

**KARAKTERISASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI DENITRIFIKASI
DARI SEDIMEN PERAIRAN RAWA JOMBOR, KLATEN
DENGAN GEN PENYANDI 16S rRNA**

Skripsi

untuk memenuhi sebagian persyaratan
guna memperoleh gelar Sarjana Sains



Oleh

ANDRI YANTI

M0410003

PROGRAM STUDI BIOLOGI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS SEBELAS MARET

SURAKARTA

2015

commit to user

PENGESAHAN

Skripsi

**KARAKTERISASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI DENITRIFIKASI
DARI SEDIMEN PERAIRAN RAWA JOMBOR, KLATEN
DENGAN GEN PENYANDI 16S rRNA**

Oleh:

Andri Yanti
M0410003

Telah dipertahankan di depan Tim penguji
pada Tanggal 13 Juli 2015
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Surakarta, Agustus 2015

Pembimbing I/Penguji III

Dr. Sunarto, M.S
NIP. 19540605 199103 1 002

Pembimbing II/Penguji IV

Dr. Ratna Setyaningsh, M.Si
NIP. 19660714 199903 2 001

Penguji I

Dr. Wiryanto, M.Si
NIP. 19530801 198203 1 005

Penguji II

Dr. Arjuni Pangastuti, M.Si
NIP. 19750531 200003 2 001

Mengesahkan

Dekan F MIPA



Prof. Dr. Ari Handono Hamelan, M.Sc (Hons)., Ph.D.
NIP. 19610223 198601 1 001

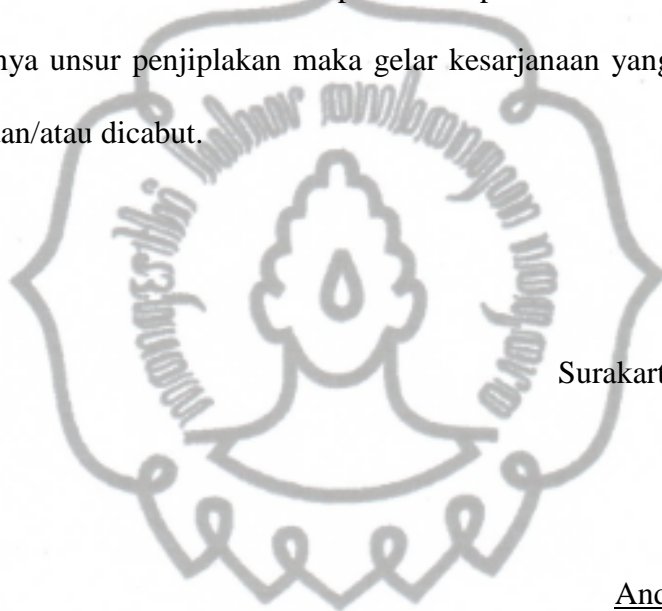
Kepala Program Studi Biologi



Dr. Ratna Setyaningsh, M.Si
NIP. 19660714 199903 2 001

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil penelitian saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi, serta tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka. Apabila di kemudian hari dapat ditemukan adanya unsur penjiplakan maka gelar kesarjanaan yang telah diperoleh dapat ditinjau dan/atau dicabut.



Surakarta, 13 Juli 2015

Andri Yanti
NIM. M0410003

**KARAKTERISASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI DENITRIFIKASI
DARI SEDIMEN PERAIRAN RAWA JOMBOR, KLATEN
DENGAN GEN PENYANDI 16S rRNA**

Andri Yanti

Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Sebelas Maret, Surakarta

ABSTRAK

Perairan air tawar yang menggenang (lentik) mudah mengalami pencemaran. Penyebab pencemaran perairan air tawar antara lain masuknya limbah domestik dan limbah sektor pertanian di sekitar perairan yang berupa bahan organik dan anorganik, sehingga perairan tersebut mengandung nutrisi yang tinggi dan dapat menyebabkan sedimentasi. Selain itu, diperkirakan kadar nitrat juga tinggi di perairan tersebut. Kadar nitrat yang tinggi dapat menyebabkan terjadinya eutrofikasi dan penurunan kualitas air di perairan tersebut, sehingga dibutuhkan suatu cara pencegahan atau penanggulangan dengan memanfaatkan mikroorganisme perairan yaitu bakteri denitrifikasi. Bakteri ini dapat mengubah nitrat menjadi gas nitrogen (N_2) dalam keadaan anaerob, sehingga kandungan nitrat di perairan dapat berkurang. Tujuan penelitian ini adalah; (1) mengidentifikasi isolat-isolat bakteri denitrifikasi yang diisolasi dari sedimen perairan Rawa Jombor dengan karakterisasi bakteri denitrifikasi dan (2) mengetahui status trofik perairan Rawa Jombor berdasarkan parameter lingkungan kecerahan, nitrogen dan fosfor.

Penelitian ini dilakukan isolasi bakteri denitrifikasi dari sedimen perairan Rawa Jombor dengan menggunakan media denitrifikasi cair dan padat, uji reduksi nitrat, uji oksidatif/fermentatif, karakterisasi bakteri dengan pewarnaan gram dan identifikasi bakteri denitrifikasi dengan sekuens gen penyandi 16S rRNA yang dianalisis dengan BLASTn. Status trofik perairan Rawa Jombor berdasarkan parameter nitrogen total, fosfor total dan kecerahan yang dianalisis dengan kriteria status trofik danau yang terlampir pada Peraturan Menteri Negara Lingkungan Hidup (Per MNLH) No. 28 Tahun 2009.

Pada penelitian ini, ditemukan 6 isolat bakteri denitrifikasi yang diisolasi dari sedimen di perairan Rawa Jombor Klaten. Karakteristik isolat bakteri tersebut adalah koloni berwarna bening, berbentuk bulat, bersifat gram negatif, selnya berbentuk batang dan motil. Satu isolat yaitu isolat TmK tidak teridentifikasi, sehingga isolat yang dapat diidentifikasi ada 5 isolat bakteri denitrifikasi. Lima isolat bakteri denitrifikasi yang ditemukan teridentifikasi termasuk ke dalam genus *Shewanella*. Isolat TmD (99%) teridentifikasi sebagai *Shewanella putrefaciens*, isolat TmE (98%) dan TmG (97%) memiliki kemiripan dengan *Shewanella putrefaciens*, isolat Tmi (98%) memiliki kemiripan dengan *Shewanella xiaminensis* dan isolat TmA (96%) merupakan spesies baru. Status trofik perairan Rawa Jombor berdasarkan parameter nitrogen total, fosfor total dan kecerahan termasuk dalam status hipereutrof.

Kata kunci : Rawa Jombor, sedimen, nitrat, bakteri denitrifikasi, gen penyandi 16S rRNA.

CHARACTERIZATION AND IDENTIFICATION OF DENITRIFICATION BACTERIA FROM AQUATIC SEDIMENT OF RAWA JOMBOR, KLATEN USING GENES ENCODING 16S rRNA

Andri Yanti

Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Science
Sebelas Maret University, Surakarta

ABSTRACT

Inundating fresh waters is vulnerable to pollution. The causes of fresh waters pollution include domestic waste and farming sector pollution entering into waters in the form of organic and inorganic materials, so that the waters contain high nutrient and can result in sedimentation. In addition, it is expected that the nitrate level is also high in the waters. The high nitrate level may lead to eutrophication and water degradation in the waters, thus a preventive and coping measure is required, namely to utilize the water microorganism, in this case denitrification bacterium. This bacterium can convert nitrate into nitrogen (N₂) gas in anaerobic condition, so that nitric content in the waters may be reduced. The objectives of research were: (1) to identify the isolates of denitrification bacterium isolated from Rawa Jombor sediment using characterization of denitrification bacterium and (2) to find out trophic status of Rawa Jombor based on environmental parameters including brightness, nitrogen and phosphor.

This research was conducted isolation of denitrification bacteria from aquatic sediment of Rawa Jombor, Klaten using denitrification medium of liquid and solid, nitrate reduction test, oxidative/fermentative, characterization of bacteria using staining gram and identification of denitrification bacteria using sequens of genes encoding 16S rRNA are analysed using BLASTn. Trophic status of Rawa Jombor based on enviromental parameters including brightness, nitrogen total and phosphor total are analysed using trophic status criteria of lake attached on the Peraturan Menteri Negara Lingkungan Hidup (Per MNLH) No. 28 Tahun 2009.

In this research, 6 isolates of denitrification bacteria were found isolated from sediment in Rawa Jombor waters of Klaten. The characteristics of such the bacterial isolates were clear yellow, round, gram negative, shaped cell of bacil and motile. One isolate is isolate TmK is not identified, so isolate of bacteria identified 5 isolates of denitrification bacteria. Five isolates of denitrification bacteria found were identified belonging into *Shewanella* genus. Isolate TmD (99%) identified is *Shewanella putrefaciens*, TmE (98%) and TmG (97%) had similarity to *Shewanella putrefaciens*, isolate Tmi (98%) had similarity to *Shewanella xiaminensis*, while TmA (96%) is new species. Trophic status of Rawa Jombor waters based on parameter of total nitrogen, total phosphor, and brightness belonging to hypereuthroph status.

Keywords: Rawa Jombor, sediment, nitrate, denitrification bacteria, genes encoding 16S rRNA.

MOTTO

“ Action is key to all Success ”
(Luxoquotes)

“ Be Brave. Take Risks. Nothing can Substitute Experience “
(Paulo Coelho)

“ Keterbatasan hanya hidup dipikiranmu saja, namun jika engkau mennggunakan imajinasi, kemungkinanmu menjadi tak terbatas “
(Jamie Paolinetti)

“ Melanjutkan Langkah itu memang Mudah, yang Sulit adalah Memulai Langkah Pertama “

“ Stop Dreaming, Start Doing “

“ Your the best teacher is Your last mistake “

“ Kamu tidak akan pernah Sukses jika tidak pernah Gagal.
Tak akan Bahagia jika tidak pernah Sedih “

PERSEMBAHAN

Skripsi ini Ku persembahkan untuk

Bapak dan Ibu tercinta yang tak henti-hentinya mendo'akan, memberi dukungan, motivasi dan mencurahkan segenap cinta, kasih dan sayangnya untukku

Kedua kakak tersayang, mbak Puji Lestari dan mbak Dwi Umiyati yang selalu memberi dukungan, motivasi dan selalu membimbingku untuk menjadi lebih baik dan dewasa

Sahabat – sahabatku ECBA yang selalu membuat hari – hariku menjadi berwarna, ceria dan selalu memberi senyuman dan kebahagiaan setiap hari di kampus

Keluarga besarku di Sragen yang selalu mendukung dan mendo'akanku

Kalian semua adalah semangat dan motivasi untuk ku....

Thank you for All.... I Love You All....

KATA PENGANTAR

Ucapan syukur tak terputus, segala puji hanya pada Allah SWT atas segala hidayah dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan Penelitian Skripsi yang berjudul “Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Denitrifikasi dari Sedimen Perairan Rawa Jombor Klaten dengan Menggunakan Metode Molekuler Gen 16S rRNA” dengan baik dan lancar. Penyusunan skripsi ini merupakan salah satu syarat penulis untuk mendapatkan gelar kesarjanaan strata-1 (S1) pada Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Dalam proses penelitian dan penulisan skripsi ini, penulis memperoleh banyak masukan, bantuan, dan bimbingan dari berbagai pihak. Maka dari itu penulis pada kesempatan ini menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Prof. Ir. Ari Handono Ramelan, M.Sc(Hons)., Ph.D., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret yang telah memberikan ijin penelitian untuk keperluan skripsi.
2. Dr. Ratna Setyaningsih, M.Si., selaku Kepala Prodi Biologi dan Pembimbing II, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret yang telah memberikan ijin, saran-saran dalam penelitian, masukan, bimbingan, petunjuk serta kesabaran selama penelitian sampai selesainya penyusunan skripsi..
3. Dr. Sunarto, M.S., selaku Dosen Pembimbing I yang telah memberikan saran, bimbingan, dukungan serta kesabaran selama penelitian sampai selesainya penyusunan skripsi.
4. Dr. Wiryanto, M.Si., selaku Dosen Penelaah I yang telah memberikan masukan dan dukungan hingga selesainya penyusunan skripsi.
5. Dr. Artini Pangastuti, M.Si., selaku Dosen Penelaah II yang telah memberikan saran dan dukungan hingga selesainya penyusunan skripsi.
6. Arina Hanif, Arum Asri Trinastuti, Astrini Ika Safitri, Dian Aditama, Lintang Amilatun Nafisah, Diana Putri Hapsari, Restykania, Sofa

Choiriyah, Muh. Ridho, Faradina K., Mbak Dwi Purwanti, Mbak Nunung Ria, Mbak Rivia, Hana Widyanti, Mutia Riska Hani yang selalu memberikan dukungan, semangat serta membantu dalam pengambilan sampel dan penyelesaian penelitian dan penyusunan skripsi.

7. Staff Sub Laboratorium Biologi FMIPA, Universitas Sebelas Maret yang telah memberikan bantuan teknis untuk melakukan penelitian di laboratorium.
8. Ibu Darwani, selaku pendamping dari Laboratorium Mikrobiologi, Balai Laboratorium Kesehatan (BLK) Yogyakarta yang telah memberi bantuan dan arahan dalam penyelesaian penelitian.
9. Balai Besar Teknik Kesehatan Lingkungan dan Pencegahan Penyakit Menular (BBTKL PP) Yogyakarta yang telah memberi bantuan secara teknis dan bahan dalam penyelesaian penelitian.
10. Teman – teman Superbio 2010 yang senantiasa memberikan semangat dan motivasi pada Penulis.
11. Kawan – kawan Karang Taruna “Mudo Mudi Utomo“ yang senantiasa memberikan dukungan, semangat dan motivasi pada Penulis.

Dengan kerendahan hati Penulis menyadari bahwa dalam melakukan penelitian dan penyusunan skripsi ini masih banyak kekurangan dan kesalahan, hal ini karena keterbatasan kemampuan dan pengetahuan yang penulis miliki. Oleh karena itu masukan yang berupa saran dan kritik yang membangun dari para pembaca akan sangat membantu. Semoga skripsi ini bisa bermanfaat bagi kita semua dan pihak-pihak yang terkait.

Surakarta, Juli 2015

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
MOTTO	vi
PERSEMBAHAN	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah	1
B. Perumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	5
D. Manfaat Penelitian	5
BAB II LANDASAN TEORI	6
A. Tinjauan Pustaka	6
1. Gambaran Umum Rawa Jombor	6
2. Nitrat (NO ₃)	8

3. Bakteri Denitrifikasi di Sedimen Perairan	9
4. Mekanisme Reduksi Nitrat Oleh Bakteri	11
a. Denitrifikasi	11
b. Dismilatory Nitrate Reduction to Ammonium (DNRA)	12
c. Oksidasi Amonia Anaerobik (Anamox)	12
5. Gen Penyandi 16S rRNA	12
6. Status Trofik Danau dan/atau Waduk	14
B. Kerangka Pemikiran	16
C. Hipotesis	18
BAB III METODE PENELITIAN	19
A. Tempat dan Waktu Penelitian	19
B. Alat dan Bahan	19
1. Alat	19
2. Bahan	20
C. Cara Kerja	21
1. Pengambilan Sampel Sedimen	21
2. Pengukuran Parameter Lingkungan	22
3. Isolasi Bakteri Denitrifikasi	23
4. Uji Reduksi Nitrat	24
5. Uji Oksidatif/Fermentatif (OF)	24
6. Karakterisasi Morfologi dan Sifat Gram Bakteri	25
7. Ekstraksi DNA Bakteri	26
8. Amplifikasi Gen 16S rRNA	27

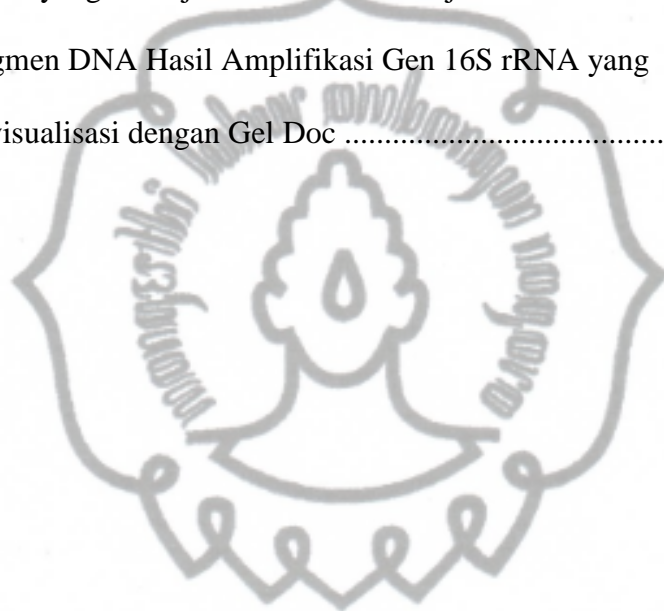
9. Purifikasi dan Sekuensing Gen Penyandi 16S rRNA	28
D. Analisis Data	28
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	29
A. Isolat Bakteri Denitrifikasi dari Sedimen Perairan Rawa Jombor ..	29
B. Karakterisasi Koloni dan Sel Isolat Bakteri Denitrifikasi	32
C. Identifikasi Bakteri Denitrifikasi dengan Sekuens Gen 16S rRNA	33
D. Status Trofik Perairan Rawa Jombor Klaten	37
BAB V PENUTUP	41
A. Kesimpulan	41
B. Saran	42
DAFTAR PUSTAKA	43
RIWAYAT HIDUP	69

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Kriteria Status Trofik Danau	16
Tabel 2. Nilai pH, Kandungan Nitrat, Nitrit dan Amonia di Sedimen Perairan Rawa Jombor Klaten	29
Tabel 3. Karakteristik Isolat Bakteri Denitrifikasi yang Diisolasi dari Sedimen Perairan Rawa Jombor Klaten	33
Tabel 4. Identitas Bakteri Denitrifikasi di Sedimen Perairan Rawa Jombor Dianalisis dengan BLASTn	35
Tabel 5. Data Hasil Pengukuran Parameter Nitrogen Total, Fosfor Total dan Kecerahan Pada Sampel Air Perairan Rawa Jombor Klaten	38

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Skema Kerangka Pemikiran	17
Gambar 2. Lokasi Pengambilan Sampel Sedimen dan Air di Perairan Rawa Jombor Klaten	22
Gambar 3. Warna yang Ditunjukkan Oleh Hasil Uji Reduksi Nitrat	31
Gambar 4. Warna yang Ditunjukkan Oleh Hasil Uji Oksidatif/Fermentatif ...	32
Gambar 5. Fragmen DNA Hasil Amplifikasi Gen 16S rRNA yang Divisualisasi dengan Gel Doc	34



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Komposisi Media	48
Lampiran 2. Komposisi Reagen	49
Lampiran 3. Hasil Pengukuran Parameter lingkungan	50
Lampiran 4. Hasil Reduksi Nitrat	54
Lampiran 5. Hasil Uji Oksidatif/Fermentatif (OF)	57
Lampiran 6. Bentuk Sel Bakteri Denitrifikasi	59
Lampiran 7. Sekuens DNA Isolat Bakteri Denitrifikasi	60
Lampiran 8. Hasil Produk Sekuens DNA Isolat Bakteri Denitrifikasi dengan Program BLASTn	64