

**ANAMMOX: SUATU PROSES BARU DALAM DAUR NITROGEN YANG  
MENAWARKAN BANYAK PELUANG DALAM PENGELOLAAN  
PENCEMARAN AIR AKIBAT NITROGEN**

**Oleh: Riyo Samekto \*)**

**ABSTRACTS**

*The paper is to study the anammox (anaerob ammonium oxydation) and its chances to be used in waste water treatments.*

*The nitrogen cycle has been developing in 15 years recently from without anammox and OLAND processes to with of them. The characteristics of anammox microorganism, its biodiversity, its cell biology, and its growth, have been studied beside of explanation of biochemistry of anammox.*

*The methods to investigate are also conducted by  $^{15}\text{NH}_4^+$  /  $^{15}\text{NO}_3^-$ , lipids analysis (ladderane lipids), fluorescence in situ hybridization (FISH), and phylogenetic analysis of partial 16 rRNA gene. All of them will increase the knowledge of waste water treatments.*

*SHARON and ANAMMOX techniques are example of the efficient use system in waste water treatments being used lately.*

*Key words : anammox, waste water treatment.*

**PENDAHULUAN**

Anammox (*anaerobic ammonia oxidation*) adalah suatu proses baru dimana nitrit digunakan sebagai aseptor electron dalam konversi ammonium menjadi gas nitrogen. Proses anammox menghilangkan ammonium dalam sistem autotrop dengan meninggalkan sedikit biomassa. Karbon organik tidak dibutuhkan dalam sistem ini karena ammonium digunakan sebagai donor electron dalam reduksi nitrit (Karthikeyan dan Joseph, 2009). Dahulu sebelum proses ini ditemukan, untuk menghilangkan ammonium, proses oksidasi ammonium adalah dari ammonium menuju nitrit, kemudian nitrat. Selanjutnya, Nitrat direduksi menjadi  $\text{N}_2\text{O}$  dan  $\text{N}_2$ .

Sejarah penemuan proses ini ditulis oleh Hertach (2008). Proses ini ditemukan tahun 1941 yang mengasumsikan bahwa di dalam lautan proses oksidasi ammonium dilakukan dengan cara ini (Hamm dan Thompson, 1941 dalam Hertach,

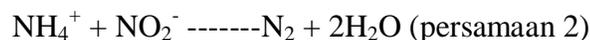
2008). Lebih dari 20 tahun berikutnya, pada tahun 1965, pengamatan dalam kolom air menunjukkan bahwa ada kehilangan ammonium dalam kondisi anaerob (Richard, 1965 dalam Hertach, 2008). Tetapi bukti langsung ditemukan pada tahun 1990 dalam proses *waste water treatment*. Dalam tahun 1995, pengamatan di laut hitam menemukan suatu zona setebal 20 meter bebas oksigen,  $\text{NH}_4^+$  dan  $\text{H}_2\text{S}$ , tetapi terdapat nitrat (Murray, *et al.*, 1995 dalam Hertach, 2008). Sampai sekarang masih dilakukan pencarian bukti-bukti di habitat yang berbeda-beda, di kolom air laut hitam tahun 2003, di laut artic, 2004, di daerah sedimen mangrove subtropik tahun 2005, di sistem lakustrin, 2006.

Tulisan yang sebagian besar dikutip dari Hertach (2008), ini dimaksudkan untuk merangkum pengetahuan tentang anammox. Untuk mengetahui anammox, kita harus mengetahui mikroorganisme yang melakukan proses ini dan biokimia dari anammox. Kita akan mempelajari bagaimana anammox dapat diamati di alam. Dengan pengetahuan tentang ini, diharapkan proses anammox ini dapat menjadi penting untuk diperhatikan dalam memahami alam.

## DAUR NITROGEN MARINE “BARU”

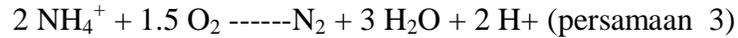
Studi baru-baru ini telah menunjukkan bahwa ada beberapa jalur baru dalam daur N di marine selain denitrifikasi. Gambar 1c menunjukkan pembaharuan (updated) daur nitrogen.

Disamping denitrifikasi (persamaan 1) dan anammox (persamaan 2) ada beberapa reaksi baru yang ditemukan, yang dapat menghasilkan nitrogen  $\text{N}_2$  dari ammonium dan nitrat.



Nitrifikasi-denitrifikasi autotrop dalam oksigen yang terbatas (*OLAND, Oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification*) telah ditemukan tahun 1998 dalam mesin pengelolaan limbah cair (*wastewater*) dan tidak melulu proses anaerob seperti anammox (Verstraete *et al.*, 1998 dalam Wehrli, 2008). Pengoksidasi nitrit

dihasilkan secara local oleh nitrifikasi. Dua hal ini yang membedakan OLAND dari anammox. Reaksi ini dipercayai berlangsung dalam sedimen dalam sebuah kelompok nitrifiers dan ammonium oxidizers (Kuai et al., 1998 dalam Hertach, 2008). Reaksi OLAND (persamaan 3) berhubungan erat dengan reduksi nitrit.



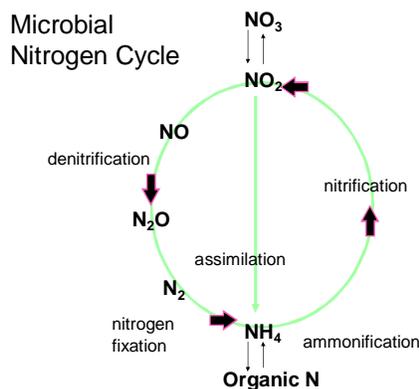
Belum diketahui dengan jelas berapa jumlah OLAND yang disumbangkan pada anammox dan seberapa pentingnya hal tersebut.

Denitrifikasi kimiawi (chemodenitrification) adalah reaksi dari spesies mangan (Mn) dengan nitrat atau ammonium (Luther et al., 1997 dalam Hertach, 2008).



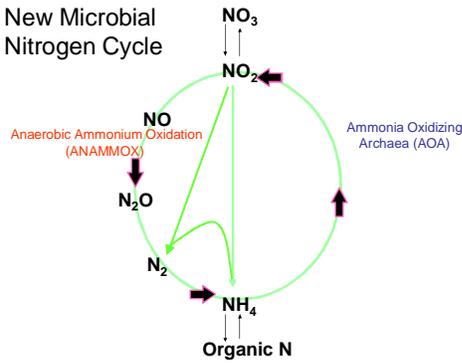
Satu bagian reaksi ini dipercaya berlangsung secara abiotik dan satu bagian lagi dikatalisir oleh mikrobia. Pentingnya reaksi ini dianggap tidak signifikan (Luther et al., 1997 dalam Hertach, 2008) Jadi, daur nitrogen telah mengalami perubahan yang ke tiga kalinya (Gambar 1)

a. Tanpa jalur anammox

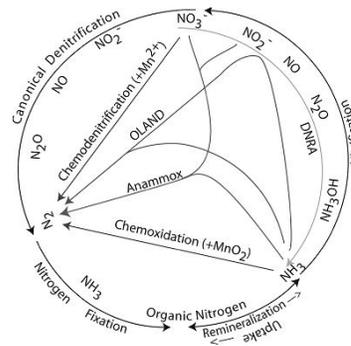


Anammox: Suatu Proses Baru Dalam Daur Nitrogen Yang Menawarkan Banyak Peluang Dalam Pengelolaan Pencemaran Air Akibat Nitrogen

b. Dengan jalur anammox



c. Dengan jalur anammox dan OLAND



Brandes, et al., 2007 dalam Hertach, 2008

**Gambar 1. Pengembangan jalur daur nitrogen a. tanpa anammox, b. dengan anammox, c. dengan anammox dan OLAND**

### KARAKTERISASI MIKROBIA PELAKU ANAMMOX

Bakteri anammox berbentuk *cocci* biasanya berukuran kurang dari 1µm dan waktu generasinya 10-30 hari. Mereka termasuk dalam ordo Planctomycetes dan oleh karena itu chemolithoautotroph anaerobic (van Niftrik et al., 2004 dalam Hertach, 2008). Sejauh ini semua percobaan kultur murni bakteri anammox gagal karena

sangat kesulitan untuk mengisolasi. Sehingga, hanya ada cara pengkayaan kultur (*enrichment cultures*) yang tersedia (Dalsgaard et al., 2005 dalam Hertach, 2008) dan semua yang kita ketahui tentang bakteri anammox diperoleh kultur dengan cara itu.

### **Biodiversitas**

Ada tiga genera bakteri anammox yang telah ditemukan sampai saat ini: *Brocardia*, *Kuenenia* dan *Scalindua* (Schmid et al., 2003 dalam Hertach, 2008). Didalam genera ini berbagai spesies berikut ini telah ditemukan (Hertach, 2008):

*Brocardia anammoxidans* (Strous et al., 2002)

*Brocardia fulgida* (Kartal et al., 2004)

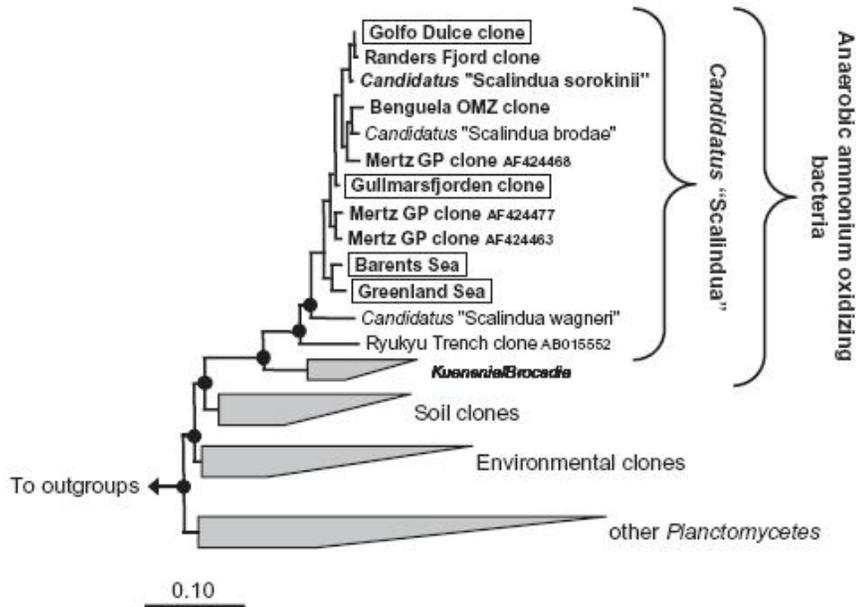
*Kuenenia stuttgartiensis* (Schmid et al., 2000; Egli et al., 2001)

*Scalindua wagneri* (Kuypers et al., 2003; Schmid et al., 2003)

*Scalindua brodae* (Kuypers et al., 2003; Schmid et al., 2003)

*Scalindua sorokinii* (Kuypers et al., 2003; Schmid et al., 2003)

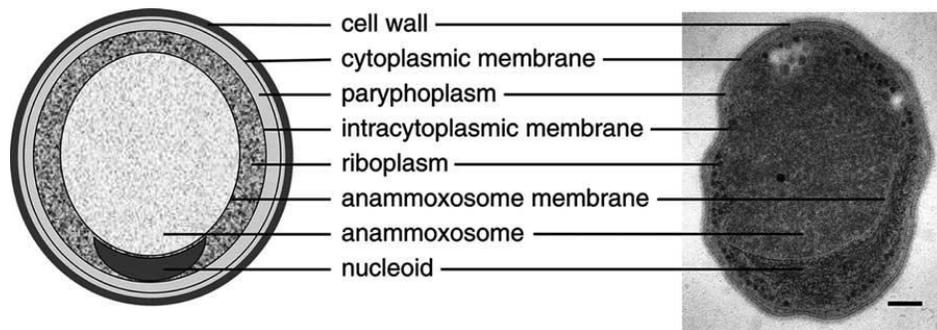
Tiga genera tersebut adalah monophyletic dan cabang dari planctomycete. Mereka memiliki suatu ultrastruktur dan metabolisme yang sama yang mengarah kepada kesimpulan bahwa ciri anammox (*anammox feature*) hanya berevolusi sekali dalam hidupnya (Schmid et al., 2003). Spesies berbeda dapat ditunjukkan pada gambar 2. Semua spesies anammox telah dapat ditemukan di sistem marin dan estuarin masuk dalam genus *Scalindua* (Schmid et al., 2007 dalam Hertach, 2008 ). Hanya bakteri anammox yang ditemukan dalam system lacustrin memiliki kemiripan 95,7% dengan bakteri anammox yang telah diketahui *Candidatus Scalindua brodae* dalam gene sequence 16S rRNA .



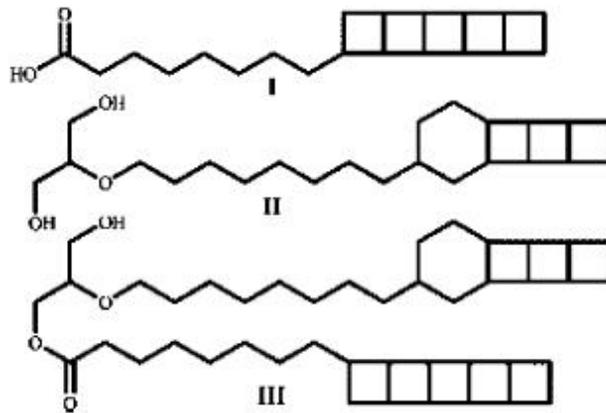
**Gambar 2: Phylogenetic tree dari bakteri anammox berdasarkan posisi 1380/700 (full-length/partial sequences) dan diperhitungkan dengan metode kemiripan maksimum. Ambang divergensi 10% dalam sequence 16S rRNA. Dari (Schmid et al., 2007 dalam Hertach, 2008).**

### Biologi sel

Satu dari sifat-sifat utama bakteri anammox adalah anammoxosom yang merupakan ruangan yang menempel pada membran yang mengandung lemak ladderane (gambar 3). Dipercaya bahwa proses anammox berlangsung dalam membrane ini. Lemak ladderane ini (disebut ladderane) unik pada bakteri anammox dan memiliki suatu struktur yang aneh yang terbuat dari lemak yang kaku dan keras (*rigid*) (gambar 4). Membran anammoxosom ini sangat rapat karena hidrasi intermediate sangat reaktif dan dibutuhkan sebagai alat proteksi dari keseluruhan sel. Keuntungan lain dari ketatnya membrane ini adalah membatasi difusi proton melalui membrane dan oleh karena itu enzim ATPase lebih efisien.



Gambar 3: Kiri: gambar skematik. Kanan: Gambar fotograf dari TEM dari Cadidatus “*Brocadia anammoxidans*”. Dari (van Niftrik et al., 2004).



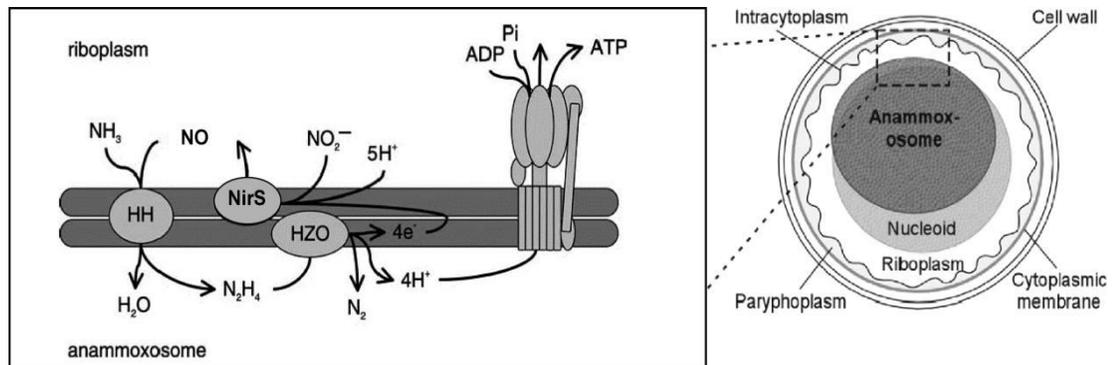
Gambar 4. Tiga contoh struktur kimiawi ladderane. Dari Brandes et al., 2007 dalam Hertach, 2008 ).

### Pertumbuhan

Bakteri anammox tumbuh secara lamban. Waktu generasinya di laboratorium dalam kondisi optimum adalah 11 hari dan dalam rata-rata 2-3 minggu. Hasil biomasnya adalah 0,07 C-mol per mol ammonium teroksidasi dengan pembebasan energy. Ini sangat irit. Sepertinya efisiensi ini yang menyebabkan pertumbuhan yang lamban. Alasan yang sebenarnya adalah kecepatan konversi substrat yang rendah. Optimum temperatur telah diamati dalam berbagai habitat yang berbeda. Dalam pengelolaan limbah cair, optimum temperatur sebesar 37<sup>0</sup> C. Di bawah kondisi lingkungan alam, optimum temperatur lebih rendah. Dalam sedimen di Young Sound, Greenland, optimumnya 12<sup>0</sup>C dan di Skagerrak 15<sup>0</sup>C.

## BIOKIMIA ANAMMOX

Proses anammox berlangsung dalam anammoxosom. Kita akan mendiskusikan bagaimana bakteri anammox menghasilkan energy dari oksidasi ammonium secara anaerob.



**Gambar 5:**Kanan: Gambar sel anammox. Kiri: demonstrasi membrane anammox dengan enzim yang terlibat dalam proses anammox. HH: hydrazine hydrolase; HZO: enzim pengoksidasi hydrazine; NIR: nitrit reduktase. Dari (Brandes et al., 2007 dalam Hertach, 2008).

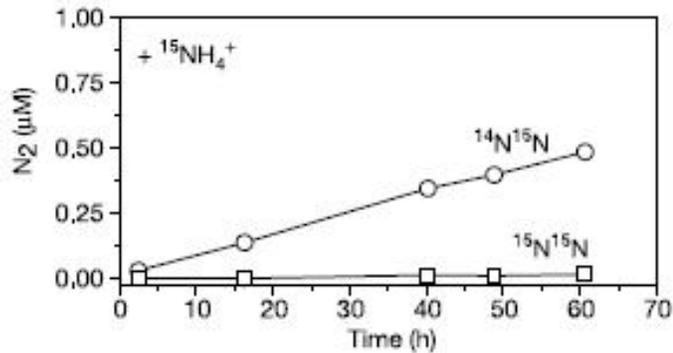
## METODE UNTUK IDENTIFIKASI ANAMMOX

Di alam denitrifikasi dan anammox dapat berlangsung bersamaan dan oleh karena itu, metode yang memadai dibutuhkan untuk membedakannya. Ada beberapa jalan untuk membuktikan bahwa terjadi proses anammox. Pertama, dengan perunut isotop nitrogen. Dengan inkubasi sampel  $^{15}\text{NH}_4^+$  dan  $^{15}\text{NO}_3^-$  kita dapat memisahkan antara denitrifikasi dan anammox sehingga kita memiliki bukti bahwa proses anammox terjadi. Langkah selanjutnya adalah mengubungkan prose situ dengan organismenya. Bakteri anammox dapat diidentifikasi dengan melihat lemak ladderane, dengan hibridisasi fluorescence in situ (FISH, Fluorescence in situ hybridization) dan dengan cara analysis phylogenetic dari gen 16S rRNA parsial.

### Inkubasi dengan $^{15}\text{NH}_4^+$

Kalau  $^{15}\text{NH}_4^+$  diberikan kedalam sampel yang berisi bakteri anammox, bakteri ini akan menggunakannya bersama dengan nitrit ( $^{14}\text{NO}_2^-$ ) untuk memproduksi  $\text{N}_2$ .

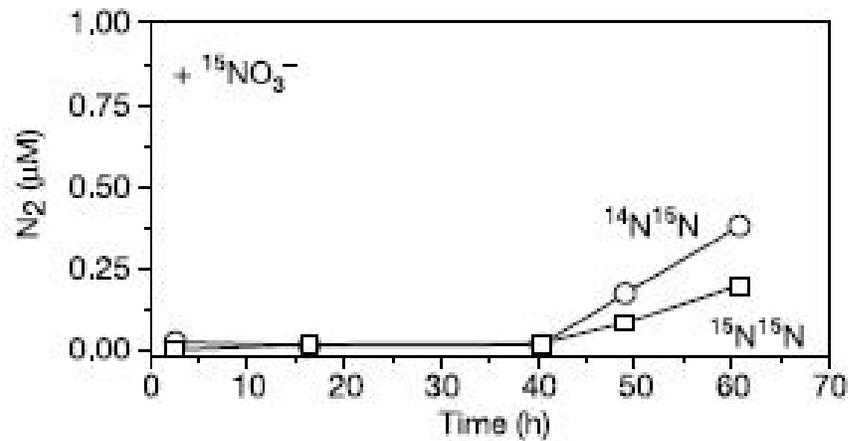
Pembentukan  $^{29}\text{N}_2$  ( $^{15}\text{N}^{14}\text{N}$ ) dapat diamati. Pembentukan ini memiliki kecepatan yang konstan (gambar 6). Jumlah  $^{30}\text{N}_2$  akan sangat rendah.



**Gambar 6: inkubasi dengan  $^{15}\text{NH}_4^+$ .  $^{29}\text{N}_2$  terbentuk dengan kecepatan konstan sementara hampir tidak terbentuk  $^{30}\text{N}_2$ . Dimodifikasi dari (Dalsgaard et al., 2003 dalam Hertach, 2008).**

#### Inkubasi dengan $^{15}\text{NO}_3^-$

Jika sampel diinkubasi dengan  $^{15}\text{NO}_3^-$ , kita memiliki pool spesies-nitrogen berikut ini:  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $^{15}\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ . Anammox dapat memproduksi baik  $^{14}\text{N}^{14}\text{N}$  ( $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$ ) maupun  $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$  ( $^{15}\text{NO}_3^- + ^{15}\text{NO}_3^-$ ). Karena *random isotope pairing* (Thamdrup dan Dalsgaard, 2002), denitrifikasi akan memproduksi semua dari tiga kemungkinan:  $^{14}\text{N}^{14}\text{N}$  ( $\text{NO}_3^- + \text{NO}_3^-$ ),  $^{15}\text{N}^{14}\text{N}$  ( $\text{NO}_3^- + ^{15}\text{NO}_3^-$ ) dan  $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$  ( $^{15}\text{NO}_3^- + ^{15}\text{NO}_3^-$ ). Jumlah  $^{28}\text{N}_2$ ,  $^{29}\text{N}_2$  dan  $^{30}\text{N}_2$  yang dihasilkan dapat dihitung. Kalau kita inkubasi sampel dengan  $^{15}\text{NO}_3^-$ , kita dapat membedakan antara proses denitrifikasi murni dan proses campuran denitrifikasi dengan anammox. Kalau jumlah  $^{29}\text{N}_2$  ( $\text{NO}_3^- + ^{15}\text{NO}_3^-$  atau  $\text{NH}_4^+ + ^{15}\text{NO}_3^-$ ) lebih tinggi dari yang seharusnya untuk proses denitrifikasi murni, ini menunjukkan adanya bukti proses anammox (lihat gambar 7 sebagai contoh)



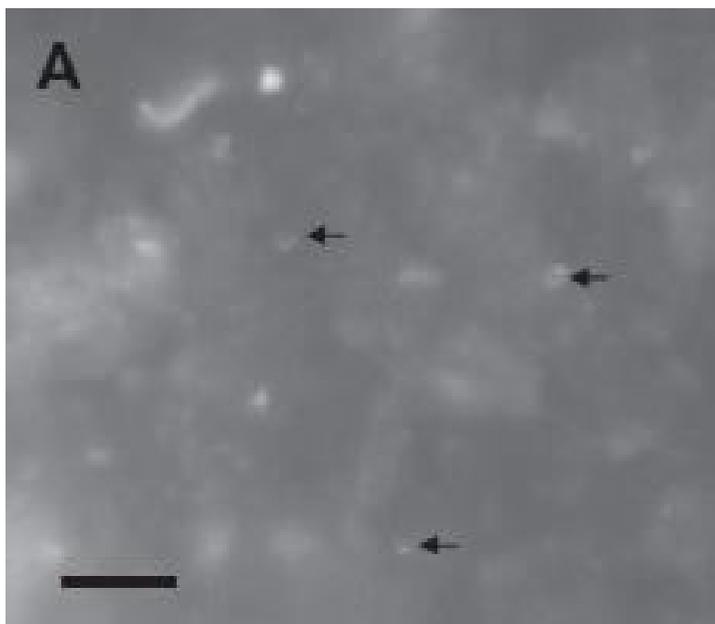
**Gambar 7: inkubasi dengan  $^{15}\text{NO}_3^-$ . Baik konsentrasi  $^{29}\text{N}_2$  dan  $^{30}\text{N}_2$  meningkat dengan waktu. Dimodifikasi dari (Dalsgaard et al., 2003).**

#### **Analisis lemak (ladderane lipids)**

Cara lainnya untuk membuktikan terjadinya anammox adalah menunjukkan bahwa ladderane pada sampel. Untuk keperluan analisis, kita harus mendapatkan bahan organik khusus melalui filtrasi sejumlah besar air (sampai 500 liter). Semua lemak akan terekstraksi dan terpisahkan menjadi fraksi asam lemak dan lemak netral. Asam lemak dianalisis dengan gas kromatografi yang dapat untuk identifikasi adanya ladderane.

#### **Fluorescence in situ hybridization (FISH)**

Umumnya, sampel oligonucleotide probes Amx-0820-a-A-22 dan BS-820-a-A22 (MWG, Jerman) yang spesifik digunakan untuk hybridisasi bakteri anammox. Sel-sel yang telah di-“label” kemudian dihitung dengan suatu mikroskop fluorescence (gambar 8)



**Gambar 8: Deteksi In situ bakteri anammox bacteria (ditandai dengan panah). Sampel sedimen Gullmarsfjorden S3, kedalaman sampel 1-2 cm . symbol garis skala 5 mm. dari (Schmid et al., 2007 dalam Hertach, 2008).**

#### **Analisis phylogenetic dari gen 16s rRNA parsial**

Dengan isolasi RNA sel bakteri anammox dan penerapan PCR, analisis phylogenetic dapat dilakukan dengan prinsip kemiripan maksimum. Bakteri memiliki kemiripan gen 16S rRNA. Dan derajat hubungan dihitung yang berdasar kemiripannya (gambar 2)

#### **APLIKASI**

Anammox telah ditemukan dalam mesin pengelola limbah cair. Diasumsikan bahwa penggunaan anammox di mesin pengolah limbah cair dapat mengurangi biaya operasional 90% (Jetten et al., 2005 dalam Hertach, 2008). Ada dua alasan bahwa, yaitu tidak perlu menambahkan methanol sebagai tambahan sumber karbon dan hanya dibutuhkan oksigen separuhnya dibanding langkah nitrifikasi/denitrifikasi tradisional. Pengirisan lain adalah penghapusan langkah nitrifikasi yang

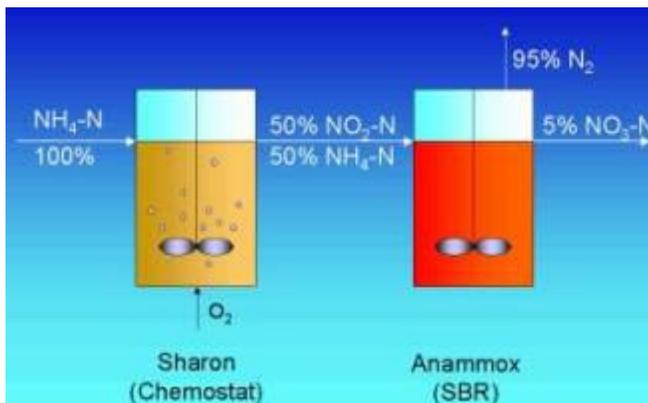
Anammox: Suatu Proses Baru Dalam Daur Nitrogen Yang Menawarkan Banyak Peluang Dalam Pengelolaan Pencemaran Air Akibat Nitrogen

membutuhkan karbon sintetis untuk berlangsungnya langkah denitrifikasi yang memproduksi  $\text{CO}_2$ .  $\text{CO}_2$  dikonsumsi oleh anammox dalam pengelolaan limbah cair. Alasan mengapa karbon ditambahkan adalah bahwa tidak cukup karbon organik dalam air limbah untuk semua nitrogen reaktif oleh denitrifikasi.

### SHARON proses untuk pengelolaan limbah cair

SHARON (*Single reactor for High activity Ammonia Removal Over Nitrite*) adalah cara baru yang berbeda dengan cara konvensional dalam penanganan limbah. Proses ini berlangsung dalam suatu reactor campuran yang sempurna tanpa penghambatan biomassa. Ini digunakan dalam menangani limbah dari pengolahan limbah yang mengalir. Dalam proses ini ammonium langsung diubah ke nitrit, dan langsung ke gas nitrogen. Oksidasi ammonium berhenti sampai nitrit oleh pengoperasian proses SHARON pada peningkatan temperatur. Pada temperatur yang lebih tinggi, bakteri pengoksidasi ammonium tumbuh lebih cepat dibanding bakteri pengoksidasi nitrit. Bakteri pengoksidasi nitrit yang tumbuh lambat terbuang dari reactor dan oksidasi ammonium berhenti pada nitrit. Temperature proses ini antara 30 dan 40 derajat Celcius. Waktu tinggal berkisar antara 1 dan 2 hari

### Kombinasi SHARON/ANAMMOX



Gambar 9: Proses SHARON/ANAMMOX. Dari (Anonym, 2007)

Dalam langkah ini, campuran ammonium-nitrit yang dihasilkan dari reactor Sharon, diubah menjadi gas nitrogen secara anaerob. Ammonium digunakan sebagai donor electron. Karena anammox berlangsung lambat (10 hari), volumenya harus diperbesar (Gambar 9).

### **Pengaruh konsentrasi COD terhadap anammox**

Semakin tinggi konsentrasi COD, semakin tinggi inhibitor, khususnya pada tahap pertamadalam percobaan. Kecepatan pembuangan (*removal*) ammonium dan jumlah ammonium, nitrit dan nitrat dikontrol oleh konsentrasi COD dalam reactor. Lebih lanjut, semakin tinggi konsentrasi COD, semakin rendah efisiensi pembuangan (*removal*) COD. Dalam permulaan reaksi, semakin tinggi konsentrasi COD, semakin tinggi pembuangan COD dan lebih besar pengaruhnya atas reaksi anammox (Jing Kang dan Jian-Long Wang, 2006)

### **KESIMPULAN**

Daur nitrogen mengalami perkembangan 15 tahun terakhir ini dari tanpa jalur anammox menjadi daur N dengan jalur anammox, dan berikutnya, daur N dengan tambahan jalur anammox dan OLAND.

Karakterisasi mikrobial pelaku anammox, biodiversitasnya, biologi selnya, dan pertumbuhannya, telah dilakukan disamping penjelasan biokimia anammox. Metode identifikasi juga dilakukan melalui Inkubasi dengan  $^{15}\text{NH}_4^+$ , Inkubasi dengan  $^{15}\text{NO}_3^-$ , Analisis lemak (ladderane lipids), Fluorescence in situ hybridization (FISH), dan Analisis phylogenetic dari gen 16s rRNA parsial. Ini Semua menambah pengetahuan peningkatan dan efisiensi pengelolaan pencemaran nitrogen.

Teknik yang dikembangkan saat ini, SHARON dan ANAMMOX, merupakan contoh dari pengembangan penemuan jalur anammox dalam daur nitrogen dan menjadi pangkal dari pengembangan reactor dan pengembangan percobaan-percobaan dalam bidang tersebut.

## DAFTAR PUSTAKA

Anonym (2007) Wastewater Technology Fact Sheet: Side Stream Nutrient Removal. United state Environmental Protection agency, USA. 7p.

Hertach, M.(2008). Anaerobic Ammonium Oxidation (Anammox) – A new sink in the marine nitrogen cycle. Hildastrasse 4 8004 Zürich. 16p.

Jing Kang dan Jian-Long Wang (2006) Influence of Chemical Oxygen Demand Concentrations on Anaerobic Ammonium Oxidation by Granular Sludge From EGSB Reactor. BIOMEDICAL AND ENVIRONMENTAL SCIENCES 19, 192-196

Karthikeyan, O.P. dan K. Joseph (2009) “ANAMMOX” a novel process for nitrogen management in bioreactor landfills – a review. Centre for Environmental Studies, Anna University, Chennai – 25.