

POPULASI DAN AKTIVITAS DENITRIFIKASI SERTA EMISI GAS N₂O PADA LAHAN PERTANIAN ORGANIK, PERTANIAN INTENSIF, DAN HUTAN

Dwi Agustiyani, Nur Laili, Hartati Imamuddin, dan Nunik Sulistinah

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI

Jl Raya Bogor-Jakarta Km 46 Cibinong 16911, Telp. 021-8765066, Fax. 8765062
titinagustin@yahoo.com

ABSTRACT

This research investigate the population and potentials denitrification activity from three different soils, organically farmed soil, intensive farmed soil and forest soil. Our objectives were to explore spatial gradients in denitrifier populations, examine whether populations density and its potential activity was related to soil chemical properties (C and N content), and determine the potential emission of gas N₂O. Results indicated biological functional differences between these three different soil ecosystems. Forest soil had the highest population density of denitrifying bacteria and also had significant potential denitrifying activities. The highest potentials denitrifying activity in the soil affected to the lowest emission of N₂O gas. The lowest population and potential denitrifying activity was measured in the intensive farmed soil. Those conditions might be promoted the potentials emission of N₂O.

Key words: denitrifiers, potential denitrification activity, potential emission of N₂O

PENGANTAR

Nitrous oxide (N₂O) diproduksi secara natural ditanah melalui proses nitrifikasi dan denitrifikasi secara mikrobial. Konsumsi pupuk nitrogen yang terus meningkat, sebagai contoh di Asia diprediksi penggunaan pupuk N akan meningkat mencapai sekitar 50% pada tahun 2030, kemungkinan besar secara proporsional akan diikuti oleh peningkatan emisi gas N₂O. Dilaporkan bahwa konsentrasi gas N₂O di atmosfer terus meningkat, mencapai sekitar 0,3% pertahun, dan sebagian besar berasal dari sektor pertanian (Alley *et al.*, 2007). Nitrous oxide (N₂O) merupakan gas rumah kaca yang penting dan perlu mendapat perhatian khusus karena berpotensi pemanasan global.

Beberapa parameter telah teridentifikasi dapat mempengaruhi kecepatan emisi N₂O dari sistem pertanian, termasuk suplai N (Bouwman, 1996; Brown *et al.*, 2000; Maggioro *et al.*, 2000), suhu (Goodroad and Keeney, 1984; Castaldi, 2000), pH (Mogge *et al.*, 1999) dan kelembaban tanah (Dobbie *et al.*, 1999). Untuk meningkatkan kesuburan, amandemen residu organik lokal banyak digunakan. Penggunaan residu tanaman menyediakan sumber C dan N tersedia dalam tanah, penambahan residu tanaman ini selanjutnya juga akan mempengaruhi emisi CO₂ dan N₂O. Tipe residu diduga merupakan faktor penting yang mempengaruhi emisi N₂O.

Produksi N₂O oleh mikroba denitrifikasi adalah fungsi dari aktivitas enzim nitrit N₂O reduktase (McKenney *et*

al., 1994; Betlach *et al.*, 1981). Aktivitas spesifik enzim tersebut tergantung pada biosintesis dan inaktivasi, sedangkan regulator utama enzimnya adalah kondisi oksigen dan konsentrasi substrat nitrogen. Namun demikian pola regulasinya berbeda pada spesies denitrifier yang berbeda (Bell *et al.*, 1991; Coyne *et al.*, 1990; Rende *et al.*, 1991). Walaupun penelitian tentang denitrifikasi di lahan pertanian yang dihubungkan dengan emisi gas nitrogen telah dipelajari sejak lama, namun masih belum terjawab dengan pasti bagaimana pupuk organik maupun pupuk kimia mempengaruhi rasio N₂O terhadap total denitrifikasi. Aktivitas komunitas denitrifikasi juga merupakan faktor yang sangat krusial dalam regulasi emisi gas N₂O, karena denitrifikasi merupakan sumber maupun *sink* bagi N₂O. Oleh karena itu, pengetahuan tentang komposisi dari komunitas bakteri denitrifikasi di tanah sangat penting untuk memahami produksi N₂O. Masih belum diketahui dengan pasti apakah pola dari produksi N₂O dipengaruhi oleh komposisi komunitas denitrifier di tanah. Dilaporkan bahwa komunitas mikroba tanah yang berperan pada reduksi nitrat berbeda tergantung pada temperatur dan pH (Granli *et al.*, 1994).

Dalam penelitian ini hubungan antara kualitas kimia tanah, dengan diversitas mikroba serta aktivitas enzim yang berperan dalam proses denitrifikasi serta potensinya dalam pembentukan gas N₂O dipelajari pada tipe lahan yang berbeda, hutan (Cibodas), pertanian intensif (Cipanas), dan pertanian organik (Cisarua).

BAHAN DAN CARA KERJA

Sampel tanah

Sampel tanah diperoleh dari tiga lokasi lahan yang berbeda fungsi, yaitu lahan pertanian organik di Cisarua, lahan pertanian intensif di Cipanas dan lahan hutan di Cibodas. Sampel tanah diambil pada permukaan (0–5 cm) secara random pada sepuluh titik dari masing-masing lokasi.

Analisis kimiawi tanah

Parameter kimia tanah yang diamati adalah kandungan NO₃⁻, NO₂⁻, NH₄⁺. Konsentrasi amonium (NH₄-N) dan nitrit (NO₂-N) dianalisis menggunakan metode kolorimetri yang tercantum dalam *Standard Method* (APHA) yang telah dimodifikasi. Konsentrasi nitrat (NO₃-N) ditentukan dengan menggunakan metode kolorimetri yang tercantum dalam SNI yang telah dimodifikasi.

Potensial Denitrifikasi

Aktivitas enzim DEA (*Denitrifying Enzym Activity*) diukur dengan menggunakan metoda *acetylene inhibition technique* (Yoshinari *et al.*, 1976). Sepuluh (10) gram sampel tanah dimasukkan dalam dua serum botol (Volume 33 ml) yang sudah di *autoclave*. Kedalam botol dimasukkan 10 ml aquades, botol ditutup dengan tutup karet (*rubber stopper*) dan kemudian dialirkan gas Argon selama 15 menit untuk membuat kondisi anaerobik. Diukur gas N₂O menggunakan GC (0 jam). Kemudian dimasukkan substrat, 1 ml larutan glukosa (10 g glukosa/L) dan 1 ml larutan KNO₃ (100 mg KNO₃/L). Satu botol diberi perlakuan acetylene (C₂H₂) (10% dari volume *headspace*), satu botol tidak diperlakukan dengan acetylene. Botol-botol tersebut dibungkus dengan kertas aluminium dan diletakkan diatas *shaker* dengan kecepatan 100 rpm/menit pada temperatur kamar. Gas disampling dari *headspace* pada interval waktu 0, 2, 4 dan 6 jam. Konsentrasi N₂O dari tiap sampel diukur dengan menggunakan GC dengan *detector* ECD.

Jumlah total N₂O:

$$M = C_g(V_g + V_l D)$$

M : total N₂O

C_g : konsentrasi N₂O dalam *headspace*

V_g : Volume *headspace* di botol

V_l : volume dari *liquid phase*

D : Bunsen *absorption coefficient*, which is 0,54 for N₂O pada suhu 25° C.

Perhitungan jumlah bakteri

Populasi bakteri yang diamati adalah bakteri denitrifikasi, bakteri respirasi nitrat (*Nitrate Respiring Bacteria*) dan bakteri DNRA (*Dessimilative Nitrate Reduction to Ammonium*). Jumlah bakteri dihitung menggunakan metoda *Most Probable Number* (MPN), menggunakan media NB+KNO₃. Pertumbuhan bakteri denitrifikasi (+) ditandai terbentuknya gas pada tabung durham. Bakteri pereduksi nitrat (+) ditandai dengan terbentuknya Nitrit (warna *pink* dengan indikator *Griess Romijn Nitrite*) namun tidak terbentuk gelembung gas. Kemudian ditentukan jumlah tabung positif dari masing-masing pengenceran berturut-turut dari 3 seri pengenceran. Jumlah bakteri untuk tiap gram tanah didasarkan pada jumlah tabung positif dari 3 seri pengenceran yang berturut-turut dan faktor pengencerannya menurut daftar MPN.

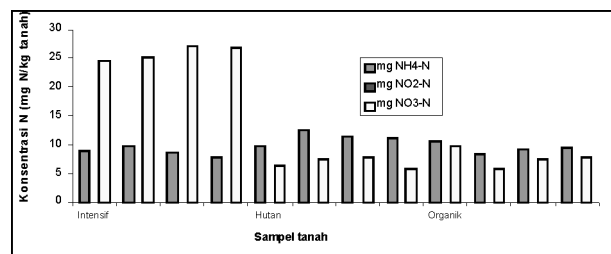
Pemantauan diversitas mikroba denitrifikasi secara molekuler

Diversitas mikroba denitrifikasi dalam tanah diamati menggunakan metoda molekuler dengan cara mengekstraksi DNA tanah. Hasil ekstraksi DNA kemudian di amplifikasi PCR menggunakan primer nirS dan nosZ. *Design* primer yang digunakan adalah: nirS (*forward*: 5' CCACACCGAGAACCAGATT, *reverse*: 5' GAAGTCCTCGCACCTCTACG) dan nosZ (*forward*: 5' ACGCCTATACCACGCTGTTC, *reverse*: 5' GGTCCTTGGAGAACTTGCTG).

HASIL

Konsentrasi Nitrogen (Amonium, Nitrit, dan Nitrat)

Hasil analisis nitrogen pada tiga tipe tanah ditampilkan pada Gambar 1. Konsentrasi nitrat paling tinggi terdeteksi pada tanah pertanian intensif, berkisar antara 24,7–27,2



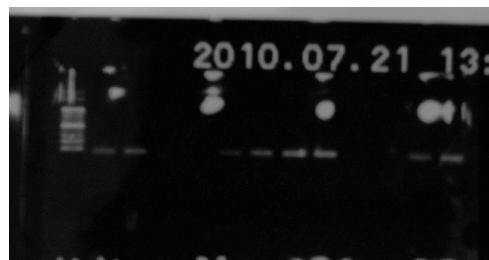
Gambar 1. Konsentrasi amonium (NH₄-N), nitrit (NO₂-N) dan nitrat (NO₃-N) pada tanah

mg N/kg tanah, sedangkan pada tanah pertanian organik dan tanah hutan tidak memperlihatkan perbedaan yang signifikan. Demikian juga dengan konsentrasi amonium, nampak tidak berbeda nyata pada ketiga tipe tanah yang diamati, sedikit lebih tinggi pada tanah hutan.

Populasi bakteri

Secara umum populasi bakteri denitrifikasi lebih tinggi dari pada bakteri respirasi nitrat maupun bakteri DNRA. Populasi bakteri denitrifikasi pada tanah hutan cukup tinggi, berkisar antara $32-920 \times 10^6$ (Gambar 2). Jumlah bakteri respirasi nitrat pada semua jenis tanah yang diamati tidak nampak perbedaan yang signifikan, berkisar antara $10-80 \times 10^4$, cenderung lebih tinggi pada tanah pertanian intensif (Gambar 3). Sedangkan jumlah bakteri DNRA relatif lebih tinggi pada tanah pertanian organik (Cisarua).

Hasil elektroforesis dari amplifikasi PCR menggunakan primer nirS dan nosZ dari tanah pertanian organik, intensif dan hutan ditampilkan pada gambar 4. Hasil menunjukkan bahwa pada tanah pertanian intensif dan tanah hutan muncul gen nirS dan nosZ, namun pada tanah pertanian organik kedua gen yang dideteksi tidak muncul.

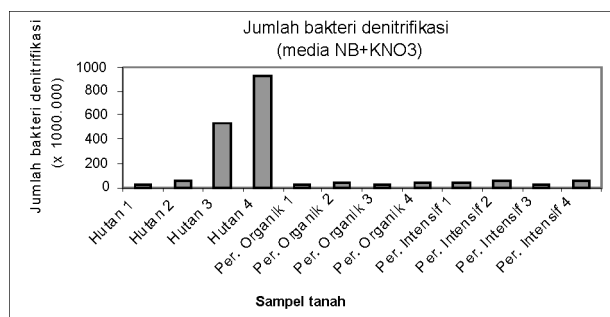


Keterangan:
No. 1-6 primer nirS dan 7-12 primer nosZ
No. 1-2/7-8 pertanian intensif, 3-4/9-10 pertanian organik, 5-6/11-12 hutan

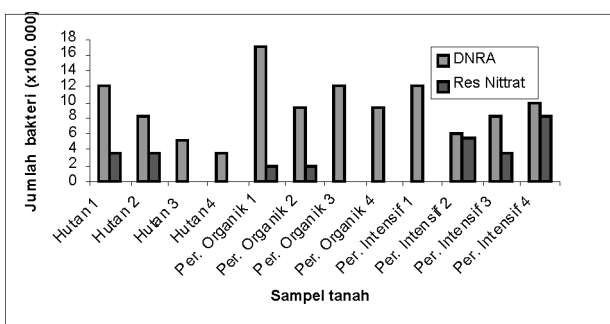
Gambar 4. Hasil elektroforesis dari amplifikasi PCR menggunakan primer nirS dan nosZ

Aktivitas reduksi nitrat dan denitrifikasi

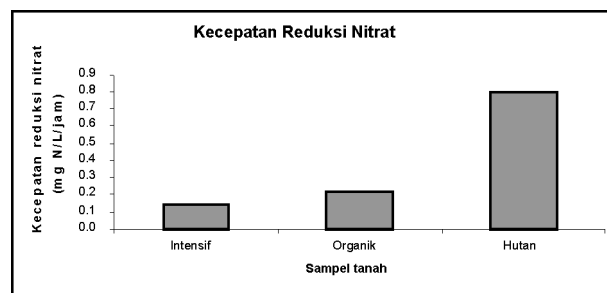
Aktivitas reduksi nitrat diukur berbarengan dengan pengukuran aktivitas denitrifikasi (DEA). Pada pengukuran aktivitas reduksi nitrat yang dipantau adalah perubahan konsentrasi nitrat dari 0 hingga 6 jam. Sedangkan aktivitas denitrifikasi diukur berdasarkan produksi N_2O setelah diperlakukan (*blocking*) dengan acetylene.



Gambar 2. Jumlah bakteri denitrifikasi pada tanah



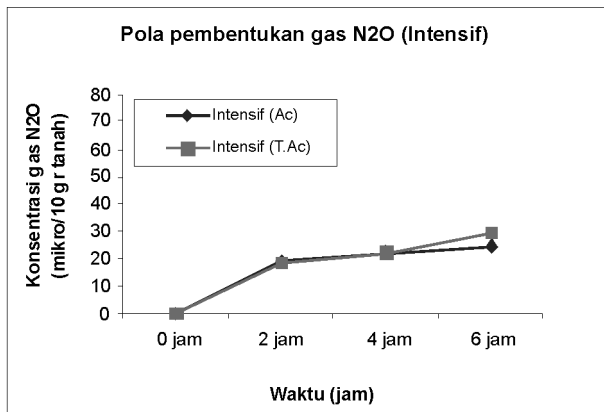
Gambar 3. Jumlah bakteri respirasi nitrat dan DNRA



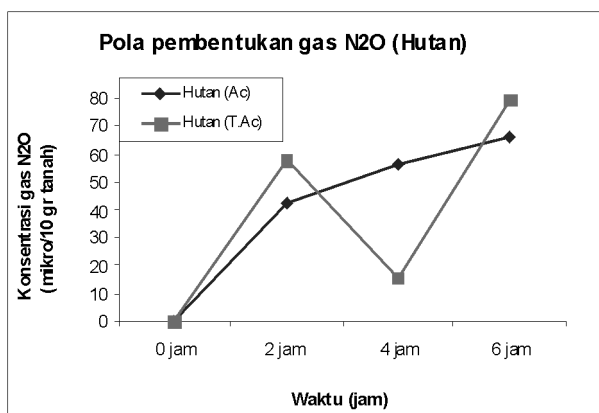
Gambar 5. Aktivitas reduksi nitrat

Aktivitas reduksi nitrat pada tanah hutan terdeteksi paling tinggi, diikuti oleh tanah pertanian organik dan tanah pertanian intensif (Gambar 5).

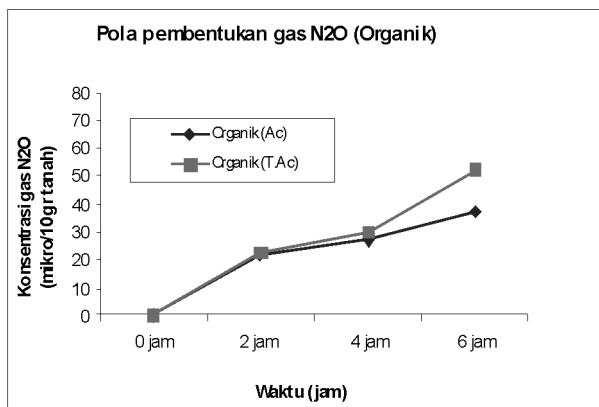
Pola pembentukan gas N_2O selama 6 jam inkubasi pada ketiga sampel tanah terlihat bervariasi (Gambar 6-8). Dari keseluruhan pola pembentukan gas N_2O nampak bahwa besarnya konsentrasi N_2O pada perlakuan tanpa acetylen dengan pemberian acetylen hampir sama. Hanya pada tanah hutan (Gambar 7) besarnya konsentrasi N_2O pada perlakuan acetylen terus meningkat, sedangkan pada perlakuan tanpa acetylene mengalami penurunan dan kenaikan secara bergantian. Ini menunjukkan adanya reaksi denitrifikasi yang cukup efektif.



Gambar 6. Pola pembentukan gas N₂O pada tanah pertanian intensif



Gambar 7. Pola pembentukan gas N₂O pada tanah hutan



Gambar 8. Pola pembentukan gas N₂O pada tanah pertanian organik

PEMBAHASAN

Dari data-data yang telah diperoleh ditunjukkan bahwa jumlah populasi bakteri denitrifikasi pada tanah hutan Cibodas cukup tinggi (10^6 – 10^7), pada tanah pertanian organik Cisarua dan pertanian intensif Cipanas relatif lebih rendah (10^5 – 10^6). Tingginya populasi bakteri denitrifikasi nampak berkorelasi positif dengan aktivitas reduksi nitrat (Gambar 5) dan aktivitas denitrifikasi yang dicerminkan oleh pembentukan gas N₂O (Gambar 7). Pola pembentukan gas N₂O dengan penghambatan acetylen pada tanah hutan nampak terus meningkat, sedangkan pada perlakuan tanpa acetylen terjadi peningkatan dan penurunan secara bergantian. Fakta ini menunjukkan reaksi denitrifikasi pada tanah hutan cukup efektif, dimana N₂O yang terbentuk hanya sebagai senyawa intermediet yang selanjutnya diubah menjadi gas N₂. Hasil elektroforesis dari amplifikasi PCR menggunakan primer nirS dan nosZ pada tanah hutan juga memperlihatkan bahwa kedua gen tersebut terdeteksi (Gambar 4). Pola pembentukan N₂O pada tanah pertanian organik (Gambar 8) dan tanah pertanian intensif (Gambar 6) nampak tidak berbeda antara perlakuan penghambatan acetylen dan tanpa penghambatan. Berarti pada kedua lahan tersebut kemungkinan terbentuk emisi gas N₂O akan lebih besar dibandingkan pada tanah hutan. Tingginya populasi bakteri denitrifikasi dan aktivitasnya nampak tidak berkorelasi positif dengan konsentrasi N dalam tanah. Pada tanah pertanian intensif yang mempunyai kandungan nitrat cukup tinggi tidak diikuti oleh populasi dan aktivitas denitrifikasi yang tinggi. Hal ini kemungkinan besar ditentukan pula oleh kandungan organik C dan rasio C/N dalam tanah tersebut. Kondisi tersebut akan mempengaruhi komposisi populasi bakteri pengguna nitrogen, utamanya bakteri nitrifikasi, respirasi nitrat, DNRA, dan denitrifikasi. Fakta ini menunjukkan bahwa faktor lingkungan yang ekstrim ataupun senyawa toksik dan penghambat lainnya akan berpengaruh terhadap komposisi populasi bakteri denitrifikasi dan selanjutnya berpengaruh terhadap aktivitas denitrifikasi, terutama pada tahap akhir denitrifikasi yaitu reaksi perubahan dari N₂O menjadi gas N₂.

KEPUSTAKAAN

Alley *et al.*, 2007. IPCC Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I in the Third Assessment Report of Intergovernmental Panel on Climate Change. Report Summary for Policy Makers (SPM).

- Bell *et al.*, 1991. Nitric and Nitrous Oxide Reductase are Active under Aerobic Condition in cells of *Thiosphaera pantotropha*. *Biochem. J.* 273:423–427.
- Betlach *et al.*, 1981. Kinetic Explanation for Accumulation of Nitrite, Nitric Oxide, and Nitrous Oxide during Bacterial Denitrification. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:1074–1084.
- Bouwman AF, 1996. Direct Emission of Nitrous Oxide from Agricultural Soils. Nutrient Cycling in Agroecosystems. *Nature* 392, 866–867.
- Brown *et al.*, 2000. Nitrous Oxide Flux from Soil Dairy Manure in Storage Asa Affected by Water Content and Redox Potential. *Journal of Environmental Quality* 29, 630–638.
- Castaldi, S., 2000. Responses of Nitrous Oxide, Dinitrogen, and Carbon Dioxide Production and Oxygen Consumption to Temperature in Forest and Agricultural Light-textured Soils Determined by Model Experiment. *Biology and Fertility of Soils* 32, 67–72.
- Coyne *et al.*, 1990. Induction of Denitrifying Enzymes in Oxygen-limited *Achromobacter cycloclastes* Continuous Culture.
- Dobbie *et al.*, 1999. Nitrous Oxide Emissions from Intensive Agricultural System: Variation Between Crops and Seasons, Key Driving Variables, and Mean Emission Factors. *Journal of Geophysical Research* 104 (D21), 26891–26899.
- Goodroad and Keeney, 1984. Nitrous Oxide Production in Aerobic Soils under Varying pH, Temperature, and Water Content. *Soil Biology & Biochemistry* 16, 39–43.
- Granli *et al.*, 1994. Nitrous Oxide from Agriculture. *Norw. J. Agric. Sci. Suppl.* 12:7–128 Intergovernmental Panel on Climate Change, 1996).
- Maggiotto *et al.*, 2000. Nitrous and Nitrogen Oxide Emissions from Turfgrass Receiving Different Forms of Nitrogen Fertilizer. *Journal of Environmental Quality* 29, 621–630.
- McKenney *et al.*, 1994. Kinetics of Denitrification by *Pseudomonas fluorescens* Oxygen Effects. *Soil Biol. Biochem.* 26:901–908.
- Mogge *et al.*, 1999. Nitrous Oxide Emissions and Denitrification N-losses from Agricultural Soils in the Bomhoved Lake Region: Influence of Organic Fertilizers and Land-use. *Soil Biology & Biochemistry* 31, 1245–1252.
- Rende *et al.*, 1991. Soil Microorganisms as Controllers of Atmospheric Trace Gases. *Microbiological Reviews*, Vol 60. No. 4: 609–640.
- Yoshinari T and Knowles R, 1976. Acetylene Inhibition of Nitrous Oxide Reduction by Denitrifying Bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 69 (3): 705–710.