

Seleksi bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi serta aplikasinya pada media budidaya udang vaname (*Litopenaeus vannamei*)

Selection of nitrification and denitrification bacteria with its application in culture medium of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

Widanarni*, Sugiyo Hadi Pranoto, Sukenda

Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor
Kampus IPB Darmaga Bogor 16680

*Email: widanarni@yahoo.com

ABSTRACT

The aim of this study was to obtain nitrification and denitrification bacteria and tested its activity in reducing the ammonia, nitrite and nitrate compounds in culture medium of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. The research was conducted through several steps: 1) Isolation of nitrification and denitrification bacteria from ponds and mangrove areas, 2) Selection of nitrification and denitrification bacteria *in vitro*, and 3) test of the nitrification and denitrification bacteria activities in culture medium of white shrimp. A total of 38 isolates of nitrification bacteria and 7 isolates of denitrification bacteria were successfully isolated from ponds and mangrove areas in the region of South Lampung and Subang, West Java. Of the total isolates were then selected *in vitro* based on its ability to reduce the compounds of ammonia, nitrite and nitrate and selected each 2 of the best isolates. Two select nitrification bacteria isolates, namely S11 and S12 each can oxidize ammonia at 78.25% and 80.54%, whereas two select denitrification bacteria isolates namely DS7 and DS3 each can reduce nitrate amounted to 85.41%, and 56, 49%. The test results of nitrification and denitrification bacteria activities in culture medium of white shrimp showed that S12-DS7 treatments gave the best result, with ammonia concentrations between 0.007 - 0.13 mg / l, nitrite of 0.04 - 2.34 mg / l, nitrate of 1 0.33 - 3, 29 mg / l, shrimp growth rate of 2.1%, and survival rate of 90%.

Keywords: nitrification, denitrification, *Litopenaeus vannamei*, water quality.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan menguji aktivitas bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi dalam mengurangi senyawa amonia, nitrit dan nitrat pada media budidaya udang vaname *Litopenaeus vannamei*. Penelitian dilakukan melalui beberapa tahap yaitu: 1) Isolasi bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi dari lingkungan tambak dan mangrove, 2) Seleksi bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi secara *in vitro*, dan 3) Uji aktivitas bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi pada media budidaya udang vaname. Sebanyak 38 isolat bakteri nitrifikasi dan 7 isolat bakteri denitrifikasi berhasil diisolasi dari lingkungan tambak dan mangrove di daerah Lampung Selatan dan Subang, Jawa Barat. Dari total isolat tersebut kemudian diseleksi secara *in vitro* berdasarkan kemampuannya dalam menurunkan senyawa amonia, nitrit dan nitrat dan dipilih masing-masing 2 isolat terbaik. Dua isolat bakteri nitrifikasi terseleksi yaitu S11 dan S12 masing-masing dapat mengoksidasi amonia sebesar 78,25% dan 80,54%, sedangkan dua isolat bakteri denitrifikasi terseleksi yaitu DS3 dan DS7 masing-masing dapat mereduksi nitrat sebesar 85,41% dan 56,49%. Hasil uji aktivitas bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi pada media budidaya udang vaname menunjukkan bahwa perlakuan S12-DS7 memberikan hasil terbaik, dengan konsentrasi amonia berkisar antara 0,007-0,13 mg/l, nitrit 0,04-2,34 mg/l, nitrat 1,33-3,29mg/l, laju pertumbuhan udang sebesar 2,1%, dan kelangsungan hidup 90%.

Kata kunci: nitrifikasi, denitrifikasi, *Litopenaeus vannamei*, kualitas air

PENDAHULUAN

Udang vaname *Litopenaeus vannamei* merupakan salah satu jenis udang laut yang memiliki nilai ekspor tinggi. Salah satu

kelebihan udang vaname adalah dapat ditanam dengan kepadatan yang tinggi atau dibudidayakan secara intensif, sehingga produksi budidaya udang vaname dapat jauh lebih tinggi dibanding dengan produksi

budidaya jenis udang yang lain. Akibat dari kepadatan yang tinggi, maka akan terjadi akumulasi bahan organik yang tinggi dalam media hidup udang. Hal ini dapat menyebabkan penurunan kualitas air sebagai akibat dari tingginya kandungan senyawa nitrogen anorganik, baik yang berasal dari limbah metabolime (ekskresi) udang, sisa-sisa pakan (*uneaten feed*), kotoran (feses) udang, alga yang mati dan bahan-bahan organik lainnya (Durborow *et al.* 1997). Kondisi ini menyebabkan terjadinya akumulasi kandungan senyawa amonia (NH_3), nitrit (NO_2^-) dan nitrat (NO_3^-), yang pada konsentrasi tertentu bersifat toksik pada udang. Kualitas air yang rendah juga akan menjadi stressor munculnya serangan beberapa penyakit bakterial maupun viral yang dapat menyebabkan kematian udang secara massal, sehingga dapat menurunkan jumlah produksi udang.

Pendekatan permasalahan tersebut dapat dilakukan dengan perbaikan kualitas air dari kontaminasi bahan organik atau anorganik menggunakan organisme hidup yang dapat menguraikan atau merombak limbah dalam tambak menjadi senyawa-senyawa yang tidak membahayakan udang dan tidak menurunkan kualitas air. Proses biologis ini sering disebut bioremediasi. Salah satu bahan yang digunakan untuk agen bioremediasi ini yaitu jenis mikro-organisme seperti bakteri nitrifikasi dan bakteri denitrifikasi (Devaraja *et al.* 2002). Adanya bakteri nitrifikasi maka amonia yang bersifat toksik dapat dioksidasi menjadi nitrit dan kemudian menjadi nitrat yang tidak begitu toksik untuk udang, selain itu nitrat dapat diambil langsung oleh alga sebagai sumber nutrisi. Konsentrasi nitrat yang tinggi dapat menyebabkan kasus *nitrate toxicity*, sehingga harus direduksi oleh bakteri denitrifikasi menjadi gas nitrogen (N_2) yang dapat lepas langsung ke atmosfer. Wang dan Han (2007) melakukan penelitian mengenai hidropobisitas dinding sel dari bakteri *Bacillus* sp. YB-030518 dan YB-034325 yang diisolasi dari kolam ikan mas *Cyprinus carpio* dan perubahannya di bawah kondisi kultur yang berbeda. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa hidropobisitas YB-034325 secara signifikan

lebih tinggi daripada YB-030518 ($P < 0,05$). Hidropobisitas permukaan sel mikroba merupakan salah satu faktor yang menentukan dalam pelekatan mikroba terhadap permukaan bioremediasi. Dengan penelitian ini diharapkan konsentrasi senyawa nitrogen anorganik (NH_3 , NO_2^- dan NO_3^-) dapat dijaga pada kondisi optimal dengan memanfaatkan bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi dan menguji aktivitasnya dalam mengurangi senyawa amonia, nitrit dan nitrat pada media budidaya udang vaname.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan sampel air dan sedimen

Sampel air dan sedimen diambil secara langsung dari setiap lokasi tambak dan lingkungan mangrove menggunakan botol steril bervolume 600 ml. Sampel air dan sedimen diambil dari bagian inlet dan bagian tambak yang relatif tenang pada bagian sudut tambak. Sampel air diambil dari permukaan sampai kolom air tambak di bagian yang sama dengan pengambilan sampel sedimen. Sedimen diambil dari bagian permukaan dasar tambak sampai kedalaman 15 cm dengan menggunakan pipa paralon 2 inci, dan dimasukkan ke dalam botol plastik bervolume 300 ml. Sampel air dan sedimen tersebut dimasukkan ke dalam kotak (*coolbox*) volume 15 liter yang sudah diberi es batu.

Isolasi dan seleksi bakteri nitrifikasi

Sebanyak 5 ml sampel air dan 1 gram contoh sedimen dimasukkan ke dalam 25 ml media nitrifikasi-cair autotrof dan heterotrof (Rodina 1972) pada erlenmeyer 100 ml, kemudian diinkubasi selama 7 hari pada inkubator bergoyang (*shaker*) pada suhu 28°C dengan kecepatan 130 rpm. Setelah 7 hari inkubasi, senyawa nitrat yang dihasilkan diukur menggunakan metode brusin.

Sebanyak 5 ml suspensi dari kultur bakteri yang positif menghasilkan nitrat diinokulasi ulang dalam media nitrifikasi-cair pada erlenmeyer kemudian diinkubasi

selama 7 hari pada inkubator bergoyang (*shaker*) pada suhu 28°C dengan kecepatan 130 rpm. Selanjutnya satu ose dari kultur bakteri digores pada media nitrifikasi-agar dengan menggunakan metode kwadran, kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 29°C selama 5-7 hari. Koloni yang terpisah dimurnikan kembali dengan cara menggores ulang pada media nitrifikasi-agar.

Isolat-isolat bakteri nitrifikasi yang diperoleh kemudian diseleksi dengan menumbuhkannya dalam 20 ml media nitrifikasi-cair heterotrof pada erlenmeyer bervolume 100 ml, kemudian diinkubasi selama 3 hari di inkubator bergoyang pada suhu 28°C dengan kecepatan 130 rpm sebagai inokulan isolat uji. Masing-masing inokulan isolat uji diambil sebanyak 2 ml dan diinokulasikan ke dalam 50 ml media nitrifikasi-cair pada erlenmeyer volume 250 ml dengan konsentrasi total amonia nitrogen 130 mg/l. Inkubasi dilakukan selama 7 hari pada suhu 28°C di atas inkubator bergoyang dengan kecepatan 130 rpm. Pengukuran konsentrasi amonia, nitrit, nitrat dan populasi bakteri dilakukan setiap 2 hari yaitu pada hari ke 0, 2, dan 4. Sebagai kontrol digunakan media yang tidak diinokulasi isolat bakteri.

Isolasi dan seleksi bakteri denitrifikasi

Sebanyak 1 ml sampel air dan 1 ml lumpur sedimen (hasil pengenceran 10⁻¹) dimasukkan ke dalam tabung reaksi berulir yang berisi 20 ml media denitrifikasi-cair (Rodina, 1972) kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 7 hari. Perubahan tingkat kekeruhan dan gas yang dihasilkan pada tabung Durham menunjukkan adanya bakteri denitrifikasi.

Sebanyak 2 ml suspensi kultur bakteri yang positif menghasilkan gas diinokulasi ulang dalam media denitrifikasi-cair pada tabung reaksi volume 22 ml kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 7 hari. Satu ose kultur bakteri digores pada media denitrifikasi-agar dengan menggunakan metode kwadran dan diinkubasi pada kondisi anaerobik dalam *Anaerobik Jar BBL* (Oxoid, BR-38, England) selama 7-10 hari. Koloni sel yang terpisah dimurnikan

kembali dengan digores kwadran pada media denitrifikasi dan diinkubasi pada kondisi anaerobik.

Isolat murni yang didapat selanjutnya diuji oksidatif/fermentatif (uji O/F). Pada uji ini disediakan dua tabung reaksi yang sudah berisi media O/F steril. Satu tabung tidak ditutup parafin steril sedangkan tabung yang lainnya ditutup menggunakan parafin steril dengan ketebalan sekitar 1 cm. Masing-masing isolat diambil satu ose penuh kemudian ditusukkan secara vertikal pada media O/F. Inkubasi dilakukan pada suhu 28°C selama 7 hari. Isolat bersifat fermentatif negatif jika kedua media O/F yang digunakan baik yang ditutup parafin maupun yang tidak, keduanya tidak berwarna kuning. Isolat-isolat yang bersifat non fermentatif ini merupakan kelompok bakteri denitrifikasi.

Isolat bakteri denitrifikasi yang diperoleh ditumbuhkan pada 20 ml media denitrifikasi-cair steril dalam erlenmeyer bervolume 100 ml, kemudian diinkubasi selama 5 hari pada suhu 28°C sebagai inokulan isolat uji. Masing-masing inokulan isolat uji diambil sebanyak 2 ml dan diinokulasikan ke dalam 50 ml media denitrifikasi-cair pada botol bervolume 100 ml dengan konsentrasi nitrat 550 mg/l. Inkubasi dilakukan pada suhu 28°C selama 16 hari dengan kondisi mikroaerofilik. Pengukuran konsentrasi nitrat, nitrit, amonia dan *optical density* (OD) dilakukan setiap 8 hari yaitu pada hari ke-0, 8, dan 16. Sebagai kontrol digunakan media yang tidak diinokulasi isolat bakteri.

Uji aktivitas bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi terseleksi pada media budidaya udang vaname

Uji aktivitas bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi dilakukan selama 26 hari dengan lima perlakuan dan 3 ulangan. Perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi :

- A: Gabungan antara isolat bakteri nitrifikasi terbaik 1 dan denitrifikasi terbaik 1
- B: Gabungan antara isolat bakteri nitrifikasi terbaik 1 dan denitrifikasi terbaik 2
- C: Gabungan antara isolat bakteri nitrifikasi terbaik 2 dan denitrifikasi terbaik 1

D: Gabungan antara isolat bakteri nitrifikasi terbaik 2 dan denitrifikasi terbaik 2

E: Kontrol, yaitu perlakuan yang tidak diinokulasi bakteri

Udang vaname (umur 40 hari) yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari tambak Pinang Gading Lampung. Sebanyak 10 ekor udang vaname dengan dengan bobot rata-rata 5,4 gram dipelihara dalam akuarium yang berisi 30 liter air laut steril. Pemberian pakan dilakukan 5 kali sehari (jam 07.00, 11.00, 15.00, 19.00, dan 23.00 WIB) dengan *feeding rate* (FR) sebesar 5% dari bobot biomassa. Udang dipelihara dengan sistem tidak ganti air atau sering disebut "Zero Water Exchange". Inokulasi bakteri pertama dilakukan tiga hari setelah penebaran udang dan inokulasi bakteri selanjutnya dilakukan setiap 7 hari sekali dengan konsentrasi 1×10^8 CFU/ml (untuk bakteri nitrifikasi) dan $1,9 \times 10^8$ CFU/ml (untuk bakteri denitrifikasi) masing-masing sebanyak 3 ml per akuarium. Penimbangan bobot udang dilakukan setiap 7 hari sekali dengan timbangan digital dan udang yang diambil sebanyak 30% dari populasi udang.

Parameter yang Diamati

a. Seleksi Bakteri Nitrifikasi

Parameter yang diukur meliputi konsentrasi senyawa amonia, nitrit, dan nitrat, serta populasi bakteri. Persentase konsentrasi amonia yang teroksidasi dan senyawa nitrat atau nitrit yang terbentuk dapat dihitung menggunakan rumus di bawah ini (Widiyanto 2005) :

$$[AO] = \frac{[AK - AP]}{[AK]} \times 100\%$$

Keterangan :

AO : Persentase konsentrasi amonia yang teroksidasi

AK : Konsentrasi amonia pada media kontrol

AP : Konsentrasi amonia pada media yang diinokulasi bakteri

Konsentrasi nitrat (NT) atau nitrit (NI) yang terbentuk adalah konsentrasi nitrat atau nitrit pada suspensi perlakuan dikurangi dengan konsentrasi nitrat atau

nitrit yang terdapat pada suspensi kontrol. Persentase konsentrasi nitrat yang terbentuk (PNT) atau persentase konsentrasi nitrit yang terbentuk (PNI) dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$[PNT] = \frac{[NTP - NTK]}{[AK - AP]} \times 100\%$$

Keterangan :

PNT : Persentase konsentrasi nitrat yang terbentuk

NTP : Konsentrasi nitrat pada suspensi perlakuan (diinokulasi bakteri)

AK : Konsentrasi amonia pada media kontrol

AP : Konsentrasi amonia pada media yang diinokulasi bakteri

Sedangkan persentase konsentrasi nitrit yang terbentuk dihitung dengan rumus :

$$[PNI] = \frac{[NIP - NIK]}{[AK - AP]} \times 100\%$$

Keterangan :

PNI : Persentase konsentrasi nitrit yang terbentuk

NIP : Konsentrasi nitrit pada suspensi perlakuan (diinokulasi bakteri)

AK : Konsentrasi amonia pada media kontrol

AP : Konsentrasi amonia pada media yang diinokulasi bakteri

b. Seleksi Bakteri Denitrifikasi

Parameter yang diukur meliputi konsentrasi senyawa amonia, nitrit, dan nitrat, serta populasi bakteri. Persentase konsentrasi nitrat yang tereduksi dihitung dengan rumus sebagai berikut (Widiyanto 2005):

$$[NO_3^-]_{red} = [NO_3^-]_{kontrol} - [NO_3^-]_{perlakuan}$$

$$\% [NO_3^-]_{red} = \frac{[NO_3^-]_{red}}{[NO_3^-]_{kontrol}} \times 100\%$$

Persentase konsentrasi nitrit yang terbentuk dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$[NO_2^-]_{terbentuk} = [NO_2^-]_{perlakuan} - [NO_2^-]_{kontrol}$$

$$\% [NO_2^-]_{terbentuk} = \frac{[NO_2^-]_{terbentuk}}{[NO_3^-]_{red}} \times 100\%$$

Produk akhir gas yang terbentuk dihitung dengan formula sebagai berikut:

$$[Gas]_{\text{terbentuk}} = [NO_3^-]_{\text{red}} - [NO_2^-]_{\text{terbentuk}} - [NH_3]_{\text{terbentuk}}$$

$$\%[Gas]_{\text{terbentuk}} = \left[\frac{[Gas]_{\text{terbentuk}}}{[NO_3^-]_{\text{red}}} \right] \times 100\%$$

c.

c. Uji aktivitas bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi

1. Populasi bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi

Populasi bakteri yang dihitung meliputi populasi bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi pada air pemeliharaan. Populasi bakteri dihitung berdasarkan rata-rata jumlah koloni yang tumbuh pada media agar dikalikan dengan faktor pengenceran.

2. Pertumbuhan udang

Pertumbuhan udang diamati pada awal dan akhir percobaan. Pertumbuhan udang vaname dihitung berdasarkan pertambahan bobot dengan rumus (Huisman (1987):

$$\alpha = \left\{ \left(\sqrt{\frac{Wt}{Wo}} - 1 \right) \right\} \times 100\%$$

α : Laju pertumbuhan harian udang (%)

t : Lama waktu pemeliharaan udang (hari)

Wt : Bobot rata-rata akhir udang (mg)

Wo : Bobot rata-rata awal udang (mg)

3. Tingkat kelangsungan hidup udang

Tingkat kelangsungan hidup udang dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Effendie, 1979):

$$SR = \frac{Nt}{No} \times 100\%$$

Keterangan :

SR : Tingkat kelangsungan hidup (%)

Nt : Jumlah udang yang hidup pada akhir pengamatan (ekor)

No : Jumlah udang pada awal pengamatan (ekor)

4. Kualitas air

Parameter kualitas air yang meliputi konsentrasi senyawa amonia, nitrit dan

nitrat diukur setiap 7 hari sekali, sedangkan pH, suhu, salinitas, kandungan oksigen terlarut (DO) diukur setiap 3 hari sekali.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat bakteri nitrifikasi

Pertumbuhan bakteri nitrifikasi dari sampel air dan sedimen ditandai dengan terbentuknya nitrat dan kekeruhan pada media cair nitrifikasi setelah diinkubasi selama 7 hari. Media yang positif memproduksi nitrat diduga terdapat bakteri nitrifikasi yang dapat mengubah amonia menjadi nitrit dan nitrat. Bakteri nitrifikasi ini kemudian ditumbuhkan pada media agar nitrifikasi dan koloni yang terpisah dimurnikan kembali dengan cara menggores ulang pada media agar nitrifikasi.

Sebanyak 38 isolat bakteri nitrifikasi berhasil diisolasi dari tambak bandeng tradisional dan lingkungan mangrove di Lampung serta tambak udang windu tradisional dan lingkungan mangrove di Subang, Jawa Barat. Dari 38 isolat yang diperoleh, 2 isolat berasal dari tambak bandeng tradisional Lampung, 8 isolat dari lingkungan mangrove (4 isolat dari mangrove Lampung dan 4 isolat dari mangrove Subang) serta 28 isolat berasal dari tambak udang windu tradisional Subang. Secara morfologis koloni diperoleh 18 isolat berwarna putih susu, 5 isolat berwarna putih bening, 10 isolat berwarna putih krem, 2 isolat berwarna kuning terang, 2 isolat berwarna kuning serta 1 isolat berwarna coklat pada media nitrifikasi.

Dari total 38 isolat bakteri nitrifikasi yang diuji memiliki kemampuan yang berbeda dalam mengoksidasi amonia pada media cair nitrifikasi, yaitu berkisar antara 18,10-80,54% dari 130 mg/l amonia yang ditambahkan. Semua isolat dapat memanfaatkan amonia untuk aktivitas metabolismenya, baik sebagai sumber energi maupun sebagai sumber nitrogen untuk pembentukan biomassa sel. Isolat S11 dan S12 yang diisolasi dari tambak udang windu tradisional Subang memiliki kemampuan paling tinggi dalam mengoksidasi amonia menjadi nitrit dan

nitrat. Isolat S11 dan S12 yang diisolasi dari media nitrifikasi autotrof dapat mengoksidasi amonia masing-masing sebesar 78,25% dan 80,54% (Tabel 1).

Sumber amonia yang ditambahkan pada media akan diubah oleh isolat bakteri nitrifikasi menjadi nitrit dan nitrat. Hal ini bisa dilihat dari nitrit dan nitrat yang dihasilkan pada media. Persentase nitrit yang dihasilkan berkisar antara 0,00-25,33% sedangkan persentase nitrat yang dihasilkan berkisar antara 4,90-67,26%. Pada Tabel 1 terlihat bahwa isolat S11 mampu menghasilkan nitrit sebesar 0,40 mg/l (0,41%), sedangkan S12 menghasilkan nitrit sebesar 0,52 mg/l (0,51%). Persentase nitrit yang dihasilkan relatif kecil disebabkan karena nitrit akan digunakan sebagai sumber energi bakteri setelah amonia teroksidasi. Selain itu senyawa nitrit bersifat reaktif, sehingga akan teroksidasi cepat secara spontan.

Menurut Schmidt *et al.* (2004), tipe liar dari bakteri *Nitrosomonas europea* memiliki enzim yang berperan dalam proses oksidasi amonia, yaitu amonium oksidoreduktase (AMO), hidrosilamina oksidoreduktase (HAO), nitrit reduktase (NIR), nitrit oksidoreduktase (NOR) dan nitrous oksidoreduktase (NOS). Enzim-enzim tersebut yang berperan dalam mengoksidasi amonia menjadi hidrosilamina, nitrit, gas nitrous oksida maupun gas nitrogen.

Isolat S11 dan S12 menghasilkan nitrat masing-masing sebesar 18 mg/l (18,16%) dan 21 mg/l (20,59%) (Tabel 1). Diduga enzim-enzim isolat bakteri yang aktif dan bekerja dalam metabolisme adalah enzim AMO, HAO dan NOR, sehingga nitrat terbentuk pada media. Selain itu isolat S12 memiliki rata-rata populasi bakteri yang lebih tinggi dibanding dengan isolat S11, sehingga isolat S12 akan menghasilkan nitrat yang lebih tinggi. Isolat S11 dapat

mencapai populasi hingga 7,70 Log CFU/ml sedangkan S12 dapat mencapai 7,87 Log CFU/ml (Tabel 1).

Isolat bakteri denitrifikasi

Parameter utama yang diamati pada tahap isolasi bakteri denitrifikasi adalah, terbentuknya gas dan kekeruhan pada media cair denitrifikasi yang telah ditambahkan sampel air dan sedimen, setelah diinkubasi selama 7 hari. Media yang positif memproduksi gas pada tabung Durham diduga terdapat bakteri denitrifikasi yang dapat mengubah nitrat (NO_3^-) menjadi nitrit (NO_2^-), nitrit oksida (NO), nitrous oksida (N_2O), dan gas dinitrogen (N_2). Bakteri denitrifikasi ini kemudian ditumbuhkan pada media agar denitrifikasi pada kondisi anaerobik dalam *Anaerobik Jar* BBL agar bakteri ini dapat tumbuh optimal tanpa ada kontaminan dari bakteri-bakteri yang bersifat aerobik. Koloni yang terpisah dimurnikan kembali dengan cara menggores ulang pada media agar denitrifikasi. Isolat murni yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk uji seleksi aktivitas bakteri denitrifikasi dalam menurunkan senyawa nitrat.

Isolat-isolat bakteri yang tumbuh pada media denitrifikasi, dapat memproduksi gas dan hidup pada kondisi fakultatif anaerobik tidak semuanya merupakan kelompok bakteri denitrifikasi. Walaupun media yang digunakan adalah media selektif untuk bakteri denitrifikasi, dengan sumber karbon dari asam asetat yang tidak menunjang untuk pertumbuhan kelompok bakteri fermentatif, tetapi masih perlu dilakukan seleksi terhadap kemungkinan didapatkannya bakteri fermentatif. Uji yang dilakukan adalah uji fermentatif/oksidatif (uji O/F). Isolat-isolat yang bersifat non fermentatif ini merupakan kelompok bakteri denitrifikasi.

Tabel 1. Kemampuan isolat bakteri nitrifikasi terpilih dalam mengoksidasi amonia serta nitrit dan nitrat yang dihasilkan selama inkubasi 2 hari.

Kode Isolat	Amonia teroksidasi		Nitrit yang terbentuk		Nitrat yang terbentuk		Populasi bakteri log CFU/ml
	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	
S11	99,09	78,25	0,40	0,41	18,00	18,16	7,70
S12	101,99	80,54	0,52	0,51	21,00	20,59	7,87
Kontrol	2,35	1,86	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Sebanyak 7 isolat bakteri denitrifikasi berhasil diisolasi dari lingkungan mangrove di Lampung dan tambak udang windu tradisional di Subang, Jawa Barat. Dari total isolat tersebut, 3 isolat berasal dari lingkungan mangrove di Lampung, dan 4 isolat berasal dari tambak udang windu tradisional Subang. Morfologi koloni dari 7 isolat tersebut menunjukkan 4 isolat berwarna putih susu, 1 isolat berwarna putih krem, 1 isolat berwarna kuning terang dan 1 isolat berwarna coklat muda pada media denitrifikasi.

Isolat bakteri denitrifikasi yang potensial adalah isolat yang mempunyai kemampuan mereduksi nitrat, dapat memproduksi gas, dan tidak memproduksi amonia. Isolat-isolat bakteri denitrifikasi yang diuji memiliki kemampuan yang berbeda dalam mereduksi nitrat pada media cair denitrifikasi, yaitu berkisar antara 28,09-85,41%, membentuk nitrit sebesar 0,53-37,03% serta memproduksi gas sebesar 62,71-99,47%.

Menurut Richardson dan Watmough (1999), enzim-enzim yang berperan dalam aktivitas denitrifikasi adalah nitrat reduktase (NAR dan NAP) yang merubah nitrat menjadi nitrit, nitrit reduktase (NIR) yang merubah nitrit menjadi nitrit oksida, nitrit oksidoreduktase (NOR) yang merubah nitrit oksida menjadi nitrous oksida, dan nitrous oksidoreduktase (NOS) yang merubah nitrous oksida menjadi gas nitrogen.

Isolat DS3 dan DS7 memiliki kemampuan terbaik dalam mereduksi senyawa nitrat menjadi nitrit maupun gas nitrogen. Isolat DS3 mereduksi nitrat sebesar 455,10 mg/l (85,41%), dan mampu memproduksi gas sebesar 312,68 mg/l (68,71%), sedangkan isolat DS7 mampu mereduksi nitrat sebesar 301,01 mg/l (56,49%) dan memproduksi gas 211,78 mg/l (70,36%) (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa masing-masing isolat bakteri denitrifikasi memiliki spesifikasi yang berbeda dalam mereduksi senyawa nitrat dan memproduksi gas nitrogen terutama berhubungan dengan aktivitas enzim yang terdapat pada masing-masing isolat. Nitrat yang direduksi oleh isolat

DS3 dan DS7 lebih banyak dibanding dengan kontrol.

Isolat DS3 mampu membentuk nitrit sebesar 142,42 mg/l (31,29%), sedangkan DS7 membentuk nitrit sebesar 87,6 mg/l (29,1%) (Tabel 2). Pada isolat DS3 enzim nitrat reduktase dapat bekerja dengan baik, tetapi tidak diimbangi oleh aktivitas enzim nitrit reduktase, sehingga terjadi akumulasi senyawa nitrit pada media uji. Kemungkinan aktivitas enzim nitrit reduktase pada isolat DS3 lebih rendah dibandingkan dengan isolat DS7. Selain itu isolat DS3 memiliki rata-rata populasi bakteri yang lebih rendah dibanding dengan DS7. Sehingga dapat dilihat bahwa isolat DS3 menghasilkan senyawa nitrit yang lebih tinggi dibandingkan dengan isolat DS7.

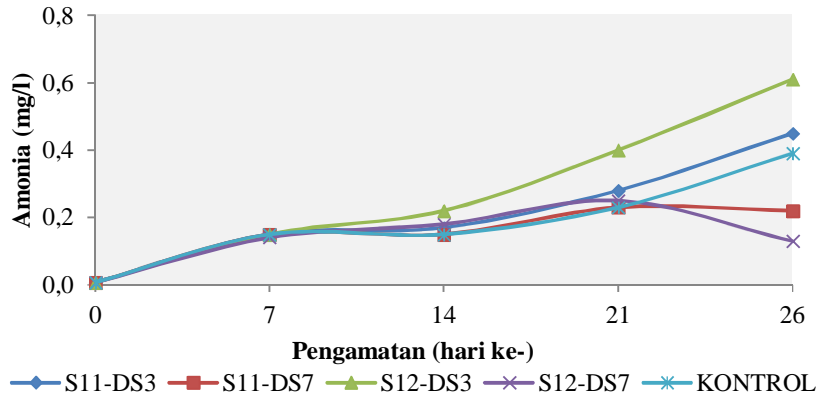
Perbedaan kemampuan mereduksi nitrat disebabkan oleh perbedaan aktivitas metabolisme dari masing-masing isolat. Hal ini dapat dilihat dari hubungan antara pertumbuhan atau populasi (nilai OD) dengan aktivitas reduksi nitrat. Tingkat pertumbuhan atau populasi yang tinggi tidak selalu diikuti oleh kemampuan tingkat reduksi yang tinggi. Dari Tabel 2 dapat dilihat bahwa isolat DS3 memiliki nilai OD yang lebih rendah jika dibandingkan DS7, tetapi DS3 memiliki kemampuan mereduksi nitrat dengan persentase yang lebih besar dibandingkan DS7.

Aktivitas bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi pada media pemeliharaan udang vaname

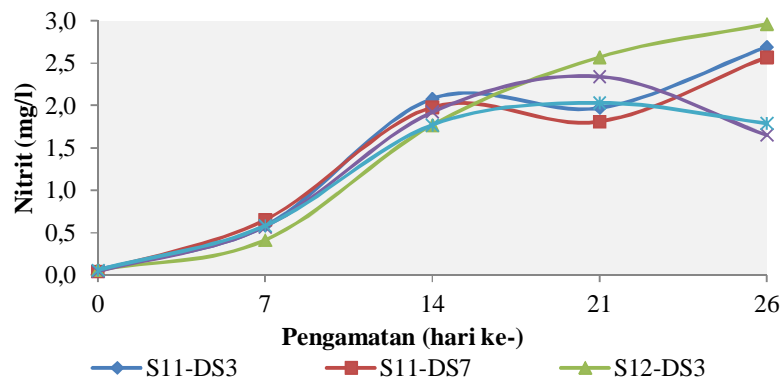
Isolat bakteri nitrifikasi terseleksi yang digunakan adalah S11 dan S12, sedangkan isolat bakteri denitrifikasi adalah DS3 dan DS7. Perlakuan yang digunakan dalam uji aktivitas ini merupakan gabungan antara isolat bakteri nitrifikasi dan bakteri denitrifikasi terseleksi. Gabungan bakteri tersebut adalah S11-DS3, S11-DS7, S12-DS3, S12-DS7, serta kontrol (tanpa inokulasi bakteri).

Profil kualitas air

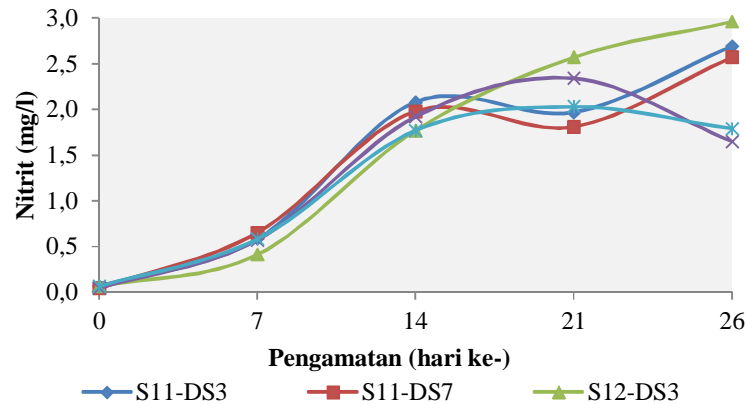
Umumnya konsentrasi amonia pada masing-masing perlakuan meningkat dengan semakin lamanya waktu pemeliharaan udang, kecuali perlakuan S11-DS7



Gambar 1. Profil amonia selama uji aktivitas bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi pada media pemeliharaan udang vaname.



Gambar 2. Profil nitrit selama uji aktivitas bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi pada media pemeliharaan udang vaname.



Gambar 3. Profil nitrat selama uji aktivitas bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi pada media pemeliharaan udang vaname.

Rata-rata populasi bakteri nitrifikasi pada perlakuan S11-DS7 dan S12-DS7 lebih tinggi dibanding dengan perlakuan yang lainnya, sehingga tingkat oksidasi amonia menjadi nitrit dan nitrat juga tinggi (Gambar 4). Terutama pada hari ke-26, perlakuan S12-DS7 dapat mengoksidasi amonia hingga 0,13 mg/l dan perlakuan S11-DS7 hingga 0,22 mg/l. Sedangkan

pada perlakuan S11-DS3 dan S12-DS3, rata-rata populasi bakteri nitrifikasi lebih rendah dibanding dengan perlakuan lain. Hal inilah yang menyebabkan rata-rata konsentrasi amonia yang lebih tinggi pada perlakuan S11-DS3 dan S12-DS3 (Gambar 1). Dengan demikian populasi bakteri nitrifikasi ini sangat mempengaruhi konsentrasi amonia, nitrit dan nitrat.

Gambar 5 memperlihatkan bahwa rata-rata populasi bakteri denitrifikasi pada perlakuan S11-DS3 dan S12-DS3 lebih tinggi dibanding dengan perlakuan lainnya sehingga konsentrasi nitrat yang direduksi menjadi nitrit dan gas nitrogen juga lebih banyak. Hal ini menyebabkan konsentrasi nitrit pada perlakuan S11-DS3 dan S12-DS3 lebih tinggi dibandingkan perlakuan yang lainnya (Gambar 2). Sebaliknya, rata-rata populasi bakteri denitrifikasi pada perlakuan S11-DS7 dan S12-DS7 lebih rendah dibanding dengan perlakuan lainnya sehingga konsentrasi nitrat yang direduksi menjadi nitrit dan gas nitrogen juga lebih sedikit.

Nilai pH pada semua perlakuan selama pemeliharaan udang berkisar antara 7,31-8,40. Kisaran pH tersebut masih layak untuk budidaya udang vaname. Udang dapat mentolerir kisaran pH dari 7,0 sampai 9,0. Air yang sangat asam (kurang dari 6,5) atau sangat basa (lebih dari 10,0) dapat merusak insang dan mengganggu pertumbuhan udang. Nilai pH sebaiknya dijaga pada kisaran 7,2-7,8, hal ini berkaitan dengan hubungan antara konsentrasi amonia dengan pH. Selain itu kisaran pH 7,2-7,8 cocok untuk pertumbuhan bakteri nitrifikasi (Boyd, 1990).

Gambar 7 menunjukkan bahwa kandungan oksigen terlarut (DO) pada masing-masing perlakuan mengalami penurunan dengan bertambahnya waktu pemeliharaan. Konsentrasi DO mengalami penurunan yang tajam setelah hari ke-12, hal ini disebabkan oleh respirasi baik yang dilakukan oleh udang maupun oleh bakteri. Dengan kata lain semakin bertambahnya waktu pemeliharaan, maka akan semakin menumpuk pula bahan-bahan organik (sisa pakan dan feses) dalam media pemeliharaan, sehingga proses dekomposisi bakteri yang membutuhkan banyak oksigen juga akan meningkat.

Oksigen diperlukan oleh udang untuk kegiatan respirasi, proses-proses fisiologis sel dan untuk mengoksidasi karbohidrat dalam pembentukan energi yang dibutuhkan untuk metabolisme nutrisi dalam pakan. Jika konsentrasi oksigen yang tersedia kurang, kemampuan udang untuk

memetabolisme pakan akan menjadi kurang dan berimplikasi pada penurunan laju pertumbuhan serta peningkatan konversi pakan (Van Wyk *et al.*, 1999).

Kandungan oksigen terlarut (DO) pada semua perlakuan selama pemeliharaan udang berkisar antara 3,07-5,03 mg/l. Perlakuan S12-DS7 memiliki rata-rata nilai DO yang paling tinggi, sedangkan perlakuan kontrol memiliki nilai DO yang paling rendah. Kisaran nilai DO tersebut masih layak untuk budidaya udang vaname. Boyd (1990) mengatakan bahwa kandungan oksigen terlarut yang masih baik untuk pertumbuhan udang adalah sekitar 3,5-7,0 mg/l.

Nilai suhu pada semua perlakuan selama pemeliharaan udang berkisar antara 27,77-30,30°C. Sedangkan nilai salinitas berkisar antara 29,67-31,67 ppt. Kisaran nilai suhu dan salinitas tersebut masih layak untuk budidaya udang vaname. Suhu yang optimal untuk pertumbuhan udang vaname berkisar 28-32°C.

Kinerja produksi udang

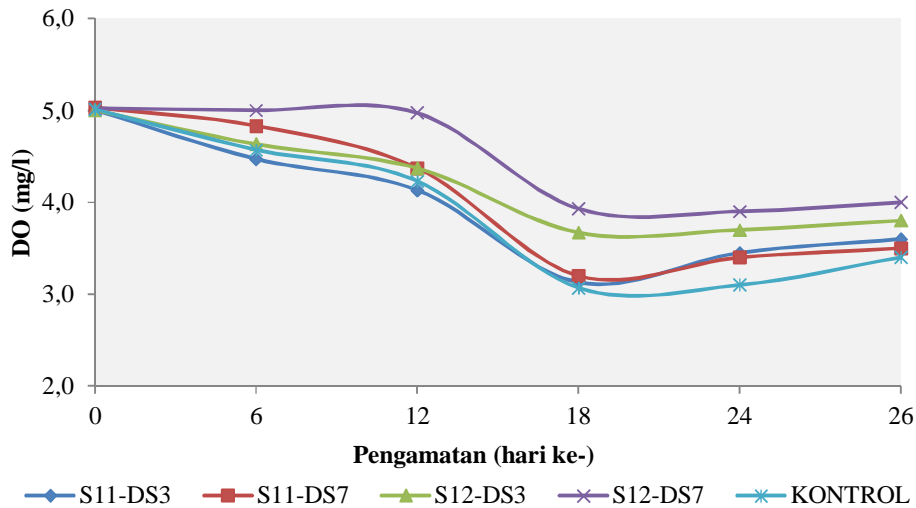
Laju pertumbuhan udang berkisar antara 1,43-2,10%. Perlakuan S12-DS7 memiliki laju pertumbuhan yang lebih tinggi dibanding dengan perlakuan lain dan kontrol, sedangkan kontrol memiliki laju pertumbuhan yang paling rendah. Berdasarkan hasil uji statistik ($p < 0,05$), perlakuan S12-DS7 tidak berbeda dengan perlakuan S11-DS3, S12-DS3, dan S11-DS7, tetapi berbeda nyata terhadap kontrol. Demikian juga perlakuan S11-DS3 hanya berbeda nyata terhadap kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi dapat meningkatkan laju pertumbuhan udang vaname.

Amonia merupakan senyawa yang toksik terhadap udang pada konsentrasi tertentu. Konsentrasi amonia yang tinggi akan mengiritasi insang udang sehingga dapat menyebabkan hiperplasia (pembengkakan filamen insang) yang akan mengurangi kemampuan darah udang mengikat oksigen dari air (Van Wyk *et al.*, 1999). Perlakuan S12-DS7 memiliki rata-rata konsentrasi amonia yang lebih rendah jika dibanding

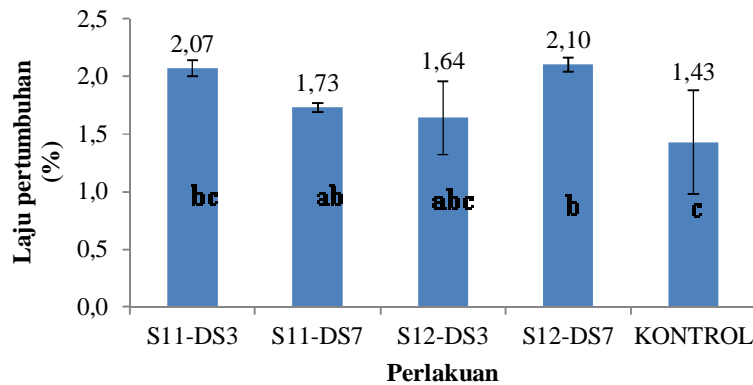
dengan perlakuan yang lain, sehingga berimplikasi pada pertumbuhan udang. Hal ini dikarenakan pada perlakuan S12-DS7 udang terekspos pada konsentrasi amonia yang lebih rendah, sehingga kualitas air pada perlakuan ini akan lebih baik. Rerata konsentrasi amonia yang rendah ini juga dapat meningkatkan metabolisme udang, sehingga dapat meningkatkan nafsu makan udang. Adanya kualitas air yang baik (amonia rendah), kandungan oksigen dalam media yang cukup dan nafsu makan udang yang tinggi menyebabkan pertambahan bobot rerata udang pada perlakuan S12-DS7 relatif lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan lain (Gambar 8).

Kelangsungan hidup udang selama pemeliharaan berkisar antara 60-90%

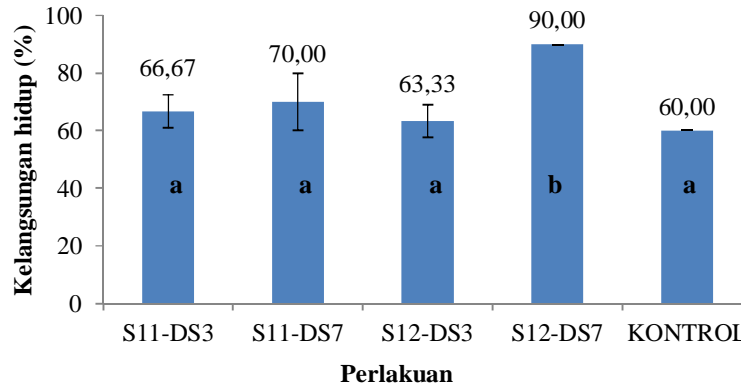
(Gambar 9). Berdasarkan uji statistik ($p < 0,05$), perlakuan S12-DS7 menghasilkan kelangsungan hidup tertinggi dan berbeda nyata terhadap perlakuan S11-DS3, S11-DS7, S12-DS3 serta kontrol. Hal ini berhubungan dengan peran bakteri tersebut dalam memperbaiki kualitas air, diantaranya kandungan amonia dan nitrit. Isolat bakteri nitrifikasi (S11 dan S12) yang diinokulasikan akan mengoksidasi amonia yang terdapat pada media pemeliharaan menjadi nitrit atau nitrat. Sedangkan isolat bakteri denitrifikasi (DS3 dan DS7) akan mereduksi nitrat maupun nitrit menjadi gas nitrogen. Sehingga akan terjadi keseimbangan dari konsentrasi amonia, nitrit, maupun nitrat dengan adanya inokulasi dari isolat-isolat bakteri tersebut.



Gambar 7. Profil DO selama uji aktivitas bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi pada media pemeliharaan udang vaname



Gambar 8. Laju pertumbuhan udang vaname pada uji aktivitas bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi.



Gambar 9. Kelangsungan hidup udang vaname pada uji aktivitas bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi

KESIMPULAN

Hasil seleksi bakteri nitrifikasi secara *in vitro* menunjukkan bahwa isolat bakteri S11 dan S12 memiliki hasil terbaik dalam mengoksidasi amonia masing-masing sebesar 78,25% dan 80,54%. Hasil seleksi bakteri denitrifikasi secara *in vitro* menunjukkan bahwa isolat bakteri DS3 dan DS7 memiliki hasil terbaik dalam mereduksi nitrat sebesar 85,41% dan 56,49%. Hasil uji aktivitas bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi secara *in vivo* menunjukkan bahwa gabungan bakteri nitrifikasi S12 dan bakteri denitrifikasi DS7 (perlakuan S12-DS7) memberikan hasil terbaik dibandingkan dengan perlakuan lainnya dan kontrol, dengan konsentrasi amonia berkisar antara 0,007-0,13 mg/l, nitrit 0,04-2,34 mg/l, nitrat 1,33-3,29 mg/l, laju pertumbuhan udang sebesar 2,1%, dan kelangsungan hidup 90%.

DAFTAR PUSTAKA

- Boyd, A.W. 1990. Water quality in Pond for Aquaculture. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Alabama, Birmingham Publishing Co USA, 482pp.
- Devaraja, T.N., Yusoff, F.M., Shariff, M., 2002. Changes in bacterial population and shrimp production in pond treated with commercial microbial products. *Aquaculture* 206, 245–256.
- Durborow, R.M., Crosby, D.M., Brunson, M.W. 1997. Ammonia in fish ponds. Southern Regional Aquaculture Center. SRAC Publ. No.463
- Effendie, M.I. 1979. Metode Biologi Perikanan. Yayasan Dewi Sri. Bogor, 105 hlm.
- Huisman, E.A. 1987. Principle of fish production. Departement of Fish Culture and Fisheries. Wageningen Agricultural University. Netherland.
- Richardson, D.J., Watmough, N.J. 1999. Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3, 207-219.
- Rodina, G.A. 1972. Methods in aquatic microbiology. Rita RC dan Michael SZ (Eds). University Park Press. Baltimore. USA. 461 hal.
- Schmidt, I., Van Spanning, R.J., Jetten, M.S.M. 2004. Denitrification and ammonia oxidation by *Nitrosomonas europea* wild-type, and NirK and NorB deficient mutans. *Microbiology* 150, 4107-4114.
- Van Wyk, M., Davis-Hodgkins, R., Laramore, K.L., Main, J., Mountain, J. Scarpa. 1999. Farming marine shrimps in recirculating freshwater system. http://www.hboi.edu/aqua/training_pubs.html. [3Agustus 2006]
- Bo, W.Y., Zhong, H.J. 2007. The role of probiotics cell wall hydrophobicity in bioremediation of aquaculture. *Aquaculture* 269, 349-354.
- Widiyanto, T. 2005. Seleksi bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi untuk bioremediasi di tambak udang. [Disertasi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.