaannya terus meningkat. Penggunaan pupuk N di Asia diprediksi akan meningkat dan mencapai sekitar 50% pada tahun 2030 (Zheng *et al.*, 2002) dimana peningkatan penggunaan N secara proporsional akan diikuti oleh peningkatan emisi gas N₂O. Konsentrasi gas N₂O di atmosfer terus meningkat, mencapai sekitar 0,3% pertahun, dan sebagian besar berasal dari sektor pertanian (Alley *et al.*, 2007). Salah satu reaksi mikrobial yang menghasilkan gas N₂O adalah proses denitrifikasi. Produksi N₂O oleh mikroba denitrifikasi adalah fungsi dari aktivitas enzim nitrit N₂O reduktase (McKenney *et al.*, 1994; Betlach *et al.*, 1981). Gas N₂O termasuk dalam enam jenis gas

rumah kaca yang diperhitungkan sebagai penyebab perubahan iklim (Choudhary *et al.*, 2002; Seinfeld dan Pandis, 1997). Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan agrokimia pada lahan pertanian intensif tidak berpengaruh nyata terhadap populasi bakteri denitrifikasi namun lebih berpengaruh pada aktivitas denitrifikasi sehingga pembentukan emisi gas N₂O cenderung lebih tinggi dibandingkan pada tanah pertanian organik (Agustiyani D, *et al.*, 2013).

Denitrifikasi merupakan proses perubahan nitrat/nitrit menjadi gas nitrogen (N₂) yang dilakukan oleh mikroorganisme, melalui tahapan reaksi sebagai berikut: 2NO₃ → 2 NO₂ → 2NO → N₂O → N₂. Denitrifikasi berperan penting pada siklus N dan merupakan reaksi mikrobial yang sangat penting dalam lingkungan, baik tanah maupun perairan/aquakultur, juga pada proses pengolahan limbah cair.

Namun demikian untuk mengetahui dan mengukur aktivitas denitrifikasi masih menjadi kendala, walaupun telah dicoba berbagai metoda pendekatan, namun semua pendekatan yang ada sekarang mempunyai kelemahan (Groffman *et al.*, 2006). Kesulitan mengukur denitrifikasi timbul dari berbagai variabel, keterbatasan metodologi dan sulitnya mengukur produk akhir N_2 . Pendekatan yang sering dipakai untuk mengukur denitrifikasi melibatkan pengukuran produksi N_2O dari tanah dengan adanya asetilen (C_2H_2) yang menghambat reduksi N_2O menjadi N_2 (Balderston *et al.*, 1976; Yoshinari and Knowles, 1976).

Bakteri denitrifikasi termasuk dalam kelompok bakteri heterotrofik, memerlukan sumber karbon organik untuk pertumbuhannya dan secara filogenetik sangat beragam. (Teixera, 2002). Bakteri ini terdistribusi secara sporadis dalam berbagai kelompok bakteri, seperti juga beberapa arkea dan fungi (Hayatsu *et al.*, 2008; Philippot *et al.*, 2007). Oleh karena itu sangatlah sulit untuk menentukan bakteri denitrifikasi hanya berbasis gen sekuensing dari 16S rRNA (Philippot *et al.*, 2007). 16S rRNA dapat memberikan informasi taksonomik mikroorganisme yang tidak dapat diperoleh dari analisis gen nitrit reduktase (*nirS* dan *nirK*) (Pratscher *et al.*, 2009). Nitrit reduktase mengkatalisis nitrit menjadi NO dan merupakan tahapan awal yang membedakan bakteri denitrifikasi dengan bakteri respirasi nitrat (Prieme *et al.*, 2002). Sedangkan gen *nosZ* adalah gen yang menyandi *nitrous oxide reductase*. Reduksi *nitrous oxide* merupakan tahapan akhir dari alur reaksi denitrifikasi. Beberapa bakteri denitrifikasi tidak dapat memproduksi *nitrous oxide reductase*. Oleh karena itu, *nosZ* dapat digunakan sebagai pendeteksi bakteri yang mempunyai aktivitas reduksi *nitrous oxide* menjadi nitrogen gas (Throback *et al.*, 2004) Sehingga gen *nirK*, *nirS* dan *nosZ* sering digunakan untuk mendeteksi bakteri denitrifikasi (Braker *et al.*, 1998; Qiu *et al.*, 2004; Rich dan Myrold, 2004).

Mengingat deteksi dan pengukuran denitrifikasi masih menjadi kendala maka penting untuk mempelajari berbagai metoda analisis denitrifikasi baik secara kualitatif, kuantitatif dan deteksi secara molekuler dengan mengamati hubungan antara

metoda-metoda analisis tersebut. Pada penelitian ini empat isolat bakteri yang secara kualitatif terindikasi sebagai bakteri denitrifikasi akan dianalisis secara kuantitatif yang meliputi kemampuan tumbuhnya pada berbagai konsentrasi nitrat, kemampuan reduksi nitrat serta aktivitas pembentukan gas N_2O . Karakter keempat isolat bakteri juga akan ditentukan berdasarkan keberadaan gen fungsional yang menyandi enzim yang berperan dalam proses denitrifikasi yaitu gen *nirS* dan *nosZ*.

BAHAN DAN CARA KERJA

Isolat bakteri denitrifikasi

Isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri *Brevundimonas diminuta* EA1, *Bacillus* sp. UPSB, *Bacillus thuringiensis* UPT1 dan *Bacillus* sp. CPNS. Isolat bakteri *Brevundimonas diminuta* EA1 diisolasi dari *sludge* yang diaklimatisasi dengan asam asetat, isolat *Bacillus* sp. UPSB dan *Bacillus thuringiensis* UPT1 diisolasi dari tanah percobaan yang diberi perlakuan pestisida, dan *Bacillus* sp. CPNS diisolasi dari tanah pertanian Cipanas yang tercemar pestisida. Keempat isolat bakteri telah diuji aktivitas denitrifikasi secara kualitatif pada media dengan berbagai variasi substrat organik sebagai donor elektron (data tidak dipublikasi).

Penentuan bakteri denitrifikasi secara kualitatif

Empat isolat bakteri yang akan diuji ditumbuhkan pada tabung reaksi yang berisi 5 ml media cair NB+ KNO_3 . Setelah 3 hari, dari masing-masing kultur bakteri tersebut diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam 9 ml aquadest steril. Satu ml suspensi diinokulasikan secara aseptik kedalam tabung yang berisi media Giltay (masing-masing 5 tabung). Untuk membuat kondisi anaerobik, kultur dalam tabung ditutup dengan parafin cair sebanyak 2 ml. Kultur tersebut kemudian di inkubasi selama 15 hari pada suhu kamar. Pertumbuhan bakteri denitrifikasi (+) ditandai dengan berubahnya media menjadi biru dan terbentuknya gas pada tabung durham.

Penentuan pertumbuhan dan aktivitas perombakan nitrat

Empat isolat bakteri ditanam dalam media NB

dengan berbagai konsentrasi KNO_3 yaitu 0 mM, 2 mM, 4 mM, 7 mM, 10 mM. Penentuan konsentrasi berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Mahne *et al.* (1995). Kultur bakteri kemudian diinkubasi selama 48 jam. Pengambilan sampel dari tiap-tiap kultur dilakukan pada interval waktu tertentu yaitu 0, 24 dan 48 jam. Sebagian sampel digunakan untuk pengukuran pertumbuhan bakteri dengan cara mengukur kekeruhan (OD) menggunakan spektrofotometri pada panjang gelombang 436 nm, sedangkan sebagian sampel di sentrifugasi untuk penentuan konsentrasi NH_4 , NO_2 dan NO_3 .

Analisis nitrat (NO_3^-)

Nitrat dianalisis berdasarkan metoda yang tercantum dalam SNI 1990, dengan modifikasi. Sebanyak 3,6 ml aquades pH 7 dicampur dengan 0,4 ml sampel (pengenceran 10 x) untuk kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi besar. Selanjutnya, kedalam tabung ditambahkan 0,8 ml larutan NaCl 30%, dan 4 ml larutan asam sulfat (H_2SO_4) 75 %. Setiap penambahan larutan dilakukan pengocokan menggunakan vortex agar tercampur sempurna. Campuran tersebut di dinginkan terlebih dahulu untuk kemudian ditambahkan dengan 0,2 ml larutan campuran brusin dan asam sulfat. Tabung kemudian dipanaskan di dalam *waterbath* pada suhu 95 °C selama 20 menit. Setelah dingin, dilakukan pengukuran konsentrasi NO_3^- dengan Spektrofotometer pada panjang gelombang (λ) 410 nm

Analisis nitrit (NO_2^-)

Analisis nitrit mengikuti metoda yang tercantum dalam APHA, 1992 dengan sedikit modifikasi. Sebanyak 4,5 ml aquades pH 7 ditambahkan 0,5 ml sampel kedalam tabung reaksi (pengenceran 10 x). Selanjutnya ditambahkan pula 0,1 ml larutan sulfanilamide kedalam tabung reaksi, dan kemudian dikocok serta dibiarkan selama kurang lebih 2–8 menit. Setelah itu, ditambahkan lagi 0,1 ml larutan Ethylendiamine dan kemudian serta dikocok dan didiamkan sampai 10 menit. Larutan kemudian di ukur dengan Spektrofotometri pada panjang gelombang (λ) 543 nm.

Penentuan aktivitas denitrifikasi

Aktivitas denitrifikasi dianalisis mengikuti metoda yang digunakan oleh Yoshinari *et al.* (1976). Mula-mula ditumbuhkan isolat bakteri pada media NB+ KNO_3 dan kemudian diinkubasi selama 2 hari pada suhu kamar. Media NB+ KNO_3 , yang telah dipersiapkan sebelumnya dalam bentuk media cair dimasukkan kedalam botol kecil (volume 13 ml) sebanyak 9 ml masing-masing isolat 3 botol. Botol-botol tersebut kemudian diflushing gas argon selama 20 menit untuk membuat kondisi anaerobik dan setelah itu ditambahkan sampel bakteri 0,5 ml kedalam masing-masing botol untuk kemudian diambil sampel gas nya guna pengukuran gas N_2O (jam ke-0). Pada larutan campuran yang telah berisi kultur bakteri, 1 botol disuntik dengan 1ml asetilena, 2 botol yang lain tidak disuntik asetilena. Semua botol kemudian di shaker dengan kecepatan sekitar 100 rpm. Pengambilan sampel gas pada botol yang ditambah acetylen dan botol tanpa asetilena dilakukan pada jam ke 4, 6, dan 8 untuk pengukuran gas N_2O . Pada botol ketiga diambil sampel cair untuk analisa NO_3^- pada jam ke 4 dan 8.

Deteksi primer nirS dan nosZ

Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode ekstraksi dengan Kit Prepman[®]. Ekstraksi dilakukan dari isolat bakteri yang ditumbuhkan pada media padat dan media cair. Pada media padat, bakteri diinokulasikan pada media NA yang mengandung KNO_3 , kemudian diinkubasi selama 24 jam. Kultur diambil 1 ose penuh dan dimasukkan ke dalam PCR *tube* yang berisi 25 μl larutan Prepman[®]. Pada media cair, bakteri diinokulasikan pada media NB yang mengandung KNO_3 , kemudian diinkubasi selama 24 jam. Diambil 1 ml kultur dan disentrifus pada 12.000 rpm selama 2 menit. Setelah itu, supernatan dibuang dan kemudian ditambahkan 25 μl larutan Prepman[®]. Selanjutnya, larutan yang mengandung kultur bakteri baik dari media padat maupun cair tersebut dihomogenisasi dengan vortex selama 10 sampai 30 detik. Larutan dipanaskan pada suhu 100 °C selama 10 menit dan kemudian didinginkan selama 5 menit pada suhu 16 °C. Larutan sampel disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit. Supernatan dipindahkan ke

dalam PCR tube yang baru untuk kemudian dilakukan amplifikasi DNA dengan PCR.

Amplifikasi PCR dilakukan menggunakan dua jenis primer yaitu Primer NIR S dan NOS Z. Primer Nir S Forward 5' CCACACCGAGAACCAGATT, Primer Nir S Reverse 5' GAAGTCCTCGCACCTC-TACG. Primer Nos Z Forward 5' ACGCCTATAC-CACGCTGTTC, Primer Noz Z Reverse 5' GGTCTTGGAGAACTTGCTG.

HASIL

Penentuan bakteri denitrifikasi secara kualitatif

Empat isolat bakteri yang diisolasi dari berbagai sampel tanah diuji aktivitas denitrifikasinya secara kualitatif menggunakan media Giltay. Pertumbuhan bakteri denitrifikasi dicirikan dengan terbentuknya gas pada tabung durham dan terjadi perubahan warna media menjadi biru. Keempat isolat bakteri yang diuji secara kualitatif memperlihatkan indikasi sebagai bakteri denitrifikasi (Tabel 1).

Pertumbuhan empat isolat bakteri pada berbagai variasi konsentrasi nitrat

Pertumbuhan bakteri ditentukan dengan cara mengukur kekeruhan (*Optical Density*) pada panjang gelombang 436 nm. Pengukuran OD dilakukan pada interval waktu 0, 24 dan 48 jam. Empat isolat bakteri ditumbuhkan pada medium NB dengan 5 variasi konsentrasi KNO_3 , yaitu 0 mM, 2 mM, 4 mM, 7 mM, dan 10 mM.

Pertumbuhan isolat bakteri *Brevundimonas diminuta* EA1 nampak meningkat seiring dengan

meningkatnya konsentrasi KNO_3 sampai konsentrasi 4 mM. Pada konsentrasi 7 dan 10 mM KNO_3 , pertumbuhan bakteri mengalami penurunan (Gambar 1A). Sedangkan pertumbuhan isolat bakteri *Bacillus* sp. CPNS meningkat sampai konsentrasi 7 mM KNO_3 , dan pada konsentrasi 10 mM nampak mengalami sedikit penurunan (Gambar 1.B). Pertumbuhan isolat bakteri *Bacillus* sp. UPSB pada konsentrasi 2 mM KNO_3 sedikit mengalami penurunan, kemudian mengalami peningkatan perlahan dari konsentrasi 4–10 mM KNO_3 (Gambar 1.C). Pertumbuhan isolat bakteri *Bacillus thuringiensis* UPT1 meningkat pada konsentrasi 2 mM, kemudian turun pada konsentrasi 4 mM dan naik kembali pada konsentrasi 7 dan 10 mM KNO_3 (Gambar 1.D).

Perubahan konsentrasi nitrat dalam kultur bakteri

Indikasi awal terjadinya aktivitas denitrifikasi adalah penurunan konsentrasi nitrat (NO_3), yang diikuti dengan kenaikan konsentrasi nitrit (NO_2) yang pada akhirnya dikonversi menjadi gas N_2 . Data pada gambar 2 memperlihatkan perubahan konsentrasi nitrat dalam kultur bakteri yang diikuti dengan meningkatnya konsentrasi nitrit. Secara umum terlihat bahwa konsentrasi nitrat mengalami penurunan, sedangkan konsentrasi nitrit pada kultur bakteri *Brevundimonas diminuta* EA1 dan *Bacillus thuringiensis* UPT1 mengalami peningkatan, sedangkan pada kultur bakteri *Bacillus* sp. CPNS dan *Bacillus* sp. UPSB nitrit tidak mengalami kenaikan yang signifikan. Pada kedua kultur bakteri *Bacillus* sp. tersebut tidak terdeteksi adanya akumulasi nitrit

Tabel 1. Hasil pengujian pertumbuhan dan aktivitas denitrifikasi secara kualitatif (*The result test of bacterial growth and denitrifying activity qualitatively*)

Nama isolat bakteri (<i>Name of bacteria isolate</i>)	Perubahan warna media (<i>change of color's media</i>)	Pembentukan gas pada tabung durham (<i>Gas production on durham tubes</i>)
<i>Bacillus thuringiensis</i> UPT1	biru (<i>blue</i>)	++
<i>Bacillus</i> sp. CPNS	biru tua (<i>dark blue</i>)	+++
<i>Bacillus</i> sp. UPSB	biru tua (<i>dark blue</i>)	+++
<i>Brevundimonas diminuta</i> EA1	biru (<i>blue</i>)	+

Keterangan (*Notes*) : + = terbentuk gas pada tabung durham, jumlah tanda + mencerminkan volume gas yang terbentuk (+ = *the existance of gas on durham tube, the number of + indicate the gas volume produced*)

dan hampir semua nitrat yang diberikan pada awal inkubasi habis, kemungkinan besar dirubah menjadi gas N (N_2 dan N_2O). Konsentrasi nitrit yang masih cukup tinggi pada akhir reaksi (48 jam) pada kultur bakteri *Brevundimonas diminuta* EA1 dan *Bacillus thuringiensis* UPT1 menunjukkan bahwa aktivitas denitrifikasi dari kedua bakteri ini rendah, diindikasikan juga dengan masih tersisanya nitrat setelah 48 jam reaksi.

Aktivitas denitrifikasi (pembentukan gas N_2O)

Aktivitas denitrifikasi dianalisis berdasarkan aktivitas pembentukan gas N_2O dengan penghambatan asetilena (Yoshinari et al., 1976). Aktivitas denitrifikasi dari empat isolat bakteri yang diuji berbeda, seperti terlihat pada gambar 3.A-D. Aktivitas pembentukan gas N_2O pada isolat bakteri

Bacillus thuringiensis UPT1 dan *Brevundimonas diminuta* EA1 relatif kecil, hanya sekitar 5 – 8 μ l. Aktivitas pembentukan gas N_2O pada perlakuan pemberian acetylen (AC) nampak tidak berbeda nyata dengan perlakuan tanpa perlakuan acetylen (TAC) (grafik 3.A dan 3.B). Aktivitas pembentukan gas N_2O pada isolat bakteri *Bacillus* sp. CPNS dan *Bacillus* sp. UPSB cenderung lebih tinggi, mencapai sekitar 25 μ l pada isolat bakteri *Bacillus* sp. CPNS (Grafik 3.D) dan 70 μ l pada isolat bakteri *Bacillus* sp. UPSB (Grafik 3.C).

Deteksi bakteri denitrifikasi dengan primer nirS dan nosZ

Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode ekstraksi dengan Kit Prepman®. Hasil ekstraksi DNA isolat bakteri denitrifikasi kemudian

Gambar 1. Pola pertumbuhan isolat bakteri denitrifikasi pada 5 konsentrasi KNO_3 (Growth pattern of denitrifying bacterial isolate on five concentrations of KNO_3)

Keterangan (Notes) : (A) *Brevundimonas diminuta* EA1; (B) *Bacillus* sp. CPNS; (C) *Bacillus* sp. UPSB; (D) *Bacillus thuringiensis* UPT1

Gambar 2. Perubahan konsentrasi nitrat dan nitrit dari empat kultur bakteri denitrifikasi (*Change in nitrate and nitrite concentrations of four denitrifying cultures*)

Keterangan (Notes) : EA1 (*Brevundimonas diminuta*), UPSB (*Bacillus* sp.), UPT1 (*Bacillus thuringiensis*), CPNS (*Bacillus* sp.)

Gambar 3. Pola pembentukan gas N₂O (*Pattern of N₂O production*)

Keterangan (Notes): (A) *Bacillus thuringiensis* UPT1; (B) *Brevundimonas diminuta* EA1; (C) *Bacillus* sp. UPSB; (D) *Bacillus* sp. CPNS

Gambar 4. Hasil amplifikasi gen *nirS* dan *nosZ* dari isolat bakteri denitrifikasi (*Amplification result of nirS and nosZ gene of denitrifying isolates*)

Keterangan (Notes) : isolat bakteri pada kultur padat (a) dan kultur cair (b). 0: marker; 1: PETI 7; 2: *Bacillus thuringiensis* UPT 1; 3: L5T3; 4: *Brevundimonas diminuta* EA1; 5: *Bacillus* sp. UPSB; 6: *Bacillus* sp. CPNS (dengan Primer NirS). 7: PETI 7; 8: *Bacillus thuringiensis* UPT 1; 9: L5T3; 10: *Brevundimonas diminuta* EA1; 11: *Bacillus* sp. UPSB; 12: *Bacillus* sp. CPNS, (dengan Primer NosZ). (bacterial isolate growth on solid media (a) and liquid media (b). 0: marker; 1: PETI 7; 2: *Bacillus thuringiensis* UPT 1; 3: L5T3; 4: *Brevundimonas diminuta* EA1; 5: *Bacillus* sp. UPSB; 6: *Bacillus* sp. CPNS (with NirS primer). 7: PETI 7; 8: *Bacillus thuringiensis* UPT 1; 9: L5T3; 10: *Brevundimonas diminuta* EA1; 11: *Bacillus* sp. UPSB; 12: *Bacillus* sp. CPNS, (with NosZ primer).

diampifikasi dengan menggunakan dua jenis primer yaitu Primer *nirS* dan *nosZ*. Hasil amplifikasi PCR kemudian dikonfirmasi dengan elektroforesis untuk mengetahui pita-pita DNA dan dibandingkan dengan marker. Hasil elektroforesis produk PCR menunjukkan bahwa keempat isolat bakteri yang diuji mempunyai gen *nirS* maupun *nosZ* (Gambar 4). *NirS* adalah gen fungsional yang menyandi (*encode*) nitrite reductase. Enzim ini mengkatalisis nitrit menjadi NO dan merupakan tahapan awal yang membedakan bakteri denitrifikasi dan bakteri respirasi nitrat (Prieme *et al.*, 2002). Sedangkan gen *nosZ* adalah gen yang menyandi *nitrous oxide reductase*. Reduksi *nitrous oxide* merupakan tahapan akhir pada alur reaksi denitrifikasi.

PEMBAHASAN

Hasil deteksi awal dari empat isolat bakteri pada media Giltay yang mengandung nitrat menunjukkan bahwa keempat isolat bakteri mampu membentuk gas pada tabung durham dan merubah warna media dari hijau menjadi biru. Isolat bakteri

Bacillus sp. CPNS dan *Bacillus* sp. UPSB membentuk gelembung udara yang lebih banyak dan merubah media lebih biru dibandingkan dengan isolat *Brevundimonas diminuta* EA1 dan *Bacillus thuringiensis* UPT1. denitrifikasi yang lebih tinggi dibandingkan 2 isolat lainnya (Tabel 1). Hasil deteksi ini megindikasikan bahwa keempat bakteri tersebut adalah bakteri denitrifikasi karena mampu mereduksi nitrat yang diindikasikan dengan terjadinya perubahan media menjadi biru dan merubah nitrat menjadi gas N₂ yang diindikasikan terbentuknya gelembung pada tabung durham. Metoda ini merupakan metoda pengukuran denitrifikasi secara kualitatif. Namun demikian, metoda ini belum spesifik untuk mendeteksi respiratori denitrifikasi karena gelembung (*bubble*) yang terbentuk pada tabung durham kemungkinan bukan gas N₂ akan tetapi gas lain yang juga bisa membentuk gelembung (Smibert *et al.*, 1981). Terjadinya perubahan warna media mengindikasikan terjadinya kenaikan pH media. Kenaikan pH terjadi karena reduksi nitrat namun

proses lain selain reduksi nitrat juga dapat meningkatkan pH (Valera *et al.*, 1961).

Karakter respiratori denitrifikasi adalah reduksi nitrogen oksida menjadi gas N dibarengi dengan dengan elektron transport posporilasi (Thauer *et al.*, 1977; Zumft, 1992). Oleh karena itu, ada 2 kriteria yang harus dipenuhi agar jenis mikroorganisme tertentu disebut sebagai respiratori denitrifikasi, yaitu: 1) gas nitrogen (N_2 dan N_2O) merupakan produk dari reduksi nitrat/nitrit dan 2) proses tersebut diatas harus dibarengi dengan peningkatan pertumbuhan yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan ketika nitrat/nitrit hanya berperan sebagai *electron sink*. Karakter lain dari denitrifikasi adalah pertumbuhannya merupakan fungsi dari reduksi N. Makin tinggi nitrat yang tereduksi maka makin tinggi pula pertumbuhannya (I. Mahne dan J. Tiedje, 1995). Isolat bakteri *Bacillus* sp. CPNS dan *Bacillus* sp. UPSB memperlihatkan pertumbuhan yang meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi KNO_3 , seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1.B dan 1.C. Pola yang demikian mengindikasikan bahwa kedua isolat tersebut adalah bakteri denitrifikasi yang cukup baik walaupun tidak tergolong mempunyai aktivitas yang tinggi. Sebagai contoh bakteri denitrifikasi yang mempunyai aktivitas tinggi adalah *Alcaligenes*, sedangkan yang mempunyai aktivitas sedang/rendah adalah *Azospirillum* dan *Aquaspirillum*.

Pertumbuhan isolat bakteri *Bacillus thuringiensis* UPT1 dan *Brevundimonas diminuta* EA1 tampak tidak linear dengan peningkatan konsentrasi KNO_3 dimana pertumbuhannya mulai terhambat pada konsentrasi 7 – 10 mM NO_3 . Hal ini kemungkinan besar disebabkan karena adanya toksisitas dari NO_2 yang terakumulasi dalam media. Dugaan tersebut didukung data pada grafik 2. Nitrit yang terbentuk dari reduksi nitrat cukup tinggi pada isolat *Bacillus thuringiensis* UPT1 dan *Brevundimonas diminuta* EA1 yang mencapai > 16 ppm. Dilaporkan bahwa nitrit pada konsentrasi > 4 mM menghambat *P. Stutzeri*, *Azospirillum lipoferum*, *Alcaligenes* sp., dan *Achromobacter cycloclastes* dimana pada konsentrasi > 2mM menghambat *Bradyrhizobium japonicum*, *C. Nephridii* dan 2 strain *Aquaspirillum* (I. Mahne

dan J. Tiedje, 1995).

Pada penelitian ini produksi gas N dari sel utuh bakteri dievaluasi dengan penambahan asetilen sehingga reduksi N_2O dapat dicegah (Smith *et al.*, 1978). Hal ini dilakukan karena N_2O lebih mudah diukur dibandingkan dengan N_2 . Hasil pengukuran N_2O menunjukkan bahwa pembentukan gas N_2O pada isolat bakteri *Bacillus thuringiensis* UPT1 dan *Brevundimonas diminuta* EA1 relatif kecil yaitu hanya sekitar 5 – 8 μ l. Aktivitas pembentukan gas N_2O pada perlakuan pemberian acetylen (AC) nampak tidak berbeda nyata dengan perlakuan tanpa pemberian acetylen (TAC) (gambar 3.A dan 3.B). Sedangkan pembentukan gas N_2O pada isolat bakteri *Bacillus* sp. CPNS dan *Bacillus* sp. UPSB lebih tinggi dan mencapai sekitar 25 μ l/l pada isolat bakteri *Bacillus* sp. CPNS (Gambar 3.D) dan 70 μ l/l pada isolat bakteri *Bacillus* sp. UPSB (Gambar 3.C). Jika diperhatikan terlihat bahwa aktivitas pembentukan gas N_2O pada perlakuan pemberian acetylen (AC) dari kedua isolat ini juga terlihat lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan tanpa pemberian acetylen (TAC). Data ini membuktikan bahwa isolat bakteri *Bacillus* sp. UPSB dan *Bacillus* sp. CPNS mempunyai aktivitas denitrifikasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan isolat bakteri *Bacillus thuringiensis* UPT1 dan *Brevundimonas diminuta* EA1. Data ini memperkuat hasil uji kualitatif yang juga menunjukkan bahwa isolat bakteri *Bacillus* sp. UPSB dan *Bacillus* sp. CPNS mempunyai aktivitas denitrifikasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan isolat *Bacillus thuringiensis* UPT1 dan *Brevundimonas diminuta* EA1. Dilaporkan bahwa genus *Bacillus* merupakan salah satu bakteri denitrifikasi yang cukup potensial (Kim *et al.*, 2005), sementara genus lainnya adalah *Pseudomonas*, dan *Alcaligenes*. *Bacillus* juga merupakan salah satu bakteri yang mampu melakukan reaksi denitrifikasi secara aerobik (Kim *et al.*, 2005), dimana bakteri lainnya yang juga mampu melakukan denitrifikasi secara aerobik adalah *Paracoccus* (Lukow and Diekmann, 1997), *Pseudomonas* (Kesser *et al.*, 2003), *Alcaligenes* (Robertson dan Kuenen, 1983).

Bacillus thuringiensis UPT1 dan *Brevundimonas diminuta* EA1.

Proses denitrifikasi dilakukan oleh 4 enzim reduktase, yaitu nitrat reduktase (NAR), nitrit reduktase (NIR), nitrik oksid reduktase (NOR) dan nitrous oksid reduktase (N₂OR) (Zumft, 1997). *NirS* dan *nirK* adalah gen yang menyandi enzim NIR yang berperan dalam mengkonversi nitrit (NO₂⁻) menjadi nitrik oksid (NO) dan *nosZ* adalah gen yang menyandi enzim N₂OR yang berperan dalam mengkonversi nitrous oksid (N₂O) menjadi nitrogen (N₂). Bakteri denitrifikasi kemungkinan bisa memiliki keempat enzim atau hanya beberapa dari itu (Dandie *et al.*, 2008; Wallenstein *et al.*, 2006). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa keempat bakteri ini mempunyai gen *nirS* maupun *nosZ* yang berarti bahwa keempat isolat bakteri tersebut adalah bakteri yang mampu melakukan proses denitrifikasi, yaitu mampu merubah NO₂⁻/NO₃⁻ menjadi gas N₂ (Gambar 4). Contoh bakteri yang mempunyai gen yang menyandi keempat enzim reduktase adalah *Paracoccus denitrificans* yang mampu merubah NO₃⁻ secara langsung menjadi N₂. Namun demikian beberapa bakteri denitrifikasi seperti *Agrobacterium tumefaciens* tidak memiliki N₂OR sehingga akan menghasilkan emisi N₂O sebagai produk akhir dari denitrifikasi (Wood *et al.*, 2001).

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa keempat isolat bakteri yang diuji adalah bakteri denitrifikasi yang diindikasikan dengan terdeteksinya gen *nirS* dan *nosZ*. Aktivitas denitrifikasi dari keempat isolat bakteri tersebut berbeda. Isolat bakteri UPSB dan CPNS mempunyai aktivitas denitrifikasi yang lebih tinggi dibandingkan isolat bakteri UPT1 dan EA1.

diindikasikan dengan pertumbuhan yang linier dengan peningkatan konsentrasi substrat KNO₃ dan pembentukan gas N₂O yang lebih tinggi dengan perlakuan penghambatan asetilena. Dari penelitian ini juga dapat ditunjukkan bahwa tingkat aktivitas denitrifikasi tidak dapat ditentukan hanya dengan

pengukuran kecepatan reduksi nitrat namun juga harus ditentukan berdasarkan tingkat pembentukan gas N₂O/N₂.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh proyek DIPA Puslit Biologi-LIPI. Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Dr. Novik Nurhidayat atas bimbingannya dalam melakukan analisis molekuler.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustiyani, D., Laili, N., Imamuddin, H., Sulistinah, N. dan Antonius, S., 2013. Pengaruh penggunaan lahan yang berbeda terhadap populasi dan aktivitas denitrifikasi serta emisi gas N₂O. *Berita Biologi*, 11(6), pp. 37–44.
- Alley *et al.*, 2007. IPCC Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I in the Third Assessment Report of Intergovernmental Panel on Climate Change. Report Summary for Policy Makers (SPM).
- APHA (American Public Health Association). 1992. Standards Methods for the Examination of Wastewater. 18th Ed. APHA. Washington, DC, USA.
- Braker, G., Fesefeldt, A. and Witzel, K.P., 1998. Development of PCR primer system for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), pp. 3769–3775.
- Balderston, W.L., Sherr, B. and Payne, W.J., 1976. Blockage by acetylene of nitrous oxide reduction in *Pseudomonas perfectomarinus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 31, pp. 504–508.
- Betlach, M.R. and Tiedje, J.M., 1981. Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide during bacterial denitrification. *Applied and Environmental Microbiology*, 42, pp. 1074–1084.
- Choudhary, M.A., Akramkhanov, A. and Sagar, S., 2002. Nitrous oxide emission from a New Zealand cropped soil: tillage effects, spatial and seasonal variability. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 93, pp. 33–43.
- Dandie, C. E., Burton, D.L., Zebarth, B.J., Henderson, S.L., Trevors, J.T. and Goyer, C. 2008. Changes in bacterial denitrifier community abundance over time in an agricultural field and their relationship with denitrification activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(19), pp. 5997–6005.
- DPU (Departemen Pekerjaan Umum). 1990. *Kumpulan SNI Bidang Pekerjaan Umum Mengenai Kualitas Air*. Departemen Pekerjaan Umum, Jakarta.
- Groffman, P.M., Altabet, M.A., Böhlke, J.K., Butterbach-Bahl, K., David, M.B., *et al.*, 2006. Methods for measuring denitrification: Diverse approaches to a difficult problem. *Ecological Applications* 16, pp. 2091–2122.
- Hayatsu, M., Tago K. and Saito, M., 2008. Various players in the nitrogen cycle: diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54, pp. 33–45.
- Kesserű, P., Kiss, I., Bihari, Z. and Polyák, B., 2003. Biological denitrification in a continuous flow pilot bioreactor containing immobilized *pseudomonas butanovora* Cells. *Bioresource Technology*, 87, pp. 75–80.
- Lukow, T. and Diekmann, H., 1997. Aerobic denitrification by a

- newly isolated heterotrophic Bacterium Strain TL1. *Biotechnology Letters*, 11, pp. 1157–1159.
- Mahne, I. and Tiedje, J.M., 1995. Criteria and methodology for identifying respiratory denitrifiers. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3), pp. 1110–1115.
- McKenney et al., 1994. Kinetics of denitrification by *Pseudomonas fluorescens* oxygen effects. *Soil Biology and Biochemistry*, 26, pp. 901–908.
- Palys T, Nakamura, L.K. and Cohan, F.M., 1997. "Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data". *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, pp. 1145–1156.
- Philippot, L., Hallin, S. and Schloter, M., 2007. Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil. *Advances in Agronomy*, 96, pp. 249–305.
- Pratscher, J., Stichternoth, C., Fichtl, K., Schleifer, K.H. and Braker, G., 2009. Application of recognition of individual genes-fluorescence in situ hybridization (RING-FISH) to detect nitrite reductase genes (nirK) of denitrifiers in pure cultures and environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, pp. 802–810.
- Prieme, A., Braker, G. and Tiedje, J.M., 2002. Diversity of nitrite reductase (nirK and nirS) gene fragments in forested upland and wetland soils. *Current Opinion in Microbiology*, 68 (4), pp. 1893–1900.
- Qiu, X.Y., Hurt, R.A., Wu, L.Y., Chen, C.H., Tiedje, J.M. and Zhou, J.Z., 2004. Detection and quantification of copper-denitrifying bacteria by quantitative competitive PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 59 (2), pp. 199–210.
- Rich and Myrold. 2004. Community composition and activities of denitrifying bacteria from adjacent agricultural soil, riparian soil, and creek sediment on Oregon, USA. *Soil Biology & Biochemistry*, 36, pp. 1431–1441.
- Robertson, L.A. and Kuenen, J.G. 1983. Thiosphaerapantotropha gen. nov. sp. nov., a Facultatively Anaerobic, Facultatively Autotrophic Sulphur Bacterium. *Journal of General Microbiology*, 129, pp. 2847–2855.
- Seinfeld, J.H. and Pandis, S.N., 1997. *Atmospheric Chemistry and Physics*. John Wiley and Sons. New York.
- Smibert, R.M. and Krieg, N.R., 1981. Nitrite reduction and denitrification, p.419. In P. Gerhardt, RGE Murray, RN Costilow, EW Nester, WA Wood, NR Krieg and GB Philips (ed), *Manual of methods for general bacteriology*. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- Smith, M.S., Firestone, M.K. and Tiedje, J.M., 1978. The acetylene inhibition method for short-term measurement of soil denitrification and its evaluation using nitrogen-13. *Soil Science Society of America Journal*, 42, pp. 611–615.
- Texeira, P. and Oliveira R., 2002. Metabolism of Alcaligenes denitrificans in biofilm vs planktonic cells. *Journal of Applied Microbiology*, 92, pp. 256–260.
- Thauer, R.K., Jungmann, K. and Decker, K., 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 41, pp. 100–180.
- Throckback, I.N., Enwall, K., Jarvis A. and Hallin, S., 2004. Reassessing PCR primers targeting nirS, nirK and nosZ genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiology Ecology*, 49(3), pp. 401–407.
- Valera, C.L. and Alexander, M., 1961. Nutrition and physiology of denitrifying bacteria. *Plant soil*, 15, pp. 268 – 280.
- Wallenstein, M. D., Myrold, D.D., Firestone, M. and Voytek, M. 2006. Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: Insights from molecular methods. *Ecological Applications*, 16(6), pp. 2143–2152.
- Wood, D. W., Setubal, J. C., Kaul, R., Monks, D. E., Kitajima, J. P., Okura, V. K., Zhou, Y., Chen, L., Wood, G. E., Almeida N.F. Jr., Woo, L., Chen, Y., Paulsen, I. T., Eisen, J. A., Karp, P. D., Bovee D, Sr., Chapman, P., Clendenning, J., Deatherage, G., Gillet, W., Grant, C., Kutayavin, T., Levy, R., Li, M. J., McClelland, E., Palmieri, A., Raymond, C., Rouse, G., Saenphimmachak, C., Wu, Z., Romero, P., Gordon, D., Zhang, S., Yoo, H., Tao, Y., Biddle, P., Jung, M., Krespan, W., Perry, M., Gordon-Kamm, B., Liao, L., Kim, S., Hendrick, C., Zhao, Z. Y., Dolan, M., Chumley, F., Tingey, S. V., Tomb, J. F., Gordon, M. P., Olson, M. V., and Nester, E. W., 2001. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*, 294(5550), pp. 2317–2323.
- Yoshinari, T. and Knowles, R., 1976. Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 69(3), pp. 705–710.
- Zheng, X., Fu, C., Xu, X., Yan, X., Huang, Y., Chen, G., Han, S., Hu, F., 2002. The Asian nitrogen cycle case study. *AMBIO*, 31, pp. 79–87.
- Zumft, W.G., 1992. The denitrifying procaryotes. In: A. Balows et al. (ed.) *The prokaryotes*. Vol. I. 2nd ed. Springer-Verlag, New York.
- Zumft, W.G., 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61 (4), pp. 533–616.
- Zheng, X., Fu, C., Xu, X., Yan, X., Huang, Y., Chen, G., Han, S. and Hu, F., 2002. The Asian nitrogen cycle case study. *AMBIO*, 31, pp. 79–87.

Pedoman Penulisan Naskah Berita Biologi

Berita Biologi adalah jurnal yang menerbitkan artikel kemajuan penelitian di bidang biologi dan ilmu-ilmu terkait di Indonesia. Berita Biologi memuat karya tulis ilmiah asli berupa makalah hasil penelitian, komunikasi pendek dan tinjauan kembali yang belum pernah diterbitkan atau tidak sedang dikirim ke media lain. Masalah yang diliput harus menampilkan aspek atau informasi baru.

Tipe naskah

1. Makalah lengkap hasil penelitian (*original paper*)

Naskah merupakan hasil penelitian sendiri yang mengangkat topik yang *up to date*, tidak lebih dari 15 halaman termasuk tabel dan gambar. Pencantuman lampiran seperlunya, namun redaksi berhak mengurangi atau meniadakan lampiran.

2. Komunikasi pendek (*short communication*)

Komunikasi pendek merupakan makalah hasil penelitian yang ingin dipublikasikan secara cepat karena hasil temuan yang menarik, spesifik dan baru, agar dapat segera diketahui oleh umum. Artikel yang ditulis tidak lebih dari 10 halaman. Hasil dan pembahasan boleh digabung.

3. Tinjauan kembali (*review*)

Tinjauan kembali merupakan rangkuman tinjauan ilmiah yang sistematis-kritis secara ringkas namun mendalam terhadap topik penelitian tertentu. Hal yang ditinjau meliputi segala sesuatu yang relevan terhadap topik tinjauan yang memberikan gambaran '*state of the art*', meliputi temuan awal, kemajuan hingga issue terkini, termasuk perdebatan dan kesenjangan yang ada dalam topik yang dibahas. Tinjauan ulang ini harus merangkum minimal 30 artikel.

Struktur naskah

1. Bahasa

Bahasa yang digunakan adalah Bahasa Indonesia atau Inggris yang baik dan benar.

2. Judul

Judul diberikan dalam bahasa Indonesia dan Inggris. Judul harus singkat, jelas dan mencerminkan isi naskah dengan diikuti oleh nama serta alamat surat menyurat penulis dan alamat email. Nama penulis untuk korespondensi diberi tanda amplop cetak atas (*superscript*).

3. Abstrak

Abstrak dibuat dalam dua bahasa, bahasa Indonesia dan Inggris. Abstrak memuat secara singkat tentang latar belakang, tujuan, metode, hasil yang signifikan, kesimpulan dan implikasi hasil penelitian. Abstrak berisi maksimum 200 kata, spasi tunggal. Di bawah abstrak dicantumkan kata kunci yang terdiri atas maksimum enam kata, dimana kata pertama adalah yang terpenting. Abstrak dalam Bahasa Inggris merupakan terjemahan dari Bahasa Indonesia. Editor berhak untuk mengedit abstrak demi alasan kejelasan isi abstrak.

4. Pendahuluan

Pendahuluan berisi latar belakang, permasalahan dan tujuan penelitian. Perlu disebutkan juga studi terdahulu yang pernah dilakukan terkait dengan penelitian yang dilakukan.

5. Bahan dan cara kerja

Bahan dan cara kerja berisi informasi mengenai metoda yang digunakan dalam penelitian. Pada bagian ini boleh dibuat sub-judul yang sesuai dengan tahapan penelitian. Metoda harus dipaparkan dengan jelas sesuai dengan standar topik penelitian dan dapat diulang oleh peneliti lain. Apabila metoda yang digunakan adalah metoda yang sudah baku cukup ditulis sitasinya dan apabila ada modifikasi maka harus dituliskan dengan jelas bagian mana dan hal apa yang dimodifikasi.

6. Hasil

Hasil memuat data ataupun informasi utama yang diperoleh berdasarkan metoda yang digunakan. Apabila ingin mengacu pada suatu tabel/grafik/diagram atau gambar, maka hasil yang terdapat pada bagian tersebut dapat diuraikan dengan jelas dengan tidak menggunakan kalimat 'Lihat Tabel 1'. Apabila menggunakan nilai rata-rata maka harus menyertakan pula standar deviasinya.

7. Pembahasan

Pembahasan bukan merupakan pengulangan dari hasil. Pembahasan mengungkap alasan didapatkannya hasil dan arti atau makna dari hasil yang didapat tersebut. Bila memungkinkan, hasil penelitian ini dapat dibandingkan dengan studi terdahulu.

8. Kesimpulan

Kesimpulan berisi informasi yang menyimpulkan hasil penelitian, sesuai dengan tujuan penelitian, dan penelitian berikutnya yang bisa dilakukan.

9. Ucapan terima kasih

Bagian ini berisi ucapan terima kasih kepada suatu instansi jika penelitian ini didanai atau didukung oleh instansi tersebut, ataupun kepada pihak yang membantu langsung penelitian atau penulisan artikel ini.

10. Daftar pustaka

Pada bagian ini, tidak diperkenankan untuk mensitasi artikel yang tidak melalui proses *peer review*. Apabila harus menyitir dari "laporan" atau "komunikasi personal" dituliskan '*unpublished*' dan tidak perlu ditampilkan di daftar pustaka. Daftar pustaka harus berisi informasi yang *up to date* yang sebagian besar berasal dari *original papers* dan penulisan terbitan berkala ilmiah (nama jurnal) tidak disingkat.

Format naskah

- Naskah diketik dengan menggunakan program Microsoft Word, huruf New Times Roman ukuran 12, spasi ganda kecuali Abstrak. Batas kiri-kanan atas-bawah masing-masing 2,5 cm. Maksimum isi naskah 15 halaman termasuk ilustrasi dan tabel.
- Penulisan bilangan pecahan dengan koma mengikuti bahasa yang ditulis menggunakan dua angka desimal di belakang koma. Apabila menggunakan Bahasa Indonesia, angka desimal ditulis dengan menggunakan koma (,) dan ditulis dengan menggunakan titik (.) bila menggunakan bahasa Inggris. Contoh: Panjang buku adalah 2,5 cm. Length of the book is 2.5 cm. Penulisan angka 1-9 ditulis dalam kata kecuali bila bilangan satuan ukur, sedangkan angka 10 dan seterusnya ditulis dengan angka. Contoh lima orang siswa, panjang buku 5 cm.
- Penulisan satuan mengikuti aturan international system of units.
- Nama takson dan kategori taksonomi ditulis dengan merujuk kepada aturan standar yang diakui. Untuk tumbuhan menggunakan *International Code of Botanical Nomenclature* (ICBN), untuk hewan menggunakan *International Code of Zoological Nomenclature* (ICZN), untuk jamur *International Code of Nomenclature for Algae, Fungi and Plant* (ICFAFP), *International Code of Nomenclature of Bacteria* (ICNB), dan untuk organisme yang lain merujuk pada kesepakatan Internasional. Penulisan nama takson lengkap dengan nama author hanya dilakukan pada bagian deskripsi takson, misalnya pada naskah taksonomi. Penulisan nama takson untuk bidang lainnya tidak perlu menggunakan nama author.
- Tata nama di bidang genetika dan kimia merujuk kepada aturan baku terbaru yang berlaku.
- Ilustrasi dapat berupa foto (hitam putih atau berwarna) atau gambar tangan (*line drawing*).
- Tabel
Tabel diberi judul yang singkat dan jelas, spasi tunggal dalam bahasa Indonesia dan Inggris, sehingga Tabel dapat berdiri sendiri. Tabel diberi nomor urut sesuai dengan keterangan dalam teks. Keterangan Tabel diletakkan di bawah Tabel. Tabel tidak dibuat tertutup dengan garis vertikal, hanya menggunakan garis horisontal yang memisahkan judul dan batas bawah. Paragraf pada isi tabel dibuat satu spasi.
- Gambar
Gambar bisa berupa foto, grafik, diagram dan peta. Judul gambar ditulis secara singkat dan jelas, spasi tunggal. Keterangan yang menyertai gambar harus dapat berdiri sendiri, ditulis dalam bahasa Indonesia dan Inggris. Gambar dikirim dalam bentuk .jpeg dengan resolusi minimal 300 dpi, untuk *line drawing* minimal 600dpi.

9. Daftar Pustaka

Sitasi dalam naskah adalah nama penulis dan tahun. Bila penulis lebih dari satu menggunakan kata 'dan' atau et al. Contoh: (Kramer, 1983), (Hamzah dan Yusuf, 1995), (Premachandra *et al.*, 1992). Bila naskah ditulis dalam bahasa Inggris yang menggunakan sitasi 2 orang penulis maka digunakan kata 'and'. Contoh: (Hamzah and Yusuf, 1995). Penulisan daftar pustaka, sebagai berikut:

a. **Jurnal**

Nama jurnal ditulis lengkap.

Agusta, A., Maehara, S., Ohashi, K., Simanjuntak, P. and Shibuya, H., 2005. Stereoselective oxidation at C-4 of flavans by the endophytic fungus *Diaporthe* sp. isolated from a tea plant. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53(12), pp.1565-1569.

b. **Buku**

Merna, T. and Al-Thani, F.F., 2008. *Corporate Risk Management*. 2nd ed. John Welly and Sons Ltd. England.

c. **Prosiding atau hasil Simposium/Seminar/Lokakarya.**

Fidiana, F., Triyuwono, I. and Riduwan, A., 2012. Zakah Perspectives as a Symbol of Individual and Social Piety: Developing Review of the Meadian Symbolic Interactionism. *Global Conference on Business and Finance Proceedings. The Institute of Business and Finance Research*, 7(1), pp. 721 - 742

d. **Makalah sebagai bagian dari buku**

Barth, M.E., 2004. Fair Values and Financial Statement Volatility. Dalam: Borio, C., Hunter, W.C., Kaufman, G.G., and Tsatsaronis, K. (eds.) *The Market Discipline Across Countries and Industries*. MIT Press. Cambridge.

e. **Thesis, skripsi dan disertasi**

Williams, J.W., 2002. Playing the Corporate Shell Game: The Forensic Accounting and Investigation Industry, Law, and the Management of Organizational Appearance. *Dissertation*. Graduate Programme in Sociology. York University. Toronto. Ontario.

f. **Artikel online.**

Artikel yang diunduh secara online ditulis dengan mengikuti format yang berlaku untuk jurnal, buku ataupun thesis dengan dilengkapi alamat situs dan waktu mengunduh. Tidak diperkenankan untuk mensitasi artikel yang tidak melalui proses peer review misalnya laporan perjalanan maupun artikel dari laman web yang tidak bisa dipertanggung jawabkan kebenarannya seperti wikipedia.

Himman, L.M., 2002. A Moral Change: Business Ethics After Enron. San Diego University Publication. <http://ethics.sandiego.edu/LMH/oped/Enron/index.asp>. (accessed 27 Januari 2008) bila naskah ditulis dalam bahasa inggris atau (diakses 27 Januari 2008) bila naskah ditulis dalam bahasa indonesia

Formulir persetujuan hak alih terbit dan keaslian naskah

Setiap penulis yang mengajukan naskahnya ke redaksi Berita Biologi akan diminta untuk menandatangani lembar persetujuan yang berisi hak alih terbit naskah termasuk hak untuk memperbanyak artikel dalam berbagai bentuk kepada penerbit Berita Biologi. Sedangkan penulis tetap berhak untuk menyebarkan edisi cetak dan elektronik untuk kepentingan penelitian dan pendidikan. Formulir itu juga berisi pernyataan keaslian naskah yang menyebutkan bahwa naskah adalah hasil penelitian asli, belum pernah dan tidak sedang diterbitkan di tempat lain.

Penelitian yang melibatkan hewan

Setiap naskah yang penelitiannya melibatkan hewan (terutama mamalia) sebagai obyek percobaan / penelitian, wajib menyertakan '*ethical clearance approval*' terkait animal *welfare* yang dikeluarkan oleh badan atau pihak berwenang. Penelitian yang menggunakan mikroorganisme sebagai obyek percobaan, mikroorganisme yang digunakan wajib disimpan di koleksi kultur mikroorganisme dan mencantumkan nomor koleksi kultur pada makalah.

Lembar ilustrasi sampul

Gambar ilustrasi yang terdapat di sampul jurnal Berita Biologi berasal dari salah satu naskah yang dipublikasi pada edisi tersebut. Oleh karena itu, setiap naskah yang ada ilustrasinya diharapkan dapat mengirimkan ilustrasi atau foto dengan kualitas gambar yang baik dengan disertai keterangan singkat ilustrasi atau foto dan nama pembuat ilustrasi atau pembuat foto.

Proofs

Naskah *proofs* akan dikirim ke penulis dan penulis diwajibkan untuk membaca dan memeriksa kembali isi naskah dengan teliti. Naskah *proofs* harus dikirim kembali ke redaksi dalam waktu tiga hari kerja.

Naskah cetak

Setiap penulis yang naskahnya diterbitkan akan diberikan 1 eksemplar majalah Berita Biologi dan *reprint*. Majalah tersebut akan dikirimkan kepada *corresponding author*

Pengiriman naskah

Naskah dikirim secara online ke website berita biologi: http://e-journal.biologi.lipi.go.id/index.php/berita_biologi

Alamat kontak

Redaksi Jurnal Berita Biologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI
Cibinong Science Centre, Jl. Raya Bogor Km. 46 Cibinong 16911
Telp: +61-21-8765067, Fax: +62-21-87907612, 8765063, 8765066,
Email: berita.biologi@mail.lipi.go.id, jurnalberitabiologi@yahoo.co.id atau
jurnalberitabiologi@gmail.com

BERITA BIOLOGI

Vol. 17 (2)

Isi (*Content*)

Agustus 2018

P-ISSN 0126-1754

E-ISSN 2337-8751

TINJAUAN ULANG (REVIEW)

Pichia pastoris: SEL RAGI UNTUK PRODUKSI PROTEIN REKOMBINAN [*Pihia pastoris*: Cell Yeast for Production of Recombinant Proteins]

Neng Herawati, Arizah Kusumawati dan Adi Santoso 91 – 102

MAKALAH HASIL RISET (ORIGINAL PAPERS)

PAKET PEMUPUKAN WORTTEL PADA TANAH LEMPUNG LIAT BERPASIR DATARAN RENDAH DI PALANGKA RAYA - KALIMANTAN TENGAH [The Fertilizer Packages of Carrots in Sandy Clay Loam of Lowland Areas Palangka Raya of Central Kalimantan]

M. Anang Firmansyah, Wiwik Rahayu dan Twenty Liana 103 – 114

KERAGAMAN GENETIK ALANG-ALANG (*Imperata cylindrica* (L.) Beauv.) BERDASARKAN MARKA INTER-SIMPLE SEQUENCE REPEATS (ISSR) [Genetic Diversity of Alang-alang (*Imperata cylindrica* (L.) Beauv.) Based on Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) Markers]

Dyah Subositi dan Harto Widodo 115 – 122

MORFOLOGI, ANATOMI DAN UJI HISTOKIMIA RIMPANG *Curcuma aeruginosa* Roxb; *Curcuma longa* L. DAN *Curcuma heyneana* Valetton dan Zijp. [Morphology, Anatomical and Histochemical Rhizome of *Curcuma aeruginosa* Roxb; *Curcuma longa* L. and *Curcuma heyneana* Valetton and Zijp.]

Trimanto, Dini Dwiyaniti dan Serafinah Indriyani 123 – 133

KERAGAMAN BEBERAPA TUMBUHAN CIPLUKAN (*Physalis* spp.) DI LERENG GUNUNG KELUD, JAWA TIMUR [Diversity of Ciplukan (*Physalis* spp.) on the Gradient of Mt. Kelud, East Java]

Nugraheni Hadiyanti, Supriyadi dan Pardono 135 – 146

PERTUMBUHAN DAN PRODUKSI TEBU (*Saccharum officinarum*; Poaceae) PADA BERBAGAI PAKET PEMUPUKAN DI LAHAN KERING BERPASIR [Sugarcane (*Saccharum officinarum*; Poaceae) Growth and Production on Several Fertilizer Packages in Sandy Upland]

Supriyadi, Nunik Eka Diana dan Djumali 147 – 156

PROFITABILITAS DAN KERAGAAN PERTUMBUHAN BENIH IKAN *Tor tambroides* DENGAN FREKUENSI PEMBERIAN PAKAN YANG BERBEDA [Profitability and Growth Performance of *Tor tambroides* with Different Feeding Frequency]

Jojo Subagja dan Deni Radona 157 – 164

BARKODING DNA BURUNG ELANG (FAMILI ACCIPITRIDAE) DI INDONESIA [DNA Barcoding of the Eagles (Family Accipitridae) in Indonesia]

Moch Syamsul Arifin Zein 165 – 173

STUDI ETNOBOTANI JENIS REMPAH YANG DIGUNAKAN DALAM BUMBU MASAKAN TRADISIONAL ADAT DI KERAJAAN ROKAN KABUPATEN ROKAN HULU, RIAU [The Etnobothanical Study of Spices on Traditional Food at Rokan Palace, Rokan Hulu Riau]

Melly Tribudiarti, Nurainas dan Syamsuardi 175 – 182

KARAKTERISASI KERAGAMAN GENETIK 27 GENOTIPE CABAI BERDASARKAN MARKA SSR (SIMPLE SEQUENCE REPEAT) [Genetic Diversity Characterization of 27 Chili Pepper Genotypes Based on SSR (Simple Sequence Repeat) Markers]

Rerenstradika Tizar Terryana, Kristianto Nugroho, Habib Rijzaani dan Puji Lestari 183 – 194

HUBUNGAN PANJANG DAN BERAT, FAKTOR KONDISI, FEKUNDITAS, DAN PERKEMBANGAN TELUR IKAN TENGADAK (*Barbonymus schwanefeldii*) DARI SAROLANGUN, JAMBI DAN ANJONGAN, KALIMANTAN BARAT, INDONESIA [The Length and Weight Relationship, Factor Conditions, Fecundity and Egg Development of Tinfoil Barb (*Barbonymus schwanefeldii*) from Sarolangun, Jambi and Anjongan, West Kalimantan, Indonesia]

Irin Iriana Kusmini, Jojo Subagja dan Fera Permata Putri 195 – 203

FISIOLOGI PERTUMBUHAN, POTENSI AKTIFITAS PRODUKSI N₂O DAN GEN FUNGSIONAL PENYANDINYA PADA BEBERAPA ISOLAT BAKTERI DENITRIFIKASI [Physiological Growth, Potential Activity of N₂O Production and Their Functional Gen of Some Isolat of Denitrifying Bacteria]

Dwi Agustiyani, Nur Laili dan Sarjiya Antonius 205 – 214

KOMUNIKASI PENDEK (SHORT COMMUNICATION)

HUBUNGAN KARAKTER FENOTIPIK DAN HASIL BIJI PLASMA NUTFAH KACANG TUNGGAK [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] MENURUT ANALISIS LINTASAN [The Relationships between Phenotypic Characters and Seed Yield of Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] Germplasm Using Path Analysis]

Mastur, Mamik Setyowati, dan Dwi N. Susilowati 215 – 221

CORRIGENDUM 223