

Full Paper**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PENDENITRIFIKASI YANG
DIISOLASI DARI LUMPUR KAWASAN MANGROVE****ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF DENITRIFYING BACTERIA FROM
MANGROVE SEDIMENTS**

Triyanto^{*)}, Alim Isnansetyo^{*)}, Irfan D. Prijambada^{**)}, Jaka Widada^{**)},
dan Duranta D. Kembaren^{*)}

Abstract

The aim of this research is to isolate denitrifying bacteria which have the highest activity to reduce nitrate. The sources of the denitrifying bacteria were mangrove sediment collected from Cilacap Regency, Central Java and Indramayu Regency, West Java. Basalt medium containing KNO₃ as a source of nitrogen was used for isolating the denitrifying bacteria. Double layer agar was used for making anaerob condition. Forty-one isolates were obtained at the first step of the isolation, 29 of them have nitrate reduction activity at a range of 0.77-95.62%. Three isolates, i.e. D19.2, DR2.1 and D27.3 having the highest activity were selected for further examination. The selected isolates were characterized and identified. Characterization includes colony and cell morphology, Gram staining, motility, spore staining and biochemical tests as catalase and oxidase. Identification was done by using profile matching to Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The results indicate that isolate D19.2 and D27.3 have similarities to the characters of genus *Listeria*, whereas isolate DR2.1 has similarities to the characters of genus *Propionibacterium*. All of the selected isolates were able to grow in a medium having NaCl concentration at a range of 0.5-3.5% and pH range of 5-8. Observation of nitrate reduction ability of the isolates during five days incubation shows that isolate DR2.1 has the highest denitrifying activity. The selected isolates can be used as bioremediation agents for controlling nitrate pollution in brackish water pond.

Key words: isolation, denitrifying bacteria, mangrove sediment

Pengantar

Budidaya udang di Indonesia mengalami stagnasi sejak dekade tahun 90-an, akibat timbulnya berbagai wabah penyakit baik yang disebabkan oleh bakteri maupun virus. Salah satu sebab timbulnya penyakit pada udang adalah adanya penurunan mutu lingkungan akibat konversi hutan mangrove secara besar-besaran dan eutrofikasi nitrogen (N) dari sisa-sisa budidaya udang itu sendiri

(Moss *et al.*, 2001). Sumber eutrofikasi N dalam budidaya udang adalah berasal dari pakan (pelet) 90% dan sisanya berasal dari *run off* (Funge-Smith & Briggs, 1998). Pada budidaya udang secara intensif dengan tingkat produksi 20 ton/ha/tahun, maka akan dibutuhkan pakan buatan sekitar 30 ton/ha/tahun (asumsi FCR 1:1,5) atau setara dengan 1,39 ton N/ha/tahun. Menurut Burford *et al.* (2001) hanya sekitar 22% N (0,3058 ton N/ha/tahun) dari pakan yang

^{*)} Jurusan Perikanan, Fakultas Pertanian UGM, Jl. Flora Gedung A4, Bulaksumur, Yogyakarta 55281, Telp. (0274) 551281

^{**)} Laboratorium Mikrobiologi Pertanian UGM, Jl. Flora Gedung A2, Bulaksumur, Yogyakarta 55281

^{*)} Penulis untuk Korespondensi: E-mail: triyanto@faperta.ugm.ac.id

digunakan untuk membentuk tubuh udang dan sisanya (1,0842 ton N/ha/tahun) dibuang ke lingkungan dalam bentuk nitrogen organik dan amonium (NH_4^+).

Proses dekomposisi nitrogen organik dan nitrifikasi terhadap amonium oleh bakteri akan menghasilkan nitrat yang merupakan senyawa toksik terhadap udang. Nitrat dalam perairan tambak akan dimanfaatkan oleh fitoplankton atau dibuang ke perairan di luar pertambakan, sehingga perairan tambak akan mengalami eutrofikasi. Sebagian kecil dari nitrat dalam perairan tambak akan diubah oleh bakteri denitrifikasi menjadi nitrogen gas (N_2) dan akan lepas ke udara. Proses denitrifikasi ini dapat dilakukan oleh berbagai jenis bakteri, seperti *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Brevibacterium*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Neisseria*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, dan *Propionibacterium* (Payne, 1981; Stanier *et al.*, 1986; Burton, 1991). Proses denitrifikasi di perairan tambak dapat mereduksi nitrat menjadi N_2 sebanyak 30% (Funge-Smith & Briggs, 1998).

Peningkatan aktivitas denitrifikasi oleh bakteri di perairan tambak udang akan sangat membantu dalam proses pengendalian kualitas air, terutama terhadap molekul nitrat yang bersifat toksik dan mencegah adanya eutrofikasi di perairan di luar pertambakan, sehingga budidaya udang yang ramah lingkungan dan berkelanjutan dapat tercapai. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri denitrifikasi dari kawasan mangrove yang mempunyai kemampuan tinggi sehingga dapat digunakan di tambak untuk mereduksi nitrat menjadi bentuk yang tidak berbahaya bagi kehidupan udang.

Bahan dan Metode

Sampel lumpur

Sampel lumpur sebagai sumber bakteri dalam penelitian ini diambil dari kawasan

hutan mangrove yang ada di Kabupaten Cilacap, Jawa Tengah dan Kabupaten Indramayu, Jawa Barat. Pengambilan sampel lumpur dilakukan secara acak pada kedalaman sekitar 5 cm. Sampel lumpur yang diambil sekitar 0,5 kg dimasukkan ke dalam kemasan plastik yang telah diberi tanggal, lokasi dan disimpan dalam *coolbox* untuk dibawa ke laboratorium. Di laboratorium sampel lumpur disimpan dalam refrigerator dengan suhu 5-10°C sampai digunakan.

Media isolasi

Isolasi bakteri pendenitrifikasi dilakukan pada medium basal (Rodina, 1972) yang dimodifikasi dan disesuaikan kandungannya dengan lingkungan payau, khususnya kandungan garam media tersebut. Komposisi media tersebut adalah NaCl (30 g), MgCl_2 (4 g), KCl (10 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5 g), CaSO_4 (1 g), KNO_3 (1 g), K_2HPO_4 (0,5 g), glukosa (10 g), agar (15 g) dalam 1000 ml aquades.

Isolasi dan pemurnian

Sampel lumpur sebanyak 11 g dimasukkan ke dalam 99 ml aquades dan digojog hingga homogen. Pengenceran suspensi sampel dilakukan mulai dari 10^{-1} sampai 10^{-4} , dan dari masing-masing pengenceran diambil 0,1 ml untuk diinokulasikan pada medium basal agar secara taburan. Agar tercipta suasana anaerob, dilakukan pelapisan menggunakan medium yang sama dan diinkubasi pada suhu kamar selama 18-24 jam. Koloni bakteri yang tumbuh selanjutnya diisolasi dan dimurnikan dengan metode *Quadrant Streak* (Cappucino & Sherman 2001) pada media yang sama. Isolat bakteri yang diperoleh disimpan pada media NA (*Nutrient Agar trisalt* (NaCl 18.4 g, KCl 0.75 g, dan $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2 g) agar miring.

Seleksi

Isolat bakteri hasil isolasi diuji kemampuannya dalam mereduksi nitrat dalam basal media cair pada tabung reaksi (10 ml). Isolat bakteri yang akan diuji kemampuannya dibiakkan terlebih dahulu dalam media TSB (*Tryptone Soya*

Broth) trisalt selama 2 hari pada suhu 30°C dan diukur kerapatan optiknya pada panjang gelombang 540 nm serta dilakukan penyetaraan konsentrasi agar bakteri yang diinokulasikan mempunyai jumlah sel yang sama. Kepadatan akhir bakteri uji pada media setelah inokulasi sebanyak 10^3 sel/ml. Setelah itu diinkubasi pada suhu ruang selama 10 hari. Hasil kultur bakteri tersebut kemudian disentrifugasi pada kecepatan 3.000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang dihasilkan diukur kadar nitratnya dengan menggunakan metode Brucine (Greenberg *et al.*, 1985). Tiga isolat yang menunjukkan kemampuan mereduksi nitrat tertinggi dipilih untuk uji berikutnya.

Uji aktivitas reduksi nitrat

Uji aktivitas reduksi nitrat ini dilakukan untuk mengetahui kecepatan bakteri pendenitrifikasi dalam mereduksi nitrat secara *in vitro*. Isolat-isolat terpilih (tiga isolat yang mampu mendegradasi nitrat tertinggi dari hasil pada uji seleksi) dibiakkan pada media *TSB trisalt* selama 24 jam sambil digojog. Isolat yang tumbuh diukur kerapatan optiknya pada panjang gelombang 540 nm. Selanjutnya dilakukan penyetaraan konsentrasi sel bakteri yang akan diujikan dengan menyamakan kerapatan optiknya. Setelah itu diinokulasikan ke dalam media basal cair pada tabung reaksi (10 ml) dan masing-masing isolat diinokulasikan pada 10 tabung reaksi. Kepadatan akhir bakteri uji pada media setelah inokulasi sebanyak 10^3 sel/ml. Selanjutnya kultur bakteri tersebut diinkubasi pada suhu 30°C selama lima hari. Pengukuran kadar nitrat dilakukan setiap 24 jam sekali dengan mengambil sampel 2 tabung reaksi untuk tiap isolat. Sebelum dilakukan pengukuran kadar nitrat, terlebih dahulu dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3.000 rpm selama 15 menit. Cairan supernatan diambil dan diencerkan 200 kali. Pengukuran kadar nitrat dilakukan dengan metode Brucine (Greenberg *et al.*, 1985).

Karakterisasi dan identifikasi

Karakterisasi hanya dilakukan terhadap tiga isolat bakteri pendetifikasi yang mempunyai kemampuan mereduksi nitrat tertinggi. Karakterisasi yang dilakukan meliputi morfologi koloni dan sel, pengecatan Gram, motilitas, dan pengecatan spora dan uji biokimia yang meliputi uji katalase dan oksidase. Sedang identifikasi dilakukan dengan mendasarkan pada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 2000).

Uji pertumbuhan pada berbagai konsentrasi NaCl

Uji ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri untuk tumbuh pada berbagai tingkat salinitas. Uji ini dilakukan dengan menginokulasikan isolat terpilih pada media *water peptone* (air peton). Kadar NaCl pada media diatur pada kadar 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5%. Inkubasi dilakukan pada suhu kamar. Setelah beberapa hari, dilihat pertumbuhan bakteri pada masing-masing konsentrasi.

Uji pertumbuhan pada berbagai tingkat pH

Uji ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat untuk tumbuh ada berbagai tingkat pH. Uji ini dilakukan dengan menginokulasikan isolat terpilih pada media *nutrien broth*. Tingkat pH pada media *nutrien broth* diatur pada 5, 6, 7, 8, dan 9. Inkubasi dilakukan pada suhu kamar. Setelah beberapa hari, dilihat pertumbuhan pada masing-masing konsentrasi.

Hasil dan Pembahasan

Isolasi bakteri

Isolasi bakteri denitrifikasi dari kawasan mangrove dilakukan untuk mendapatkan isolat bakteri yang memiliki kemampuan mereduksi nitrat tinggi. Kawasan mangrove kaya akan bahan organik yang berasal dari dekomposisi guguran serasah yang kemudian diurai oleh mikroorganisme menjadi senyawa-senyawa nitrogen. Salah satu bentuk

senyawa nitrogen yang ada pada sedimen mangrove adalah nitrat yang merupakan senyawa toksik bagi organisme akuatik seperti ikan dan udang. Akan tetapi nitrat secara alami dapat diubah menjadi nitrogen bebas yang tidak bersifat toksik bagi ikan dan udang dengan bantuan bakteri denitrifikasi. Proses perubahan nitrat menjadi nitrogen bebas tersebut disebut dengan proses denitrifikasi dan bakteri yang melakukan proses tersebut dikenal dengan bakteri denitrifikasi.

Dalam penelitian ini jumlah isolat bakteri yang berhasil diisolasi dari kedua lokasi tersebut adalah 41 isolat, yang berasal Kabupaten Cilacap 29 isolat (70,7%) dan Kabupaten Indramayu 12 isolat (29,3%). Dengan demikian dapat diketahui bahwa isolat bakteri denitrifikasi yang berhasil diisolasi sebagian besar berasal dari Kabupaten Cilacap. Berdasarkan data ini juga dapat diketahui bahwa di kawasan mangrove terdapat banyak bakteri yang diduga sebagai bakteri pendenitrifikasi. Bakteri denitrifikasi tersebut berhasil diisolasi dari sampel sedimen yang diambil pada kedalaman sekitar 5 cm. Menurut Oremland *et al.* (1984), aktivitas denitrifikasi terbatas terjadi pada beberapa sentimeter di atas permukaan sedimen di daerah pesisir. Sebab pada kedalaman di atas 6 cm dari permukaan sedimen konsentrasi nitrat dalam keadaan maksimum (Sorensen, 1978).

Aktivitas endogen denitrifikasi kebanyakan terjadi pada kedalaman 1 cm dari permukaan sedimen yang memungkinkan pertukaran gas terjadi lebih cepat (Oremland *et al.*, 1984).

Seleksi isolat bakteri

Berdasarkan hasil seleksi aktivitas reduksi nitrat, dalam penelitian ini hanya diperoleh sebanyak 29 isolat yang menunjukkan kemampuan positif. Sedang 12 isolat yang lain tidak menunjukkan kemampuan mereduksi nitrat. Daya mereduksi nitrat isolat-isolat tersebut berkisar antara 0,77-95,62%. Tabel 1 menunjukkan kemampuan mereduksi nitrat 9 isolat terbaik. Tiga isolat yang mempunyai kemampuan mereduksi nitrat tertinggi adalah isolat DR2.1, D19.2 dan D27.3.

Menurut Bazylinski & Blakemore (1983), bakteri yang benar-benar bakteri pendenitrifikasi mampu mereduksi lebih dari 90% nitrat menjadi N_2 . Dengan demikian, dalam penelitian ini hanya diperoleh satu isolat yang benar-benar bakteri pendenitrifikasi yaitu isolat D19.2. Rendahnya kemampuan bakteri pendenitrifikasi dalam penelitian ini, kemungkinan disebabkan karena bakteri pada penelitian ini merupakan bakteri fakultatif anaerob dan proses mereduksi nitrat dilakukan pada kondisi mikroaerob/aerob. Sedangkan bakteri yang disampaikan oleh Bazylinski & Blakemore (1983) adalah bakteri yang

Tabel 1. Seleksi kemampuan reduksi nitrat bakteri hasil isolasi

No	Kode	Asal isolat	NO_3^- (ppm)	Reduksi nitrat (%)
	Kontrol		1767,51	0
1	D19.2	Cilacap	77,50	95,62
2	DR2.1	Indramayu	218,41	87,64
3	D27.3	Cilacap	680,15	61,52
4	D19.3	Cilacap	832,83	52,88
5	DR4	Indramayu	916,12	48,17
6	DA4	Indramayu	1064,18	39,79
7	D27.1	Cilacap	1147,46	35,08
8	D19.1	Cilacap	1179,85	33,25
9	DR5.3	Indramayu	1274,25	27,91
10	32 isolat	Cilacap dan Indramayu	>1390,72	<21,32

melakukan denitrifikasi dalam kondisi anaerob. Pada kondisi anaerob, bakteri denitrifikasi menggunakan nitrat sebagai akseptor elektron terakhir untuk menjalankan respirasi, sehingga nitrat akan tereduksi lebih banyak dibandingkan pada kondisi mikroaerob atau aerob. Pada kondisi aerob, oksigen digunakan sebagai akseptor elektron terakhir sehingga nitrat yang ada tidak direduksi dalam jumlah yang banyak. Bakteri yang mampu mereduksi nitrat dalam kondisi aerob sangat besar kemungkinannya untuk dijadikan sebagai agensia bioremediasi untuk mengurangi pencemaran yang disebabkan oleh nitrat di tambak. Bakteri pendenitrifikasi mampu mereduksi nitrat hanya pada kondisi

anaerob, tidak dapat dimanfaatkan secara optimal sebagai agensia bioremediasi pada tambak karena kondisi anaerob akan membahayakan bagi organisme budidaya itu sendiri.

Karakterisasi dan identifikasi

Karakterisasi dan identifikasi dalam penelitian ini hanya dilakukan terhadap isolat yang memiliki kemampuan mereduksi nitrat paling tinggi, yaitu D19.2, DR2.1 dan D27.3. Hasil karakterisasi menunjukkan bahwa semua isolat yang positif mereduksi nitrat merupakan bakteri Gram positif dengan bentuk koloni bervariasi (*circulair, irregular* dan *curled*), sedangkan warna koloni krem, putih keruh dan coklat kemerahan. Bentuk sel

Tabel 2. Karakteristik isolat D19.2 dan D27.3 hasil isolasi pada penelitian ini

No.	Karakter	Isolat D19.2	Isolat D27.3	Brochothrix (Holt <i>et al.</i> 2000)	Listeria (Holt <i>et al.</i> 2000)
1.	Morfologi				
	a. Bentuk koloni	<i>Irregular</i>	<i>Curled</i>		
	b. Tepi	<i>Entire</i>	<i>Entire</i>		<i>Entire</i>
	c. Warna	Krem kecoklatan	Coklat kemerahan	Tidak berpigmen	Abu-abu kebiruan
	d. Elevasi	<i>Convex</i>	<i>Convex</i>		<i>Low convex</i>
2.	Morfologi sel	Regular, batang pendek, tidak berantai, sel ada yang berpasangan dan tunggal.	Regular, batang pendek, sebagian hampir berbentuk kokus, berpasangan, ada juga yang tunggal	Regular, batang pendek, tidak bercabang, sel tunggal atau berantai, rantai berfilamen panjang berlipat pada ikatan kumpulan sel	Regular, batang pendek, ujung membulat, hampir berbentuk kokus, tunggal dan berantai, sedikit memiliki filamen panjang
3.	Katalase	++	++	+	+
4.	Oksidase	-	-	(punya cytochrome)	-
5.	Gram	+	+	+	+
6.	Motilitas	-	-	-	-/+
7.	Fakultatif anaerob	+	+	+	+
8.	Spora	-	-	-	-
9.	Habitat	Tanah hutan mangrove	Tanah hutan mangrove	Pada produk daging, tersebar luas di lingkungan	Tersebar luas dilingkungan

isolat D19.2, DR2.1 dan D27.3 bervariasi antara batang panjang dan batang pendek. Identifikasi berdasarkan pada *Bergey's Manual for Determinative Bacteriology* edisi ke-9 (Holt *et al.* 2000), dapat diketahui bahwa isolat D19.2 dan D27.3 memiliki kesamaan beberapa karakter dengan genus *Brochothrix* dan *Listeria*. Akan tetapi jika dilihat dari persentase kemiripannya, isolat D19.2 dan D27.3 memiliki persentase kemiripan dengan genus *Listeria* yang lebih besar, yaitu 88,9%, dibandingkan dengan genus *Brochothrix* (77,8%) (Tabel 2). Isolat DR2.1 memiliki kemiripan dengan genus *Propionibacterium*, *Corynebacterium* dan *Cellulomonas*. Berdasarkan kemiripannya maka isolat DR2.1 kemungkinan besar termasuk dalam genus *Propionibacterium* dengan nilai kemiripan sebesar 88,9% (Tabel 3). Dengan demikian, isolat terpilih D19.2 dan D27.3 diduga merupakan anggota genus *Listeria*, sedang isolat DR2.1 diduga merupakan anggota genus *Propionibacterium*.

Bakteri pendenitrifikasi yang diperoleh pada penelitian ini berbeda dengan yang umum diungkapkan pada penelitian-penelitian terdahulu. Pada umumnya bakteri yang dikenal sebagai bakteri pendenitrifikasi adalah seperti *Pseudomonas denitrificans* (Watson, 2002). Meskipun demikian, menurut Payne (1981) terdapat pula bakteri pendenitrifikasi yang berasal dari bakteri Gram positif, seperti *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp., dan *Propionibacterium* sp.

Schaperclaus (1992), penyakit bakterial pada ikan disebabkan oleh bakteri-bakteri dari genus *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Edwardsiella*, *Listeria*, *Leptospira*, *Erysipelothrix* dan *Clostridium*. Akan tetapi pada budidaya

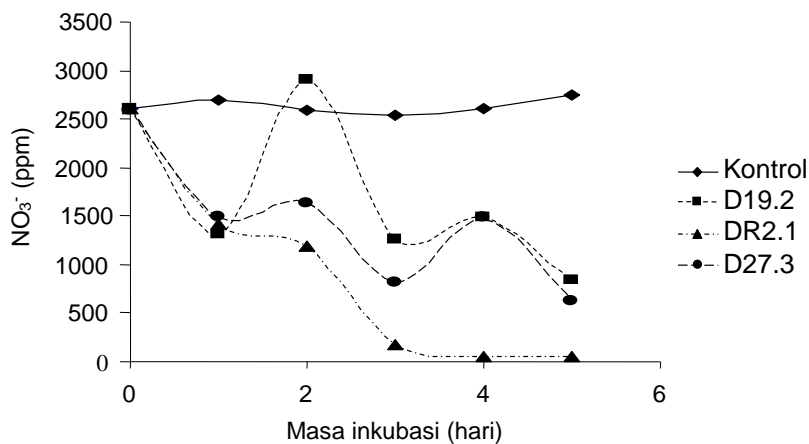
udang, belum pernah ditemukan kasus penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Listeria* maupun *Propionibacterium*. Dengan demikian, isolat bakteri yang diperoleh pada penelitian ini memiliki tingkat keamanan yang baik jika digunakan sebagai agensia bioremediasi pada tambak udang.

Uji aktivitas isolat terpilih

Berdasarkan uji aktivitas isolat terpilih, diketahui bahwa isolat DR2.1 yang diduga merupakan genus *Propionibacterium* memiliki aktivitas yang paling tinggi dalam mereduksi nitrat. Bakteri ini mampu mereduksi nitrat secara bertahap seiring dengan semakin lamanya waktu inkubasi. Pada pengamatan hari pertama daya mereduksi nitrat isolat DR2.1 sebesar 45,48%, terus mengalami peningkatan sampai hari kelima yaitu sebesar 97,78% (Gambar 1). Isolat DR2.1 ini diisolasi dari kawasan mangrove di Kabupaten Indramayu. Tingginya kemampuan mereduksi nitrat bakteri yang berasal dari Indramayu ini kemungkinan besar disebabkan oleh keadaan lingkungan lokasi pengambilan cuplikan. Cuplikan tanah diambil dari lokasi yang berdekatan dengan areal pertambakan. Pada lokasi pengambilan cuplikan terjadi akumulasi bahan organik yang berasal dari aliran limbah tambak yang ada disekitar kawasan mangrove. Akumulasi ini menyebabkan terjadinya pencemaran bahan organik dan lumpurnya berwarna hitam. Lumpur yang berwarna hitam menunjukkan adanya asam sulfida (H_2S) yang dihasilkan karena kondisi anaerob dan kondisi anaerob ini sangat sesuai untuk pertumbuhan bakteri pendenitrifikasi. Sementara itu, bakteri yang diperoleh pada penelitian ini merupakan bakteri fakultatif anaerob dan reduksi nitrat dilakukan pada kondisi aerob atau mikroaerob.

Tabel 3. Karakteristik isolat DR2.1 hasil isolasi pada penelitian ini

No	Karakter	Isolat DR2.1	Propionibacterium (Holt dkk. 2000)	Corynebacterium (Holt et al. 2000)	Cellulomonas (Holt et al. 2000)
1.	Morfologi				
	a. Bentuk koloni	<i>Circular</i>			
	b. Tepi	<i>Entire</i>			
	c. Warna	Putih keruh	Krem sampai kemerahan		Kuning
	d. Elevasi	<i>Convex</i>	<i>Convex</i>	<i>Convex</i>	<i>Convex</i>
2.	Morfologi sel	<i>Irregular</i> , batang pendek, terdapat juga bentuk kokus, sel ada yang berpasangan dan tunggal, beberapa ada bentuk V	<i>Irregular</i> , batang pendek, dan kokus, ada juga yang bentuk V atau Y	<i>Irregular</i> batang, membentuk V, sel mengumpul.	<i>Irregular</i> , batang, beberapa bentuk kokus
3.	Katalase	++	+	+	+
4.	Oksidase	+			
5.	Gram	+	+	+	+
6.	Motilitas	-	-	-	-/+
7.	Fakultatif anaerob	+	+	+	+
8.	Spora	-	-	-	-
9.	Habitat	Tanah hutan mangrove	<i>Dairy product</i> , kulit manusia, di tempat lain*	Manusia, binatang, kadang-kadang ditemukan ditempat lain	Tanah dan sayuran yang busuk



Gambar 1. Kadar NO₃⁻ dalam media selama uji aktivitas denitrifikasi

Tabel 4. Pertumbuhan isolat bakteri pada konsentrasi NaCl yang berbeda

No	Isolat	Konsentrasi NaCl (%)						
		0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5
1.	DR2.1	+	+	+	+	+	+	+
2.	D19.2	+	+	+	+	+	+	+
3.	D27.3	+	+	+	+	+	+	+

Keterangan : +, tumbuh

Uji pertumbuhan pada beragam konsentrasi NaCl

Hasil uji pertumbuhan isolat pendenitrifikasi terpilih pada berbagai konsentrasi NaCl dapat dilihat pada Tabel 4. Ketiga isolat bakteri pendenitrifikasi yang diperoleh dalam penelitian ini menunjukkan kemampuannya untuk tumbuh pada media dengan kadar NaCl antara 0,5-3,5%. Dengan demikian, ketiga isolat pendenitrifikasi tersebut mampu tumbuh dengan baik pada kisaran salinitas yang cocok untuk budidaya udang di tambak. Salinitas air tambak untuk budidaya udang penaeid yang optimum adalah berkisar antara 10-25 ppt (Lim & Suanta, 1993). Dengan demikian ketiga isolat bakteri pendenitrifikasi hasil isolasi dalam penelitian ini tidak akan mengalami masalah apabila digunakan sebagai bakteri bioremediasi pada budidaya udang penaeid di tambak.

Uji pertumbuhan pada beragam tingkat pH

Berdasarkan Tabel 5, dapat diketahui bahwa ketiga isolat terpilih memiliki kemampuan untuk hidup pada kisaran pH antara 5-8, sedangkan pada pH 9 ketiga isolat tidak mampu hidup. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri yang diperoleh mampu tumbuh pada kondisi yang asam dan sedikit basa, sedangkan

pada kondisi yang basa (pH >8) pertumbuhannya terhambat. Menurut Boyd (1989), udang-udang penaeid yang dibudidayakan di tambak membutuhkan kadar salinitas yang ideal untuk pertumbuhannya berkisar antara 15-25 ppt dan nilai pH yang berkisar antara 6-9. Sedang untuk udang vanamei, menurut Wyban & Sweeney (1991) pH air yang optimum untuk pertumbuhan adalah 8 dengan kisaran antara 7,4-8,9. Dengan demikian, isolat bakteri pendenitrifikasi yang diperoleh pada penelitian ini mampu untuk tumbuh pada media budidaya udang untuk mengurangi pencemaran yang disebabkan oleh nitrat di tambak.

Kesimpulan dan Saran

Kesimpulan

- Sebanyak 29 isolat bakteri pendenitrifikasi telah berhasil diisolasi dari kawasan mangrove yang mempunyai kemampuan mereduksi nitrat (NO_3^-) antara 0,77-95,62% dan isolat DR2.1., D19.2 dan D27.3 sebagai isolat tertinggi daya reduksi nitratnya.
- Berdasarkan identifikasi, isolat DR2.1 diduga termasuk genus *Propionibacterium*, sedangkan isolat D19.2 dan D27.3 termasuk genus *Listeria*.

Tabel 5. Pertumbuhan bakteri pendenitrifikasi pada berbagai derajat keasaman (pH)

No	Isolat	Derajat keasaman (pH)				
		5	6	7	8	9
1.	DR2.1	+	+	+	+	-
2.	D19.2	+	+	+	+	-
3.	D27.3	+	+	+	+	-

Keterangan : +, tumbuh; -, tidak tumbuh

Saran

- a. Sebelum bakteri pendenitrifikasi tersebut digunakan sebagai agensia bioremediasi untuk mereduksi nitrat di tambak udang, diperlukan uji patogenisitas terhadap ikan atau udang.
- b. Perlu dilakukan karakterisasi dan identifikasi yang lebih mendalam terhadap isolat-isolat bakteri pendenitrifikasi yang diperoleh pada penelitian ini baik secara klasik maupun molekuler.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Universitas Gadjah Mada Yogyakarta yang telah membiayai penelitian ini dengan SK No. UGM/2323b/PII/Set.R/2004 tanggal 1 Mei 2004.

Daftar Pustaka

- Bazylnski, D.A., and R.P. Blakemore. 1983. Denitrification and assimilatory nitrate reduction in *Aquaspirillum magnetotacticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:1118-1124.
- Boyd, C.E., 1989. Water quality and management and aeration in shrimp farming. Auburn University, Alabama.
- Burford, M.A., C.J. Jackson, and N.P. Preston, 2001. Reducing nitrogen waste from shrimp farming: an integrated approach. *In: The new wave, proceeding of the special session on sustainable shrimp culture, Aquaculture 2001C.* L. Browdy and J.E. Jory (Eds.). The WAS, Louisiana, USA. 35-43.
- Burton, F.L. 1991. Wastewater engineering: treatment disposal reuse. 3rd ed. McGrawHill International. Singapore.
- Cappuccino, J.G and N. Sherman. 2001. *Microbiology: a laboratory manual.* Benjamin/Cumming Publishing, California.
- Funge-Smith, S.J. and M.R.P. Briggs, 1998. Nutrient budgets in intensive shrimp ponds: implications for sustainability. *Aquaculture.* 164: 117-133.
- Greenberg, A.E., R.R. Trussell, and L.S. Clesceri. 1985. *Standard method for the examination of water and wastewater.* APHA, Washington.
- Holt, G.J., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. William. 2000. *Bergey's Manual for Determinative Bacteriology.* 9th eds. William&Wilkins, Baltimore.
- Lim, C. dan D.S. Suanta. 1993. *Budidaya tambak udang intensif.* PT. Dipasena Citra Darmaja, Lampung.
- Moss, S.M., S.M. Arce, B.J. Argue, C.A. Otoshi, F.R.O. Calderon and A.G.J. Tacon. 2001. Greening of the blue revolution: efforts toward environmentally responsible shrimp culture. *In: The new wave, proceeding of the special session on sustainable shrimp culture, Aquaculture 2001.* C.L. Browdy & J.E. Jory (Eds.). The WAS. Louisiana. USA. 1-19.
- Oremland, R.S., C. Umberger, C.W. Culbertson, and R.L. Smith. 1984. Denitrification in San Fransisco Bay intertidal sediments. *Appl. Environ. Microbil.* 47: 1106-1112.
- Payne, W.J. 1981. *Denitrification.* Willey-Interscience. New York.
- Rodina, A.G. 1972. *Methods in Aquatic Microbiology.* University Park Pers. Baltimore.
- Schaperclause, W. 1992. *Fish Diseases.* Vol. 1. A.A. Balkema. Rotterdam.

- Sorensen, J. 1978. Denitrification rates in a marine sediments as measured by the aacetylene inhibition technique. *Appl. Environ. Microbiol.* 36 : 139-143.
- Stainer, R.Y, J.L. Ingraham, M.L. Wheelis, and P.R. Painter. 1986. *The Microbial World*. 5th ed. Prentice-Hall. London.
- Watson, I. 2002. The effect of exposure to oxygen on diauxic lag of *Pseudomonas denitrificanse*. *J. Undergraduate Research.* 4(2): 30-34.
- Wyban, J.A. and J.N. Sweeney. 1991. *Intensive shrimp production technology*. The Oceanic Institute. Honolulu. Hawaii.