BUKU

by Buku Anammox

Submission date: 30-Dec-2020 04:32PM (UTC+0800)
Submission ID: 1482035420
File name: PENEMUAN_DAN_APLIKASI_06.pdf (1.95M)
Word count: 20528
Character count: 132550

PENEMUAN DAN APLIKASI ANAMMOX

ZULKARNAINI

ANDALAS UNIVERSITY Press

PENEMUAN DAN APLIKASI ANAMMOX

Penulis	:	**Zulkarnaini**
Desain Sampul	:	Syamsul Hidayat
Tata Letak	:	Syamsul Hidayat Ikhsanul Anwar
ISBN	:	-
Ukuran Buku	:	15,5 x 23 cm
Tahun Terbit	:	2020
Cetakan	:	Pertama
Anggota :	:	*Asosiasi Penerbit Perguruan Tinggi Indonesia (APPTI)*

Dicetak dan diterbitkan oleh :
Andalas University Press
Jl. Situjuh No. 1, Padang 25129
Telp/Faks. : 0751-27066
email : cebitunand@gmail.com

Hak Cipta Pada Penulis © 2020

Hak Cipta dilindungi Undang-Undang.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, segala puji dan syukur penulis ucapkan ke hadirat Allah SWT karena buku ini telah selesai disusun. Buku ini disusun karena belum adanya buku sejenis yang membahas khusus tentang proses *anaerobic ammonium oxidation* (anammox). Hal ini karena belum adanya penelitian yang berkesinambungan tentang pengolahan air limbah menggunakan proses biologi anammox. Sehingga buku ini bisa menjadi referensi bagi mahasiswa, staf pengajar dan peneliti di Indonesia untuk memahami dan mempelajari sejarah penemuan dan konsep-konsep dasar proses anammox.

Isi dari buku ini adalah kumpulan review jurnal tentang bakteri anammox yang menjadi referensi penulis ketika melaksanakan studi Doktoral di *Kanazawa University*, Jepang. Beberapa bagiannya merupakan hasil penelitian dari kelompok penelitian anammox Jurusan Teknik Lingkungan Universitas Andalas yang memulai penelitian pada tahun 2018. Salah satu cita–cita yang ingin dicapai dari kelompok penelitian ini adalah membangun reaktor anammox pertama di Indonesia dan menemukan bakteri anammox yang hidup di lingkungan tropis untuk diaplikasikan pada pengolahan air limbah dalam penghilangan kadar nitrogen.

Mudah-mudahan buku ini juga menjadi langkah untuk mewujudkan cita-cita di atas. Mewujudkan cita-cita besar tersebut tentu tidak dapat dilaksanakan sendiri dengan keahlian individu tetapi memerlukan kerjasama berbagai ahli multidisiplin keilmuan, Harapannya dapat dibentuk kelompok penelitian anammox di berbagai perguruan tinggi di Indonesia dan membangun kolaraborasi penelitian yang saling menguatkan untuk satu tujuan menjadikan kualitas lingkungan Indonesia lebih baik dengan kemandirian sebagai bangsa Indonesia yang bermartabat.

Penulis menyadari apabila dalam penyusunan buku ini terdapat kekurangan, tetapi penulis meyakini sepenuhnya bahwa sekecil apapun buku ini tetap memberikan manfaat. Akhir kata, guna penyempurnaan buku ini, kritik dan saran dari pembaca sangat penulis nantikan.

Padang, April 2020

Penulis

DAFTAR ISI

Kata Pengantar iii
Daftar Isi v
Daftar Gambar vii
Daftar Tabel iv
BAB I. Pendahuluan 1
1.1. Sifat Fisik Senyawa Nitrogen 1
1.2. Siklus Nitrogen 1
1.3. Transformasi Siklus Nitrogen menjadi *Jaringan Nitrogen Network* 5
1.4. Fiksasi Nitrogen dan Produksi Primer 7
1.5. Nitrifikasi 9
1.6. Denitrifikasi 10
1.7. Anammox 11
1.8. Reduksi Nitrat Dissimilasi menjadi Amonia 11
BAB II. Sejarah Bakteri dan Reaksi Anammox 13
2.1. Sejarah Bakteri Anammox 13
2.2. Pertumbuhan dan Metabolisme Anammox 17
2.3. Biologi Sel Bakteri Anammox 19
2.3. Lipid *Laddarane* yang Unik 21
2.4. Anammoxosom dan Metabolisme Energi 24
2.5. Anammoxosom dan Pertumbuhan 25
2.6. Biokimia dan Bio-Energi Proses Anammox 28
BAB III. Genomik Bakteri Anammox 33
3.1. Fiksasi dan Respirasi Karbon Dioksida 33
3.2. Fleksibelitas Cara Hidup 34
3.3. Metabolisme Anammox yang Unik 34
3.4. Biologi Sel dan Pemilahan Protein 37

BAB IV. Ekologi dan Lingkungan Bakteri Anammox 39
4.1. Deteksi Bakteri Anammox di Lingkungan 39
4.2. Anammox di Ekosistem Laut 43
4.3. Interaksi Mikroba dalam Siklus N Laut 44
4.4. Anammox dalam Ekosistem Air Tawar dan Terrestrial 46
4.5. Penelitian Anammox di Indonesia 46
4.6. Eksplorasi dan Identifikasi Bakteri Anammox Tropis 52
BAB V. Tren dan Aplikasi Anammox 63
5.1. Tren Saat Ini Aplikasi Anammox 63
5.2. Aplikasi Proses Anammox dalam Pengolahan Air Limbah 65
5.3. Aplikasi Proses Anammox pada Suhu Sedang dan Konsentrasi Amonia Rendah 68
5.4. Penghilangan Amonia dan Metana secara Simultan 69
5.5. Penelitian dan Aplikasi Anammox di Masa Depan 69
Daftar Pustaka 73
Daftar Istilah 77
Daftar Singkatan 85
Index 87

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1	Siklus Nitrogen Sederhana	4
Gambar 1.2	Pemahaman Terkini tentang Jaringan Biogeokimia Nitrogen	5
Gambar 1.3	Pohon evolusi filum bakteri yang berkaitan dengan siklus nitrogen	6
Gambar 2.1	Danau Talago, Kab. Tanah Datar, Indonesia. Lokasi Eksplorasi dan Identifikasi Bakteri Anammox Pertama Kali di Indonesia	17
Gambar 2.2	Bentuk Sel *Planctomycetes*, termasuk Bakteri Anammox	20
Gambar 2.3	Komposisi Lipid Ladderane Bakteri Anammox	23
Gambar 2.4	Elektron Mikrograf Menunjukkan Lokalisasi Immunogold dari Hidrazin/ Hidroksilamin Oksidoreduktasi (Titik Hitam) pada Anammoxosom Bakteri Anammox *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*. bar Skala, 500 nm	26
Gambar 2. 5	Skema Hipotesis yang Memperlihatkan Kombinasi antara Pusat Katabolisme *K. Stuttgartiensis* Bersama dengan Nitrat Reduksi Untuk Menghasilkan *Low-redox-potential Electron* untuk Jalur asetil-KoA.	31
Gambar 4.1	Distribusi Geografis Global Penelitian Anammox dari Tahun 1995 – 2018 dari Hampir Semua Wilayah di Dunia Kecuali Beberapa Negara Afrika dan Asia	47
Gambar 4.2	Bakteri Anammox *Candidatus Brocadia sinica*, dari Kanazawa University, Jepang	48
Gambar 4.3	Roadmap Penelitian Anammox oleh Group Peneliti Anammox, Universitas Andalas	48
Gambar 4.4	Perbandingan Reaktor Anammox Granular dengan Biofilm Menggunakan Ijuk	50

Gambar 4.5.	Reaktor Anammox dengan Media Tumbuh, A. Plastik, B. Kulit Ampas Tebu	51
Gambar 4.6	Pengambilan Sampel di Danau Talago, Koto Baru, Kabupaten Tanah Datar, Propinsi Sumatera Barat	54
Gambar 4.7	Lokasi Pengambilan Sampel Lumpur pada Danau Talago, Koto Baru, Kabupaten Tanah Datar	54
Gambar 4.8	Konfigurasi Rekator Kultivasi Bakteri Anammox	55
Gambar 4.9	Gambar Pertumbuhan Biofilm Merah pada FtBR	56
Gambar 4.10	Kelimpahan Mikroba pada Reaktor Kultivasi FtBR pada Tingkat Genus	59
Gambar 4.11	Pohon Filogenetik yang Dihitung dengan Metode Neighbor-Joining dan Analisis Nilai Bootstrap Dilakukan dengan 1.000 Sampel Ulang	60
Gambar 4.12	Distribusi Sebaran Penemuan Bakteri Anammox di Dunia Berdasarkan Genus	61

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1	Sifat Fisik Senyawa Nitrogen Anorganik	2
Tabel 1.2	Enzim yang Terlibat pada Siklus Nitrogen dan Reaksi yang Dikatalis	2
Tabel 2.1	Spesies Anammox yang Telah Ditemukan	16
Tabel 4.1	Koordinat Pengambilan Sampel di Danau Talago, Koto Baru, Kabupaten, Tanah Datar	53
Tabel 4.2	Kemiripan Sampel Bakteri Genus *Candidatus Brocadia* dan *Candidatus Anammoxoglobus* FtBR Berdasarkan Sekuens Gen 16S rRNA	57
Tabel 5.1	Reaktor Anammox Skala Besar yang Dibangun oleh Perusahaan Paques	64
Tabel 5.2	Aplikasi Proses Anammox dalam Pengolahan Air Limbah Skala Laboratorium	66

BAB I
PENDAHULUAN

1.1. Sifat Fisik Senyawa Nitrogen

Nitrogen (N) adalah elemen grup 5B dengan bilangan oksidasi dari −3 hingga +5 (Tabel 1.1). Dalam setiap keadaan oksidasi, atom nitrogen bergabung dengan atom hidrogen, oksigen, atau atom nitrogen lainnya. Dengan cara ini setidaknya ada satu molekul anorganik yang unik perkeadaan oksidasi. Meskipun beberapa molekul nitrogen secara termodinamika lebih stabil daripada molekul nitrogen dalam bentuk lainnya. Semua nitrogen dalam keadaan teroksidasi terdapat dalam fasa cair (nitrat dan nitrit), karena keadaan teroksidasi N dalam lingkungan tertentu dikontrol oleh kinetika (energi aktivasi senyawa-N tinggi), dan bukan oleh kesetimbangan termodinamika (sistem berada dalam keadaan setimbang mekanis, setimbang termal dan setimbang secara kimia). Tidak ada kecenderungan untuk terjadi perubahan keadaan, baik untuk sistem maupun untuk lingkungannya. Sebagian besar nitrogen di dunia ini dalam keadaan padat (batuan). Namun, gas nitrogen di atmosfer adalah sumber nitrogen paling penting yang tersedia untuk proses biologi.

2.1. Siklus Nitrogen

Kehidupan tergantung pada nitrogen. Rumus kimia sederhana untuk organisme hidup adalah $CH_2O_{0.5}N_{0.15}$. Dari sudut pandang mikrobiologis, pergantian senyawa nitrogen di dalam biosfer (siklus nitrogen) terdiri dari: lima proses katabolik (nitritifikasi, nitratifikasi, denitrifikasi, reduksi nitrat disimilasi dan anammox), tiga proses anabolik (penyerapan amonium, reduksi nitrat assimilasi dan fiksasi nitrogen), dan ammonifikasi (hasil utama dari rantai makanan biologis). Enzim yang paling penting dari siklus nitrogen dan reaksi yang dikatalisasinya dirangkum dalam Tabel 1.1-1.2.

Tabel 1.1. Sifat fisik senyawa nitrogen anorganik.

Senyawa	Rumus kimia	Bilangan oksidasi	$\Delta H_f°$ (Kj/ mol)	$\Delta G_f°$9 (kJ/ mol)	S° (J/ mol.K)	pK
Ammonium	NH_4^+	−3	133.1	−79.4	713	9.2
Hidrazin	N_2H_4 (aq)	−2	34.4	128.5	−316	6.1
Hidroksilamin	NH_2OH (aq)	−1	−98.7	−22.9	−254	6.0
Gas nitrogen	N_2 (g)	0	0	0	0	—
Dinitrogen oksida	N_2O (g)	+1	82.4	104.6	−74	—
Nitrogen oksida	NO (g)	+2	90.6	86.9	12	—
Nitrit	NO_2^-	+3	−105.0	−37.4	−227	3.3
Nitrogen dioksida	NO_2 (g)	+4	33.3	51.5	−61	—*
Nitrat	NO_3^-	+5	−208.2	−111.7	−324	−1.5

*Nitrogen dioksida bereaksi di dalam air menjadi nitrit dan nitrat. Angka termodinamik berdasarkan kondisi standar/ STP (pH 0, 25°C) dan kondisi fisiologi (pH 7, 25 °C).

Tabel 1.2. Enzim yang terlibat pada siklus nitrogen dan reaksi yang dikatalis.

Proses/enzim	Reaksi		Nomor persamaan	$E^{0'}$ (V/e⁻)	Lokasi
Nitritifikasi					
Amonia monooksigenase	$NH_4^+ + O_2 + H^+ + 2e^-$	$\rightarrow NH_2OH + H_2O$	1	0.73	Transmembran
Hidroksilamin oxidoreduktase	$NH_2OH + H_2O$	$\rightarrow NO_2^- + 5H^+ + 4e-$	2	−0.06	Periplasma
Nitratifikasi/anammox					
Nitrit oksidoreduktase	$NO_2^- + H_2O$	$\rightarrow NO_3^- + 2H^+ + 2e-$	3	−0.43	Membran
Hidrazin hidrolase	$NH_4^+ + NO + 2H^+ + 3e^-$	$\rightarrow N_2H_4 + H_2O$	4	0.34	Anammoxosom
Hidrazin oxidoreduktase	N_2H_4	$\rightarrow N_2 + 4H^+ + 4e-$	5	−0.75	Anammoxosom

Proses/enzim	Reaksi		Nomor persamaan	$E^{0'}$ (V/e⁻)	Lokasi
Denitrification & reduksi nitrat disimilasi					
Nitrat reduktase	$NO_3^- + 2H^+ + 2e^-$	$\rightarrow NO_2^- + H_2O$	6	0.43	Membran, periplasma atau sitoplasma
Nitrit reduktase	$NO_2^- + 2H^+ + e^-$	$\rightarrow NO + H_2O$	7	0.34	Periplasma
Ntrogen oksida reduktase	$2NO + 2H^+ + 2e^-$	$\rightarrow N_2O + H_2O$	8	1.17	Transmembran
Dinitrogen oksida reduktase	$N_2O + 2H^+ + 2e^-$	$\rightarrow N_2 + H_2O$	9	1.36	Periplasma
Disimilasi nitrit reduktase	$NO_2^- + 8H^+ + 6e^-$	$\rightarrow NH_4^+ + 2H_2O$	10	0.75	*

*Penurunan aktifitas pada bagian dalam dan luar membran sitroplasma. Reaksi yang ditampilkan sebagai reaksi setengah reduksi oksidasi (redoks) dimana enzim itu sendiri berperan sebagai donor atau penerima elektron yang utama.

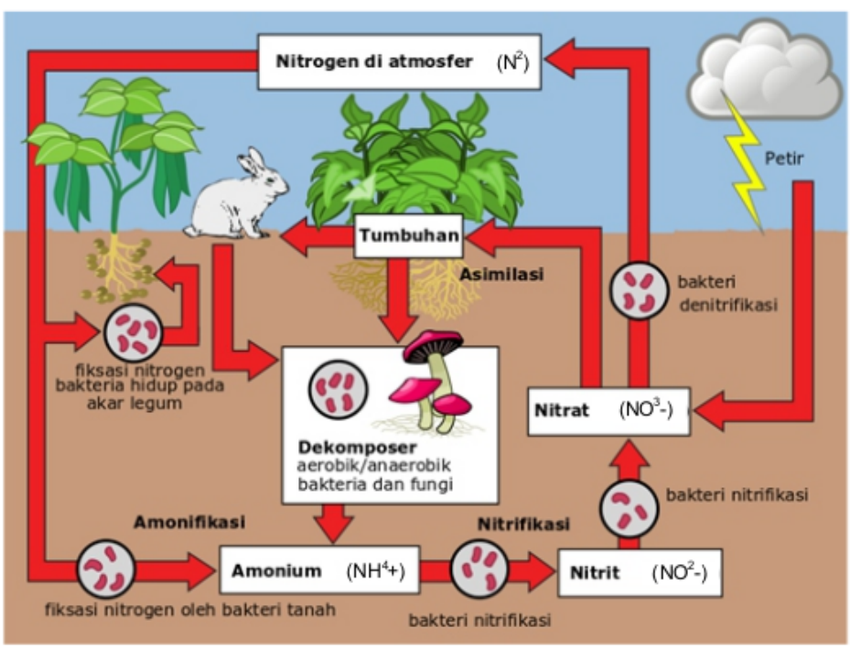
Pada awalnya, aplikasi utama mikrobiologi siklus-N adalah untuk memahami dan meningkatkan efisiensi pupuk dalam pertanian. Tidak sampai tahun 1960-an potensi nitrifier dan denitrifier untuk penghilangan unsur hara dari air limbah baru diketahui secara umum, dan penelitian diarahkan untuk meningkatkan penghilangan nitrogen dari air limbah. Pada tahun 1980-an, kontribusi nitrogen oksida di atmosfer terhadap penipisan ozon dan pemanasan global ditinjau kembali, dan peran nitrifikasi dan denitrifikasi dalam produksi senyawa-senyawa ini menjadi fokus penelitian siklus-N.

Pengetahuan tentang mikroba pada siklus nitrogen dan pemain utamanya masih jauh dari lengkap hingga penemuan spektakuler seperti *anaerobic ammonium oxidation* (anammox), oksidasi ammonium oleh *Crenarchaea* (AOA), interaksi antara kedua kelompok ini, reduksi nitrat menjadi gas *dinitrogen* oleh *foraminifera*, fototrof pengoksidasi-nitrit, *nitrit-dependent anaerobic methane oxidation* (N-DAMO), arkea hipertermofilik penghasil metana pengikat N_2, dan sekuensing genom dari beberapa organisme siklus-N, merupakan contoh bahwa ada keanekaragaman hayati yang sangat besar dan kemampuan metabolisme konversi nitrogen yang tersembunyi di dunia mikroba yang masih tersembunyi dan belum diketahui. Lebih lanjut, teknologi sekuens terbaru dan penyempurnaan metode molekuler menunjukkan bahwa sangat banyak rahasia sebahagian

besar keanekaragaman mikroba fungsional di lingkungan yang masih tersembunyi.

Di sisi lain peningkatan pembakaran bahan bakar fosil dan tingginya permintaan nitrogen di bidang pertanian dan industri menunjukkan bahwa umat manusia terus mengubah siklus N global pada tingkat tinggi. Sejumlah besar nitrogen antropogenik hilang ke lingkungan dan menyebabkan berbagai masalah, misalnya peningkatan kadar nitrat dalam air tawar dan peningkatan produksi oksida nitrat, yang dapat meningkatkan perubahan iklim global. Peningkatan pengetahuan tentang mikroba yang terlibat dalam transformasi nitrogen diperlukan untuk memahami dan akhirnya dapat menangkal efek negatif dari polusi nitrogen. Buku ini fokus pada salah satu tambahan terbaru pada siklus nitrogen yaitu oksidasi amonium secara anaerob (*anaerobic ammonium oxidation*/ anammox).

Sejak penemuannya pada tahun 1995, proses anammox berkembang dari siklus nitrogen biologis yang belum dieksplorasi menjadi pengetahuan yang terhimpun dalam berbagai jurnal penelitian dan buku teks. Dari penelitian yang ada telah menjadi jelas bahwa bakteri anammox menjadi pemain utama dalam siklus nitrogen global.

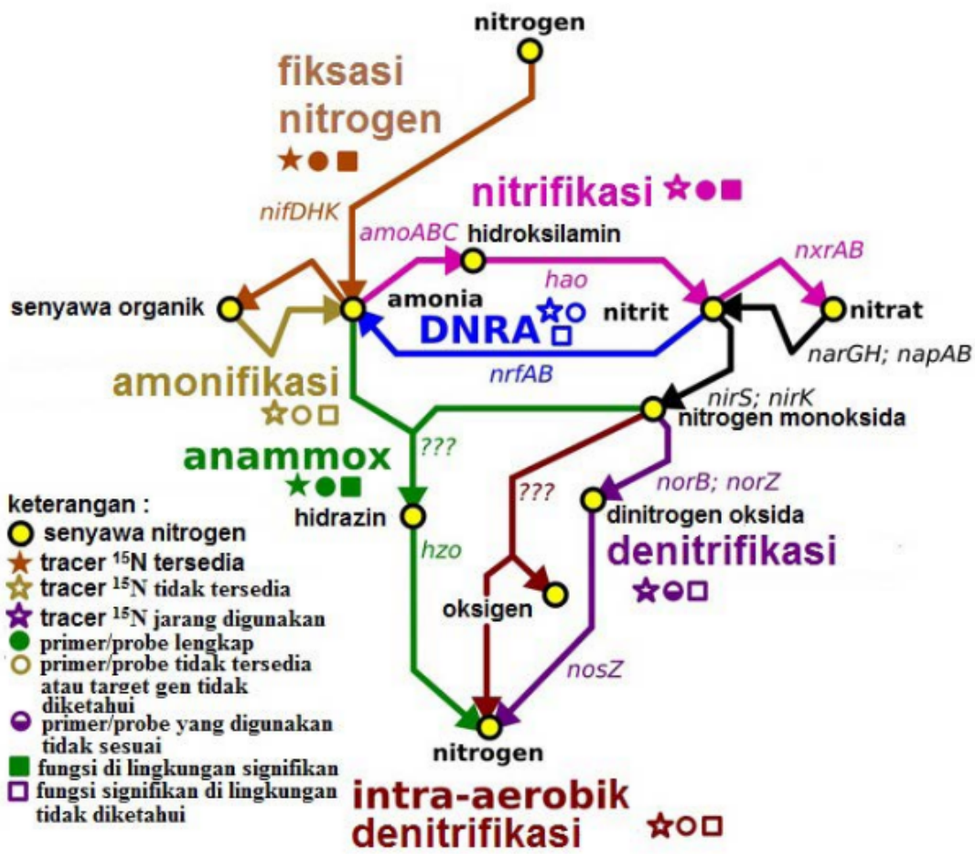


Gambar 1.1. Siklus nitrogen sederhana

Sumber : diadaptasi dari (Wikipedia, https://id.wikipedia.org 2019)

1.3. Transformasi Siklus Nitrogen Menjadi *Jaringan Nitrogen Network*

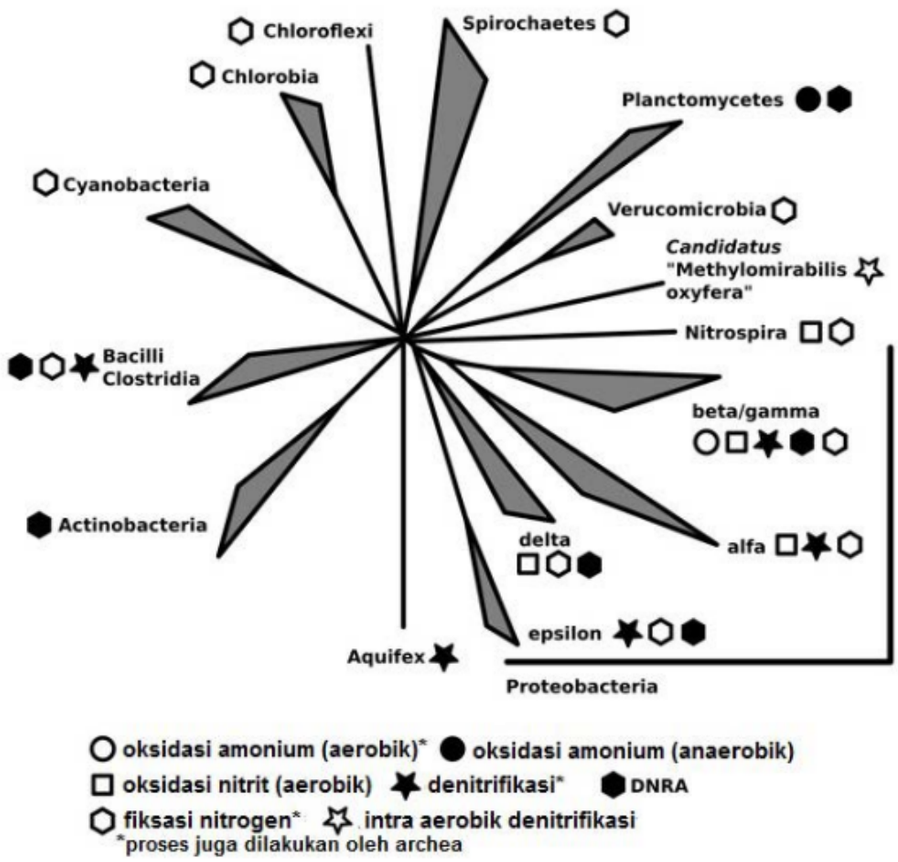
Siklus nitrogen (Gambar 1.1) terdiri dari proses perpindahan (transportasi) dan reaksi kimia; reaksi ini sebagian besar dikatalisis oleh bakteri. Selain untuk fiksasi nitrogen, bakteri melakukan reaksi ini agar mendapatkan energi untuk melakukan pertumbuhan secara *chemotrophic*. Ungkapan "siklus nitrogen" umumnya digunakan, tetapi jika bersama-sama dengan reaksi yang terjadi, maka akan membentuk "jaringan nitrogen" yang lebih rumit (Gambar 1.2). Untuk mendapatkan pengetahuan yang lebih dalam tentang jaringan nitrogen ini, penting untuk menggabungkan dua pendekatan eksperimental yang akan saling melengkapi. Pendekatan pertama, pelabelan ^{15}N, yang dapat memberikan informasi tentang proses pada tingkat individu.



Gambar 1.2. Pemahaman terkini tentang jaringan biogeokimia nitrogen.

Sumber : modifikasi dari (Hanke and Strous 2010)

Meskipun pendekatan lain telah digunakan untuk tujuan ini di masa lalu (misalnya penggunaan inhibitor seperti asetilena) pelabelan ^{15}N adalah satu-satunya yang masih berguna dalam konteks memberikan gambaran kompleksitas secara lengkap seperti pada Gambar 1.2. Pendekatan komplementer dan independen kedua adalah ekologi molekuler, yang memberikan informasi tentang keberadaan dan aktivitas bakteri dan gen yang terkait. Karena banyak proses dilakukan oleh bakteri yang tidak terkait, sehingga umumnya bergantung pada deteksi dan kuantifikasi gen fungsional saja (Gambar 1.3). Kemajuan teknis dalam bidang ini, misalnya penerapan teknologi pelacak baru dan pencarian terus menerus terhadap penanda (*marker*) gen fungsional, sangatlah penting.



Gambar 1.3. Pohon evolusi filum bakteri yang berkaitan dengan siklus nitrogen.

Sumber : (Hanke and Strous, 2010)

1.4. Fiksasi Nitrogen Dan Produksi Primer

Semua kehidupan tergantung pada unsur nitrogen karena merupakan komponen penting dari asam amino, asam nukleat, gula amino, dll. Gas dinitrogen (N_2) di atmosfer adalah reservoir nitrogen terbesar yang tersedia untuk kehidupan di bumi. Gas dinitrogen diakses oleh mikroorganisme dalam suatu reaksi yang dikenal sebagai fiksasi nitrogen. Dalam reaksi ini dinitrogen direduksi menjadi amonia (NH_3) oleh enzim nitrogenase (*nifDHK*). Meskipun reaksinya eksergonik, energi aktivasi reaksi ini sangat tinggi dan membutuhkan 16 molekul ATP per N_2 yang difiksasi. Dalam kondisi terdapat oksigen (O_2), akan sangat sulit untuk mengikat nitrogen karena enzim nitrogenase akan rusak oleh oksigen. Oleh karena itu, selama sejarah geologis bumi, kesulitan mengikat nitrogen pada atmosfer menjadi salah satu faktor yang menghambat produksi primer nitrogen.

Hanya sebagian kecil spesies bakteri yang diketahui mampu memfiksasi nitrogen dan memiliki gen struktural untuk nitrogenase. Organisme pengikat nitrogen yang penting di lingkungan adalah tanaman simbion seperti *Rhizobium* dan organisme hidup bebas (*free-living organism*) seperti *Cyanobacteria Trichodesmium*. *Nitrogenase* tersebar luas secara filogenetik, misalnya banyak spesies yang tidak terkait evolusi telah memiliki gen untuk nitrogenase, walaupun sedikit adanya bukti terjadinya transfer gen lateral (*lateral gene transfer*). Oleh karena itu, gen *nifH* digunakan sebagai penanda fungsional untuk mengidentifikasi bakteri pengikat nitrogen di alam, terlepas dari filogeni organisme seperti yang didefinisikan oleh gen ribosom 16S. Untuk fiksasi nitrogen, studi pelacak (*tracer study*) dengan pelabelan N_2 dengan label ^{15}N dan ekologi molekuler (yang menargetkan NifH) adalah metode yang umum digunakan. Secara teknis, fiksasi *nitrogen* dilakukan oleh proses *Haber Bosch*-reaksi kimia yang sama dengan fiksasi nitrogen.

Penggunaan pupuk yang luas pada pertanian menyebabkan konsentrasi nitrat (NO_3^-) yang tinggi (ratusan mikrometer) pada perairan air tawar dan air permukaan pesisir pantai. Pada area ini, nitrat telah menggantikan dinitrogen sebagai sumber utama nitrogen yang menopang pertumbuhan bakteri dan tanaman. Hal ini nantinya dapat menyebakan eutrofikasi, hilangnya keanekaragaman hayati dan tingkat produksi primer yang lebih tinggi (fiksasi karbon dioksida dari atmosfer).

Tidak mungkin bahwa proses pemupukan menyebabkan penghilangan karbon dioksida dari atmosfer, karena air permukaan

tidak mengandung penyerap jangka panjang untuk karbon dioksida. Kelebihan biomasa yang dihasilkan akan dikonsumsi dengan cepat dan didaur ulang menjadi karbon dioksida. Studi jangka panjang yang membahas masalah ini telah melaporkan peningkatan pelepasan karbon dioksida dengan meningkatkan mineralisasi bahan organik yang dapat dihilangkan dengan adanya nitrat. Satu-satunya penyerap biologis jangka panjang untuk karbon dioksida atmosfer adalah pompa biologis yang membutuhkan penyerap biomassa ke laut dalam dan penyimpanan karbon dalam sedimen laut dalam.

Oleh karena itu, deposisi amonia ke laut lebih penting sebagai umpan balik negatif yang mungkin terhadap pemanasan global daripada fertilisasi. Namun, meskipun pada lautan bebas, efek iklim dapat menguntungkan yang disebabkan oleh peningkatan produksi primer kemungkinan akan diimbangi dengan peningkatan produksi dinitrogen oksida.

Pada perairan permukaan, kemungkinan besar ferlitisasi meningkatkan pemanasan global dengan merangsang produksi metana secara biologis dan produksi dinitrogen oksida. Peningkatan produksi primer menyebabkan lebih banyak penumpukan biomassa di sedimen dangkal di mana sebagian besar biomassa terdegradasi secara anaerob, yang meningkatkan produksi metana. Karena sedimen dangkal merupakan sumber utama emisi metana ke atmosfer (*mis. wetland, sawah*), kemungkinan sebagian karbon dioksida yang dihilangkan dari atmosfer melalui pemupukan dikembalikan ke atmosfer dalam bentuk metana. Sebagai gas rumah kaca, metana jauh lebih kuat daripada karbon dioksida.

Nitrogen masuk ke dalam biomassa oleh produsen primer melalui proses rantai makanan. Pada setiap tingkat trofik rantai makanan, sebagian besar biomassa digunakan sebagai sumber energi; gula, protein dan lipid sebagian besar dioksidasi menjadi karbon dioksida dan hanya sebagian kecil yang digunakan untuk pertumbuhan. Oleh karena itu, sebagian besar nitrogen dalam biomassa dibebaskan sebagai amonia. Pelepasan amonia ini dikenal sebagai amonifikasi. Kemungkinan, banyak organisme yang terlibat dalam proses ini, tapi jarang diselidiki secara eksperimental. Tingkat amonifikasi umumnya disimpulkan dari stoikiometri Redfield.

1.5. Nitrifikasi

Amonia dapat dioksidasi menjadi nitrat dengan keberadaan oksigen. Proses aerobik ini dikenal sebagai nitrifikasi dan terdiri dari dua langkah yang dilakukan oleh dua kelompok bakteri *Chemolithoautotroph* yang berbeda: oksidator amonium mengoksidasi amonia menjadi nitrit dan oksidator nitrit mengoksidasi nitrit menjadi nitrat. *Ammonia oxidizer* (pengoksidasi amonia) di lingkungan termasuk dalam *Beta-Proteobakteria* (contoh : *Nitrosomonas europaea*) dan *Gamma-Proteobacteria* (contoh : *Nitrosococcus oceani*) dan *Crenarchaea* (contoh : *Nitrosopumilus maritimus*). Saat ini, lima kelompok oksidator nitrit (Gambar 3) telah diidentifikasi, semuanya berafiliasi dengan filum bakteri yang berbeda.

Secara biokimia, amonia diaktivasi oleh enzim kompleks *ammonia monooxygenase*. Gen yang mengkode kompleks ini adalah *amoABC* dan mereka berfungsi sebagai penanda genetik fungsional untuk menilai keanekaragaman dan kelimpahan oksidator amonia. *Hydroxylamine* dioksidasi menjadi nitrit oleh enzim *octaheme hydroxylamine oxidoreductase*, disandikan oleh gen hao. Namun, gen ini tidak ada dalam genom pengoksidasi amonia *crenarchaeal*. Oksidasi nitrit dikatalisis oleh enzim kompleks nitrit-nitrat *oksidoreduktase*, anggota superfamili *molybdopterin oksidoreduktase*. Gen-gen tersebut dikenal sebagai nxrAB tetapi mereka homolog dengan gen-gen yang digunakan oleh denitrifier untuk melakukan reaksi sebaliknya (contoh : NarGH).

Pupuk umumnya digunakan dalam bentuk amonium. Amonium bermuatan positif dan berikatan dengan tanah liat (bermuatan negatif). Setelah nitrifier mengubah amonium menjadi nitrat (bermuatan negatif), nitrat terdesorbsi dari tanah liat dan siap terbawa ke air permukaan atau air tanah. Untuk alasan ini, inhibitor nitrifikasi sering ditambahkan ke campuran pupuk tetapi teknik ini hanya efektif sebagian.

Nitrifikasi juga merupakan sumber utama emisi dinitrogen oksida (N_2O). Meskipun dinitrogen oksida bukan merupakan perantara dari nitrifikasi, dinitrogen oksida masih diproduksi oleh oksidator amonia, baik sebagai produk sampingan dari *hidroksilamin oksidoreduktase* atau dengan reduksi nitrit yang dihasilkan ("nitrifier-denitrifikasi") oleh enzim denitrifikasi yang diekspresikan oleh oksidator amonia pada kondisi kadar oksigen rendah. Aplikasi pelacak ^{15}N dan penanda gen molekuler sudah digunakan untuk proses nitrifikasi.

1.6. Denitrifikasi

Proses pertama yang mendaur ulang nitrat menjadi gas dinitrogen dikenal sebagai denitrifikasi atau "respirasi nitrat". Istilah terakhir dihasilkan dari fakta bahwa nitrat, disamping oksigen berfungsi sebagai akseptor elektron terakhir. Selama denitrifikasi, nitrat (NO_3^-) direduksi melalui nitrit (NO_2^-), nitrat oksida (NO), dan dinitrogen oksida (N_2O) menjadi dinitrogen (N_2). Denitrifikasi umumnya terjadi tanpa oksigen tetapi kadang-kadang dapat terjadi bahkan ketika oksigen ada.

Denitrifikasi dilakukan oleh banyak spesies yang berbeda. Denitrifier berafiliasi dengan *Proteobacteria* (contoh : *Pseudomonas, Thauerea*) tetapi denitrifier yang penting di lingkungan belum ditemukan. Tahapan pertama denitifikasi adalah reduksi nitrat menjadi nitrit, yang dikatalisis oleh enzim kompleks nitrat reduktase yang dikodekan oleh narGH atau napAB. Langkah selanjutnya, reduksi nitrit menjadi nitrit oksida, dikatalisis oleh enzim nitrit reduktase. Nitrit reduktase berada dalam dua bentuk, enzim tipe *multicopper oksidase* yang dikodekan oleh nirK atau aniA dan enzim heme cd yang dikodekan oleh nirS. Pengurangan dua molekul oksida nitrat menjadi oksida nitrat dikatalisis oleh nitrat oksida reduktase yang dikodekan oleh norB atau norZ. Enzim ini adalah bagian dari famili heme/ tembaga oksigen reduktase. Dinitrogen oksida direduksi menjadi dinitrogen oleh tembaga enzim dinitrogen oksida reduktase, yang dikodekan oleh nosZ. nirK, nirS dan nosZ yang paling sering digunakan sebagai penanda gen fungsional. Namun sekuensing seluruh genom memberikan bukti bahwa dengan primer yang saat ini digunakan sebagian besar dari gen fungsional ini dapat diabaikan di lingkungan.

Baru-baru ini, dilaporkan bahwa denitrifikasi juga dapat berlangsung melalui jalur yang berbeda. Dalam jalur ini, dilakukan oleh bakteri *Candidatus "Methylomirabilis oxyfera"*, nitrat pertama kali direduksi menjadi nitrat oksida seperti dijelaskan di atas. Selanjutnya, dua molekul oksida nitrat (NO) dipecah menjadi dinitrogen (N_2) dan oksigen (O_2). Oksigen kemudian dapat direspirasi secara aerobik atau digunakan dalam reaksi monooksigenasi untuk mengaktifkan hidrokarbon seperti metana. Tidak diketahui enzim dan gen mana yang bertanggung jawab atas reaksi pemutusan ini. Juga tidak diketahui seberapa penting reaksi ini di alam. Dengan semua metode pelacak (*tracer*) saat ini, jalur ini tidak dapat dibedakan dari denitrifikasi "normal". Implikasi menarik dari penemuan jalur ini adalah emisi metana yang dihasilkan dari kegiatan pemupukan dapat kemungkinan

mengendalikan jalur ini.

Bersama dengan nitrifikasi, denitrifikasi adalah sumber penting dari emisi dinitrogen oksida ke atmosfer. Dalam beberapa kondisi, denitrifikasi berlangsung tidak sempurna dan dinitrogen oksida tidak direduksi lebih lanjut menjadi dinitrogen. Kondisi kimia atau biologis yang mempengaruhi produksi oksida nitrat diteliti secara aktif tetapi sejauh ini tidak ada hubungan sebab akibat yang jelas.

1.7. Anammox

Proses kedua yang mendaur ulang nitrat kembali menjadi gas dinitrogen dikenal sebagai oksidasi amonium anaerob (anammox), penemuan ini relatif baru. Dalam proses ini, amonia dan nitrit digabungkan menjadi dinitrogen. Sejauh ini, anammox dilakukan oleh satu kelompok bakteri monofiletik yang termasuk dalam filum *Planctomycetes*.

Jalur tersebut kemungkinan berlangsung melalui nitrit oksida dan hidrazin (N_2H_4) dan dihambat oleh oksigen. Sebagai contoh, hidrazin diduga dioksidasi oleh homolog *hidroksilamin oksidoreduktase* yang dikodekan oleh hzo. Sifat umum dari bakteri anammox adalah bahwa bakteri anammox juga dapat mengurangi nitrat menjadi amonia (reduksi nitrat disimilasi). Karena alasan ini, mungkin sulit dalam *tracer study* untuk membedakan keseluruhan kegiatan bakteri anammox dari denitrifikasi.

Namun, karena anammox dilakukan oleh hanya satu kelompok bakteri dan bakteri ini memiliki biomarker lipid yang unik dalam bentuk *ladderanes*. Bakteri anammox dapat dideteksi di lingkungan dengan relatif mudah dengan menargetkan gen 16S dan *ladderanes*. Saat ini, diperkirakan bahwa di lingkungan laut sekitar 50% dari dinitrogen diproduksi oleh bakteri anammox dari genus *Scalindua*.

1.8. Reduksi Nitrat *Dissimilasi* Menjadi Amonia

Denitrifikasi dan anammox menutup siklus nitrogen dengan mendaur ulang nitrat menjadi dinitrogen, reduksi nitrat disimilasi menutup siklus dengan mendaur ulang nitrat menjadi amonia. Berbeda dengan denitrifikasi dan anammox, proses disimilasi tidak menghilangkan nitrogen dari habitat tetapi tetap tersedia untuk produsen primer. Seperti denitrifikasi dan anammox, ini adalah bentuk respirasi anaerob, dimana nitrat digunakan sebagai akseptor elektron, bukan

oksigen. Banyak bakteri yang berbeda yang mampu melakukan proses ini, tetapi *Proteobacteria* telah banyak diteliti yang berperan dalam proses ini; pereduksi nitrat disimilasi yang paling dikenal adalah *Escherichia coli* dan bakteri *giant sulfur* seperti *Thioploca.*

Langkah pertama jalur ini berbagi dengan denitrifikasi, karena sama–sama mereduksi nitrat menjadi nitrit oleh kompleks enzim *molybdopterin*. Selanjutnya reduksi lima elektron nitrit menjadi amonia dilakukan oleh *pentaheme nitrit reduktase* yang dikodekan oleh nrfAB. Baru-baru ini, ditemukan bahwa enzim *octaheme* secara evolusioner terkait dengan *hidroksilamin oksidoreduktase* yang bersifat reversibel dan juga dapat mengurangi nitrit menjadi amonia. Dengan demikian, penanda gen fungsional untuk proses ini masih dalam proses penyelidikan. Laju reduksi nitrat *dissimilasi* dapat diukur dalam ekosistem alami dengan *tracer study* tetapi ini jarang dilakukan dan hal yang sama berlaku untuk penggunaan penanda gen fungsional. Oleh karena itu, tidak diketahui seberapa penting proses ini dibandingkan dengan denitrifikasi. Tidak diketahui juga seberapa besar proses ini berkontribusi terhadap emisi dinitrogen oksida.

BAB II
SEJARAH BAKTERI DAN REAKSI ANAMMOX

2.1. Sejarah Bakteri Anammox

Amonia dapat dioksidasi oleh mikroorganisme dalam kondisi aerobik (terdapat oksigen) dan anaerobik (tanpa oksigen bebas/ O_2 maupun oksigen terikat pada molekul). Oksidasi amonia secara aerobik oleh bakteri pengoksidasi amonia (*amonia oxidation bacteria*/AOB) telah ditemukan sebelum abad ke-19. Sampai akhir abad ke-20 pendapat umum memahami bahwa amonium merupakan molekul inert dalam kondisi anoksik. Aktivasi oleh oksigen diasumsikan diperlukan untuk metabolisme pada bakteri nitrifikasi. Sedangkan oksidasi amonium secara anaerobik (*anaerobic amonium oxidation*/ anammox) oleh bakteri anammox ditemukan pada awal tahun 1990-an. Penemuan proses anammox menunjukkan bahwa terdapat jalur (*pathway*) lain dalam konversi amonia menjadi gas nitrogen selain melalui jalur konvensional nitrifikasi-denitrifikasi.

$$NH_4^+ + 1.5O_2 \rightarrow NO_2^- + H_2O + 2H^+ \quad (\Delta G = -235\ kJ/mol) \qquad [2.1]$$

$$NH_4^+ + NO_2^- \rightarrow N_2 + 2H_2O \quad (\Delta G = -357\ kJ/mol) \qquad [2.2]$$

Sebelum tahun 1990 sudah ada beberapa postulat atau asumsi yang memperkirakan keberadaan oksidasi amonia dalam kondisi anaerobik. Peneliti yang pertama memprediksi oksidasi amonia di lautan adalah Hamm dan Thomson. Hilangnya amonium yang tidak dapat dijelaskan dalam kondisi anoksik telah dilaporkan satu dekade sebelumnya oleh Richards tahun 1965 dalam studi keseimbangan nitrogen pada *fjords* anoksik (lekukan garis pantai, biasanya panjang dan sempit dengan sisi atau tebing yang curam, seperti teluk atau lengan kecil, yang terbentuk oleh gletser). Richards mengemukakan oksidasi amonia dengan nitrat dalam kondisi anoksik (kondisi tanpa ada oksigen, tapi terdapat molekul oksigen terikat dalam bentuk molekul seperti NO_3 dan NO_2). Akan tetapi karena kekurangan bukti akan keberadaan bakteri anammox, studi ini kurang mendapatkan perhatian. Ahli biokimia Austria, Broda, tahun 1977 memprediksi keberadaan mikroorganisme yang mampu mengoksidasi amonium dengan nitrit atau nitrat sebagai akseptor elektron. Kemudian, Broda melakukan perhitungan termodinamika dan memprediksi bahwa

dua jenis litotrof (mikroorganisme yang menggunakan senyawa anorganik sebagai donor elektron untuk mendapatkan energi untuk pertumbuhan) hilang di alam. Broda berasumsi bahwa litotrof ini dapat mengoksidasi amonia menjadi gas nitrogen menggunakan nitrat atau nitrit sebagai penerima elektron dalam kondisi anaerobik. Tiga puluh tahun kemudian, pada tahun 1995, sebuah pengamatan serupa di sebuah bioreaktor denitrifikasi di Delft, Belanda mengamati kehilangan amonia dengan penambahan nitrit pada reaktor *pilot plant fluidized-bed reactor* (FBR) dalam kondisi anaerobik pada pengolahan air limbah pabrik *yeast* di Gist-Brocades (Belanda) sehingga diprakarsailah pencarian mikroorganisme yang terlibat dalam proses penghilangan ammonium tersebut (Mulder, et al. 1995). Selain itu Mulder juga mengamati terbentuknya gas nitrogen pada reaktor *pilot plant* tersebut. Istilah "anammox" pertama kali dikemukakan oleh Arnold Mulder. Van De Gaaf, et al. (1995) menggunakan label $^{15}NH_4^+$ dan $^{14}NO_2^-$ sebagai *tracer* pada FBR dan mendapatkan bahwa gas $^{14\text{-}15}N_2$ merupakan produk akhir yang dominan. Berdasarkan hasil ekperimen tersebut disimpulkan bahwa bakteri anammox menggunakan nitrit sebagai penerima elektron dalam reaksi anammox. Strous, et al. (1998) menggunakan pendekatan kesetimbangan masa (*mass balance*) untuk menghitung persamaan stoikiometri proses anammox, yaitu :

$$NH_4^+ + 1{,}32NO_2^- + 0{,}066HCO_3^- + 0{,}13H^+ \rightarrow 1{,}02N_2 + 0{,}26NO_3^- + 2{,}03H_2O + 0{,}066CH_2O_{0,5}N_{0,15} \quad [2.3]$$

Deskripsi pertama bakteri anammox dipublikasikan tahun 1999, ketika Jetten, et al. (1999)mampu memurnikan sel-sel anammox secara fisik dari kultur pengayaan di laboratorium. Sel-sel anammox yang dimurnikan mengkonversi amonium dan nitrit menjadi gas dinitrogen tanpa adanya oksigen dan sumber karbon seluler hanya berasal dari karbon dioksida (CO_2). Bakteri anammox merupakan yang pertama berhasil diidentifikasi, salah satu dari litotrof yang hilang yang sudah diprediksi oleh Broda pada tahun 1977, diidentifikasi sebagai bagian dari filum *Planctomycetes* baru dan diberi nama *Candidatus "Brocadia anammoxidans"*, karena tidak bisa dimurnikan menurut standar mikrobiologi klasik, maka ia diberi status *Candidatus*. Sel-sel anammox menampilkan arsitektur sel yang kompleks dengan sebuah kompartemen sentral, yang berhubungan dengan anggota dari filum *Planctomycetes* lainnya, yang secara filogenetik terkait dengan bakteri anammox. Meskipun pengayaan dan/atau deteksi mikroorganisme

yang mampu melakukan pertumbuhan anaerob pada amonium tidak berhasil dalam waktu yang lama, saat ini banyak kelompok penelitian sedang mempelajari berbagai aspek dari proses anammox. Sejauh ini, tujuh genus anammox telah dideskripsikan, dengan identitas urutan gen 16S rRNA dari spesies berkisar antara 87 dan 99%. Meskipun jarak filogenetiknya relatif besar, semua organisme anammox termasuk dalam kelompok (orde) monofiletik yang sama bernama *Brocadiales* dan terkait dengan ordo *Planctomycetales*. Cabang *Brocadiales* jauh berada di dalam filum *Planctomycetes*. Empat *Candidatus* genus anammox yang telah diperkaya dari lumpur aktif yaitu : *Kuenenia*, *Brocadia*, *Anammoxoglobus* dan *Jettenia*. Genus anammox kelima, *Scalindua* terdeteksi di habitat alami, terutama di sedimen laut dan zona minimum oksigen (*oxygen minimum zones*/OMZ). Dan yang terbaru adalah genus *Brasilis* dan *Anammoximicrobium.*

Sampai saat ini sudah dua puluh empat (24) spesies bakteri anammox diidentifikasi dalam orde *Brocadiales* (Tabel 2.1). Di Indonesia sudah dieksplorasi dan diidentifikasi keberadaan bakteri anammox untuk pertama kalinya yaitu di Danau Talago, Kabupaten Tanah Datar, Indonesia yang mengalami eutrofikasi (Gambar 2.2). Struktur sel dan kondisi kultur bakteri anammox saat ini juga sudah dapat diketahui lebih dalam. Sehingga bakteri ini sudah dikembangkan dan diaplikasikan untuk mengolah berbagai macam air limbah yang mengandung kadar ammonia tinggi baik dalam skala *pilot plant* maupun skala besar (*full-scale*).

Tabel 2.1. Spesies anammox yang telah ditemukan

Genus	Species	Sumber
Brocadia	*Ca. Brocadia anammoxidans*	*Denitrifying fluidized bed reactor*
	Ca. Brocadia fulgida	SBR
	Ca. Brocadia sinica	Up-flow fixed-bed biofilm reactor
	Ca. Brocadia brasiliensis	IPAL, Brazil
	Ca. Brocadia caroliniensis	Bioreaktor
	Ca. Brocadia sapporoensis	MBR
Kuenenia	*Ca. Kuenenia stuttgartiensis*	*Biofilm trickling filter*
Scalindua	*Ca. Scalindua brodae*	RBC
	Ca. Scalindua wagneri	RBC
	Ca. Scalindua sinooifield	Reservoir minyak bumi
	Ca. Scalindua zhenghei	Laut Cina Selatan
	Ca. Scalindua richardsii	Laut Hitam
	Ca. Scalindua sorokinii	Laut Hitam
	Ca. Scalindua arabica	Laut arab
	Ca. Scalindua marina	Gullmar Fjord, Swedia
	Ca. Scalindua pacifica	Laut Bohai, Cina
	Ca. Scalindua profunda	*Fjord,* swedia
Brasilis	*Ca. Brasilis concordiensis*	Bioreaktor (laboratorium)
Jettenia	*Ca. Jettenia asiatica*	*Up-flow granular sludge reactor*
	Ca. Jettenia moscovienalis	Digesti lumpur
	Ca. Jettenia caeni	MBR
Anammoxoglobus	*Ca. Anammoxoglobus propionicus*	SBR
Anamm oximicrobium	*Ca. Anammoxoglobus sulfate*	RBC
	Ca. Anammoximicrobium moscowii	Sungai di Moskow, Rusia

Gambar 2.1. Danau Talago, Kab. Tanah Datar, Indonesia. Lokasi eksplorasi dan identifikasi bakteri anammox pertama kali di Indonesia.

2.2. Pertumbuhan dan Metabolisme Anammox

Bakteri anammox adalah adalah bakteri dengan pertumbuhan lambat, sel-sel berlipat ganda hanya sekali dalam 11-20 hari. Di alam, mikroorganisme ini berkembang pada konsentrasi substrat yang sangat rendah. Bakteri anammox berlangsung dalam kondisi anaerobik dan metabolismenya terhambat secara reversibel pada konsentrasi oksigen di atas 2 μM. Teknik isolasi mikrobiologis saat ini tidak dirancang untuk menangani mikroorganisme yang memiliki tingkat pertumbuhan lambat. *Sequencing batch reactor* (SBR) sudah diaplikasikan dan dioptimalkan untuk melakukan pengayaan (*enrichment*) dan analisis kuantitatif bakteri anammox. Teknik SBR memastikan operasi jangka panjang yang dapat diandalkan (> 1 tahun) dalam kondisi stabil dan kondisi substrat terbatas dengan retensi biomassa yang efisien (kurang dari 10% biomassa yang tumbuh, terbuang/ keluar dari reaktor) dan distribusi substrat yang homogen, produk, dan agregat biomassa. Pengayaan yang stabil diperoleh setelah periode 90-200 hari dari SBR yang di bilas dengan gas nitrogen atau argon untuk menghilangkan oksigen dan diinokulasi dengan sampel dari lingkungan (lumpur air limbah, sedimen sungai atau laut). Reaktor diberi suplai makanan dengan amonium, nitrit, bikarbonat

dan nitrat. Nitrat digunakan untuk menghindari potensi redoks yang rendah. Konsentrasi nitrit dan amonium pada inlet secara bertahap ditingkatkan, sehingga konsentrasinya dalam reaktor dipertahankan dalam kisaran mikromolar oleh aktivitas mikroba. Selama pengayaan 90-200 hari, biomassa dalam SBR perlahan-lahan berubah menjadi merah (protein heme membentuk sekitar 20% dari massa protein seluler) dan bakteri anammox meningkat hingga 70% dari populasi. Kultur pengayaan dengan SBR menghasilkan pertumbuhan biomassa anammox sebagai agregat biofilm. Baru-baru ini *Membrane Bioreactor* (MBR) juga sukses digunakan untuk pembiakan bakteri anammox sebagai suspensi sel tunggal. Di bawah mikroskop, bakteri anammox diamati berbentuk sel *coccoid* kecil dengan diameter sekitar 800 nm. Dalam reaktor skala laboratorium yang beroperasi dalam kondisi *steady state*, amonium, nitrit, dan bikarbonat dikonversi sesuai dengan persamaan 2.3 diatas.

Bakteri anammox memperoleh energi untuk pertumbuhannya dari konversi *chemolithotrophic* amonium dan nitrit 1:1 menjadi N_2 ($\Delta G^{o'}$= -275 kJ/mol NH_4^+). Bikarbonat berfungsi sebagai satu-satunya sumber karbon untuk sintesis biomassa sel ($CH_2O_{0.5}N_{0.15}$), untuk membuat organisme autotrof. Fiksasi karbon sel melibatkan jalur asetil-KoA (Strous et al., 2006). Berdasarkan pembentukan biomassa dan nitrat dalam reaktor SBR, tempat berlangsungnya proses anammox dan pada perhitungan stoikiometrik dihipotesiskan bahwa pengurangan ekuivalen pada pengurangan CO_2 berasal dari oksidasi nitrit menjadi nitrat. Bakteri anammox ditandai oleh afinitasnya yang tinggi terhadap substratnya. Amonium dan nitrit digunakan hingga konsentrasi yang sangat rendah (Ks <5 μM). Namun, aktivitas metabolisme relatif rendah (15-80 μmol N_2 terbentuk per gram berat kering sel per menit), yang dapat menjelaskan tingkat pertumbuhan yang rendah sampai batas tertentu.

Penelitian terbaru mengungkapkan bahwa bakteri anammox mungkin bukan spesialis *chemolithoautrophic* yang ketat, tetapi dapat mendukung cara hidup yang lebih fleksibel. Di samping amonium, bakteri anammox mampu menggunakan besi II (Fe^{2+}) dan berbagai senyawa organik, termasuk asam karboksilat (format, asetat, propionat, metilamin), sebagai donor elektron. Pengayaan *Ca. Anammoxoglobus propionicus*, *Ca. Anammoxoglobus sulfate* dan *Ca. Brocadia fulgida* menimbulkan pertanyaan menarik mengenai diferensiasi *niche* dan mekanisme adaptasi spesifik spesies anammox. Kedua spesies dibiakkan dari lumpur pengolahan air limbah dengan

mengoperasikan dua SBR secara paralel dalam kondisi yang sama kecuali untuk jenis penambahan senyawa karbon yang digunakan. *Ca. B. fulgida* secara khusus menjadi spesies anammox dominan ketika reaktor diberikan suplai dengan asetat, sedangkan *Ca. A. propionicus* dominan di SBR yang diberi suplai makanan dengan propionat. Meskipun kedua spesies dapat mengoksidasi asetat dan propionat, perbandingan menunjukkan bahwa laju spesifik oksidasi asetat lebih tinggi pada *Ca. B. fulgida*, sedangkan *Ca. A. propionicus* lebih menyukai propionat. Perbedaan ini tampaknya memberikan organisme tersebut keunggulan kompetitif mereka. Hebatnya, semua mikroorganisme pereduksi nitrat atau nitrit lainnya dalam inokulum kalah bersaing yang menunjukkan bahwa keberadaan amonium menghasilkan sel-sel anammox dengan keunggulan selektif yang kuat.

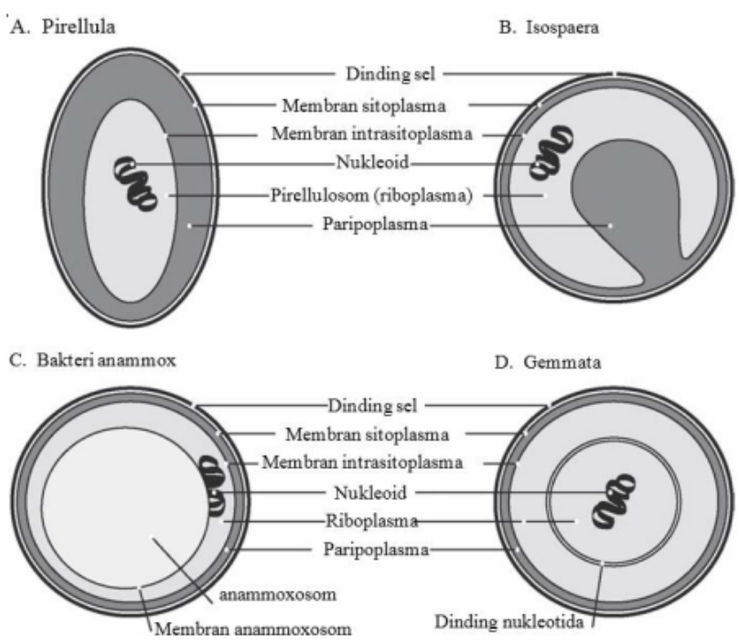
Selain nitrit, bakteri anammox juga menggunakan Fe^{3+}, mangan oksida dan nitrat sebagai akseptor elektron dalam metabolisme mereka. Penggunaan nitrat sangat menarik seperti dalam konvensional denitrifikasi, nitrat diubah menjadi gas dinitrogen tetapi melalui rute yang sangat berbeda. Nitrat direduksi menjadi nitrit dan amonium, yang bergabung membentuk N_2 oleh mekanisme anammox dan dengan demikian bakteri anammox mampu menyamarkan diri sebagai denitrifier.

2.3. Biologi Sel Bakteri Anammox

Sebagian besar sel prokariotik memiliki struktur yang sama, terdiri dari dinding sel, membran sitoplasma dan sitoplasma. Untuk tujuan taksonomi, sel bakteri dapat dibagi menjadi dua kelas berdasarkan perbedaan dalam struktur kapsul sel: Gram-negatif dan Gram-positif. Dinding sel bakteri Gram-positif terdiri dari membran sitoplasma dan lapisan peptidoglikan yang tebal dan sangat saling berhubungan. Dinding sel gram-negatif terdiri dari membran sitoplasma, ruang periplasmik, yang diisi oleh gel peptidoglikan yang kurang saling berhubungan, dan membran luar. Membran luar adalah membran ganda (bilayer) yang terdiri dari fosfolipid (di sisi periplasmik) dan lipopolisakarida (di luar). Meskipun organel bermembran adalah salah satu ciri yang menunjukkan sel eukariotik, ada juga prokariotik yang mengandung sistem membran intraseluler.

Planctomycetes yang dalam kultur murni terbukti memiliki kompartementalisasi (*compartmentalization*) yang lebih atau kurang kompleks, melibatkan membran intrasitoplasma (*intracytoplasmic*) tunggal yang mencirikan kompartemen sel utama (Gambar 2.2).

Sebagai kesimpulan dari pengamatan mikroskop elektron, analisis kimia, sekuensing genom dan resistensi terhadap antibiotik β-laktam (seperti penisilin dan sefalosporin yang menghambat sintesis dinding sel) dan antibiotik lain yang menargetkan dinding sel, *Planctomycetes* tidak memiliki polimer peptidoglikan, sebagaimana dinding sel bakteri umumnya. Lebih lanjut, dinding selnya tidak dikelilingi oleh satu membran di bagian luar dan satu membran di sisi dalam dinding sel seperti halnya bakteri gram-negatif. Sebaliknya, ada dua membran di sisi dalam dan tidak ada membran di sisi luar dinding sel, yang sebagian besar terdiri dari protein. Bagian terluar dari kedua membran ini berada dekat dengan dinding sel. Membran ini telah ditetapkan sebagai membran sitoplasma berdasarkan deteksi RNA secara langsung pada sisi dalamnya dengan pelabelan *immunogold*. Membran yang lainnya, bagian paling dalam, merupakan membran yang didefinisikan sebagai membran *intracytoplasmic* yang berada pada bagian dalam membran sitoplasma. Kompartemen sitoplasma terluar sel (antara dua membran ini) dinamakan *"paryphoplasma"*. Lokasi *paryphoplasma* adalah sama dengan periplasma gram-negatif, tetapi paryphoplasma berada di dalam batas sel esensial, sedangkan *periplasma* Gram-negatif tidak. Oleh karena itu susunan dinding sel *Planctomycetes* pada dasarnya berbeda dari bakteri gram-negatif lainnya.



Gambar 2.2. Bentuk sel *Planctomycetes*, termasuk bakteri anammox

Sumber : ***(Jetten, et al. 2009)***

Dalam *Planctomycetes Pirellula* dan *Isosphaera*, membran intrasitoplasma mengelilingi organel sel bagian dalam tunggal, yaitu "riboplasma", tempat DNA dan ribosom berada (Gambar 2.2). Dalam *Isosphaera* membran intrasitoplasma menunjukkan invaginasi besar ke dalam riboplasma. Dalam *Planctomycetes Gemmata* dan bakteri anammox, riboplasma itu sendiri mempunyai membran kedua yang membatasinya (Gambar 2.2). Dalam *Gemmata,* riboplasma berisi DNA sel dan dikelilingi oleh membran ganda. Pada bakteri anammox riboplasma dibatasi oleh membran bilayer tunggal yang dinamakan anammoxosom (*anammoxosome*). Sitoplasma pada bakteri anammox dengan dibagi menjadi tiga kompartemen sitoplasma yang dipisahkan oleh membran *bilayer* tunggal : (1) bagian luar, yaitu *paryphoplasma*, sebagai bingkai luar (*outer rim*) yang berada antara membran sitoplasma dan dinding sel pada sisi luarnya dan membran intrasitoplasma pada sisi dalam; (2) riboplasma, mengandung DNA, ribosom, dan material penyimpanan (granul glikogen); dan (3) kompartemen bagian dalam tanpa ribosom, yaitu anammoxosom, dibatasi oleh membran anammoxosom dan terdiri dari 50-70% total volume sel. Membran yang mengikat kompartemen ini berbentuk melengkung, hal ini kemungkinan untuk meningkatkan rasio permukaan terhadap volume.

Terlepas dari apakah anammoxosom memiliki fungsi seluler tertentu, perlu dipertanyakan apakah kompartemen ini benar-benar merupakan kompartemen terpisah, yaitu bahwa tidak ada membran penghubung antara membran anammoxosom dan membran intrasitoplasma. Penelitian mendalam menggunakan mikroskop transmisi elektron dan tomografi elektron tidak pernah mengungkapkan hubungan membran yang jelas antara anammoxosom dan membran intrasitoplasma. Kompartemen anammoxosom secara vertikal diwarisi ke sel anak setelah pembelahan sel. Pewarnaan sitokrom peroksidasi menunjukkan bahwa protein sitokrom c terletak di dalam anammoxosom. Kesimpulannya, hasil ini membuktikan bahwa anammoxosom merupakan kompartemen terpisah dari membran.

2.3. Lipid *Laddarane* yang Unik

Sebagaimana organisme hidup lainnya, membran bakteri anammox terdiri dari lapisan ganda gliserolipid . Bagian gliserol terikat dengan residu asam lemak baik melalui ikatan ester (tipikal bakteri dan

eukarya) dan melalui ikatan eter (tipikal archaea). Komposisi lipid membran dari bakteri anammox telah dipelajari menggunakan *gas chromatography mass spectrometry* (GC-MS) dan *nuclear magnetic resonance* (NMR). Ditemukan struktur lipid yang tidak biasa pada bakteri anammox, yang terdiri dari rantai hidrokarbon dengan 3 atau 5 cincin siklobutana yang disatukan secara linier, masing-masing pada posisi [3]- dan [5]-*ladderane*, dengan [3]-*ladderane* terkondensasi ke cincin *siklohexana* (Gambar 2.2). Struktur *ladderane* (berbentuk seperti tangga) ini diesterifikasi atau dieterifikasi menjadi tulang punggung (*backbone*) gliserol melalui rantai alkil. Sistem cincin siklobutana yang tersusun menjadi satu bersifat unik di alam. Untuk menjelaskan struktur lipid *ladderane* lengkap, fosfolipid lengkap dianalisis dengan *high performance liquid chromatography electrospray ionization* tandem dengan *mass spectrometry* (HPLC-ESI-MS/MS) dan *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF-MS).

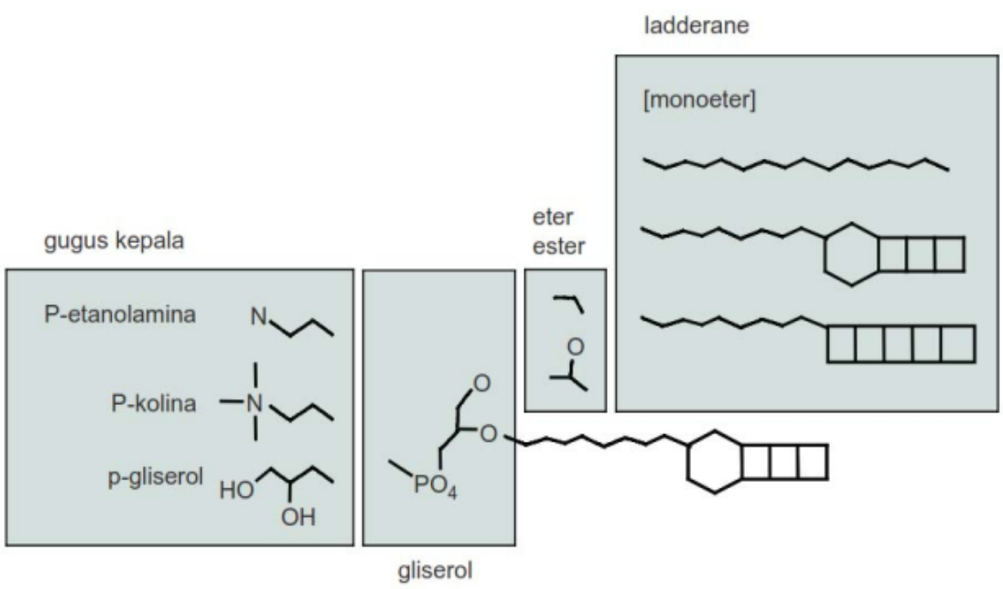
Hasilnya menunjukkan bahwa fosfokolin (*phosphocholine*/PC) dan fosfoetanolamina (*phosphoethanolamine*/PE) adalah bagian kepala (*headgroup*) gugus utama kelompok lipid *ladderane* dan keanekaragaman (*diversity*) jenis lipid anammox sebagian besar ditunjukkan oleh berbagai macam ekor hidrokarbon pada posisi *sn-1* gliserol *backbone* (Gambar 2.3). Fraksinasi sel menunjukkan bahwa membran anammoxosom secara khusus kaya dengan *ladderane*.

Pemodelan molekuler menunjukkan bahwa lipid *ladderane* yang mengelilingi anammoxosom sangat padat. Kepadatan yang tidak biasa membuat mereka kedap terhadap senyawa nonpolar, seperti *fluorofor*, yang mudah melewati membran. Karena metabolisme anammox melibatkan pembentukan zat gas intermediet, terutama oksida nitrat (NO) dan hidrazin, kebocoran (*leakage*) proton dan hilangnya zat intermediet dapat dengan mudah menyebabkan gangguan. Karena sifatnya yang padat, kemungkinan lipid *ladderane* dapat meminimalkan kehilangan yang terjadi.

Baru-baru ini, fosfolipid *ladderane* lengkap dan lipid inti (*core lipid*) dipelajari dalam berbagai spesies bakteri anammox, mewakili empat dari tujuh genus yang diketahui. Setiap spesies terbukti mengandung asam lemak *ladderane* C18 dan C20 dengan tiga atau lima cincin siklobutana yang terkondensasi secara linier dan *ladderane* monoeter yang mengandung gugus alkil C20 dengan tiga cincin siklobutana. Distribusi lipid *ladderane* yang luas di antara spesies

anammox konsisten dengan peran fisiologisnya untuk membentuk membran padat di sekitar anammoxosom. Berbeda dengan lipid inti, variasi besar diamati dalam distribusi fosfolipid *ladderane*, yaitu perbedaan kombinasi dari tipe ekor hidrofobik yang melekat pada posisi *sn-1* gliserol, berkombinasi dengan berbagai jenis gugus polar yang melekat pada posisi *sn-3*. Fakta bahwa lipid *ladderane* lengkap merupakan persentase terbesar dari lipid pada *Kuenenia stuttgartiensis*, menunjukkan bahwa lipid *ladderane* juga ada dalam membran selain anammoxosom. Akhirnya, keempat spesies yang diselidiki mengandung keton *hopanoid* C27 dan *bacteriohopanetrol*. Ini mendukung temuan bahwa hopanoid disintesis secara anaerob oleh bakteri anammox. Komposisi isotopnya yang stabil dan keunikannya membuat *ladderane* representasi yang sempurna untuk aktivitas anammox.

Ladderane dan turunannya sangat menarik bagi ahli kimia organik fisik karena strain cincin dan sifat elektroniknya. Studi sintesis kimia menggaris bawahi sifat luar biasa dari biosintesisnya. Mode biosintesis *ladderane* sama sekali tidak diketahui dan belum pernah terjadi sebelumnya karena kebaruan struktural dan ketegangan cincin tinggi. Genom *K. stuttgartiensis* menunjukkan pada kode jalur untuk biosintesis asam lemak, *squalena*, hopanoid dan ubikuinon.



Gambar 2.3. Komposisi lipid *ladderane* bakteri anammox.

Sumber: (Jetten, et al. 2009)

Biosintesis asam lemak diwakili oleh empat operon, yang salah satunya terdiri dari kombinasi homolog gen biosintesis asam lemak, metilase S-adenosil metionin (SAM), enzim SAM radikal dan gen yang mirip dengan ligase fenil asetat. Enzim SAM *putative* radikal tampaknya sering dicadangkan untuk reaksi kimia yang paling sulit. Menariknya, genom *K. stuttgartiensis* menyandikan 62 enzim SAM *putative* radikal, jauh lebih banyak daripada genom apa pun yang disekuen saat ini. Tampaknya bakteri anammox memiliki kemampuan luas untuk biosintesis molekul organik yang saat ini tidak diketahui. Meskipun jalur yang tepat tidak dapat langsung disimpulkan, tampaknya melibatkan metilasi, siklisasi melalui kimia radikal oksidatif, dan penambahan residu aromatik, dikombinasikan dengan perpanjangan asam lemak biasa.

2.4. Anammoxosom dan Metabolisme Energi

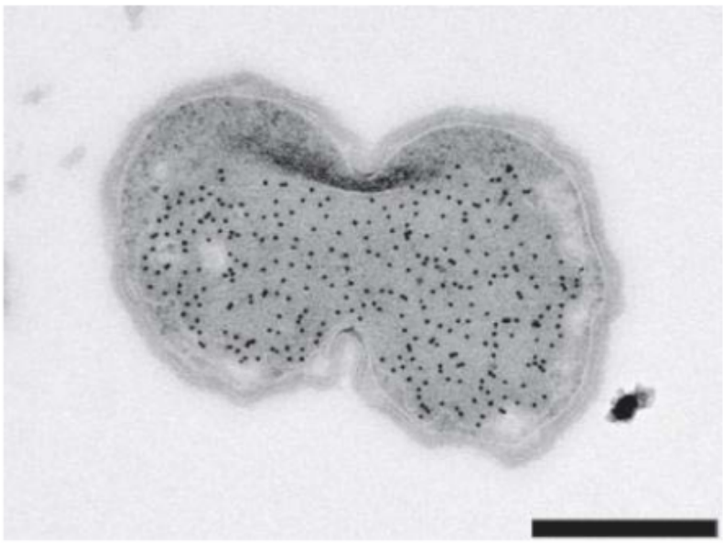
Hipotesis bahwa reaksi anammox terjadi di dalam kompartemen anammoxsosom (bersamaan dengan penumpukan kekuatan motif proton) didasarkan pada lokalisasi imunogold hidrazin/ hidroksilamin *oksidoreduktase* (*hidroksilamin oksidoreduktase/*HAO), salah satu enzim kunci dari proses ini (Gambar 2.4; van Niftrik, 2008). Antiserum HAO yang digunakan ditingkatkan terhadap enzim-mirip HAO murni dari *Ca. Brocadia anammoxidans*. Hasil yang diperoleh dalam dua penelitian tersebut menunjukkan bahwa anammoxosom mengandung HAO. Namun, pertanyaannya adalah apakah protein ini bekerja bersama dengan protein dari rantai transpor elektron untuk secara aktif mentranslokasi proton melintasi membran anammoxosom ke anammoxosom. Proton kemudian dapat mengalir kembali ke riboplasma sepanjang gradien proton melalui ATPase yang mengubah energi yang tersimpan dalam gradien ini menjadi ATP. Untuk mengatasi hal ini, imunolokasi ATPase anammox dimulai. Genom dianalisis untuk kluster gen ATPase, empat kluster putatif ditemukan, dan bagian-bagian dari sub-unit katalitik diekspresikan dalam *Escherichia coli*, untuk digunakan dalam produksi antibodi. Keempat antisera yang dihasilkan digunakan dalam analisis *Western blot*, Imunofluoresensi dan percobaan pilot lokalisasi *imunogold* tetapi masih mengalami kendala metodologi yang masih perlu diatasi. Akibatnya, lokasi ATPase anammox masih harus ditentukan. Namun, aspek lain dari penelitian ini menyajikan bukti tambahan untuk hipotesis yang telah dikemukakan. Pewarnaan sitokrom peroksidasi

hanya dapat mendeteksi protein c sitokrom yang terkait dengan anammoxosom, terutama sepanjang keliling 150-nm di bagian dalam membran anammoxosom. Ini menunjukkan bahwa protein sitokrom c anammox secara dominan terletak di area ini, yang sesuai dengan hipotesis bahwa sitokrom yang terlibat dalam rantai transpor elektron terletak di bagian dalam membran anammoxosom. Indikasi lain bahwa anammoxosom memang digunakan untuk metabolisme energi membran anammoxosom yang berlipat-lipat. Lengkungan ini dapat digunakan untuk meningkatkan permukaan membran yang tersedia untuk enzim yang terlibat dalam katabolisme, seperti yang terjadi pada membran dalam mitokondria (krista). Kesimpulannya, hasil yang diperoleh sejauh ini mendukung hipotesis bahwa kompartemen anammoxosom digunakan untuk pembangkit energi.

2.5. Anammoxosom dan Pertumbuhan

Kombinasi pertumbuhan yang lambat dan respirasi merupakan hal yang menarik pada bakteri anammox. Teori *Chemiosmotic Mitchell* memprediksi batas yang lebih rendah untuk laju pernapasan setelah tingkat ekstrusi proton pernapasan turun di bawah laju masuknya proton yang tidak berpasangan (karena kebocoran membran), energi tidak lagi dapat dikonservasi melalui respirasi. Bakteri dapat membatasi kebocoran proton sampai batas tertentu, dengan menyesuaikan komposisi dan lebar membran. Namun, perhitungan menunjukkan bahwa di beberapa ekosistem alami aktivitas bakteri anammox tidak mungkin dijelaskan dengan teori standar *chemiosmotic*. Bakteri ini harus memiliki strategi untuk mengatasi masalah ini, dan strategi ini mungkin tergantung pada keberadaan kompartemen intrasitoplasma.

Dalam kasus nitrifier, diasumsikan bahwa area permukaan membran yang luas berfungsi untuk mengakomodasi lebih banyak protein pernapasan (aktivitas spesifik dari protein yang terlibat rendah). Area permukaan membran yang lebih luas dapat menyebabkan tingkat pertumbuhan maksimum yang lebih tinggi (seperti yang telah dijelaskan untuk metanotrof-prokariota yang memetabolisme metana sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi, dapat berupa bakteri atau *archaea* dan dapat tumbuh secara aerob atau anaerob). Namun, hipotesis ini sendiri tidak dapat menjelaskan sistem membran internal nitrifier. Karena jika area permukaan yang besar dibutuhkan, lalu mengapa tidak ada nitrifier berserabut. Ada yang berpendapat bahwa energi biosintesis dinding sel akan menjadi penghalang untuk autotrof ini.



Gambar 2.4. Elektron mikrograf menunjukkan lokalisasi immunogold dari hidrazin/hidroksilamin oksidoreduktasi (titik hitam) pada anammoxosom bakteri anammox *Ca. Kuenenia stuttgartiensis*. barskala, 500 nm.

Sumber : (Jetten, et al. 2009)

Di sisi lain, morfologi filamen akan mengarah ke afinitas substrat yang lebih tinggi, dibandingkan dengan membran internal dimana substrat perlu melakukan perjalanan lebih lama melalui proses difusi sebelum dikonversi. Susunan internal dari area permukaan membran juga dapat dijelaskan sebagai berikut: permukaan membran eksternal yang besar dan kontinu akan menyebabkan masuknya dalam jumlah besar proton yang tidak terpisahkan (karena kebocoran membran). Ini bukan masalah, asalkan tersedia cukup substrat untuk memanfaatkan semua permukaan membran itu. Tetapi begitu substrat menjadi terbatas, area permukaan yang luas akan membuat konservasi energi menjadi tidak mungkin; proton yang diekstrusi akan berdifusi kembali ke dalam sel melalui membran dan energi tidak lagi dikonservasi.

Sistem membran internal nitrifier dapat mengatasi masalah ini. Komponen *lamella* tampaknya disusun dalam vesikel berbeda yaitu, *lamella* yang berbeda adalah sistem yang berbeda. Dengan demikian, *Nitrosococcus oceanus* dapat menyesuaikan luas permukaan membran yang diaktifkan dengan ketersediaan substrat. Ketika substrat yang tersedia cukup, semua area permukaan membran akan diaktifkan. Ketika substrat terbatas, hanya satu dari membran internal yang akan diaktifkan dan bakteri masih akan mampu melakukan

konservasi energi. Dengan demikian, susunan membran internal dapat memungkinkan bakteri ini untuk mengatasi berbagai tingkat pertumbuhan, dari yang sangat lambat hingga cukup cepat.

Karena bakteri anammox memiliki area permukaan membran internal yang terbatas, sehingga tidak akan memperkirakan fleksibelitas (*versatility*) dalam kasus ini, dan tidak ada ditemukan aktivitas maksimum bakteri anammox lebih rendah dibandingkan dengan nitrifier. Dalam kasus anammox, tidak ada permukaan membran internal yang besar dan volume internal yang besar (seperti yang ditemukan pada *Thioploca* atau *Thiomargarita*). Dengan demikian, kompartemen anammox tampaknya tidak dirancang untuk meningkatkan pergantian substrat atau menyimpan substrat dalam jumlah besar. Namun, karena kompartemen adalah lokasi enzim katabolik yang utama, kemungkinan besar kompartemen anammox memiliki peran dalam katabolisme.

Ada yang berpendapat bahwa fungsi anammoxosom adalah untuk menginternalisasi kumpulan hidrazin dan dengan demikian membatasi terjadinya kehilangan hidrazin. Namun, perbandingan konstanta waktu untuk difusi dan konversi di dalam anammoxosom menunjukkan bahwa pergantian hidrazin terlalu lambat untuk mencegah hilangnya hidrazin keluar dari kompartemen oleh difusi. Dengan demikian, strategi ini tidak akan menguntungkan sel.

Jadi apa yang bisa menjadi keuntungan dari membran/ kompartemen internal dalam kasus anammox? Satu fitur respirasi terhadap membran internal belum dipertimbangkan: untuk memulai respirasi (untuk mengaktifkan membran) lebih sedikit proton yang perlu ditranslokasi, karena: (1) meskipun melengkung, area permukaan membran internal lebih kecil; dan (2) volume internal jauh lebih kecil daripada medium eksternal. Secara Bersamaan hal ini akan mengarah ke kontak yang lebih dekat dari muatan yang berlawanan di dalam anammoxsosom dan energi potensial yang lebih besar per proton ditranslokasi.

Bagi sebagian besar organisme, tingkat pertumbuhan yang sangat lambat hanya akan terjadi di bawah keterbatasan substrat ekstrim. Tetapi untuk anammox hanya 10 kali lebih lambat dari tingkat pertumbuhan maksimumnya. Diasumsikan bahwa proses respirasi yang ditandai oleh urutan dua fase bergantian. Pada fase pertama dari siklus pernafasan seperti itu, semua substrat yang ada dalam sel dikonsumsi dengan cepat, pada tingkat yang melebihi difusi

substrat dari larutan (atau lingkungan sekitar) kembali ke dalam sel. Proton ditranslokasi, gaya motif proton dihasilkan, membran internal diaktifkan dan beberapa ATP dihasilkan. Setelah semua media habis, gaya gerak proton menghilang. Pada fase kedua, enzim pernapasan diam dan substrat berdifusi kembali ke dalam sel tanpa dikonversi. Ketika tingkat medium di dalam kompartemen dipulihkan, siklus berikutnya dimulai. Keuntungan dari anammoxosom dalam skema ini adalah sebagai berikut: dalam setiap siklus, beberapa energi terbuang dalam aktivasi membran. Dengan memanfaatkan kompartemen internal, kehilangan ini diminimalkan dan ini akan meningkatkan efisiensi energi bakteri dalam skema dinamis ini. Dengan demikian, kompartemen internal memungkinkan pertumbuhan yang sangat lambat.

2.6. Biokimia dan Bio-Energi Proses Anammox

Dari sudut pandang biokimia, mekanisme proses anammox, khususnya cara molekul amonium inert ditangani dan cara ATP dkonservasi, sangat menarik. Jalur anammox yang dihipotesiskan terdiri dari serangkaian minimal tiga reaksi redoks: (1) reduksi satu elektron dari nitrit menjadi NO (Tabel 1.2, Persamaan (3)); (2) kondensasi NO dan amonia dengan input tiga elektron menghasilkan hidrazin (Tabel 1.2, Persamaan (4)); dan (3) oksidasi empat elektron hidrazin untuk menghasilkan gas dinitrogen (Tabel 1.2, Persamaan (5)).

Dukungan biokimia awal berasal dari percobaan dengan substrat berlabel ^{15}N (amonium, nitrit dan nitrat). Ketika inkubasi dengan bakteri anammox diubah dengan hidroksilamin (NH_2OH), akumulasi sementara dari senyawa nitrogen yang diidentifikasi sebagai hidrazin (N_2H_4) diamati. Hidrazin adalah salah satu reduktor paling kuat di alam dan sintesisnya sejauh ini unik untuk bakteri anammox. Pada awalnya, baik hidroksilamin dan hidrazin dipostulatkan sebagai zat antara dalam proses anammox. Efek penambahan hidroksilamin pada metabolisme hidrazin dari bakteri anammox dipelajari baik secara eksperimental dan dengan pemodelan matematika. Diamati bahwa hidroksilamin tidak proporsional secara biologis dengan tidak adanya nitrit menjadi gas dinitrogen dan amonium. Sedikit Hidrazin terakumulasi selama proses ini. Namun, produksi hidrazin yang cepat diamati ketika hampir semua hidroksilamin dikonsumsi. Sebuah model mekanistik diusulkan di mana hidrazin diperkirakan terus diproduksi dari amonium dan hidroksilamin (mungkin melalui oksida nitrat) dan

kemudian dioksidasi menjadi N_2. Akseptor elektron untuk oksidasi hidrazin adalah hidroksilamin, yang direduksi menjadi amonium. Penurunan tingkat reduksi hidroksilamin, menyebabkan penurunan laju oksidasi hidrazin, yang menghasilkan akumulasi hidrazin.

Dari data genom *K. stuttgartiensis*, peran intermediet oksida nitrat (NO) daripada hidroksilamin tampaknya lebih mungkin (Strous et al., 2006). Genom ini tampaknya tidak memiliki nitrit: *Hydroksilamin-reduktase*, sebaliknya terdapat cd_1 nitrit: *nitric oxide oxidoreductase* (NirS). Namun, baru-baru ini menunjukkan bahwa HAO bakteri pengoksidasi amonium aerob dapat mengubah NO melalui hidroksilamin menjadi amonium menggunakan metilviologen tereduksi sebagai donor elektron. Hal ini masih harus ditetapkan jika ini merupakan reaksi fisiologis yang relevan.

Hydrazine dehydrogenase/oxidase (HZO), yang mengkatalisasi oksidasi hidrazin dengan sitokrom c, telah dimurnikan dari strain anammox KSU-1. Enzim ini memiliki aktivitas pengoksidasi terhadap hidrazin tetapi tidak terhadap hidroksilamin. Protein *octaheme dimer* dengan aktivitas spesifik tinggi dan afinitas substrat tinggi banyak terdapat dalam sel. Dua salinan protein homolog dikodekan pada genom K. *stuttgartiensis*. Belum diverifikasi apakah reaksi enzim berlangsung sesuai dengan Persamaan (5) (Tabel 2.1). Juga dari bakteri anammox ini, *hidroksilamin oksidoreduktase* (HAO) dimurnikan yang menunjukkan karakteristik yang berlawanan: aktivitas oksidasi tinggi terhadap hidroksilamin dan aktivitas rendah menuju hidrazin. Sifat-sifat enzimatik ini mirip dengan HAO yang dimurnikan dari *Ca. Brocadia anammoxidans*. Strain gen KSU-1 *hao* ada di awal gen *hzoB*, yang mengkode HZO. Urutan gen *hao* menunjukkan 87% identitas dengan polipeptida yang dikodekan oleh *open reading frame* (ORF) (kustc1061) dalam genom *K. stuttgartiensis*. Temuan ini menunjukkan bahwa baik HZO dan HAO adalah enzim yang sangat diperlukan dan terawat baik (*well conserved*) dalam bakteri anammox.

Kehadiran *dissimilatory nitrite reductase* (NrfA) secara eksperimental divalidasi dengan memurnikan sebagian nitrat reduktase tergantung kalsium dari ekstrak bebas sel (*cell-free extracts*) *Ca. Brocadia anammoxidans* yang mengandung (400-500 nmol/min. mg protein) aktivitas nitrit reduktase tinggi. Akhirnya 25 kDa protein *multiheme* dengan tingkat reduksi nitrit yang sangat tinggi menjadi ammonium (305 μmol/min.mg protein) dapat di*recoveri*. Enzim asli (*native enzyme*) tampaknya terjadi sebagai homodimer. *Sodium azide*

dan agen pengkelat tembaga *diethyldithiocarbamate* (DDC) tidak menghambat enzim pada konsentrasi 1 mM, sementara 1 mM KCN menghambat enzim lebih dari 95%. Fraksi paling aktif mengkonversi NO^{2-}, NO dan NH_2OH pada tingkat tinggi, dan dalam semua kasus produk akhir dari reaksi adalah amonium. Ca^{2+} tidak dapat digantikan oleh ion divalen lainnya. Seperti yang dinyatakan di atas ketika perakitan genom (*genome assembly*) *K. stuttgartiensis* dianalisis untuk protein multiheme, gen kandidat yang paling mungkin yang dapat mengkode untuk reduktase nitrit tergantung kalsium (*calcium-dependent*) ini diidentifikasi sebagai kustc0392, menyandikan protein multiheme 25,2 kDa yang terletak di sebuah cluster gen dengan gen pengkode protein multiheme lainnya (kustc0393, kustc0394) dan gen *cytochrome* b (kustc0395).

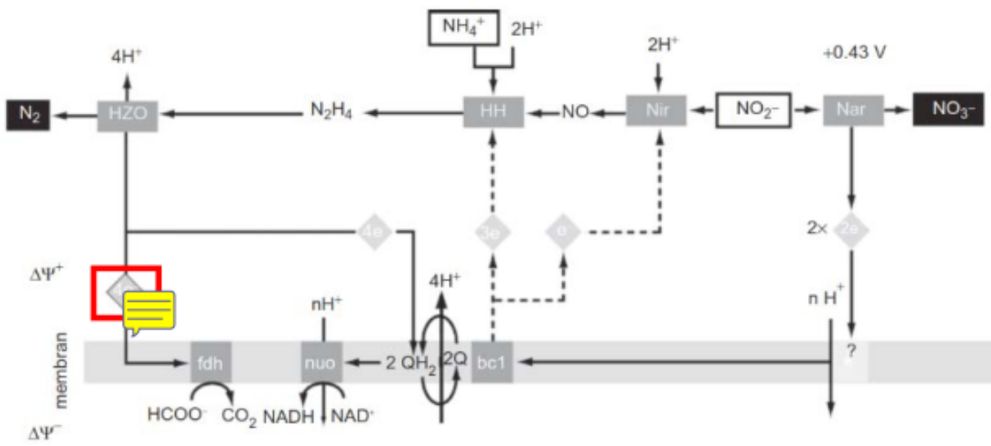
Akhirnya, pemurnian "*hidrazin hidrolase*" (HH), yang memediasi sintesis hidrazin (Tabel 2.1, Persamaan (4)) akan memungkinkan untuk membuktikan bahwa gugus gen yang dipostulatkan adalah benar-benar mengkodekan HH.

Bakteri anammox diyakini dapat menghemat energi yang berasal dari konversi amonium dan nitrit oleh mekanisme *chemiosmotic*. Ini berarti bahwa elektron yang berasal dari oksidasi hidrazin ditransfer melalui ubikuinon ke kompleks sitokrom bc1 (kompleks III). Kompleks bc1 mengangkut elektron menuju reduksi nitrit dan sintesis hidrazin. Digabungkan dengan transfer elektron ini, proton ditranslokasi melintasi sistem membran, sehingga menciptakan tekanan motif proton (*proton motive force*). Pemindahan elektron perantara akan dilakukan dengan satu set protein tipe-c sitokrom.

Selama pertumbuhan, sebagian nitrit dioksidasi menjadi nitrat yang dihipotesiskan menghasilkan elektron untuk fiksasi CO_2. Jalur asetil-KoA bergantung pada elektron pada potensial redoks yang sangat rendah untuk reduksi NAD^+ (-0,32 V), reduksi CO_2 menjadi format (-0,44 V) dan sintesis asetil-KoA (-0,5 V). Dalam kebanyakan kasus, elektron ini berasal dari oksidasi molekul hidrogen (Drake dan Daniel, 2004). Namun, bakteri anammox mendapatkan elektronnya dari oksidasi anaerob nitrit menjadi nitrat (+0,43 V), menjadikan jalur asetil-KoA menjadi tantangan. Data genom memungkinkan pemotongan jalur biokimia yang menjelaskan bagaimana jalur asetil-KoA dapat direkonsiliasi dengan nitrit sebagai donor elektron untuk fiksasi karbon (Gambar 2.5). Dalam model ini, sebagian dari elektron berdaya reduksi tinggi yang berasal dari oksidasi hidrazin disalurkan

menuju pengurangan NAD^+ dan CO_2 untuk mempertahankan fiksasi karbon. Pengisian kembali kolam hidrazin untuk mengkompensasi hidrazin yang diinvestasikan dalam fiksasi karbon tidak memerlukan enzim tambahan kecuali *reverse* transpor elektron. Oksidasi nitrit kemungkinan dikatalisis oleh NarGH nitrat oksidoreduktase yang hadir dalam genom *K. stuttgartiensis*. Hebatnya, gugus gen *nar* tampaknya tidak memiliki kode gen (*narI*) untuk subunit pengikat ubikuinon. Selain enam gen terdapat pengkodean protein tipe-c sitokrom, yang mungkin memfasilitasi transpor elektron.

Banyak detail sehubungan dengan biokimiawi anammox dan bioenergi perlu diverifikasi secara eksperimental, termasuk bukti akurat untuk intermediet yang dipostulatkan, pemurnian dan karakterisasi enzim metabolik utama dan kompleks pernapasan yang terlibat dalam proses transfer elektron. Selain itu, lokalisasi sel (anammoxosom) dan orientasi membran dari proses proton-motif harus diselesaikan.



Keterangan: Nir : *nitrite reductase;* HH : *hidrazin hidrolase*; HZO : *hidrazin dehidrogenase*; Nar : *nitrat reduktase*; Q : *ubikuinon*; fdh : format *dehidrogenase,* nuo : NADH: *ubikuinon oksidoreduktase*, Q(H2) : (tereduksi) ubikuinon; bc1 : komplek bc1;.

Simbol: ◊, sitokrom; ◊ ferredoxin; ⍰ : reduksi; ---> : oksidasi. ΔΨ+ : anammoxosom; ΔΨ – : riboplasma.

Gambar 2. 5. Skema hipotesis yang memperlihatkan kombinasi antara pusat katabolisme K. stuttgartiensis bersama dengan nitrat reduksi untuk menghasilkan *low-redox-potential electron* untuk jalur asetyl-KoA.

Sumber : (Jetten, et al. 2009)

BAB III
GENOMIK BAKTERI ANAMMOX

Pada tahun 2006 sekuens genom *Kuenenia stuttgartiensis* dipublikasikan yang merupakan publikasi pertama dari bakteri anammox. Penyusunan dilakukan dari metagenom yang diperoleh dari komunitas mikroba kompleks yang tumbuh dalam SBR di mana *K. stuttgartiensis* merupakan 74% dari populasi mikroba. Pada akhirnya, lima *supercontigs* (serangkaian *contigs*/ seperangkat segmen DNA yang tumpang tindih yang bersama-sama mewakili area DNA yang terurut dan berorientasi yang masih mengandung beberapa *gap*/ celah) (total 4,2 Mb) dapat disusun. Lima *gap* yang tersisa tidak bisa diidentifikasi dan ukuran *gap* ini masih belum diketahui. Namun, kelengkapan dan susunan yang benar dari genom *K. stuttgartiensis* dikonfirmasi oleh kurangnya redundansi atau gen esensial yang hilang dalam jalur biosintesis utama, replikasi DNA, transkripsi, translasi dan translokasi protein. Kecuali dari *leucyl-t*RNA *synthetase*, 64 *clusters orthologous groups of proteins* (COGs) terdapat pada semua sekuens genom bakteri yang saat ini ada dalam database STRING dan dari genom ini di perkirakan tingkat kelengkapannya lebih dari 98%.

3.1. Fiksasi dan Pespirasi Karbon Dioksida

Diantara *Planctomycetes*, *K. stuttgartiensis* adalah satu-satunya *chemolithoautotroph* yang diketahui. Oleh karena itu tidak dapat diprediksi jalur mana untuk fiksasi karbon yang akan digunakan, meskipun beberapa indikasi diperoleh dari analisis ^{13}C-karbon. Genom *K. stuttgartiensis* mengkode untuk jalur asetil-KoA (*Wood-Ljungdahl*) lengkap, sementara semua jalur fiksasi karbon yang lainnya hilang atau tidak lengkap. Dalam rute *Wood-Ljundahl* dua molekul CO_2 direduksi dan terikat pada koenzim A (HS-CoA) untuk membentuk asetil-KoA. Penggunaan jalur asetil-KoA konsisten dengan pengurangan karbon yang ditemukan secara eksperimen dalam lipid *ladderane* dari bakteri anammox, dengan aktivitas dua enzim utama (format dehidrogenase dan karbon monoksida dehidrogenase) dalam ekstrak bebas sel (*cell-free extract*) dan dengan metabolisme satu karbon seperti dijelaskan dalam *Planctomycetes*. Namun, seperti pada asetogen, metabolisme satu karbon pada *K. stuttgartiensis* melibatkan

folat, bukan metanopterin. Dengan demikian gennya sama sekali berbeda dengan pengkodean protein metabolisme satu-karbon yang bergantung pada metanopterin yang ditemukan dalam *Planctomycetes* terkait. Asetil-KoA adalah substrat untuk semua konstituen sel yang dimulai dengan jalur glukoneogenesis/ glikolisis dan siklus asam trikarboksilat sebagai jalur intermediet. Semua gen pada jalur ditemukan dalam genom, kecuali untuk gen yang mengkode ATP sitrat *lyase*. Tidak adanya enzim ini mungkin mengindikasikan bahwa siklus asam sitrat lebih disukai digunakan untuk metabolisme asam amino. Pengurangan ekuivalen yang dibutuhkan untuk pengurangan CO_2 berasal dari oksidasi kuinon tereduksi atau NADH. Pengkodean cluster untuk NADH: *ubiquinone oksidoreduktase* (kompleks I), NADH translokasi-natrium: kuinon oksidoreduktase dan format: kompleks kuinon oksidoreduktase diidentifikasi dalam genom dan ini sesuai dengan transfer elektron tersebut.

3.2. Fleksibelitas Cara Hidup

Data genom dari K. *stuttgartiensis* juga mendukung penemuan fleksibelitas cara hidup bakteri anammox. Metabolisme karbon inti bersifat reversibel, dan transporter untuk asam organik dan asam amino telah dapat diidentifikasi. Selain itu, respirasi sangat berlebih dalam genom *K. stuttgartiensis*: setidaknya 200 gen diprediksi terlibat langsung dalam respirasi. Sejauh ini, tingkat redundansi yang sebanding hanya diamati untuk fleksibelitas bakteri heterotrofik seperti *Geobacter sulphurucens* dan *Shewanella oneidensis*, sedangkan oksidator amonia secara aerob, *Nitrosomonas europaea,* hanya memiliki 50 gen. Penemuan tiga kelompok gen yang mengkode kompleks III (sitokrom bc_1) dan empat kelompok gen yang mengkode untuk kompleks ATP *synthase* memberikan bukti kuat bahwa ATP disintesis oleh mekanisme chemiosmotik.

3.3. Metabolisme Anammox yang Unik

Anammox adalah oksidasi amonia dengan menggunakan nitrit sebagai penerima elektron menjadi gas nitrogen sebagai produk. Proses ini dilakukan oleh bakteri anaerobik kemolitoautotrof yang membentuk kluster monofili (*monophyletic*) dalam filum *Planctomycetes,* salah satu divisi utama dari bakteria. Saat ini, 24 spesies anammox sudah diidentifikasi dan dibiakkan dari biomasa yang berasal dari

instalasi pengolahan air limbah (IPAL) dan lingkungan yang tersebar pada 7 genus yaitu *Ca. Brocadia, Ca. Kuenenia, Ca. Scalindua, Ca. Anammoxoglobus, Ca. Jettenia*, *Brasilis* dan *Anammoximicrobium*

Penemuan bakteri anammox pertama kali di alam, ditemukan pada area anoksik (*anoxic water column*) dalam laut hitam yang diberi nama *Ca. Scalindua sorokinii,* sekaligus membuktikan keberadaan bakteri anammoxson di alam. Bakteri anammox memiliki kompartemen sel yang disebut anammoxosom. Tempat dimana terjadinya proses katabolisme anammox. Membran lipid *bilayer* yang mengelilingi anammoxosom mengandung lipid yang tidak biasa, yang disebut lipid *ladderane,* gabungan dari bagian siklobutana (*cyclobutane*) dimana eter (*ether*) dan/atau ester terikat pada gliserol (*glycerol*) atau terdapat sebagai alkohol bebas (contoh gambar 2 struktur II-4). Membran bakteri anammox yang lainnya terdiri dari jenis lipid *Planctomycetes* secara umum, yaitu iso, normal, dan *midchain* asam metil heksadekanoik (contoh gambar 2.3, struktur I).

Anammox sendiri adalah kombinasi amonium dan nitrit menjadi gas dinitrogen dan oksidasi sebagian nitrit menjadi nitrat untuk menghasilkan reduksi ekuivalen dengan fiksasi karbon dioksida (Gambar 2.5). Untuk metabolisme ini, gen berikut diidentifikasi dalam genom *K. stuttgartiensis*: nitrat-nitrit oksidoreduktase (*nar*GH), oksida nitrat-nitrit oksidoreduktase dari tipe cd_1 (*nirS*) dan sembilan paralog hidroksilamin/ hidrazin oksidoreduktase (HAO/HZO) yang berbeda.

Baru-baru ini, dua artikel menggambarkan evolusi enzim N-*cycle* secara umum dan HAO/HZO secara lebih rinci. Perbandingan aliran elektron siklik dalam oksidasi amonium secara aerob dan anaerob (Strous et al., 2006) mengungkapkan kesamaan yang mencolok dan posisi sentral protein HAO/HZO. Protein HAO/HZO ini diasumsikan sebagai analog fungsional karena keduanya mengoksidasi hidroksilamin dan hidrazin, dan mengirimkan elektron yang dilepaskan ke ubiquinol melalui protein *cytochromec*. Dalam kasus seperti itu, HAO dan HZO dapat dipertukarkan, dan mendefinisikan modul redoks hidroksilamin/ hidrazin-ubiquinol (HURM) dari oksidator amonium aerob dan anaerob. Menurut hipotesis ini, kemungkinan besar bakteri anammox memungkinkan daur ulang lengkap nitrogen terikat pertama kali ke kolam nitrogen dan memenuhi peran ini sampai munculnya enzim tembaga.

Kemampuan untuk oksidasi nitrit menjadi nitrat (dan sebaliknya) yang dimediasi oleh NarGH konsisten dengan bukti eksperimental sebelumnya. Kehadiran NirS (NirS) mengejutkan karena nitrit oksida sebelumnya tidak diakui sebagai perantara metabolisme nitrogen anammox. Reduktase nitrat (NarGH) dan nitrit (NirS) juga dikenal sebagai langkah pertama denitrifikasi konvensional. Namun, gen yang mengkode nitrat oksida reduktase dan nitrogen oksida reduktase tidak ada dalam susunan genom anammox, sehingga sangat tidak mungkin bahwa *K. stuttgartiensis* mampu menyelesaikan denitrifikasi konvensional sepenuhnya, lebih mungkin bahwa oksida nitrat adalah intermediet dari jalur anammox itu sendiri.

Sejauh ini dua langkah reaksi masih hilang. Pertama, langkah penting di mana amonium dikombinasikan dengan oksida nitrat dan ikatan nitrogen-nitrogen ditempa untuk menghasilkan hidrazin ("hidrazin hidrolase") dan kedua, pengurangan nitrit menjadi amonium. Reaksi terakhir dilakukan oleh bakteri anammox dalam kondisi stres dan juga diperlukan untuk menjelaskan secara ekperimen kemampuan untuk menghasilkan gas dinitrogen dari nitrat tanpa adanya amonium dan dengan asam organik sebagai satu-satunya sumber elektron. Tanpa denitrifikasi, bakteri anammox masih bisa menghasilkan gas dinitrogen dari nitrat dengan terlebih dahulu mereduksi setengah nitrat hingga ammonium dan kemudian melanjutkan dengan jalur anammox. Reduksi enam elektron nitrit menjadi amonium ini telah dikenal dan biasanya dikatalisis oleh *dissimilatory nitrite reductase* (NrfA), *pentaheme* sitokrom c, yang membentuk dimer (Simon, 2002). Namun, tidak ada ortolog yang jelas untuk NrfA, yang mengandung motif CxxCK, terdapat dalam genom. Kandidat gen untuk dua langkah yang hilang ini diidentifikasi dengan berfokus pada domain yang diminati daripada pada gen tanpa ortolog dalam database. Penekanan khusus diberikan pada bagian pengikatan heme dan iron sulfur karena kompleks enzim yang menengahi langkah-langkah ini setidaknya harus memiliki potensi untuk menerima dan menyumbangkan elektron (tiga elektron untuk hidrazin hidrolase dan enam untuk *dissimilatory nitrite reductase*). Sebagian besar gen yang mengandung domain tersebut dikodekan untuk protein kecil yang mungkin hanya terlibat dalam transfer elektron dan bukan dalam katalisis. Menariknya, novelti genetik utama, gen yang mengandung kombinasi domain baru yang terlibat dalam transfer elektron dan katalisis, dapat diidentifikasi hanya dalam tiga operon. Salah satu dari kode operon ini untuk kandidat kompleks yang terdiri dari dua protein *pentaheme* dan

satu *cytochrome c decaheme.*

Meskipun gen-gen ini tidak ortologis dengan *dissimilatory nitrite reductase* (NrfA), keberadaan lima atau sepuluh bagian pengikatan heme-c masih membuat kompleks ini kandidat yang paling mungkin untuk mengkode homolog fungsional NrfA pada *K. stuttgartiensis.*

Dua kompleks lainnya adalah kandidat yang paling mungkin untuk peran hidrazin hidrolase (HH). Kandidat operon pertama menunjukkan bahwa pembentukan biologis hidrazin dari amonium dan nitrat oksida dikatalisis oleh protein beta-propellor (seperti nitrat oksida reduktase) dengan bantuan quino-kofaktor (yang juga digunakan dalam oksidasi metilamin oleh bakteri methylotrophic). Kandidat operon kedua yang diidentifikasi menunjukkan peran untuk oksidase multicopper baru (seperti nitrit reduktase, NirK), flavin yang mengandung amina oksidasi dan beberapa protein membran integral.

Ringkasnya, genom *K. stuttgartiensis* yang dikumpulkan dari metagenome SBR memungkinkan suatu rekonstruksi *in silico* dari metabolisme anammox dan identifikasi gen yang mungkin terlibat. Meskipun alternatif biokimia dimungkinkan, jalur yang digambarkan adalah satu-satunya yang konsisten dengan data eksperimental yang tersedia, layak secara termodinamik dan biokimia, dan konsisten dengan *Ockham's razo*. Ini memerlukan biokimia minimum yang baru dan membutuhkan jumlah reaksi biokimia paling sedikit.

3.4. Biologi Sel dan Pemilahan Protein

Biogenesis dari kompartemen anammoxosom yang terikat membran akan menyebabkan bakteri untuk secara selektif mentranslokasi beberapa protein dan lainnya ke dalam anammoxosom melintasi membran sitoplasma. Hal yang sama berlaku untuk penyisipan protein membran yang sesuai. Redundansi fungsi pernapasan, serta adanya beberapa paralog untuk perkiraan transporter amonia, nitrit dan nitrat akan memungkinkan untuk mentranslokasi protein secara selektif ke berbagai arah. Multipel paralog dapat memiliki sinyal peptida berbeda yang digunakan untuk menyortir protein. Upaya telah dilakukan untuk menemukan pola dalam urutan N-terminal dan asam amino C-terminal dari paralog ini, tetapi tidak ada pola signifikan yang dapat ditemukan. Hal ini disebabkan oleh (1) redundansi besar (yaitu sembilan salinan berbeda dari *hydroxylamine oksidoreduktase*, setidaknya satu di antaranya diketahui ada di dalam anammoxosom (Gambar 3); (2) kurangnya konservasi dalam sinyal penyortiran

protein; dan (3) kesulitan memprediksi kodon awal (*start codon*/ kodon pertama dari transkrip messenger RNA yang diterjemahkan oleh ribosom) yang benar.

Untuk translokasi protein, genom *K. stuttgartiensis* menyandikan aparatus umum non-redundan lengkap (termasuk partikel pengenal sinyal dan reseptor) dan jalur arginin kembar (*twin arginine pathway*/ TAT) untuk translokasi protein terlipat (folded protein). *K. stuttgartiensis* akan membutuhkan protein terlipat untuk translokasi enzim besi-sulfur dan *molybdopterin* seperti nitrat reduktase, yang mengandung sinyal TAT konvensional. Sistem sekresi protein bakteri I ke V terbukti tidak ada. Dalam eukariota, penargetan subseluler protein dimediasi oleh urutan N-terminal dan sinyal C-terminal spesifik yang dikenali oleh protein *tetratricopeptide repeat* (TPR). Menariknya, protein TPR secara mencolok sering terjadi pada genom *K. stuttgartiensis*. Sementara domain TPR ada di mana-mana di antara eukariota yang lebih tinggi, genom bakteri umumnya hanya memiliki sedikit (kurang dari lima) gen yang menyandikan domain ini. Sebaliknya, 90 gen dengan domain TPR multipel (1–12) diidentifikasi dalam genom *K. stuttgartiensis*, jauh lebih banyak daripada genom bakteri apa pun yang disekuen sejauh ini. Delapan dari gen ini terdiri dari keluarga protein membran integral dengan tujuh domain TPR. Dengan tidak adanya homolog yang jelas untuk menyelesaikan sistem penargetan, mekanisme penargetan protein anammoxosomal tetap tidak terselesaikan. Namun, berdasarkan data saat ini, kemungkinan besar melibatkan protein TPR, yang dapat berfungsi dalam pengenalan sinyal dan sebagai reseptor membran.

BAB IV
EKOLOGI DAN LINGKUNGAN BAKTERI ANAMMOX

4.1. Deteksi Bakteri Anammox di Lingkungan

Berbagai metode yang sesuai tersedia untuk mendeteksi bakteri anammox dan aktivitasnya dalam ekosistem alami dan buatan manusia. Dalam sampel lingkungan, amplifikasi PCR dengan primer target gen 16S rRNA dan analisis filogenetik biasanya digunakan untuk mendeteksi organisme yang sebelumnya tidak diketahui. Namun, bakteri anammox mungkin kurang terwakili di perpustakaan klon gen 16S rRNA karena set primer "universal" yang banyak digunakan untuk amplifikasi gen 16S rRNA memiliki beberapa ketidakcocokan. Penggunaan primer yang lebih spesifik, yaitu Pla46F (*primer forward spesifik-Planctomycete*) atau amx386F (primer spesifik anammox) bersama-sama dengan *primer reverse eubacterial* atau *primer reverse anammox* spesifik (mis. Amx820R) dapat meningkatkan jumlah relatif *Planctomycete* atau sekuen gen 16S rRNA anammox. Baru-baru ini, pendekatan PCR fungsional menggunakan primer yang memperkuat gen anammox yang mengkode protein hidroksilamin/ hidrazin oksidoreduktase (HAO/HZO) menunjukkan bahwa gen ini adalah target yang cocok untuk studi ekologi molekuler pada bakteri pengoksidasi ammonium aerob dan anaerob. Untuk evaluasi yang tepat dari kontribusi proses anammox terhadap siklus nitrogen di habitat tertentu, kombinasi metode (rRNA dan non-rRNA) yang berbeda diperlukan. *Fluorescence in situ hybridization* (FISH) adalah metode yang sangat baik untuk mengumpulkan data kualitatif dan kuantitatif bakteri anammox dalam sampel lingkungan. Metode FISH juga dapat digunakan untuk memvalidasi temuan *clone libraries*. Desain probe akan meningkat karena sekuens anammox yang lebih tervalidasi tersedia, juga termasuk data dari proyek metagenome. Selain FISH, metode real time PCR berbasis gen 16S rRNA dikembangkan untuk kuantifikasi bakteri anammox. FISH-MAR dan ISR probing adalah teknik canggih yang memungkinkan pengukuran aktivitas dan pertumbuhan pada tingkat sel tunggal. Raman-FISH menggabungkan spektroskopi Raman-isotop stabil dan FISH untuk analisis *identity* dan fungsi sel tunggal.

Confocal Raman Microscopy (CRM) digunakan sebagai teknik non-invasif baru untuk menentukan distribusi berbagai mikroorganisme dan zat lain di dalam fisiologis komunitas mikroba. Bakteri anammox diidentifikasi tanpa *pretreatmen*t sampel hanya dengan tanda getaran Raman-nya.

Menggunakan efek resonansi Raman dari sitokrom c, distribusi mikroba nitrifier dan bakteri anammox dalam agregat mikroba yang diperoleh dari pengolahan air limbah biologis dapat dicatat. Berdasarkan referensi basis data dari bakteri yang diduga ditemukan, pengelompokan bakteri ke tingkat dibawah strain (*down to strain*) dimungkinkan.

Eksperimen pelacak (*tracer*) dengan amonium dan nitrit berlabel ^{15}N umumnya digunakan untuk mendeteksi aktivitas anammox. Dalam kondisi anoksik, amonium berlabel ^{15}N bereaksi secara unik, dalam perbandingan 1:1 dengan ^{14}N-nitrit tanpa label hingga $^{29}N_2$ ($^{14}N^{15}N$) melalui reaksi anammox. Teknik isotop ^{15}N juga dapat dikombinasikan dengan penambahan inhibitor. Efek diferensial dari asetilena dan metanol pada anammox dan denitrifikasi membantu untuk menjelaskan kontribusi jalur utama produksi N_2 dalam sedimen laut. Namun, harus diingat bahwa studi penghambatan pada ekosistem yang kompleks seperti sedimen laut harus ditafsirkan dengan hati-hati. Senyawa yang menghambat satu kelompok mikroorganisme dalam kondisi yang diberikan dapat meningkatkan aktivitas mikroorganisme lainnya.

Selain itu, biosensor yang sangat sensitif untuk pemantauan nitrit online telah tersedia untuk deteksi sensitif aktivitas anammox dalam sistem reaktor atau sedimen. Meskipun konversi hidroksilamin menjadi hidrazin adalah fitur unik dari bakteri anammox, pengujian ini membutuhkan jumlah sel anammox yang agak tinggi.

Lipid ladderane unik dari bakteri anammox juga dapat digunakan sebagai biomarker. Lipid dari bakteri anammox ditandai oleh kandungan ^{13}C yang jauh lebih rendah daripada sumber karbonnya. Karena kandungan ^{13}C *ladderane anammox* sekitar 45 % berkurang dibandingkan dengan sumber karbonnya, komposisi isotop lipid anammox dalam sampel lingkungan dengan demikian dapat menjadi konfirmasi tambahan darimana asal mereka. Lipid dari organisme autotrofik lainnya umumnya 20 hingga 30 % terkuras. Lipid *ladderane* juga digunakan sebagai proksi untuk aktivitas anammox sebelumnya. Analisis distribusi fosil lipid *ladderane* dalam sedimen utama dari

Laut Arab utara mengungkapkan konsentrasi lipid *ladderane* antara 0,3 dan 5,3 ng/sedimen selama 140.000 tahun terakhir, menunjukkan bahwa proses anammox merupakan *sink* penting untuk mengikat nitrogen anorganik di Laut Arab selama siklus gletser terakhir.

Bakteri anammox yang pertama ditemukan, diberi nama *Ca. Brocadia anammoxidans*, pada bioreaktor pembiakan kultur dan secara fisik dimurnikan menggunakan prosedur gradien sentrifugasi *Percoll* (*Percoll gradient centrifugation*). Bakteri anammox memperlihatkan struktur sel yang kompleks dan komposisi kimia membran lipid dan sebuah kompartemen sel yang berbeda yang disebut anammoxosom dimana reaksi biokimia anammox berlangsung, dengan *ladderane* lipid yang unik pada membran untuk mengatur reaksi biokimia. Saat ini, sudah ditemukan 7 genus anammox yaitu *Brocadia, Kuenenia, Scalindua, Anammoxoglobus, Jettenia, Anammoximicrobium* dan *Brasilis.* Spesies baru ditemukan dari ladang pengeboran minyak, sedimen laut yang masih asli, dan mangrove pesisir. Spesies ini memperlihatkan pola distribusi sepanjang salinitas dan perbedaan antropogenik, tapi keberadaan N-antropogenik terlihat menentukan distribusi lebih penting daripada salinitas. Dari penelitian yang telah dilakukan saat ini, *Scalindua* mendominasi di laut terbuka dan ekosistem air tawar murni hampir secara eksklusif, menunjukkan pola distribusi tergantung pada polusi dan dampak antropogenik.

Tiga kategori pendekatan utama sudah digunakan untuk mendeteksi bakteri anammox pada lingkungan alam dan sistem pengolahan air limbah sejak tahun 2005 yaitu pengukuran aktivitas dengan NIPT, analisis lipid spesifik bakteri anammox pada biomasa dan teknik molekular berdasarkan asam nukleat mulai dari amplifikasi PCR sampai *quantitative* PCR (qPCR) dan *reverse-transcription* (RT)-PCR dari biomarker bakteri anammox.

Bakteri anammox, berbeda dengan semua prokariot yang sudah dikenal, memiliki lipid yang spesial pada membran selnya yang membungkus anammoxosom dalam sel. Membran *ladderane* lipid ini terdiri dari struktur cincin siklobutana/ sikloheksana, yang membuat membran anammoxosom sangat impermiabel bila dibandingkan dengan membran bakteri selain anammox. Karena lipid yang unik hanya ditemukan pada bakteri anammox maka *ladderane* lipid menjadi indikator dan biomarker keberadaan bakteri anammox di lingkungan dan konsentrasinya berhubungan langsung dengan biomasa. Selanjutnya, lipid *ladderane* sebagian besar disebutkan

sebagai turunan lipid inti, tetapi terjadi sebagai *intact ladderane glycerophospholipids* (IGPs *ladderane*) di dalam sel dengan kelimpahan tinggi, sehingga IGP *ladderane*, seperti C20-[3]-*ladderane monoalkyl ether phosphocholine*, dapat mencerminkan biomassa hidup lebih akurat daripada lipid inti *ladderane*. Oleh karena itu, lipid *ladderane* lebih layak sebagai biomarker spesifik untuk bakteri anammox. Deteksi dan kuantifikasi lipid *ladderane* digunakan tidak hanya untuk menyimpulkan keberadaan bakteri anammox dalam sampel lingkungan, tetapi juga untuk menilai keberadaan bakteri anammox yang terkait dengan beberapa peristiwa geologis (*geological event*).

Untuk menganalisis lipid *ladderane*, sampel yang mengandung bakteri anammox pertama-tama diekstraksi dengan metanol, metanol/ diklorometana, dan diklorometana secara substansial. Ekstrak dimetilasi dengan B3/ metanol setelah pelarut dihilangkan dan kemudian fraksi dipisahkan oleh kolom silika kecil menggunakan etil asetat sebagai eluen. Setelah itu, fraksi yang diperoleh di sialilasi dengan BSTFA dalam alkohol piridin yang mengkonversi alkohol dalam TMS eter untuk analisis lebih lanjut dengan kromatografi gas (GC) dan spektrometri GC/ massa (MS). Berbagai senyawa kimia yang terkandung pada lipid *ladderane*, seperti asam lemak, gliserol dieter, gliserol eter ester dan sn-2-gliserol monoeter, 45 an dianalisis melalui prosedur tersendiri. Pada tahun 2006, metode *high-performance liquid chromatography/ atmospheric pressure chemical ionization*-MS/MS memungkinkan penentuan tingkat rendah lipid *ladderane* dalam matriks kompleks (misalnya, sedimen) dan teknik ini dapat mendeteksi sekitar 35 pg lipid tangga, yang meningkatkan resolusi metode dibandingkan dengan metode GC/MS. Meskipun analisis lipid menyediakan alat *powerfull* untuk mendeteksi bakteri anammox, kekurangan berikut masih ada saat menggunakan teknik ini pada sampel lingkungan: (1) prosedur ekstraksi rumit, (2) volume sampel yang tinggi diperlukan, seperti air laut dan sedimen, karena kelimpahan bakteri anammox yang rendah; (3) kesulitan ditemukan dalam pemurnian ketika berurusan dengan bahan sedimen karena kontaminan lainnya, seperti asam humat dan asam fulvat, dan (4) lipid ini juga dapat hadir dalam bahan organik tidak hidup dan dengan demikian mungkin tidak selalu menunjukkan adanya bakteri anammox yang aktif secara metabolik tanpa kesalahan, yang membatasi kuantifikasi populasi bakteri anammox aktif dengan kepercayaan dan presisi tinggi.

4.2. Anammox di Ekosistem Laut

Nitrogen anorganik adalah salah satu nutrisi utama di perairan laut yang dapat membatasi produktivitas produsen. Amonium dapat berasimilasi, tetapi dapat juga digunakan sebagai sumber energi ketika dioksidasi pertama kali menjadi nitrit dan kemudian menjadi nitrat dalam proses nitrifikasi. Nitrit dan nitrat selanjutnya dapat direduksi menjadi gas nitrogen di zona suboksik dengan oksidasi amonium anaerob (anammox) atau denitrifikasi. Saat ini sedikit informasi tentang bagaimana dan sejauh mana berbagai kelompok bakteri siklus nitrogen berkontribusi pada siklus biogeokimia nitrogen (laut). Pada tahun 2003, bukti langsung yang pertama diberikan untuk keberadaan bakteri anammox di cekungan anoksik terbesar di dunia, Laut Hitam, didukung oleh profil nutrisi, klon gen 16S rRNA *library*, *fluorescence in situ hybridization*, tes aktivitas ^{15}N, dan analisis lipid *ladderane*. Sejak itu penelitian lanjutan telah menunjukkan bahwa bakteri anammox memainkan peran dominan dalam penghilangan nitrogen dalam sistem *upwelling* Benguela dan Peru, dua lokasi produksi primer paling penting di dunia. Analisis distribusi vertikal dari aktivitas anammox (pelabelan ^{15}N) pada zona suboksik dari pusat Laut Hitam menunjukkan bahwa laju anammox meningkat dengan kedalaman pada zona suboksik atas dan mencapai kesamaan maksimum pada interface yang jelas antara nitrat dan amonium, di bawah ini tingkatnya menurun hingga kedalaman akumulasi sulfida. Karena denitrifikasi heterotrofik tidak terdeteksi, anammox lah yang menghilangkan nitrogen terikat dalam ekosistem ini. Juga dalam sistem *upwelling* Benguela, bakteri anammox bahkan mungkin satu-satunya penyerap nitrogen terikat. Selain itu, keberadaan bakteri anammox dalam sedimen laut dan muara telah ditemukan. Berdasarkan studi ini, sekarang diperkirakan bahwa bakteri anammox dapat berkontribusi lebih dari 50% untuk penghilangan nitrogen global saat ini dari lautan. Dengan demikian, bakteri anammox dapat mewakili suatu *sink* besar (*unexplored sink*) tetapi saat ini belum dieksplorasi dalam siklus biogeokimia nitrogen di lautan dengan konsekensinya besar pada siklus karbon laut masa lalu dan sekarang. Temuan terbaru menunjukkan bahwa kedua bakteri pengoksidasi amonium, seperti *Nitrosococcus oceanii*, dan *Crenarchaea* pengoksidasi ammonium, seperti *Nitrosopumilus maritimus*, berkontribusi terhadap oksidasi amonium laut di Laut Hitam dan oxygenminimum zones (OMZ, daerah dengan konsentrasi oksigen minimum) di Namibia dan kemungkinan bersama dengan anammox secara tidak langsung dan langsung.

Berdasarkan inkubasi ^{15}N, studi ekspresi dan pemodelan difusi, setiap proses diasumsikan memasok sekitar setengah dari nitrit yang dibutuhkan oleh anammox. Karena bakteri anammox berkontribusi besar terhadap kehilangan nitrogen di perairan suboksik laut, pasangan nitrifikasi-anammox berpotensi juga terjadi di zona minimum oksigen oseanik dan akan bertindak sebagai jalur pintas yang menghubungkan amonium yang diregenerasi untuk jalur pintas. Dengan cara ini denitrifikasi penghilangan nitrogen secara langsung dilewati, yang hingga saat ini diyakini sebagai bak penampung utama (*main sink*) untuk nitrogen anorganik terikat di lautan. Perubahan dinamis dalam proses produksi N_2 dapat terjadi. Setelah aliran besar-besaran air Laut Utara yang teroksigenasi, menyebabkan aliran hawa pada Laut Baltik, dan pembentukan kembali *redoxcline* (lapisan air, yang memiliki gradien redoks vertikal yang kuat, antara air beroksigen bagian atas dan bawah), terjadi pergeseran dari proses denitifikasi ke anammox sebagai proses utama penghilangan nitrogen.

Sejauh ini kisaran suhu yang cocok untuk bakteri anammox telah diperkirakan antara -2°C (es laut, Greenland) dan 43°C (uji laboratorium). Sebuah studi baru-baru ini menyelidiki peran anammox dalam ventilasi hidrotermal (*hydrothermal vents*) laut dalam. Sampel dikumpulkan dari lima lokasi lubang hidrotermal dari *Mid-Atlantic Ridge* (batas divergen atau lempeng tektonika konstruktif yang terletak di sepanjang dasar Samudra Atlantik, dan merupakan bagian dari rangkaian pegunungan terpanjang di dunia) pada kedalaman mulai dari 750 hingga 3650 m. Bukti keberadaan bakteri anammox di habitat khusus ini ditunjukkan oleh analisis gen 16S rRNA, analisis lipid *ladderane* dan pengukuran produksi $^{29}N_2$ dalam percobaan pasangan isotop (*isotope-pairing*) pada 60°C dan 85°C.

4.3. Interaksi Mikroba Dalam Siklus N Laut

Saat ini diperkirakan bahwa bakteri anammox berkontribusi sekitar 50% terhadap hilangnya nitrogen terikat secara global. Perhitungan ini didasarkan pada asumsi bahwa satu-satunya sumber amonium untuk bakteri anammox adalah difusi ke atas amonium yang berasal dari mineralisasi anaerob di zona sulfida ke OMZ. Sumber amonium lain yang mungkin seperti *dissimilatory reduction of nitrate to ammonium* (DNRA) yang tidak dipelajari dengan baik di ekosistem laut. Baru-baru ini ditunjukkan bahwa DNRA dapat memasok bakteri anammox dengan amonium yang dibutuhkan. Sumber nitrit yang cukup dan

persaingan terhadap jumlah nitrit yang terbatas belum dipahami. Di satu sisi, di daerah lautan yang terdapat oksigen, mikroba pengoksidasi amonium aerobik dapat memberikan nitrit untuk bakteri anammox, sementara bakteri pengoksidasi nitrit bersaing untuk mendapatkan nitrit. Kerjasama antara bakteri anammox dan bakteri pengoksidasi aerob telah dikonfirmasi dalam percobaan laboratorium. Di bagian lautan yang anoksik, bakteri pereduksi nitrat dapat menghasilkan nitrit untuk bakteri anammox dalam kondisi keterbatasan donor elektron, sementara mikroba denitrifikasi juga akan bersaing untuk mendapatkan nitrit ketika donor elektron yang cukup tersedia.

Sampai saat ini, bakteri pengoksidasi ammonium *betaproteobacteria* (*Nitrosomonas*, *Nitrosospira* atau *Nitrosococcus*) dianggap bertanggung jawab atas nitrifikasi di laut, walaupun jumlah sel mereka yang sebenarnya relatif rendah. Namun, beberapa bukti telah menunjukkan bahwa *Crenarchaea*, yang berjumlah sekitar 20% dari semua sel prokariotik yang ada di lautan global, dapat terlibat dalam proses nitrifikasi dan kemudian memberikan nitrit untuk bakteri anammox. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa bakteri anammox dan *Crenarchaea* dapat bekerja sama dalam ekosistem yang terbatas oksigen (*oxygen-limited ecosystems*). Di Laut Hitam bakteri anammox menghuni *interface* aerob-anaerob, di mana baik amonium dan nitrit dapat ditemukan. Menariknya, nitrit dipasok oleh bakteri pengoksidasi amonium aerob dan *Crenarchaea* menempati zona sub-oksik yang berbeda. Setengah dari nitrit diperkirakan dihasilkan oleh nitrifier *gammaproteobacteria* yang menempati zona di mana hampir tidak ada oksigen, dan setengah nitrit lainnya oleh *Crenarchaea* yang tinggal di zona dengan konsentrasi oksigen yang relatif lebih tinggi.

Mikroba pengonversi nitrit alami bersama mikroba pengoksidasi amonium di lautan belum sepenuhnya ditetapkan dan mungkin tergantung pada kondisi fisiologis lokal. Misalnya dalam kondisi oksigen rendah, bakteri anammox mungkin disukai, sedangkan bakteri pengoksidasi nitrit aerobik yang mengubah nitrit menjadi nitrat mungkin lebih berperan dalam kondisi oksigen yang lebih tinggi. Organisme yang bertanggung jawab untuk oksidasi aerobik nitrit dalam proses nitrifikasi laut sebagian besar masih belum diselidiki. Pengetahuan yang ada sebagian besar didasarkan pada data molekuler dan kultur pertumbuhan aktif bakteri pengoksidasi nitrit yang langka.

Respon bakteri anammox terhadap keberadaan kompetitor denitrifikasi terhadap (surplus) senyawa karbon di ekosistem laut

belum dieksplorasi. Beberapa bakteri anammox air tawar seperti *Ca. Brocadia fulgida* atau *Ca. Anammoxoglobus propionicus* dapat secara efektif bersaing untuk asetat atau propionat, tetapi belum diketahui bagaimana bakteri anammox laut menanggapi peningkatan ketersediaan karbon. Kultur pengayaan spesies *Ca. Scalindua* adalah titik awal yang sangat baik untuk menyelidiki kompetisi ini dengan menambahkan peningkatan jumlah asetat.

4.4. Anammox Dalam Ekosistem Air Tawar dan Terrestrial

Bukti langsung pertama untuk proses anammox dalam sistem *lacustrine*, Danau Tanganyika, danau terbesar kedua di dunia. Inkubasi dengan nitrat berlabel ^{15}N menunjukkan bahwa anammox terjadi di lapisan air suboksik pada kedalaman air 100-110 m. Biomarker lipid *ladderane* ditemukan dalam air yang disaring dari kedalaman yang sama dan FISH mengungkapkan hingga 13.000 bakteri anammox per ml (1,4% dari jumlah total). Analisis filogenetik dari gen 16S rRNA menunjukkan sekuens yang ada berkaitan erat dengan bakteri anammox yang dikenal "*Candidatus Scalindua brodae*". Tingkat anammox sebanding dengan yang dilaporkan untuk kolom air laut. Lebih dari sekitar 13% dari N_2 yang diproduksi dapat dikaitkan dengan proses anammox sedangkan sisanya terkait dengan denitrifikasi. Dalam sebuah survei tentang keanekaragaman hayati dan kelimpahan bakteri pengoksidasi amonium aerob dan anaerob dalam sampel sedimen dari Sungai Xinyi (Cina), gen 16S rRNA dan sel-sel bakteri (FISH) yang terkait erat dengan bakteri anammox yang sudah dikenal yaitu *Ca.* "*Brocadia anammoxidans*" ditemukan disana. Juga di ekosistem tanah, habitat dengan amonium tinggi dan konsentrasi oksigen rendah tersebar luas, tetapi keberadaan dan aktivitas anammox dalam ekosistem tanah belum pernah diselidiki. Namun, baru-baru ini sebuah survei molekuler menunjukkan bahwa sekuen anammox 16S rRNA dapat diambil dari beberapa sampel tanah dan air tanah.

4.5. Penelitian Anammox di Indonesia

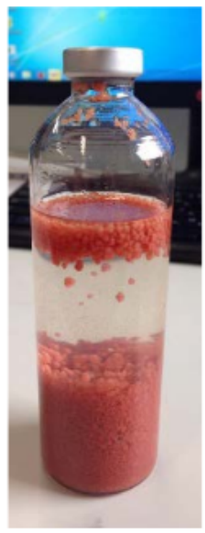
Penelitian tentang anammox masih sangat terbatas di Indonesia bandingkan dengan perkembangan penelitian yang sangat pesat di dunia, sebagaimana terlihat pada gambar 4.1. Sampai tahun 2018 belum ada informasi tentang kelompok penelitian khusus anammox

yang berkelanjutan dan menghasilkan publikasi di skala nasional maupun internasional. Terdapat satu penelitian yang dipublikasikan oleh Agustina, et al. (2017) tentang aplikasi proses anammox untuk penghilangan nitrogen ada suhu rendah di Indonesia menggunakan bakteri anammox strain KSU-1 yang berasal dari Osaka University, Jepang. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa proses anammox mampu berlangsung pada suhu tropis dengan tingkat penyisihan nitrogen maksimum 1,05 kg-N/m^3.h, akan tetapi penelitian ini tidak berlanjut (komunikasi pribadi).

Gambar 4.1. Distribusi geografis global penelitian anammox dari tahun 1995 – 2018 dari hampir semua wilayah di dunia kecuali beberapa negara Afrika dan Asia.

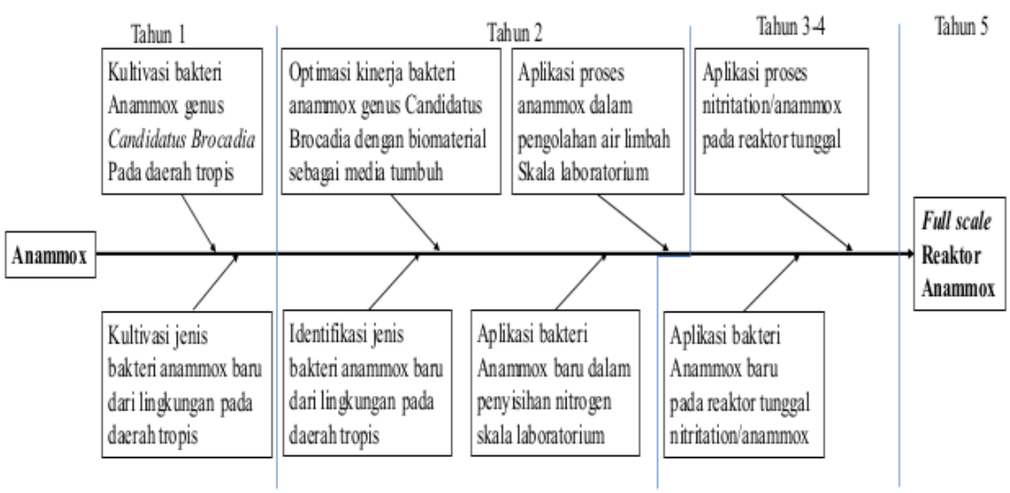
Saat penulis kembali ke Indonesia pada akhir bulan Maret 2018, salah satu cita-cita yang ditekadkan adalah, bisa membangun reaktor anammox skala besar pertama di Indonesia untuk pengolahan air limbah, berbekal 20 mL granul bakteri anammox spesies *Ca. Brocadia sinica* yang di bawa dari *Kanazawa University*, Jepang. Maka dimulai membiakkan bakteri anammox dengan destilator gelas yang sudah patah, karena keterbatasan peralatan, tapi bisa difungsikan seperti reaktor UASB yang dioperasikan pada suhu ruangan di Universitas Andalas, Padang. Pembuatan substrat tidak menggunakan air destilat, sebagaimana teknik pembuatan kultul murni yang harus steril untuk menghindari kontaminan, akan tetapi menggunakan air yang berasal dari sistem penyediaan air bersih yang dikelola mandiri

oleh Universitas. Hal ini sama halnya yang dilakukan oleh Zhang and Okabe (2020) yang menggunakan air tanah yang tersedia di Hokaido University, Jepang untuk pengayaan bakteri anammox selama bertahun-tahun.



Gambar 4.2. Bakteri anammox *Ca. Brocadia sinica*, dari Kanazawa University, Jepang.

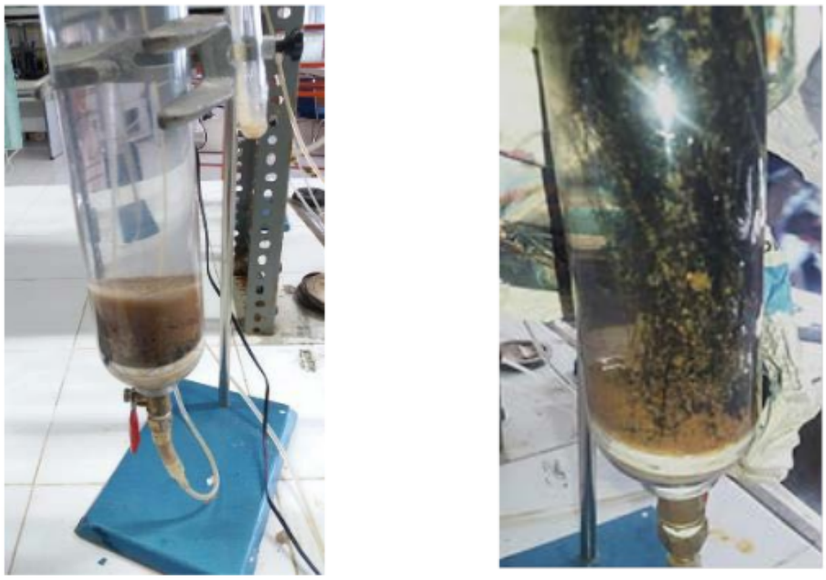
Memulai penelitian anammox yang berkelanjutan di Indonesia membutuhkan perencanaan panjang yang dituangkan dalam roap map penelitian sebagaimana gambar 4.3.



Gambar 4.3. Roadmap penelitian anammox oleh group peneliti anammox, Universitas Andalas.

Dengan roadmap yang sudah disusun, dapat diukur capaian penelitian yang sudah, sedang dan akan dijalankan untuk mewujudkan cita-cita yang diinginkan. Pada tahun pertama fokus penelitian group anammox lebih kepada kultivasi bakteri anammox yang dibawa dari Kanazawa University pada suhu tropis, untuk melihat kinerja dan kemampuan dalam beradaptasi pada suhu yang lebih rendah dari suhu optimalnya, dimana spesies *Ca. Brocadia sinica* memiliki kinerja optimal pada suhu 35 - 40 °C (Oshiki, et al. 2011). Empat buah reaktor UASB ukuran 300 mL dioperasikan dengan menggunakan biomasa berbentuk granular dan biofilm. Untuk reaktor anammox biofilm digunakan media lekat yang berbeda, yaitu plastik yang berasal dari botol air minum kemasan yang dibuat berbentuk bulat panjang, ijuk dan ampas kulit tebu. Selain membandingkan kinerja penghilangan nitrogen juga untuk mencari media lekat yang sesuai dan tersedia melimpah di sekitar sehingga nantinya biaya material yang dibutuhkan untuk konstruksi reaktor skala percontohan dan skala besar dapat diefisienkan.

Dengan bantuan dari Kementrian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi kala itu tahun 2019, melalui hibah penelitian magister, maka penelitian dapat dijalankan dengan baik dan menghasilkan luaran yang melebihi dari yang dijanjikan. Dengan ikut memberdayakan juga mahasiswa sarjana terlibat dalam penelitian anammox untuk tugas akhir dari hibah yang didapatkan. Pada penelitian tahun pertama didapatkan kesimpulan bahwa didapatkan hasil yang hampir sama penggunaan granul anammox dengan media ijuk untuk parameter tingkat penghilang nitrogen yaitu 0,196 kg-N/m^3 berbanding 0,200 kg-N/m^{3}dengan waktu tinggal hidrolis 12 jam. Hal ini terjadi karena bakteri anammox gagal membentuk flok pada ijuk karena permukaan yang terlalu tipis walaupun biofilm tetap terbentuk, sehingga kinerja penyisihan nitrogen maksimal berlangsung pada bagian bawah reaktor sebagaimana halnya reaktor dengan granul anammox seperti terlihat pada gambar 4.4 berikut :



Gambar 4.4. Perbandingan reaktor anammox granular dengan biofilm menggunakan ijuk.

Kinerja terbaik di dapatkan dengan menggunakan media lekat plastik yang dibentuk seperti sedotan dan diisi 50% dari volume reaktor. Dimana tingkat penyisihan nitrogen mencapai 0,250 kg-N/ m^3 dengan kondisi operasional yang sama dan efisiensi penyisihan nitrogen mencapai 96% (Zulkarnaini et. al. 2019). Penambahan media lekat yang sesuai dapat meningkatkan penyisihan nitrogen, dimana terjadi kontak yang lebih intensif antara biomasa bakteri dan anammox dengan substrat sehingga nitrogen yang dihilangkan lebih tinggi dan bakteri bekerja secara optimal. Sedangkan kondisi yang tidak optimal didapatkan ketika menggunakan kulit ampas tebu. Pada penelitian menggunakan ampas tebu terjadi proses inhibisi yaitu penghambatan proses anammox karena keberadaan senyawa organik yang melebihi ambang batas, dimana senyawa organik pada konsentrasi tertentu akan menjadi inhibitor bagi bakteri anammox. Hal ini terlihat dari penurunan tingkat penyisihan nitrogen pada reaktor dan secara visual juga dapat dilihat dari perubahan biomasa anammox yang berubah menjadi hitam. Warna hitam merupakan indikasi bahwa biomasa anammox mengalami kematian (gambar 4.5). Bakteri anammox dengan kinerja terbaik adalah merah terang atau merah tua, sedangkan bakteri yang pucat merah menjadi hitam menunjukkan penurunan aktivitas dan bahkan kematian dan pada bakteri (Ali, et al. 2013).

Gambar 4.5. Reaktor anammox dengan media tumbuh, A. plastik, B. kulit ampas tebu

Salah satu faktor penghambat yang dapat menyebabkan kematian pada bakteri Anammox adalah tingkat bahan organik (COD). Menurut Tang, et al. (2010) proses anammox mulai terhambat ketika rasio COD:NO_2^--N adalah 1,68, dimana heterotrofik denitrifier akan tumbuh dengan cepat, sehingga bakteri anammox tidak dapat berkompetisi dengan heterotrofik denitrifier dalam hal ruang dan aseptor elektron (nitrit). Ketika rasio COD:NO_2^--N mencapai 2,92 maka proses anammox hampir tidak terjadi. Hal ini terjadi pada reaktor yang menggunakan media lekat kulit ampas tebu, dimana pada hari ke 96 operasional reaktor, kinerja penyisihan menurun secara signifikan. Dan bakteri anammox mengalami kematian parsial, ini ditunjukkan oleh terjadinya perubahan warna pada bakteri yang menempel pada media menjadi hitam. Setelah mengukur konsentrasi COD, didapatkan konsentrasi sebesar 140,8 mg/L dengan rasio COD:NO_2^--N 2,02. Nilai rasio ini cukup untuk menjelaskan penurunan kinerja penghilangan nitrogen disebabkan oleh rasio COD:NO_2^--N melebihi batas inhibisi yang dijelaskan diatas. Namun, proses inhibisi ini tidak terjadi dari awal penelitian karena kinerja penghilangan nitrogen cendrung naik, sehingga tidak ada pengukuran COD yang dilakukan. Konsentrasi COD yang tinggi dapat disebabkan oleh pelapukan media ampas kulit tebu yang terjadi secara perlahan selama proses penelitian. Pernyataan ini didukung oleh Yosephine, et al. (2012) yang menyatakan terdapat 37% kandungan selulosa dalam ampas tebu. Selulosa ini terurai dan menyebabkan tingginya kadar COD dalam reaktor. Untuk pemulihan proses anammox dan mengatasi inhibisi karena COD, maka konsentrasi

NO_2^--N ditingkatkan agar rasio COD:NO_2^--N menjadi 1.

Meskipun kinerja penyisihan nitrogen tinggi dengan konsentrasi influen ammonium dan nitrit masing – masing 70 mg-N pada suhu di bawah optimum. Akan tetapi terjadi perubahan warna biomasa anammox dari merah terang menjadi merah kecoklatan yang merupakan indiakator visual yang berkorelasi dengan penurunan kinerja bakteri anammox. Ma, et al. (2019) melaporkan bahwa perubahan warna biomasa berkaitan dengan kandungan heme c protein yang nilainya menjadi indikator kinerja bakteri anammox dan berubah dengan perubahan suhu. Hal ini sesuai dengan karakteristik bakteri anammox *Ca. Brocadia sinica* yang digunakan memiliki kinerja optimum pada suhu 30 – 45 °C. Suhu tersebut berada diatas suhu di Indonesia, maka butuh biaya besar untuk operasional dalam kondisi optimal.

4.6. Eksplorasi dan Identifikasi Bakteri Anammox Tropis

Saat ini lebih dari 24 spesies bakteri anammox yang telah berhasil diidentifikasi yang tergabung pada 7 genus di dalam filum *Planctomycetes*. Penemuan ini berkembang di negara yang memiliki perhatian yang tinggi terhadap kualitas lingkungan yang dipengaruhi oleh konsentrasi nitrogen di lingkungan seperti Eropa dan China yang termasuk pada negara sub-tropis. Indonesia yang merupakan negara tropis memiliki perhatian yang masih rendah terhadap kondisi pencemaran oleh nitrogen di lingkungan walaupun dampak nitrogen di lingkungan dapat dilihat di mana-mana seperti terjadinya eutrofikasi. Umumnya bakteri anammox ditemukan pada daerah yang memiliki konsentrasi nitrogen yang tinggi seperti pada daerah yang mengalami eutrofikasi oleh air limbah industri pupuk. Maka perlu dilakukan identifikasi bakteri anammox yang ada di Indonesia dengan melakukan kultivikasi terhadap sampel lumpur yang ada di lingkungan yang mengalami eutrofikasi dengan substrat yang mengandung makanan bagi bakteri anammox yaitu ammonium dan nitrit.

Dari hasil yang sudah diperoleh pada tahun 2018-2019, pada tahun kedua penelitian, pertengahan tahun 2019, dimulai eksplorasi bakteri anammox yang berasal dari Indonesia dan hidup pada suhu tropis. Sehingga bakteri ini lebih sesuai untuk dikembangkan dan diaplikasikan untuk pengolahan air limbah di Indonesia untuk penghilangan nitrogen. Secara umum bakteri anammox ada di berbagai ekosistem di lingkungan seperti danau, sungai, ait tanah, *wetland*,

muara sungai, lautan dan sistem buatan seperti IPAL. Akan tetapi di Indonesia, keberadaan IPAL masih sangat minim dan operasional yang belum kontinu. Maka pilihan terbaik adalah pengayaan bakteri anammox dari ekosistem lingkungan. Karena keberadaan bakteri anammox yang sangat rendah kelimpahannya di lingkungan, maka parameter yang perlu diperhatikan adalah lokasi yang memiliki konsentrasi nitrogen berlebih di lingkungan dan menimbulkan dampak terhadap lingkungan. Secara umum, dampak lingkngan yang ditimbulkan oleh kelebihan kadar nitrogen bersama dengan nutrient lain adalah eutrofikasi. Pertumbuhan tanaman peraian yang tidak terkendali, sehingga menutupi permukaan peraian. Eutrofikasi sering dijumpai di berbagai tempat di Indonesia. Tanaman yang tumbuh diantaranya eceng gondok dan kiambang. Di daerah Koto Baru, Kabupaten Tanah Datar, Sumatera Barat terdapat sebuah danau yang dinamakan oleh masyarakat sekitar "Danau Talago", lebih dari 50% permukaan danau ditutupi oleh tanaman kiambang dan sisanya dilakukan pembersihan secara berkala.

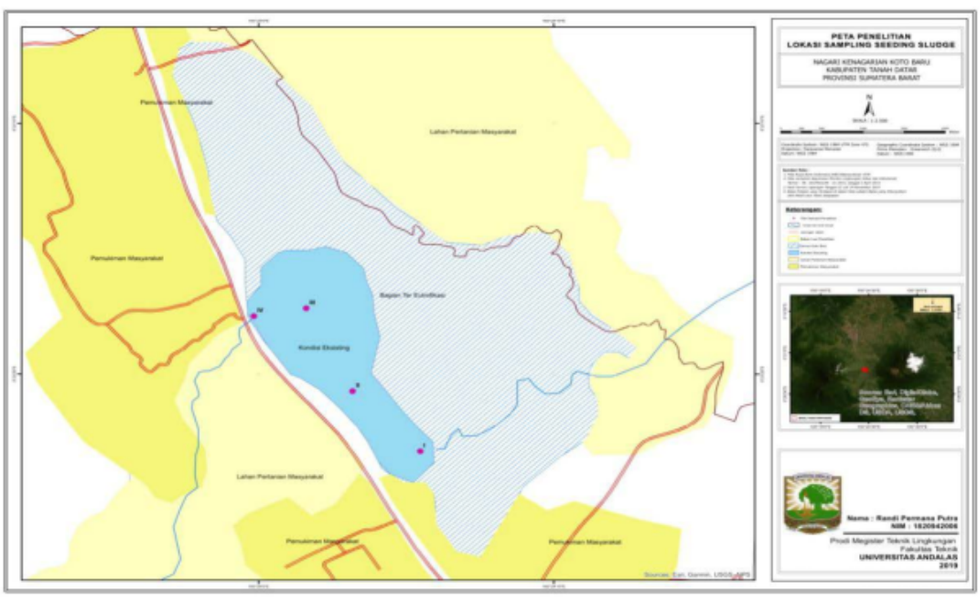
Pada tanggal 31 Juli 2019, dilakukan pengambilan sampel di Danau Talago, dengan lokasi sampling pada gambar 4.6. Titik koordinat pengambilan sampel dijelaskan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Koordinat pengambilan sampel di Danau Talago, Koto Baru, Kabupaten, Tanah Datar

No	Titik sam-pling	Koordinat			
		Geografis		UTM*	
		X	Y	X	Y
1	I	100° 24' 5,400" E	0° 23' 23,075" S	1.004.015	-0,389743
2	II	100° 24' 3,110" E	0° 23' 20,674" S	100.400.864	-0,389076
3	III	100° 24' 1,537" E	0° 23' 17,376" S	100.400.427	-0,38816
4	IV	100° 23' 59,766" E	0° 23' 17,682" S	100.399.935	-0,388245

* *Universal Transverse Mercator* (UTM)

Gambar 4.6. Pengambilan sampel di Danau Talago, Koto Baru, Kabupaten Tanah Datar, Propinsi Sumatera Barat.

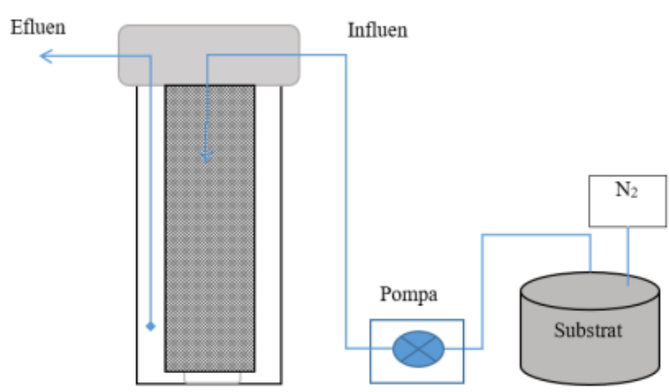


Gambar 4.7. Lokasi pengambilan sampel lumpur pada Danau Talago, Koto Baru, Kabupaten Tanah Datar.

Pengayaan bakteri anammox dari lumpur Danau Talago dilakukan di Politeknik ATI Padang yang merupakan penelitian dari mahasiswa magister Jurusan Teknik Lingkungan. Sekaligus untuk menghindari terjadinya kontaminasi dengan penelitian yang dilaksanakan di Laboratorium Air Jurusan Teknik Lingkungan Universitas Andalas.

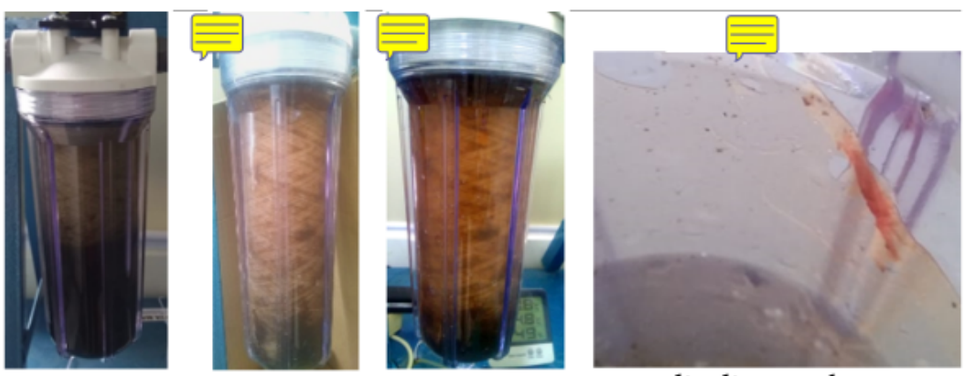
Pembiakan dilakukan di laboratorium menggunakan dua buah reaktor biofilm dengan *string wound filter* sebagai media tumbuh bakteri anammox. Reaktor ini merupakan reaktor pertama digunakan di dunia dengan konfigurasi tersebut diatas. Material yang digunakan dapat ditemukan dengan mudah di pasaran karena merupakan filter yang biasa dipakai di tempat penjualan air minum isi ulang untuk penjernih filter penjernih air. Sehingga akan memudahkan bagi peneliti manapun untuk dapat melakukan penelitian yang serupa di berbagai daerah lain di Indonesia maupun luar negri. Reaktor ini dinamakan *Filter* Bioreaktor dengan singkatan FtBR.

Kedua reaktor dimulai (*start-up*) dengan menambahkan lumpur biakan (*seeding sludge*) dari lumpur Danau Talago Koto Baru, Kabupaten Tanah Datar. Reaktor pertama dioperasikan pada suhu ruangan dan reaktor kedua pada inkubator dengan suhu konstan 35 ^{o}C. Selama operasional reaktor di amati penghilangan konsentasi nitrogen dan gas nitrogen yang terbentuk dengan pemasangan *tedral bag* pada saluran efluen serta pengukuran konsentrasi amonium, nitrit yang disisihkan dan nitrat yang terbentuk sebagai indikator terjadinya proses anammox. Selanjutnya dilakukan identifikasi mikroba yang tumbuh pada reaktor menggunakan *illuminate Miseq Sequencing* di *Kanazawa University*, Jepang untuk mengetahui keberhasilan dalam kultivikasi bakteri anammox. Konfigurasi dan reaktor kultivasi diperlihatkan pada gambar 4.7.



Gambar 4.8. Konfigurasi rekator kultivasi bakteri anammox.

Pada minggu pertama kultivasi terjadi penurunan konsentrasi nitrit yang tajam, akan tetapi tidak sebanding dengan konsentasi ammonium, yang konsentrasinya meningkat dibandingkan dengan influen. Hal ini terjadi karena proses demineralisasi bahan organik pada lumpur. Kondisi ini berlanjut selama dua bulan hingga semua lumpur dikeluarkan dari reaktor. Pada hari ke 106 mulai kelihatan perubahan warna biofilm yang tumbuh pada filter berubah dari hitam menjadi merah, yang merupakan warna spesifik bakteri anammox selain penghilangan ammonium dan nitrit sebagaimana persamaan (1) selama proses kultivasi. Biofilm merah semakin tebal hingga 180 hari proses kultivasi. Selain pada filter, biofilm juga tumbuh pada dinding reaktor bagian dalam (gambar 4.8), Untuk memastikan bahwa bakteri yang tumbuh adalah bakteri anammox maka sampel biomasa diambil pada hari ke 200 untuk dilakukan analisa mikrobiologi mengunakan *illuminate Miseq Sequencing* yang di bawa langsung ke *Kanazawa* University untuk di analisis.



Gambar 4.9. Gambar pertumbuhan biofilm merah pada FtBR.

Hasil analisa mikrobiologi menunjukkan bahwa terdapat 2 genus bakteri anammox yang tumbuh yaitu *Ca. Brocadia* dan *Ca. Anammoxoglobus* pada reaktor yang dioperasikan pada suhu 35 ^{o}C dengan kelimpahan relatif kecil, akan tetapi pada reaktor yang dioperasikan pada suhu ruangan hanya genus *Ca. Brocadia* yang tumbuh (gambar 4.9). Terdapat tiga spesies yang tergolong pada genus *Ca. Brocadia* berhasil diperkaya pada reaktor. Maka dilakukan analisis filogenetik untuk melihat kemiripan *sekuens* gen 16s rRNA bakteri yang didapat dengan basis data bakteri yang sudah diketahui menggunakan basis data SILVA dan software ARB.

Didapatkan hasil yang menarik dimana, berdasarkan analisis pohon filogenetik (gambar 4.10) FtBR1 memiliki kesamaan sekuens gen 16S rNA 98% dengan *Ca. Brocadia sinica* dengan kelimpahan terkecil dalam sampel 0.01% dari total total *reads* (bacaan). Sedangkan, FtBR4 memiliki kesamaan sekuens gen 16S rNA 94% dengan *Ca. Brocadia caroliniensis* dengan kelimpahan ketiga pada level genus yaitu 6.20%. Dan bakteri yang dominan dengan keimpahan 20.04% adalah FtBR2 dengan kesamaan sekuens gen 16S rNA 96% dengan *Ca. Brocadia fulgida*). Berdasarkan *An average nucleotide identity* (ANI) batas kesamaan pasangan sekuens > 95% menunjukkan spesies yang sama (Figueras, et al. 2014).

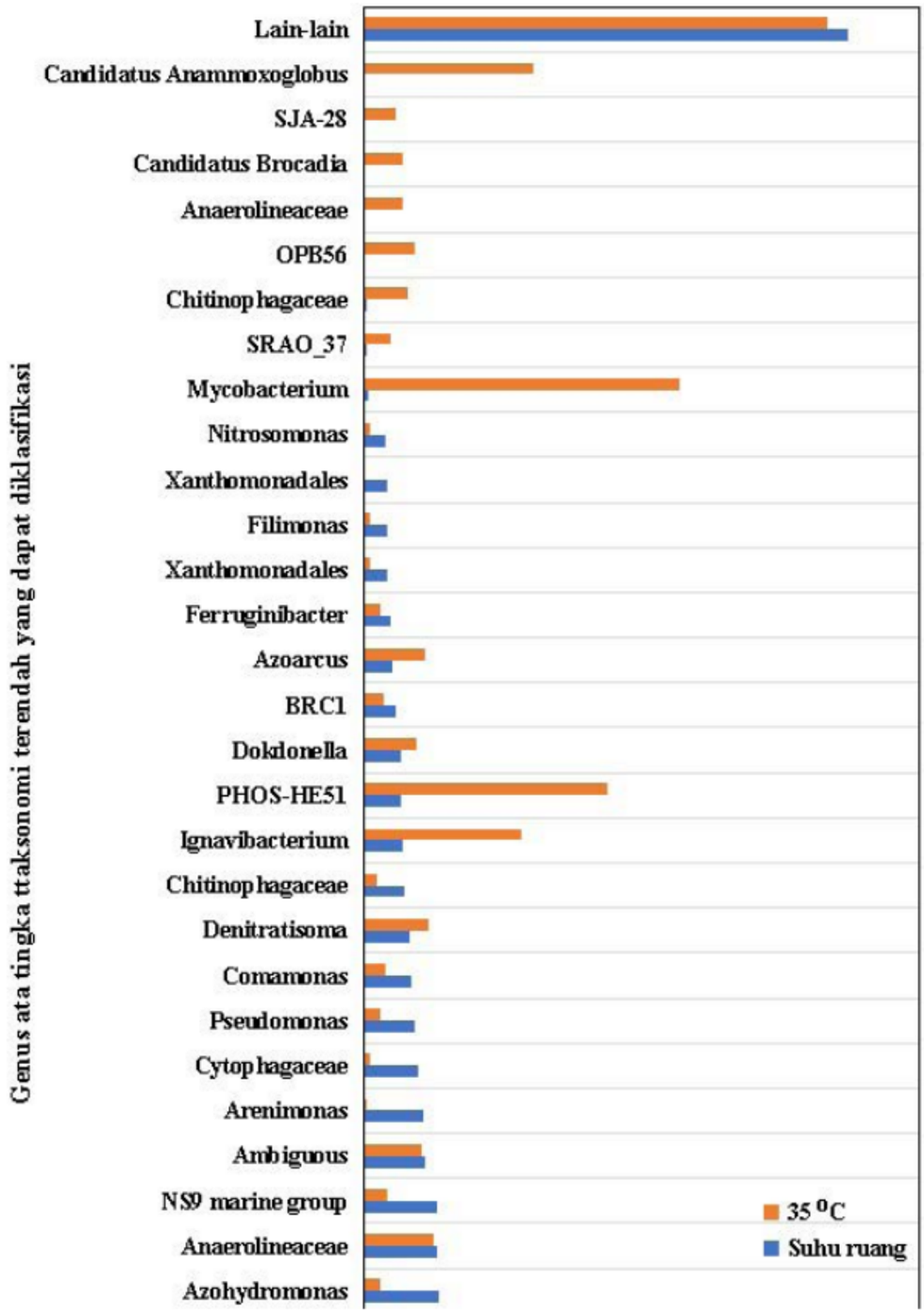
Tabel 4.2. Kemiripan sampel bakteri genus Ca. Brocadia dan Ca. Anammoxoglobus FtBR berdasarkan sekuens gen 16S rRNA

No	Sekuen	Kelimpahan (%)	Spesies acuan	*Identity* (%)
1	FtBR1	0,01	*Ca. Brocadia sinica*	98
2	FtBR2	20.04	*Ca. Brocadia fulgida*	96
3	FtBR3	7,64	*Ca. Anammoxoglobus propionicus*	93
4	FtBR4	6.20	*Ca. Brocadia caroliniensis*	94

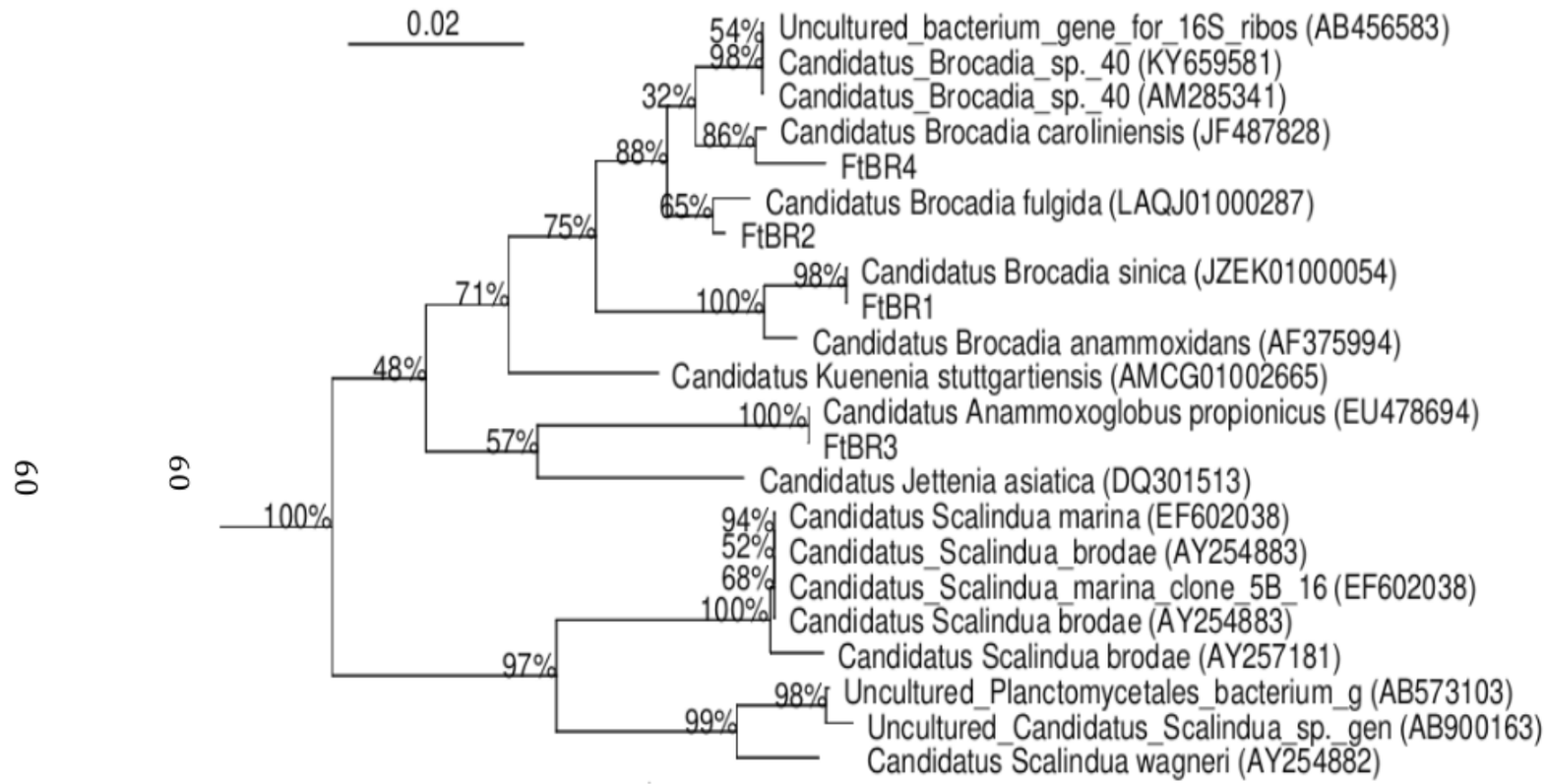
Penemuan dua spesies baru bakteri anammox yang berasal dari lingkungan tropis yaitu dari Danau Talago, Koto Baru, Kabupaten Tanah Datar, Propinsi Sumatera Barat, merupakan yang pertama di Indonesia. Sekaligus membuktikan bahwa bakteri anammox sudah menjalankan fungsinya di lingkungan tropis untuk menghilangkan nitrogen dari perairan menjadi gas nitrogen. Dua jenis bakteri baru tersebut diberi nama sesuai panduan taksonommi yaitu Candidatus Brocadia tropica untuk FtBR2 dan Candidatus Brocadia hajjkanazawa untuk FtBR4. Nama tropika diberikan oleh mahasiswa bimbingan penelitian S2 yang menjalankan penelitian tersebut merujuk kepada spesies anammox tropis yang pertama kali ditemukan. Sedangkan nama hajjkanazawa diberikan oleh penulis sendiri. Kata hajjkanazawa memiliki makna tersendiri, dimana pada tahun 2015 setahun menjalani studi doctoral di Kanazawa University Jepang, penulis menunaikan ibadah Haji ke

Baitullah, Makkah. Pada momen mulia dan berharga tersebut, salah satu do'a di multazam (dinding antara hajar aswad dan pintu Ka'bah) yaitu mohon diberikan ilmu untuk bisa menemukan bakteri baru yang bermanfaat untuk pengolahan air limbah dan nama hajjkanazawa sudah disiapkan sebelum selesai melaksanakan studi. Setelah 5 tahun doa tersebut dikabulkan oleh Allah SWT.

Selain bakteri anammox genus *Brocadia*, pada reaktor FtBR yang dioperasikan pada suhu 35 °C tumbuh bakteri anammox *Genus Anammoxoglobus*. *Ca. Brocadia Anammoxoglobus* termasuk bakteri anammox langka karena spesies ini juga dapat mengoksidasi senyawa organic. Kondisi operasional pada suhu 35 °C menunjukkan *Ca. Brocadia Anammoxoglobus* bekerja pada suhu tinggi untuk menghilangkan nitrogen dan mengoksidasi senyawa organik. Berdasarkan gambar 4.10, FtBR3 memiliki kesamaan 92% dengan *Ca. Brocadia Anammoxoglobus propionicus.* Spesies ini tumbuh dominan dibandingkan bakteri anammox spesies lainnya dengan kondisi terdapat senyawa propionat, ammonium, nitrit dan nitrat dalam skala laboratorium menggunakan SBR pada suhu percobaan 33 °C (Kartal, et al. 2008). Peta terbaru distribusi sebaran penemuan bakteri anammox dapat dilihat pada Gambar 4.

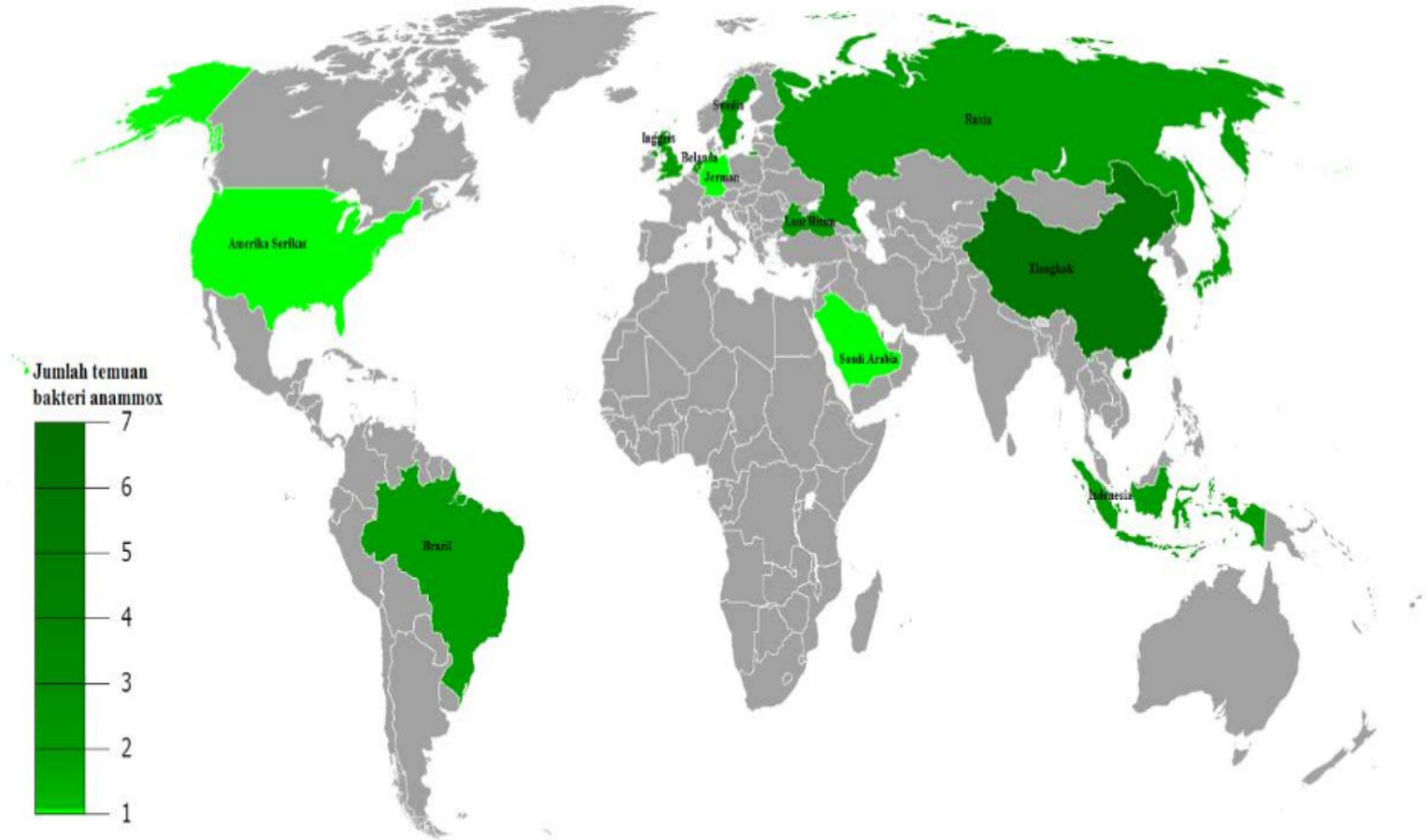


Gambar 4.10. Kelimpahan mikroba pada reaktor kultivasi FtBR pada tingkat genus.



Ket : nomor akses dalam tanda kurung, setelah nama spesies.

Gambar 4.11. Pohon filogenetik yang dihitung dengan metode Neighbor-Joining dan analisis nilai bootstrap dilakukan dengan 1.000 sampel ulang.



Gambar 4.12. Distribusi sebaran penemuan bakteri anammox di dunia.

BAB V
TREN DAN APLIKASI ANAMMOX

5.1. Tren saat ini Aplikasi Anammox

Bakteri anammox ada di mana-mana dan tersebar luas di ekosistem yaitu permukaan dan bawah permukaan tanah, air tawar dan laut, *wetland* alami, dan sistem buatan (instalasi pengolahan air limbah). Hal ini menunjukkan kemampuan beradaptasi dan evolusi bakteri anammox; sel-sel anammox dengan kemampuan menggunakan NH_4^+ dan NO_2^-/NO_3^- untuk membentuk N_2 mungkin telah memanfaatkan N anorganik yang tersedia pada konsentrasi rendah dan kemudian berevolusi menjadi dapat beradaptasi pada konsentrasi N anorganik yang lebih tinggi dan juga asimilasi asam organik yang berat molekulnya rendah. Tujuh genus bakteri anammox yang sudah dikenal menunjukkan perbedaan filogenik yang sangat jelas dalam hal bahwa genus *Scalindua* tampaknya terkait jauh dengan enam genus lainnya. Hubungan seperti itu juga berkorelasi dengan toleransi atau kemampuan beradaptasi mereka terhadap N anorganik yang tersedia dalam media kultur, dalam hal itu *Scalindua* lebih suka konsentrasi N anorganik rendah, misalnya, lautan terbuka dan *wetland* air tawar tanpa pengaruh antropogenik, sedangkan lainnya tumbuh aktif di instalasi pengolahan air limbah dan *wetland* pesisir dan sungai dimana terjadi polusi oleh air limbah dan limpasan (*run off*) permukaan. Hubungan evolusi di antara bakteri anammox dapat memberikan informasi penting tentang faktor pendorong perubahan biologis dalam kelompok mikroorganisme ini. Informasi tersebut dapat memberikan pencerahan tentang perubahan iklim atau dampak antropogenik di planet Bumi.

Aplikasi anammox skala laboratorium dalam menghilangkan berbagai jenis air limbah yang kaya akan amonia seperti air lindi lahan urug, limbah industri optoelektronik, efluen digesti anaerob, dll., telah berhasil dilakukan (Tabel 5.1) proses anammox dua tahap (nitrifikasi parsial-anammox) dan satu-tahap [CANON (*completely autotrophic nitrogen removal over nitrit*) dan *simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification* (SNAD)] telah digunakan untuk penghilangan amonia (Tabel 5.1). Sudah 114 reaktor anammox skala besar berhasil dioperasikan di seluruh dunia. Sebagian besar

reaktor anammox skala besar ini berada di Eropa, Cina, Taiwan, Jepang dan Amerika Serikat. Reaktor anammox skala besar pertama (70 m^3) yang dirancang oleh Paques BV dimulai di Rotterdam, Belanda, pada tahun 2007 dan mengolah hingga 750 kg-N/hari. Waktu *start-up* untuk reaktor skala besar pertama ini adalah 3,5 tahun, sedangkan reaktor kedua waktu *start-up* nya setahun. Reaktor anammox skala besar Asia pertama dibangun di Jepang dan hanya membutuhkan waktu 2 bulan untuk *start-up*. Di Taiwan, proses anammox pertama kali diamati di instalasi pengolahan air lindi lahan uruk (*landfill leachate*) skala besar pada tahun 2009. Lumpur anammox diambil dari IPAL skala besar ini digunakan untuk memulai proses anammox dalam tiga IPAL air lindi yang berbeda di Taiwan dengan aliran lindi rata - rata 304, 208, dan 500 CMD oleh perusahaan Leaderman & Associates. Tabel 4.2 memperlihatkan reaktor anammox skala besar yang sudah dioperasikan seluruh dunia untuk pengolahan air limbah yang dibangun oleh perusahaan PAQUES BV, Belanda.

Tabel 5.1. Reaktor anammox skala besar yang dibangun oleh perusahaan PAQUES.

Proses	Lokasi	Air limbah	Vol-ume (m^3)	Kap-asitas desain (kg-N/d)	Tahun
SHARON anammox	Rotterdam, NL		72	490 (750)[b]	2002
Nitrifikas anammox	Lichtenvoor-de, NL	Penyamakan	100	325 (150)[c]	2004
Anammox	Olburgen, NL	Pengolahan kentang	600	1200 (700)[c]	2006
Nitrifikasi anammox	Mie prefec-ture, JP	Semikondukor	50	220 (220)[b]	2006
Anammox	Niederglatt, Switzerland		180	60 (60)[b]	2008
Anammox	Tongliao, Chi-na	Monosodi-um glutamat (MSG)	6600	11000	2009
Anammox	Yichang, China	Produksi ragi	500	1000	2009

Anammox	Tongliao, China	MSG	4100	9000	2010
Anammox	The Netherlands		425	600	2010
Anammox	Tai'an, China	Pati jagung dan MSG	4300	6090	2011
Anammox	Poland	Penyulingan	900	1460	2011
Anammox	Wuxi, China	Pemanis	1600	2180	2011
Anammox	Wujiaqu, China	MSG	5400	10710	2011
Anammox	Coventry, UK		1760	4000	2011
Anammox	Shaoxing, China	Penyulingan	560	900	2011

Sumber : (Kumar, et al. 2017)

5.2. Aplikasi Proses Anammox dalam Pengolahan Air Limbah

Teknologi pengolahan air limbah konvensional untuk menghilangkan nitrogen menggunakan metode nitrifikasi diikuti dengan denitrifikasi. Amonium dioksidasi menjadi nitrat oleh bakteri pengoksidasi amonium dan nitrit dan nitrat yang dihasilkan direduksi menjadi gas dinitrogen dengan donor elektron yang sesuai (biasanya metanol). Penerapan proses-proses ini tidak hemat biaya (kebutuhan oksigen tinggi, produksi lumpur tinggi dan membutuhkan pasokan donor elektron eksternal) atau tidak ramah lingkungan (mis. ada produksi CO_2 dan N_2O, yang berkontribusi terhadap pemanasan global). Aplikasi bakteri anammox yang dikombinasikan dengan nitrifikasi parsial oleh bakteri pengoksidasi amonium aerob menawarkan alternatif yang cukup menarik.

Tabel 5.2. Aplikasi proses anammox dalam pengolahan air limbah skala laboratorium

Proces	Tahapan proses penghi-langan nitrogen	Air limbah	Tipe reaktor	Volume reaktor (Anam-mox) (L)	Penyisi-han NH_4^+-N (%)
OLAND	Tunggal	air limbah dewa-tering lumpur	MBR	1.5	82
Anammox	Tunggal	Air larian lahan urug	UASB	4.46	87.5
PN-anam-mox-sistem infil-trasi minyak	Dua	Air larian lahan urug	Reaktor upflow fixed-bed biofilm	36	60
PN-anammox	Dua	Livestock ma-nure digester liquor	UASB	3	79.2
Short-cut reaktor nitrifikasi-anammox	Dua	Air larian lahan urug	UASB	8.5	93
Konfigurasi UASB-MBR-SHA-RON-anammox	Dua	Air larian lahan urug	CSTR	2.3	78
SNAD	Tunggal	Air limbah opto-elektronik	SBR	2.5	>85
Anammox	Tunggal	air limbah in-dustri monoso-dium glutamat	SBR	2.2	69-74
SNAD	Tunggal	Digester liquor of swine waste-water	SBR	5	96
CANON	Tunggal	Air limbah opto-elektronik	SBR	18	98
PN-anammox	Dua	Air larian lahan urug	Reaktor Anammox hibrid	5	>90

CANON, *completely autotrophic nitrogen removal over nitrite*; CSTR, *continuous-stirred tank reactor*; MBR, *membrane bioreactor*; SBR, *sequencing batch reactor*; SNAD, *simultaneous partial nitrification, anammox, and denitrification*; UASB, *upflow anaerobic sludge blanket*; PN, OLAND, SHARON.

Bakteri anammox membutuhkan nitrit sebagai akseptor elektron untuk oksidasi amonium anaerob. Tujuan umum dalam penerapan sistem satu-reaktor dan dua-reaktor adalah menyediakan nitrit untuk bakteri anammox, nitrit merupakan senyawa yang jarang ditemukan dalam air limbah pada konsentrasi tinggi. Ini berarti bahwa dalam kedua sistem, sebagian dari amonium yang tersedia harus diubah menjadi nitrit oleh bakteri pengoksidasi amonium secara aerobik. Kemudian, amonium yang tersisa dan nitrit yang terbentuk dikonversi menjadi gas dinitrogen oleh bakteri anammox. Beberapa sistem reaktor yang digunakan diantaranya : CANON (*completely autotrophic removal of nitrogen over nitrite*), DEMON (proses deammonifikasi dengan mengontrol pH), dan proses OLAND (nitrifikasi-denitrifikasi dengan pembatasan oksigen).

Sementara beberapa proses dilakukan dalam reaktor tunggal, proses SHARON (*single reactor system for high-rate ammonium removal over nitrite*) mengambil produk dari proses nitrifikasi parsial (*partial nitrification*) oleh bakteri pengoksidasi amonium secara aerobik dalam kondisi oksigen terbatas pada reaktor terpisah. Bakteri pengoksidasi nitrit tidak berkembang karena waktu penggandaannya yang lama, menghasilkan efluen dengan rasio amonium: nitrit 1:1, yang merupakan influen yang cocok untuk reaktor anammox.

Penerapan bakteri anammox laut untuk menghilangkan nitrogen dari limbah cair berkadar tinggi dan asin dan opsi penggunaan tangki tunggal yang mengeksploitasi potensi denitrifikasi bakteri anammox saat ini sedang dipelajari. Terlihat bahwa baik biomassa anammox yang diperkaya dan tipe OLAND kultur campuran AOB-anammox dapat disesuaikan dengan konsentrasi garam yang tinggi (hingga 3% garam, salinitas air laut) dengan peningkatan secara bertahap kadar garam pada influen air limbah. Selain itu, reaktor kolom biofilm *fixed-bed up-flow* dengan kain nonwoven sebagai *carrier* biomassa digunakan untuk mengembangkan reaktor *highrate* biofilm anammox. Reaktor anammox pertama pada skala industri (75 m^3) di dunia dibangun di Rotterdam, Belanda. Reaktor di *scale-up* secara langsung dari skala laboratorium ke skala besar dan mengolah air limbah hingga 50 kg-N/h. Reaktor menunjukkan kinerja yang stabil pada laju pemuatan tinggi yang tampaknya merupakan hasil dari pembentukan granul anammox dengan kepadatan tinggi dan kecepatan pengendapan tinggi. Menggunakan biomassa dari reaktor sebagai inokulum, dibangun lagi dua reaktor skala besar.

Pengetahuan mendasar tentang metabolisme anammox dan ekspresi gen sangat relevan untuk mengoptimalkan dan memperluas aplikasi bakteri anammox di masa depan. Memahami kemampuan metabolisme dan kompetitif bakteri anammox akan membantu menyempurnakan kondisi operasional dan stabilitas sistem reaktor anammox, dan dapat berperan untuk mempersingkat waktu *start-up* yang relatif lama. Penemuan bahwa bakteri anammox menggunakan Nitrogen monoksida sebagai zat antara akan membuka kemungkinan aplikasi baru dalam menghilangkan NOx dari *exhaust* dan *flue* gas.

5.3. Aplikasi Proses Anammox Pada Suhu Sedang dan Konsentrasi Amonia Rendah

Sebagian besar reaktor anammox dioperasikan pada rentang suhu tinggi berkisar (≥ 30^0C) dan mengolah air limbah berkonsentrasi nitrogen tinggi. Kisaran suhu optimal untuk pertumbuhan bakteri anammox adalah antara 30 dan 40^0C. Aktivitas enzim metabolisme bakteri anammox berkurang karena suhu yang lebih rendah dari nilai optimal. Oleh karena itu, penyerapan nitrit oleh bakteri anammox berhenti pada suhu yang lebih rendah, dan akumulasi nitrit dalam reaktor menyebabkan penghambatan proses anammox (inhibisi). Beberapa laporan menyebutkan bahwa laju penghilangan nitrogen pada reaktor anammox secara signifikan menurun ketika suhu menurun dari ≥30 - ≤20^0C. Operasi reaktor dalam IPAL pada suhu yang lebih tinggi (≥30^0C) tidak ekonomis, sedangkan operasinya pada suhu lebih rendah (≤20^0C) menjadi tantangan bagi para peneliti. Di sisi lain, beberapa jenis air limbah seperti air limbah domestik memiliki konsentrasi amonia yang rendah (≤ 50 mg NH_4^--N/ L).

Beberapa upaya telah berhasil dilakukan dengan menggunakan air limbah sintetis untuk mengoperasikan proses anammox pada suhu yang lebih rendah dan konsentrasi amonia yang lebih rendah. contohnya, Hendrickx, et al. (2012) berhasil memulai reaktor gas *lift* dengan air limbah sintetis yang mengandung 69 mg-N/L (NH_4^+-N+NO_2^--N) sebagai influen pada suhu 20 ^{0}C. Ma, et al. (2013) mempelajari pengolahan air limbah dengan konsentrasi ammonia rendah, (< 20 mg NH_4^+-N) pada UASB dengan suhu di bawah 16 ^{0}C dan 30 ^{0}C. Tingkat penghilangan nitrogen mencapai 2,28 kg-N/m^3.hari pada 16 ^{0}C. Hu, et al. (2013) mempelajari kemungkinan penghilangan nitrogen dari air limbah domestik sintetis dalam SBR dua tahap (nitrifikasi parsial-anammox) pada suhu yang lebih rendah. Kinerja reaktor dapat mencapai lebih dari 90% penghilangan ammonia pada suhu 12 ^{0}C.

5.4. Penghilangan Amonia dan Metana Secara Simultan

Produk akhir dari digesti anaerob adalah amonia dan metana. Metana adalah sumber energi terbarukan dan dapat dikumpulkan untuk produksi listrik dalam fase gas. Namun, *recovery* metana terlarut sangat sulit dan lambat terlepas ke dalam lingkungan dan berkontribusi terhadap efek rumah kaca. Oleh karena itu, dibutuhkan cara untuk menghilangkan metana terlarut bersama dengan amonia dari efluen digesti. Maka dikembangkanlah sebuah proses baru bernama *nitrit-dependent anaerobic oxidation of methane* (n-DAMO). Proses n-damo ini dikatalisis oleh bakteri *Ca. "Methylomirabilis oxyfera"*. Studi awal menunjukkan kelayakan *coculturing* n-DAMO dan bakteri anammox untuk menghilangkan amonia dan metana secara simultan di masa yang akan datang.

5.5. Penelitian dan Aplikasi Anammox di Masa Depan

Semakin banyaknya minat dalam mengembangkan reaktor anammox telah muncul dalam beberapa tahun terakhir. Hal ini karena proses anammox membutuhkan lebih sedikit oksigen, tidak membutuhkan tambahan karbon organik, dan produksi lumpur lebih sedikit, sehingga anammox dianggap sebagai proses berkelanjutan untuk menghilangkan nitrogen pada air limbah. Desain yang memungkinkan dapat berdasarkan pada reaktor anammox anoksik ditambah dengan proses nitrifikasi parsial seperti SHARON atau anammox dan nitrifikasi parsial secara simultan berlangsung dalam reaktor biofilm seperti proses CANON/OLAND atau deammonifikasi aerobik. Implementasi dari anammox dalam pengolahan air limbah perkotaan akan meningkatkan keberlanjutan yang signifikan dari sistem ini. Permasalahan yang muncul ketika memperkenalkan proses anammox adalah laju pertumbuhan bakteri anammox yang sangat lambat (membutuhkan waktu yang lama untuk menjalankan *pilot plant*) dan interaksi yang kompleks dalam biofilm anammox-*nitrifying*, yang perlu penyelidikan lebih lanjut. Selain itu, mempertahankan biomassa secara efisien adalah area penelitian baru dalam rekayasa bio-lingkungan; terutama sangat dibutuhkan dalam menangani biomassa yang tumbuh lambat seperti bakteri anammox. Salah satu metode mempertahankan biomassa adalah dengan meng-immobilisasi-nya dalam media pendukung, misalnya, butiran gel (*gel bead*), spons dan foam poliuretan, dll.

Banyak peneliti telah melaporkan keberhasilan imobilisasi bakteri anammox pada polivinil alkohol (PVA), natrium alginat (SA), campuran PVA dan SA, polietilen glikol, dan gel butiran PVA-SA. Reaktor yang dioperasikan dengan biomassa anammox imobilisasi telah menunjukkan tingkat penghilangan nitrogen yang sangat baik; bagaimanapun juga, biomasa pada lapisan dalam memperlihatkan kontribusi yang lebih sedikit dalam penghilangan nitrogen. Selain itu, sebagian besar studi biomassa imobilisasi telah dilakukan pada skala laboratorium. Ketebalan yang optimal, sifat hidrodinamik, dan daya tahan biomassa yang diimobilisasi untuk operasi real-time dan jangka panjang perlu dieksplorasi, yang mungkin penting dan krusial dalam bidang penelitian anammox pada masa yang akan datang. Di sisi lain, menggabungkan anammox, denitrifikasi, dan sulfidogenesis dalam reaktor tunggal dapat berguna untuk menghilangkan nitrogen, karbon organik, dan sulfat secara bersamaan, daripada menghilangkan setiap polutan dalam suatu rantai berurutan dari unit pengolahan. Pembentukan anammox, denitrifikasi, dan sulfidogenesis dalam reaktor tunggal lebih rumit mengingat kesulitan dalam penentuan kondisi operasi yang menguntungkan termasuk sistem ORP dan rasio NH_4^+: NO_2^-, COD: NO_3^- dan COD: SO_4^{2-}. Selain itu, kompetisi nitrit oleh anammox, denitrifikasi dan sulfidogenesis dapat menciptakan kerumitan dalam pengabungan dari proses ini. Namun, penelitian lebih lanjut tentang optimalisasi jalur biokimia dari proses ini dapat meningkatkan proses pengolahan air limbah.

Keberadaan metanogenik archaea telah diamati pada berbagai sistem pengolahan air limbah seperti proses lumpur aktif dan sistem granul, termasuk sistem anammox. González-Martínez, et al. (2015) mengkonfirmasi keberadaan metanogen dalam berbagai bioreaktor air limbah anammox skala besar. Populasi archaea tertinggi diamati dalam sistem DEMON dan paling sedikit dalam bioreaktor CANON. Komposisi taksonomi komunitas archaeal di reaktor sangat erat berafiliasi dengan *Methanosaeta sp.* dan kehadiran populasi archaeal yang lebih tinggi memiliki kecenderungan untuk mengurangi efisiensi penghilangan nitrogen autotrofik dalam reaktor anammox.

Kehadiran *Methanosaeta* sp. dalam biomassa granular sistem anammox menegaskan adanya beberapa tahapan metana serta siklus nitrogen. Anaerob oksidasi metana dengan mediasi nitrit dan nitrat sebagai akseptor elektron digabungkan dengan metabolisme anammox memungkinkan untuk dilakukan seperti yang dibahas pada bagian sebelumnya. Namun, lebih dari itu investigasi terperinci ke dalam

reaktor anammox skala besar diperlukan untuk lebih memahami peran archaea dan pengaruhnya terhadap eliminasi nitrogen.

Bidang potensial lain dari penelitian anammox meliputi (1) efek dari keberadaan hidrokarbon aromatik dan polutan mikro baru lainnya pada aktivitas anammox dan laju penghilangan nitrogen, (2) jenis EPS yang dikeluarkan dari organisme anammox dan dampaknya terhadap kelangsungan hidup organisme lain yang berkepentingan dalam penghilangan nitrogen, dan (3) pengembangan sistem/ perangkat berbasis sensor untuk pemantauan dan kontrol sistem anammox dan sistem anammox yang digabung dengan proses lain.

DAFTAR PUSTAKA

Agustina, Tuty Emilia , Novia, Gusti Diansyah, Michihiko Ike, and Satoshi Soda. 2017. "Nitrogen Removal by Anammox Biofilm Column Reactor at Moderately Low Temperature." *Indonesian Journal of Fundamental and Applied Chemistry* 72-82.

Ali, Mohammad, Li-Yuan Chai, Chong-Jian Tang, Ping Zheng, Xiao-Bo Min, Zhi-Hui Yang, Lei Xiong, and Yu-Xia Song. 2013. "The Increasing Interest of ANAMMOX Research in China: Bacteria, Process Development, and Application." *BioMed Research International* 1-20.

Figueras, María José, Roxana Beaz-Hidalgo , Mohammad J. Hossain, and Mark R. Liles. 2014. "Taxonomic affiliation of new genomes should be verified using average nucleotide identity and multilocus phylogenetic analysis." *Genome Announcements* 6-7.

González-Martínez, Alejandro , Jose Antonio Morillo-Pérez, María Jesús García Ruiz, Jesus Gonzalez-Lopez, Francisco Osorio, M. V. Martinez-Toledo, and Mark Van Loosdrecht. 2015. "Archaeal populations in full-scale autotrophic nitrogen removal bioreactors operated with different technologies: CANON, DEMON and partial nitritation/anammox." *Chemical Engineering* 194-201.

Hanke, Anna , and Marc Strous. 2010. "Climate, Fertilization, and the Nitrogen Cycle." *Journal of Cosmology* 1838-1845.

Hendrickx, Tim L.G. , Yang Wang, Christel Kampman, Grietje Zeeman, Hardy Temmink, and Cees J.N. Buisman. 2012. "Autotrophic nitrogen removal from low strength waste water at low temperature." *Water Research* 2187-2193.

Hu, Ziye , Tommaso Lotti, Merle de Kreuk, Robbert Kleerebezem, Mark van Loosdrecht, Jans Kruit, Mike S. M. Jetten, and Boran Kartal. 2013. "Nitrogen Removal by a Nitritation-Anammox Bioreactor at Low Temperature." *Applied and Environmental Microbiology* 2807–2812.

Jetten, Mike S. M., Laura van Niftrik, Marc Strous, Boran Kartal, Jan T. Keltjens, and Huub J. M. Op den Camp. 2009. "Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria." *Biochemistry and*

Molecular Biology 65-84.

Jetten, Mike S. M., Marc Strous, Katinka T. Van De Pas-Schoonen, Jos Schalk, Udo G.J.M. Van Dongen, Astrid A. Van De Graaf, Susanne Logemann, Gerard Muyzer, Mark C.M. Van Loosdrecht, and J.Gijs Kuenen. 1999. "The anaerobic oxidation of ammonium." *FEMS Microbiology Reviews* 421-437.

Kartal, Boran , Laura A. van Niftrik, Jayne Rattray, Jack van de Vossenberga, Markus C. Schmid, Richard I. Webb, Stefan Schouten, et al. 2007. "Anammoxoglobus propionicus'' a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria." *Systematic and Applied Microbiology* 39–49.

Kumar, Mathava , Achlesh Daverey, Ji-Dong Gu, and Jih-Gaw Lin. 2017. "Anammox Processes." *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* 381-407.

Ma, Bin , Yongzhen Peng, Shujun Zhang, Junmin Wang, Yiping Gan, Jiang Chang, Shuying Wang, Shanyun Wang, and Guibing Zhu. 2013. "Performance of anammox UASB reactor treating low strength wastewater under moderate and low temperatures." *Bioresource Technology* 606–611.

Ma, Haiyuan , Yanlong Zhang, Yi Xue, Yuanfan Zhang, and Yu-You Li. 2019. "Relationship of heme c, nitrogen loading capacity and temperature in anammox reactor." *Science of the Total Environment* 568–577 Contents.

Mulder, Arnold , A.A. Van de Graaf, Lesley A Robertson, and J.G. Kuenen. 1995. "Anaerobic Ammonium Oxidation Discovered in a Denitrifying Fluidized-Bed Reactor." *FEMS Microbiology Ecology* 177-184.

Oshiki, Mamoru , Masaki Shimokawa, Naoki Fujii, Hisashi Satoh, and Satoshi Okabe. 2011. "Physiological characteristics of the anaerobic ammonium-oxidizing bacterium 'Candidatus Brocadia sinica'." *Microbiology* 1706–1713.

Strous, M., J. J. Heijnen, J. G. Kuenen, and M. S M Jetten. 1998. "The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms." *Applied Microbiology and Biotechnology* 589-596.

Tang, Chong-jian , Ping Zheng, Cai-hua Wang, and Qaisar Mahmood. 2010. "Suppression of anaerobic ammonium oxidizers under high organic content in high-rate Anammox UASB reactor."

Bioresource Technology 1762–1768.

Van De Gaaf, Astrid A., Arnold Mulder, Peter De Bruijn, Mike S. M. Jetten, Lesley A. Robertson, and J. Gijs Kuenen. 1995. "Anaerobic Oxidation of Ammonium Is a Biologically Mediated Process." *Applied and Environmental Microbiology* 1246–1251.

van der Star, Wouter R.L., Wiebe R. Abma, Dennis Blommers, Jan-Willem Mulder, Takaaki Tokutomi, Marc Strous, Cristian Picioreanu, and Mark C.M. van Loosdrecht. 2007. "Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: Experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam." *Water Research* 4149 – 416 3.

Wikipedia. 2020. *https://en.wikipedia.org/wiki/Nitrogen_cycle*. April 19. Accessed April 22, 2020. https://en.wikipedia.org/wiki/Nitrogen_cycle.

Yosephine, Allita, Gala Victor, Aning Ayucitra, and Ery Susiany Retnoningtyas. 2012. "Pemanfaatan ampas tebu dan kulit pisang dalam pembuatan kertas serat campuran." *Jurnal Teknik Kimia Indonesia* 94-100.

Zhang, Lei , and Satoshi Okabe. 2020. "Ecological niche differentiation among anammox bacteria." *Water Research* 1-14.

Zulkarnaini, Ansiha Nur, and Wina Ermaliza. 2019. "Nitrogen Removal in the Anammox Biofilm Reactor using Palm Fiber as Carrier in Tropical Temperature Operation." *Jurnal Riset Teknologi Pencegahan Pencemaran Industri* 7-15.

Zulkarnaini, Budhi Primasari, and Dollas Jenni Saputra. 2019. "Performance of Anammox Biofilm Reactor under Tropical Temperature." *FEIIC-International Conference on Engineering Education and Research.* Kingdom of Saudi Arabia.

Zulkarnaini, Reri Afrianita, and Ilham Hagi Putra. 2020. "Aplikasi Proses Anammox Dalam Penyisihan Nitrogen Menggunakan Reaktor Up-FlowAnaerobic Sludge Blanket." *Jurnal Teknologi Lingkungan* 031-039.

DAFTAR ISTILAH

Aerobik	:	Kondisi dengan keberadaan oksigen bebas (O_2)
Anoksik	:	Kondisi tanpa keberadaan oksigen bebas (O_2) tapi terdapat oksigen terikat seperti NO_2, NO dll
Anaerobik	:	Kondisi tanpa keberadaan oksigen bebas (O_2)
Anammox	:	*Anaerobic ammonium oxidation,* proses oksidasi amonium secara anaerobik
Anammoxosom	:	Bakteri anammox memperlihatkan struktur sel yang kompleks dan komposisi kimia Membran lipid dan sebuah kompartemen sel yang berbeda
Antisera	:	Serum darah yang mengandung antibodi terhadap antigen spesifik, disuntikkan untuk mengobati atau melindungi terhadap penyakit tertentu.
AOB	:	*Ammonium oxidation bacteria,* bakteri pengoksidasi amonium
ATPase	:	Aktivitas enzimatik yang mengkatalisis dekomposisi adenosin trifosfat (ATP) menjadi adenosin difosfat (ADP) dan fosfat (Pi), atau reaksi sebaliknya.
Chemolithoautotroph	:	Mikroorganisme autotrof yang mengasilkan energi dengan mengoksidasi senyawa anorganik.
Biomarker	:	Suatu teknik pengukuran specimen biologis yang dapat menjelaskan hubungan antara pemaparan lingkungan dan timbulnya dapak buruk pada organisme

Chemiosmotic	:	pergerakan ion melintasi membran semi-permeabel, menuju gradien elektrokimia mereka. Contohnya adalah pembentukan adenosin trifosfat (ATP) dengan pergerakan ion hidrogen (H^+) melintasi membran selama respirasi seluler atau fotosintesis.
Chimera	:	sekuens artefak yang dibentuk oleh dua atau lebih sekuens biologis yang disatukan secara keliru. Ini sering terjadi selama reaksi PCR menggunakan templat campuran (mis., sampel dari lingkungan yang tidak kultur).
Eksergonik	:	Reaksi kimia di mana perubahan energi bebas negatif ($\Delta G < 0$), menunjukkan reaksi spontan dan terjadi aliran energi sistem ke lingkungan.
Enzim nitrogenase	:	Enzim yang bertanggung jawab untuk reduksi nitrogen (N_2) menjadi amonia (NH_3)
Eukariotik	:	Organisme dengan sel yang memiliki nukleus dan organel bermembran lainnya
Eukarya	:	Organisme yang menyimpan materi genetik mereka, atau DNA, di dalam nukleus
Clusters of Orthologous Groups of proteins (COGs)	:	klasifikasi filogenetik dari protein yang dikodekan dalam genom lengkap
Denitrifikasi	:	Proses reduksi nitrat menjadi gas nitrogen dalam kondisi anaerobik
Denitrifier	:	Bakteri heterotrofik (kebanyakan bersifat anaerob fakultatif) yang mengoksidasi bahan organik untuk mereduksi NO_3^- menjadi N_2O atau N_2.
Difusi	:	peristiwa mengalirnya/berpindahnya suatu zat dari bagian berkonsentrasi tinggi ke bagian yang berkonsentrasi rendah.

Filogeni	:	Evolusi kelompok organisme yang saling berhubungan diwakili dengan pohon filogenetik yang menunjukkan bagaimana spesies tersebut terhubung antara satu sama lain dengan melalui nenek moyang yang sama.
Fluorokrom	:	Bahan kimia yang dapat menyerap energi dari sumber eksitasi (sinar laser) dan memancarkan foton pada panjang gelombang yang lebih panjang (fluoresensi), yang ditangkap oleh detektor optik dari sitometer aliran.
free-living organism	:	Organisme yang tidak tergantung pada organisme lain untuk kelangsungan hidupnya.
Gen ribosom 16S	:	Komponen dari 30S subunit kecil ribosom prokariotik
Genom	:	Keseluruhan informasi genetik yang dimiliki suatu sel atau organisme, atau khususnya keseluruhan asam nukleat yang memuat informasi tersebut.
Genome assembly	:	Perakitan genom, mengacu pada proses mengambil sejumlah besar sekuens DNA pendek dan menyatukannya kembali untuk membuat representasi kromosom asli dari mana DNA berasal
Gliserolipid	:	Lipid yang mengandung gliserol di mana gugus hidroksilnya telah tersubstitusi.
Gram negatif	:	Bakteri yang memiliki sistem membran ganda di mana membran plasmanya diselimuti oleh membran luar permeabel. Dinding sel tebal berupa peptidoglikan terletak di antara membran dalam dan membran luarnya. Sewaktu proses pewarnaan Gram, bakteri tidak mempertahankan zat warna kristal violet sehingga akan berwarna merah bila diamati dengan mikroskop

Gram positif	:	Bakteri yang mempunyai membran plasma tunggal yang dikelilingi dinding sel tebal berupa peptidoglikan. Sewaktu proses pewarnaan Gram, bakteri mampu mempertahankan zat warna kristal violet sewaktu proses pewarnaan Gram sehingga akan berwarna biru atau ungu di bawah mikroskop
Hidrofobik	:	Bersifat tidak bersenyawa dengan air, tapi dapat larut dengan pelarut nonpolar.
Homodimer	:	protein yang terdiri dari dua rantai polipeptida yang identik dalam urutan, jumlah, dan jenis residu asam amino mereka
Homolog	:	Gen yang memiliki kemiripan urutan (sekuens) basa DNA
Hopanoid	:	senyawa pentasiklik (mengandung lima cincin) alami berdasarkan struktur kimia hopana.
immobilize	:	Mencegah agar biomasa tidak keluar dari reaktor, dengan menggunakan media lekat, atau memperangkap biomasa dalam gel atau bead.
Immunogold	:	teknik pewarnaan yang digunakan dalam mikroskop elektron
Imunolokasi	:	teknik menggunakan antibodi spesifik untuk melokalisasi makromolekul (protein, polisakarida) dalam material biologis (fraksi subseluler, sel, jaringan, biofilm)
Imunofluoresensi	:	teknik yang digunakan untuk mikroskop cahaya dengan mikroskop fluoresensi dan digunakan terutama pada sampel mikrobiologis. Teknik ini menggunakan spesifisitas antibodi untuk antigennya untuk menargetkan pewarna fluoresen ke target biomolekul spesifik dalam sel, dan karenanya memungkinkan visualisasi distribusi molekul target melalui sampel.

in silico	:	Menggunakan computer atau melalui simulasi komputer
Katabolisme	:	lintasan metabolisme yang merombak suatu substrat kompleks molekul organik menjadi komponen-komponen penyusunnya sambil melepaskan energi, pada umumnya berupa ATP.
Kluster gen	:	sekelompok dua atau lebih gen yang ditemukan dalam DNA organisme yang menyandikan polipeptida, atau protein, yang secara kolektif berbagi fungsi umum dan sering terletak dalam beberapa ribu pasangan basa satu sama lain.
Lamella	:	lapisan tipis, membran, atau plat jaringan.
Litotrof	:	Mikroorganisme yang menggunakan senyawa anorganik sebagai sumber donor elektron untuk memperoleh energi, menggunakan karbon organik atau karbon dioksida sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan sel.
Metanotrof	:	prokariota yang memetabolisme metana sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi.
Mitokondria	:	organel tempat berlangsungnya fungsi respirasi sel makhluk hidup
Monofiletik	:	Organisme yang membentuk sebuah klad, terdiri dari semua keturunan dari nenek moyang yang sama
Nitrifikasi	:	Proses pembentukan senyawa nitrat dari senyawa amoniumyang berlangsung dalam kondisi aerobik
Open reading frame (ORF)	:	bagian dari *reading frame* yang memiliki kemampuan untuk diterjemahkan. ORF adalah bentangan kodon terus-menerus yang dimulai dengan kodon awal (biasanya AUG) dan berakhir pada kodon berhenti (biasanya UAA, UAG atau UGA).

Operon	:	unit fungsional yang mengatur ekspresi suatu gen dari sebuah promotor.
Paralog	:	Sepasang gen yang berasal dari gen nenek moyang yang sama dan sekarang berada di lokasi berbeda dalam genom yang sama
Pompa biologis	:	Penyerapan karbon yang didorong secara biologis dari atmosfer ke interior laut dan sedimen dasar laut
Produksi primer	:	Produksi primer adalah produksi senyawa organik dari karbon dioksida di udara atau air yang didominasi oleh proses fotosintesis dan kurang memerlukan kemosintesis
Prokariotik	:	Organisme yang tidak memiliki membran inti sel.
Proton motive force (PMF)	:	tenaga yang mendorong pergerakan proton melintasi membran menuruni potensi elektrokimia
Redoks	:	Jenis reaksi kimia dimana bilangan oksidasi atom berubah. Reaksi redoks ditandai oleh transfer elektron antara spesies kimia, satu spesies (agen pereduksi) yang mengalami oksidasi (kehilangan elektron) sementara spesies lain (agen pengoksidasi) mengalami reduksi (memperoleh elektron)
Stoikiometri Redfield atau Rasio Redfield	:	Rasio atom yang konsisten antara karbon , nitrogen , dan fosfor yang ditemukan di fitoplankton laut dan di seluruh lautan dalam
Sitokrom c	:	protein heme yang terlokalisasi di kompartemen antara membran mitokondria bagian dalam dan luar di mana ia berfungsi untuk mentransfer elektron antara kompleks III dan kompleks IV dari rantai pernapasan sel.
Skualena	:	senyawa organik yang biasa ditemukan pada tumbuhan, hewan dan manusia. Skualena disintesis di dalam hati dan disirkulasikan di dalam darah

Strain	:	varian genetik atau subtipe dari mikroorganisme
STRING	:	database biologis dan sumber daya web dari interaksi protein-protein yang diketahui dan diprediksi.
Supercontigs	:	serangkaian contigs/seperangkat segmen DNA yang tumpang tindih yang bersama-sama mewakili area DNA yang terurut dan berorientasi yang masih mengandung beberapa gap/celah
Thioploca	:	genus bakteri belerang berfilamen yang terdapat di sepanjang 3.000 kilometer pantai di sebelah barat Amerika Selatan.
Thiomargarita	:	genus yang mencakup spesies bakteri belerang vakuola Thiomargarita namibiensis, Candidatus Thiomargarita nelsonii, dan Ca. Thiomargarita joergensii.
Transfer gen lateral/horizontal	:	Proses masuknya bahan-bahan genetik suatu organisme ke organisme lain tanpa melalui proses reproduksi
Ubikuinon	:	adalah senyawa organik dari keluarga kuinon dengan gugus parakuinon dan 10 gugus isoprenil. CoQ10 merupakan substansi mirip vitamin yang larut di dalam lemak, yang terdapat pada membran plasma hampir seluruh jenis sel eukariota dan pada badan Golgi, dan di dalam rantai transpor elektron pada mitokondria, sebagai bagian dari sistem transpor elektron transmembran.
Upwelling	:	Naiknya massa air di lapisan bawah (thermocline) ke permukaan. Naiknya massa air dikarenakan adanya angin yang bergerak di atas perairan sehingga angin ini akan mendorong massa air di permukaan
Washout	:	Biomasa yang terbuang keluar dari reaktor.

Western blot : teknik analitik dalam biologi molekuler dan imunogenetika untuk mendeteksi protein spesifik dalam sampel homogenat atau ekstrak jaringan.

DAFTAR SINGKATAN

AHLs	:	Asil homoserine lactones
COGs	:	*Clusters orthologous groups of proteins*
CRM	:	*Confocal Raman microscopy*
DDC	:	Diethyldithiocarbamate
FBR	:	Fluidized-bed reactor
FISH	:	*Fluorescence in situ hybridization*
GC-MS	:	*Gas chromatography mass spectrometry*
HAO	:	*Hidroksilamin oksidoreduktase*
HZO	:	Hydrazine dehydrogenase/oxidase
HPLC-ESI-MS	:	*High performance liquid chromatography electrospray ionization* tandem dengan *mass spectrometry*
MALDI-TOF-MS	:	*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*
IPAL	:	Instalasi pengolahan air limbah
N-DAMO	:	Nitrit-dependent anaerobic methane oxidation
NIPT	:	Nitrogen-15 Isotope Pairing Technique
NirS	:	Nitric oxide oxidoreductase
NMR	:	Nuclear magnetic resonance
NrfA	:	Dissimilatory nitrite reductase
OMZ	:	Oxygen minimum zones
ORF	:	*Open reading frame*
PMF	:	*Proton motive force*
rRNA	:	*Ribosomal ribonucleic acid*
SAM	:	S-adenosil metionin
SBR	:	*Sequencing batch reactor*
TPR	:	*Tetratricopeptide repeat*

INDEX

16S rRNA, **20**, **47**, **52**, **53**, **55**
aerobik, 18, 81
Amonia, 18
anaerobi, 18
anaerobik, 18, 42
anammox, 18, 19, 42, 49, 50, 75, 76, 79, 80, 81, 82, 83
anammoxidans, 20, 49
Anammoxoglobus, 20
anammoxosom, 30, 31
Anammoxosom, 30
anammoxosome, 49, 50
anammoxsome, 42
aniA, 14
anoksik, 18, 42, 81
AOB, 18
asetat, 24
asetil-KoA, 23, 37, 40
ATPase, 30, 31
bacteriohopanetrol, 29
biomarker, 16, 50
Brocadia, 20, 42, 49
Brocadia anammoxidans, 20
Brocadiales, 20
Candidatus, 20, 42, 49, 81
Candidatus Scalindua, 20
chemiosmotic, 31, 37
chemolithoautotroph, 13
coccoid, 23
Denitrifier, 14
difusi, 32

eksergonik, 10
enzim nitrogenase, 11
eukariotik, 25
filogenetik, 11, 20
filogeni, 11
filum, 20, 42
fjords, 18
fluorofor, 28
format, 24
fosfoetanolamina, 28
fosfokolin, 28
free-living organism, 11
genom, 30
genome assembly, 37
Gram-negatif, 24
Gram-positif, 24
Haber Bosch, 11
hidrazin, 15, 28, 30
hidrofobik, 29
hidroksilamin oksidoreduktase, 16, 30, 91
homodimer, 36
homolog, 13, 30
hopanoid, 29
hzo, 16
immunofluorescence, 30
imunogold, 30
imunolokasi, 30
intrasitoplasma, 27, 31
Isosphaera, 26
Jettenia, 20
katabolisme, 31, 33, 39, 42
kemolitoautotrof, 42
kesetimbangan, 19

keton hopanoid, 29
kluster gen, 30
kodon, 45
Kuenenia, 20
ladderane, 16, 28, 29, 40, 42, 49, 50, 52, 53, 55
Ladderane, 29
ladderanes, 16
lamella, 33
lamellae, 33
lithotrophs, 19, 88
litotrof, 19, 88
metilamin, 24
mitokondria, 31
molybdopterin, 16
monofiletik, 15
napAB, 14
narGH, 14
niche, 24
NIPT, 50
nirK, 14
nirS, 14
nonpolar, 28
norB, 14
norZ, 14
nosZ, 14
nrfAB, 16
octaheme, 16
octaheme dimer, 36
oksidasi, 18, 42, 82
operon, 30
paralog, 42, 45
paryphoplasma, 27
PCR, 50

penanda fungsional, 11
pentaheme nitrit reduktase, 16
peroksidasi, 27
Pirellula, 26
Planctomycetales, 20
Planctomycetes, 20, 26, 42
pompa biologis, 12
Produksi Primer, 10
produsen primer, 16
prokariotik, 25
propionat, 24
redoks, 23
Reduksi Nitrat Dissimilatory menjadi Ammonia, 16
riboplasma, 26, 30
riboplasma,, 27
ribosom, 27
Scalindua, 16
Sequencing batch reactor, 22
siklobutana, 28
sitokrom, 27, 31, 36, 37, 38, 41, 44, 48
sitokrom c, 27, 31
sitoplasma, 27
Sitoplasma, 26
squalena, 29
stoikiometri, 19
stoikiometri Redfield, 13
STRING, 40
tembaga enyzme nitrous oxide reductase, 14
Thiomargarita, 33
Thioploca, 16, 33
tracer study, 11, 17
transfer gen lateral, 11
Ubikuinon, 37

ubiquinones, 29
Western blot, 30

BUKU

ORIGINALITY REPORT

7%	7%	3%	0%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	www.tandfonline.com Internet Source	1%
2	id.unionpedia.org Internet Source	1%
3	www.scribd.com Internet Source	1%
4	M. Kumar, A. Daverey, J.-D. Gu, J.-G. Lin. "Anammox Processes", Elsevier BV, 2017 Publication	<1%
5	www.researchgate.net Internet Source	<1%
6	makalah.id Internet Source	<1%
7	id.scribd.com Internet Source	<1%
8	hal.univ-lorraine.fr Internet Source	<1%
9	prokum.esdm.go.id Internet Source	<1%
10	www.national-oceanographic.com Internet Source	<1%
11	biology2017.wordpress.com Internet Source	<1%
12	chyrun.com Internet Source	<1%
	repository.tudelft.nl	

13	Internet Source	<1 %
14	digital.auraria.edu Internet Source	<1 %
15	docobook.com Internet Source	<1 %
16	kiapratama.files.wordpress.com Internet Source	<1 %
17	www.tdx.cat Internet Source	<1 %
18	rahmabioklasmadup08.blogspot.com Internet Source	<1 %
19	pt.scribd.com Internet Source	<1 %
20	repositori.uin-alauddin.ac.id Internet Source	<1 %
21	medpub.litbang.pertanian.go.id Internet Source	<1 %
22	id.123dok.com Internet Source	<1 %
23	repository.radenintan.ac.id Internet Source	<1 %
24	ejournal.medan.uph.edu Internet Source	<1 %
25	id.wikipedia.org Internet Source	<1 %
26	www.hindawi.com Internet Source	<1 %
27	ejurnal.bppt.go.id Internet Source	<1 %
28	jnm.snmjournals.org	

Internet Source

<1 %

29	lib.unnes.ac.id Internet Source	<1 %
30	rumusrumus.com Internet Source	<1 %
31	Rismaya Khaerunnisa, Iis Kurniati, Dewi Nurhayati, Asep Dermawan. "PEMANFAATAN AIR REBUSAN UMBI KUNING DAN UNGU SEBAGAI MEDIA ALTERNATIF PERTUMBUHAN Escherichia coli DAN Staphylococcus aureus", Jurnal Riset Kesehatan Poltekkes Depkes Bandung, 2019 Publication	<1 %
32	www.yumpu.com Internet Source	<1 %
33	onlinelibrary.wiley.com Internet Source	<1 %
34	repo.unand.ac.id Internet Source	<1 %
35	www.science.gov Internet Source	<1 %
36	www.stw.nl Internet Source	<1 %
37	Zulkarnaini Zulkarnaini, Ansiha Nur, Wina Ermaliza. "NITROGEN REMOVAL IN THE ANAMMOX BIOFILM REACTOR USING PALM FIBER AS CARRIER IN TROPICAL TEMPERATURE OPERATION", Jurnal Riset Teknologi Pencegahan Pencemaran Industri, 2019 Publication	<1 %
38	repository.uinjkt.ac.id Internet Source	<1 %

39	www.sridianti.com Internet Source	<1 %
40	es.scribd.com Internet Source	<1 %
41	islamkukaffah.blogspot.com Internet Source	<1 %
42	ja.wikipedia.org Internet Source	<1 %
43	vdocuments.site Internet Source	<1 %
44	veprints.unica.it Internet Source	<1 %
45	www.ncbi.nlm.nih.gov Internet Source	<1 %
46	Boumann, H.A.. "Biophysical properties of membrane lipids of anammox bacteria: II. Impact of temperature and bacteriohopanoids", BBA - Biomembranes, 200907 Publication	<1 %
47	aaltodoc.aalto.fi Internet Source	<1 %
48	arllawang.blogspot.com Internet Source	<1 %
49	bakohumas.kominfo.go.id Internet Source	<1 %
50	d-nb.info Internet Source	<1 %
51	ejournal.uncen.ac.id Internet Source	<1 %
52	febs.onlinelibrary.wiley.com Internet Source	<1 %

53	finishwellunbiologi.wordpress.com Internet Source	<1 %
54	nophienov.wordpress.com Internet Source	<1 %
55	suhendraiskandar.blogspot.com Internet Source	<1 %
56	Robert Niederdorfer, Lisa Fragner, Ling Yuan, Damian Hausherr, Jing Wei, Paul Magyar, Adriano Joss, Feng Ju, Helmut Bürgmann. "Distinct growth stages shaped by an interplay of deterministic and neutral processes are indispensable for functional anammox biofilms", Cold Spring Harbor Laboratory, 2020 Publication	<1 %
57	beritabojonegoro.com Internet Source	<1 %
58	dramarnathgiri.blogspot.com Internet Source	<1 %
59	epdf.pub Internet Source	<1 %
60	www.jove.com Internet Source	<1 %
61	Sivarajah Ganesan, Vel Murugan Vadivelu. "Effect of storage conditions on maintaining anammox cell viability during starvation and recovery", Bioresource Technology, 2020 Publication	<1 %
62	en.wikipedia.org Internet Source	<1 %
63	pms.unsri.ac.id Internet Source	<1 %
64	qdoc.tips Internet Source	

		<1 %
65	doku.pub Internet Source	<1 %
66	libmast.utm.my Internet Source	<1 %
67	www.microbiologyresearch.org Internet Source	<1 %
68	Aurista Miftahatul Ilmah Aurista. "ANALISIS KONDUKTIVITAS PANAS PADA MATERIAL ALTERNATIF SEBAGAI INSULASI DINDING RUANG AKOMODASI KAPAL BERBASIS LIMBAH AMPAS TEBU DAN SERBUK KAYU", JOURNAL ONLINE OF PHYSICS, 2020 Publication	<1 %

Exclude quotes	On	Exclude matches	Off
Exclude bibliography	On		