

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/jra>

ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI NITRIFIKASI DAN DENITRIFIKASI SEBAGAI KANDIDAT PROBIOTIK

Yosmaniar[#], Hesy Novita, dan Eri Setiadi

Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan

(Naskah diterima: 5 Desember 2017; Revisi final: 10 Januari 2018; Disetujui publikasi: 10 Januari 2018)

ABSTRAK

Senyawa nitrogen yang tinggi pada limbah budidaya perikanan intensif dapat memperburuk kualitas air, sehingga perlu diatasi dengan penambahan probiotik untuk proses bioremediasi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi yang berpotensi sebagai kandidat probiotik pengendali senyawa nitrogen pada budidaya ikan air tawar. Tahap penelitian terdiri atas: 1) koleksi sampel air dan sedimen dari kolam budidaya ikan patin di kawasan minapolitan Desa Pudak Kecamatan Kumpeh Kabupaten Muaro Jambi Provinsi Jambi dan Desa Koto Mesjid Kecamatan XIII Koto Kampar Kabupaten Kampar Provinsi Riau; 2) pengujian sampel secara *in vitro* yang meliputi: a) Isolasi dan seleksi bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi; b) Karakterisasi morfologis bakteri terpilih; c) Karakterisasi fisiologi/biokimia isolat bakteri terpilih; d) Karakterisasi genetika isolat bakteri terpilih dengan sekuensing 16S-rRNA. Analisis data dilakukan secara deskriptif. Berdasarkan hasil penelitian diperoleh empat isolat bakteri nitrifikasi dan empat isolat bakteri denitrifikasi. Isolat bakteri nitrifikasi *Pandoraea pnomenusa* strain 1318 (NP1); *Pseudomonas aeruginosa* strain PSE12 (NP2); *Pseudomonas aeruginosa* strain PSE12 (NP3); *Burkholderia vietnamiensis* strain NE 7 (NP4); dan denitrifikasi *Achromobacter xylosoxidans* strain TPL14 (DP1); *Stenotrophomonas acidaminiphila* strain BTY (DP2); *Stenotrophomonas maltophilia* strain BHWSL2 (DP3); *Ochrobactrum intermedium* strain: SQ 20 (DP4) *Achromobacter xylosoxidans* strain TPL14 (DP1); *Stenotrophomonas acidaminiphila* strain BTY (DP2); *Stenotrophomonas maltophilia* strain BHWSL2 (DP3); *Ochrobactrum intermedium* strain: SQ 20 (DP4); yang berpotensi digunakan sebagai kandidat probiotik pengendali senyawa nitrogen pada budidaya ikan air tawar.

KATA KUNCI: bakteri nitrifikasi; bakteri denitrifikasi; karakterisasi; probiotik

ABSTRACT: *Isolation and characterization of nitrifying and denitrifying bacteria as probiotic candidates. By: Yosmaniar, Hesy Novita, and Eri Setiadi*

Wastes from an intensive aquaculture contain nitrogen compounds which, if untreated, could rapidly reduce water quality condition within the system. The addition of probiotics as bioremediation to aquaculture system has been used to improve water quality with promising results. The aim of this study was to obtain potential nitrifying and denitrifying bacteria that could be used as probiotic candidates to control excessive nitrogen compounds in freshwater culture. This study consisted of two steps, 1) the collection of water samples and sediments from catfish ponds at 'Minapolitan Area' in Pudak Village, Jambi Province and Koto Mesjid Village, Riau Province; 2) *in vitro* tests consisting of isolation and selection of nitrifying and denitrifying bacteria; morphological characterization of the selected nitrifying and denitrifying bacteria; characterization of physiological/biochemical selected nitrifying and denitrifying bacteria; genetic characterization of the selected nitrifying and denitrifying bacteria with 16SrRNA sequencing. All data were analyzed descriptively. The study had found four nitrifying bacteria isolates: *Pandoraea pnomenusa* strain 1318 (NP1); *Pseudomonas aeruginosa* strain PSE 12 (NP2); *Pseudomonas aeruginosa* strain PSE12 (NP3); *Burkholderia vietnamiensis* strain NE 7 (NP4). The study also found four isolates of denitrifying bacteria isolates: *Achromobacter xylosoxidans* strain TPL14 (DP1); *Stenotrophomonas acidaminiphila* strain BTY (DP2); *Stenotrophomonas maltophilia* strain BHWSL2 (DP3); *Ochrobactrum intermedium* strain: SQ 20 (DP4). All the identified nitrifying and denitrifying bacteria isolates have the potential to be used as probiotic candidates to control nitrogen compound in freshwater aquaculture.

KEYWORDS: nitrifying bacteria; denitrifying bacteria; characterization; probiotic

[#] Korespondensi: Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan. Jl. Sempur No. 1, Bogor 16154, Indonesia. Tel. + 62 251 8313200
E-mail: yosmaniar@yahoo.com

PENDAHULUAN

Budidaya ikan secara intensif dengan padat penebaran dan jumlah pakan tinggi, dapat menyebabkan penumpukan bahan organik dan an organik yang berasal dari sisa pakan dan ekskresi metabolisme ikan dalam wadah budidaya (Djokosetiyanto *et al.*, 2006) dan mengendap di dasar kolam. Hal ini berdampak pada penurunan kualitas air budidaya karena meningkatnya senyawa nitrogen (amonia, nitrit, dan nitrat) sehingga mengganggu keseimbangan siklus nitrogen seperti nitrifikasi dan denitrifikasi yang dapat menyebabkan keracunan dan mortalitas ikan.

Untuk memperbaiki kualitas air dapat dilakukan dengan memanfaatkan mikroorganisme (bioremediasi). Bioremediasi merupakan upaya untuk memperbaiki kualitas air melalui aktivitas biologi oleh mikroorganisme (Rusmana, 2003). Beberapa persyaratan bioremediasi, antara lain mampu mengoptimalkan laju nitrifikasi untuk menjaga amonia agar tetap rendah, mampu mengoptimalkan laju denitrifikasi untuk mengeliminir kelebihan nitrogen sebagai gas nitrogen dari kolam (Badjoeri & Widiyanto, 2008; Khasani, 2008).

Agen bioremediasi yang digunakan memiliki kemampuan metabolisme nitrifikasi dan denitrifikasi, sehingga secara langsung dapat merombak bahan organik di dalam air media (Yuhana, 2010). Nitrifikasi merupakan reaksi penting dalam siklus nitrogen yang membutuhkan oksigen dalam proses oksidasi NH_3 , menjadi NO_2 dan oksidasi NO_2 menjadi NO_3 (Agustiyan *et al.*, 2010). Denitrifikasi merupakan proses mikrobial di mana NO_3 dan NO_2 , diubah menjadi NO_2 dan N_2 di sedimen aerobik maupun anerobik (Long *et al.*, 2013).

Isolasi, seleksi, dan karakterisasi merupakan tahapan penting untuk mendapatkan bakteri yang diharapkan sebagai kandidat untuk probiotik. Tahapan proses tersebut diperlukan agar jenis bakteri yang diperoleh memiliki kemampuan sesuai target. Pada tahap seleksi dibutuhkan medium bakteri yang tepat dan pengujian secara biokimia atau fisiologis. Tahap karakterisasi dilakukan untuk mengetahui jenis bakteri dan hubungan kekerabatannya menggunakan 16S rRNA sekuensing. Analisis Taksonomi menggunakan gen 16S dan 18S rRNA untuk mensekuensing data telah menunjukkan pendekatan yang valid dalam mengkarakterisasi komunitas bakteri (Sogin *et al.*, 2006).

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi yang berpotensi sebagai kandidat probiotik pengendali senyawa nitrogen pada budidaya ikan air tawar.

BAHAN DAN METODE

Koleksi Sampel dari Sedimen dan Air

Sampel air dan sedimen dikoleksi dari kolam budidaya ikan patin pada tahun 2013, di kawasan minapolitan Desa Pudak Kecamatan Kumpeh Kabupaten Muaro Jambi Provinsi Jambi dan Desa Koto Mesjid Kecamatan XIII Koto Kampar Kabupaten Kampar Provinsi Riau (Gambar 2). Kedua Desa tersebut merupakan sentra budidaya ikan patin intensif dan dijadikan sebagai kawasan minapolitan (Yantos, 2016). Pengambilan sampel air permukaan pada kolam ikan patin dilakukan di kedua desa dengan setiap desa sebanyak empat kolam. Kriteria kolam yang diambil sampel air dan sedimen merupakan kolam budidaya patin intensif. Untuk sampel air permukaan kolam ikan dilakukan lima titik per kolam, yaitu di setiap sudut kolam (empat sampel) dan di tengah kolam (satu sampel) menggunakan bobot sampel dengan volume 600 mL yang steril. Untuk sedimen, dilakukan tiga titik setiap kolam yaitu dua titik di dua sudut kolam dan satu titik di tengah kolam menggunakan *eigment grab*, kemudian sampel sedimen diambil sebanyak 300 g pada setiap titik. Selanjutnya sedimen dipindah ke dalam botol sampel steril. Botol sampel yang telah terisi air maupun sedimen dimasukkan ke dalam *cool box*.

Isolasi dan Seleksi Bakteri Nitrifikasi dan Denitrifikasi

Media spesifik untuk isolasi bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi berdasarkan (Rodina, 1972), untuk 1000 mL, yaitu: 13,5 g KH_2PO_4 ; 0,7 g K_2HPO_4 ; 0,1 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,18 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g NH_4Cl ; 0,2 g EDTA dan 0,5 g Na_2CO_3 ; 0,18 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; dan 0,5 g glukosa. Sedangkan untuk bakteri denitrifikasi: 10 g Na-asetat, 5 g KNO_3 ; 0,2 g KH_2PO_4 ; 0,9 g K_2HPO_4 ; 0,1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; dan 0,2 g EDTA.

Sebanyak 5 mL sampel air dan 1 g sedimen dimasukkan ke dalam media nitrifikasi cair pada erlenmeyer, kemudian diinkubasi selama 7 hari menggunakan *shaker* pada suhu 28°C dengan kecepatan 130 rpm, selanjutnya senyawa nitrat yang dihasilkan diukur menggunakan metode Brucine menggunakan Spektrofotometer (Clesceri *et al.*, 1998).

Sebanyak 5 mL suspensi dari kultur bakteri yang positif menghasilkan nitrat diinokulasi ulang pada erlenmeyer media nitrifikasi kemudian diinkubasi selama 7 hari menggunakan *shaker* pada suhu 28°C dengan kecepatan 130 rpm. Sebanyak satu ose dari kultur bakteri digores pada media agar nitrifikasi dengan menggunakan metode kuadran (Sanders, 2012), kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 29°C



(A)



(B)

Gambar 1. Lokasi pengambilan sampel air dan sedimen di kawasan minapolitan Desa Pudak Kecamatan Kumpeh Kabupaten Muaro Jambi (A), Desa Koto Mesjid Kecamatan XIII Koto Kampar Kabupaten Kampar Provinsi Riau (B).

Figure 1. Locations of water and sediment sampling in the study sites: (A) Pudak Village, (B) Koto Mesjid Village.

selama 5-7 hari. Koloni yang terpisah dimurnikan kembali dengan cara menggores ulang pada media agar nitrifikasi. Isolat murni yang diperoleh digunakan untuk uji selanjutnya.

Sebanyak 1 mL sampel air dan 1 g sedimen dimasukkan ke dalam tabung ulir yang berisi 20 mL media denitrifikasi cair, 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 yang mengandung bakteri denitrifikasi, kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 7 hari. Satu ose dari kultur bakteri digores pada media agar denitrifikasi dengan menggunakan metode kuadran dan diinkubasi pada kondisi anaerob dalam *Anaerobik jar* selama 7-10 hari. Koloni sel yang terpisah dimurnikan kembali dengan digores kuadran pada media cawan dan diinkubasi pada kondisi anaerobik. Isolat murni yang diperoleh selanjutnya dilakukan uji oksidatif/fermentatif.

Karakterisasi, Morfologi, Biokimia Bakteri Nitrifikasi, dan Denitrifikasi

Karakterisasi bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi dilakukan dengan melakukan pengamatan secara morfologi pada bentuk dan warna koloni bakteri serta melalui pewarnaan gram. Setelah itu, isolat yang terseleksi kemudian diuji secara biokimia (Novita *et al.*, 2014). Isolat yang terseleksi kemudian diuji secara biokimia dengan menggunakan kit API untuk melihat kemampuan bakteri dalam menggunakan gula-gula yang ada pada media sebagai sumber C dan N. Ciri biokimia merupakan kriteria yang amat penting di dalam identifikasi spesimen bakteri yang tak dikenal

karena secara morfologis biakan ataupun sel bakteri yang berbeda dapat tampak serupa, tanpa hasil pengamatan fisiologis yang memadai mengenai organik yang diperiksa maka penentuan spesiesnya tidak mungkin dilakukan. Karakteristik dan klasifikasi sebagai mikroba seperti bakteri berdasarkan pada reaksi enzimatis ataupun biokimia. Mikroba dapat tumbuh pada beberapa tipe media memproduksi metabolit tentunya yang dideteksi dengan interaksi mikroba dengan reagen test yang mana menghasilkan perubahan warna reagen (Murray *et al.*, 2005).

Karakterisasi Isolat Bakteri Nitrifikasi dan Denitrifikasi Terpilih dengan Sekuensing 16S-rRNA

Karakterisasi bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi yang terpilih secara molekuler dengan 16S rRNA sekuensing dilakukan untuk mengetahui jenis dan kekerabatan isolat bakteri. DNA isolat terpilih diekstraksi dengan metode geneaid kit (prosedur sesuai dengan instruksi manual dalam kit). Setelah itu dilakukan uji PCR menggunakan primer 16SrRNA (Marchesi *et al.*, 1998) dengan susunan primer *forward* 63f (52 -CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-32), dan primer *Reverse*, 1387r (52 -GGG CGG WGT GTA CAA GGC-32). Amplifikasi PCR dilakukan sebanyak 30 siklus menggunakan suhu predenaturasi 95°C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 92°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 55°C selama 30 detik, *elongation* 72°C selama 1 menit, dan *final extension* dengan suhu 72°C selama 5 menit.

Sekuensing dan Dendogram

Hasil PCR 16S rRNA menunjukkan target pita DNA berada pada 1300 bp. Isolat yang telah di PCR kemudian di sekuensing. Hasil sekuensing dari masing-

masing isolat disejajarkan dengan sekuen dari *Genebank* selanjutnya dilakukan BLAST di NCBI untuk melihat tingkat kemiripannya dengan sekuen di *Genebank*.

Kemudian hasil sekuensing disejajarkan lagi dengan program MEGA 5 untuk mendapatkan dendrogram

Analisis Data

Semua data yang diperoleh ditabulasi dengan bantuan Microsoft Excel 2010. Data yang diperoleh dari isolasi, seleksi, dan identifikasi bakteri kandidat probiotik dianalisis secara deskriptif dan ditampilkan dalam tabel.

HASIL DAN BAHASAN

Isolasi Bakteri Nitrifikasi dan Denitrifikasi

Hasil isolasi bakteri kandidat probiotik yang teridentifikasi. Kelompok denitrifikasi di Desa Pudak, Jambi lebih banyak dibandingkan nitrifikasi, sedangkan di Riau nitrifikasi lebih dominan dibandingkan denitrifikasi. Kondisi perbedaan tersebut mengindikasikan bahwa kedalaman kolam (kolom air) dan kandungan bahan organik baik di air maupun di sedimen diduga berpengaruh terhadap perbedaan jumlah bakteri nitrifikasi dan bakteri denitrifikasi. Azhar *et al.* (2017) melaporkan bahwa kelimpahan dan keanekaragaman bakteri dipengaruhi oleh kedalaman air, ketebalan sedimen, dan kandungan bahan organik baik di air maupun di sedimen.

Jumlah isolat yang berhasil diisolasi dari dua lokasi pengambilan contoh disajikan pada Tabel 1.

Karakterisasi Isolat Bakteri Nitrifikasi dan Denitrifikasi

Diperoleh 4 isolat bakteri nitrifikasi dan 4 isolat bakteri denitrifikasi dengan ciri morfologi koloni isolat tepian sama yaitu licin sedangkan warna, permukaan, dan bentuk umumnya hampir sama (Tabel 2). Bakteri nitrifikasi terpilih NP1 dan NP4 bersifat

gram positif sedangkan NP2 dan NP3 merupakan gram negatif. Pada isolate bakteri nitrifikasi ditemukan ada yang gram negatif. Hal ini menunjukkan bahwa isolate NP2 dan NP3 dapat berperan ganda (nitrifikasi dan denitrifikasi). Semua bakteri denitrifikasi merupakan gram negatif. Empat isolat bakteri nitrifikasi yaitu NP1, NP2, NP3, NP4 termasuk ke dalam kelompok bakteri heterotrof.

Pertumbuhan bakteri heterotrof lebih baik dibandingkan dengan bakteri autotrof. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa keempat isolat bakteri nitrifikasi termasuk ke dalam kelompok bakteri heterotrof. Bakteri ini merupakan bakteri yang tidak dapat memfiksasi karbon dan menggunakan karbon organik untuk pertumbuhannya (Tabel 3). Bakteri heterotrof terbagi menjadi dua kelompok berdasarkan pada penggunaan energi, yaitu: a) fotoheterotrof, yang menggunakan cahaya sebagai sumber energi, dan b) kemoheterotrof, yang menggunakan senyawa organik maupun anorganik sebagai sumber energi (Hogg & Stuart, 2013). Pertumbuhan bakteri heterotrof lebih baik dibandingkan dengan bakteri autotrof. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Michauda *et al.* (2006) yang melaporkan bahwa pertumbuhan bakteri heterotrof lebih cepat dibandingkan dengan bakteri autotrof.

Uji oksidatif-fermentatif dilakukan pada bakteri denitrifikasi dengan tujuan mencari isolat yang bersifat oksidatif dan fermentatif. Jika bakteri bersifat fermentatif akan terjadi perubahan warna dari yang hijau menjadi kuning, sedangkan bakteri yang bersifat oksidatif akan tetap berwarna hijau (Novita *et al.*, 2014).

Isolat bakteri DP1 dan DP4 serta bakteri NP2 dan NP3 merupakan gram negatif. Bentuk sel semua isolat adalah basil. Keempat isolat bakteri nitrifikasi bersifat oksidatif. Umumnya bakteri denitrifikasi bersifat oksidatif, karena dalam proses metabolisme untuk tumbuh dan berkembang membutuhkan oksigen.

Tabel 1. Jumlah isolat bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi yang diisolasi dari budidaya ikan patin di Jambi dan Riau

Table 1. Number of nitrifying and denitrifying isolates from catfish culture in Jambi and Riau

Asal sampel <i>Origin of sample</i>	Jenis sampel <i>Kind of sample</i>	Jumlah isolat (<i>Number of isolate</i>)		
		Bakteri nitrifikasi <i>Nitrification bacteria</i>	Bakteri denitrifikasi <i>Denitrification bacteria</i>	Total <i>Total</i>
Desa Pudak Kecamatan Kumpeh	Air (<i>Water</i>)	7	8	15
Kabupaten Muaro Jambi Provinsi Jambi	Sedimen (<i>Sediment</i>)	7	7	14
Desa Koto Mesjid Kecamatan XIII Koto Kampar	Air (<i>Water</i>)	9	9	18
Kabupaten Kampar Provinsi Riau	Sedimen (<i>Sediment</i>)	10	9	19
Total		33	33	66

Tabel 2. Morfologi dan karakteristik koloni isolat bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi yang terpilih
 Table 2. Morphology and characteristic of selected isolates of nitrifying and denitrifying bacteria

Isolat <i>Isolate</i>	Morfologi karakteristik koloni isolat (<i>Morphology and characteristics of colonies</i>)				
	Warna <i>Colour</i>	Tepian <i>Edge</i>	Permukaan <i>Surface</i>	Bentuk sel <i>Shape of cell</i>	Reaksi gram <i>Gram reaction</i>
Nitrifikasi (<i>Nitrification</i>)					
NP1	Putih (<i>White</i>)	Licin (<i>Slippery</i>)	Datar (<i>Flat</i>)	Basil	Positif (<i>Positive</i>)
NP2	Putih (<i>White</i>)	Licin (<i>Slippery</i>)	Cembung (<i>Convex</i>)	Basil	Negatif (<i>Negative</i>)
NP3	Kecoklatan (<i>Brownish</i>)	Licin (<i>Slippery</i>)	Cembung (<i>Convex</i>)	Basil	Negatif (<i>Negative</i>)
NP4	Kecoklatan (<i>Brownish</i>)	Licin (<i>Slippery</i>)		Basil	Positif (<i>Positive</i>)
Denitrifikasi (<i>Denitrification</i>)					
DP1	Kecoklatan (<i>Brownish</i>)	Licin (<i>Slippery</i>)		Basil	Negatif (<i>Negative</i>)
DP2	Putih pucat (<i>Pale white</i>)	Licin (<i>Slippery</i>)	Timbul (<i>Arise</i>)	Kokus (<i>Coccus</i>)	Negatif (<i>Negative</i>)
DP3	Kekuningan (<i>Yellowish</i>)	Licin (<i>Slippery</i>)	Cembung (<i>Convex</i>)	Basil	Negatif (<i>Negative</i>)
DP4	Kekuningan (<i>Yellowish</i>)	Licin (<i>Slippery</i>)	Datar (<i>Flat</i>)	Basil	Negatif (<i>Negative</i>)

Tabel 3. Pertumbuhan isolat bakteri nitrifikasi yang terpilih

Table 3. Growth of selected nitrifying bacteria isolates

Isolat <i>Isolate</i>	Pertumbuhan isolat bakteri nitrifikasi <i>Growth of nitrifying bacteria isolates</i>	
	Heterotrof <i>Heterotroph</i>	Autotrof <i>Autotroph</i>
NP1	++++	+
NP2	++++	+
NP3	++++	+
NP4	++++	+

Keterangan (Note): + + + + = pertumbuhan sangat cepat (*very rapid growth*)

+ = pertumbuhan sangat lambat (*very slow growth*)

Karakterisasi Biokimia Isolat Bakteri Nitrifikasi dan Denitrifikasi

Dari hasil Table 4 di atas menunjukkan bahwa bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi terpilih (NP2 dan NP4) dan (DP1 dan DP3) dapat memanfaatkan bahan uji biokimia dengan baik sebagai media tumbuh sehingga berotensi sebagai kandidat.

Karakterisasi Isolat Bakteri Nitrifikasi dan Denitrifikasi Terpilih dengan Sekuensing 16S-rRNA

Hasil karakterisasi berdasarkan 16SrRNA dapat dilihat pada Gambar 3. Hasil PCR dengan 16S rRNA menunjukkan bahwa isolat terpilih menghasilkan pita PCR pada target 1300 bp. Hasil sekuensing yang dilakukan dengan membandingkan sekuen yang ada di *Genbank* diperoleh hasil BLAST N seperti disajikan pada Tabel 5.

Dendogram filogeni dari isolat bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi, disajikan pada Gambar 3 dan 4. Isolat

DP1 menunjukkan kemiripan 100% dengan *Achromobacter xylosoxidans* strain TPL14. Isolat DP2 dan DP3 homolog dengan *Stenotrophomonas acidaminiphila* strain BTY dan *Stenotrophomonas maltophilia* strain BHWSL2 dengan tingkat kemiripan 100% dan 99%. Sedangkan untuk isolat NP1 homolog dengan *Pandoraea pnomenusa* strain 1318 dengan tingkat kemiripan 99% begitu juga dengan NP2, NP3 homolog dengan *Pseudomonas aeruginosa* strain PSE12 dengan kemiripan 99%, sedangkan isolat NP4 homolog 98% dengan *Burkholderia vietnamiensis* strain NE 7.

Hasil sekuensing isolat bakteri nitrifikasi NP1 menunjukkan bahwa bakteri isolat NP1 memiliki kekerabatan terdekat dengan genus *Pandoraea* dan *Burkholderia*. Namun paling dekat dengan jenis *Pandoraea pnomenusa* strain 1318. Jenis bakteri genus *Pandoraea* yang pertama kali terbukti memiliki kemampuan dalam mendegradasi dichlorometan adalah *Pandoraea pnomenusa* LX-1 (Fu *et al.*, 2012). Bakteri *Pandoraea pnomenusa* memiliki kemampuan dalam memanfaatkan sumber karbon sebagai energi

Tabel 4. Karakteristik biokimia isolat bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi
 Table 4. Biochemistry characteristics of the nitrifying and denitrifying bacteria

Uji biokimia <i>Biochemical test</i>	Kode isolat bakteri nitrifikasi <i>Code of nitrifying bacteria isolates</i>			
	NP1	NP2	NP3	NP4
NO ₃ (Nitrate)	+	+	-	-
Glukosa (Glucose)	-	+	-	-
(Adh)	+	+	+	+
Urea (Ure)	+	+	+	+
Gelatin (Gel)	-	+	-	-
(Png)	-	-	+	+
(Glu)	-	+	+	+
Arabinosa (Ara)	-	-	+	+
(Mne)	-	-	+	+
Manosa (Man)	+	+	+	+
(Nag)	+	+	+	+
(Gnt)	+	+	+	+
(Cap)	-	+	+	+
(Adi)	+	+	+	+
(Mlt)	+	+	-	-
Asam sitrat (Cit)	+	+	-	-
(Pac)	+	+	+	+
Oxidase (Ox)	+	+	+	+
Metabolisme fermentatif/oksidatif	Oksidatif	Oksidatif	Oksidatif	Oksidatif

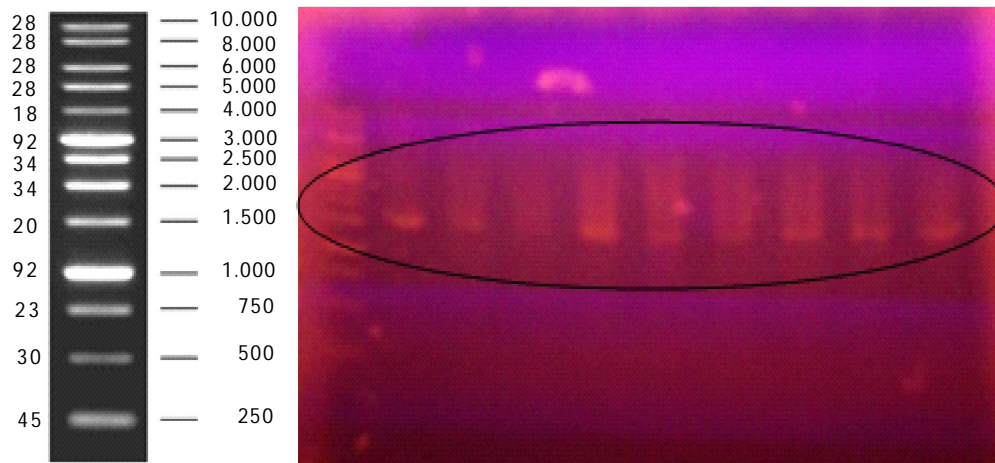
Uji biokimia <i>Biochemical test</i>	Kode isolat bakteri denitrifikasi <i>Code of denitrifying bacteria isolates</i>			
	DP1	DP2	DP3	DP4
NO ₃ (Nitrate)	+	+	+	+
Glukosa (Glucose)	+	-	-	-
(Adh)	+	+	+	+
Urea (Ure)	+	+	+	+
(Esc)	+	-	+	-
Gelatin (Gel)	+	-	+	-
(Png)	-	-	+	-
(Glu)	-	+	+	-
(Mne)	-	-	+	-
(Nag)	+	-	+	+
Maltosa (Mal)	-	-	+	+
(Mlt)	+	-	-	+
Asam sitrat (Cit)	+	-	-	+
Oxidase (Ox)	+	+	+	+
Metabolisme fermentatif/oksidatif	-	-	-	-

Keterangan (Note): (+) isolat dapat memanfaatkan mineral dan gula- gula sebagai sumber C dan C untuk pertumbuhannya (*isolates able to to use minerals and sugars as C and C sources for growth*)
 (-). Isolat tidak mampu memanfaatkan mineral dan gula- gula sebagai sumber C dan C untuk pertumbuhannya (*isolates not able to to use minerals and sugars as C and C sources for growth*)

dan kemampuan dalam mereduksi senyawa dichlorometan (DMC) sebesar 56-85% (Yu *et al.*, 2013).

Berdasarkan hasil sekuensing, isolat bakteri nitrifikasi NP2 dan NP3 merupakan kelompok proteobakteri yang memiliki kekerabatan terdekat

dengan jenis *Pseudomonas* sp. yaitu *Pseudomonas aeruginosa* strain PSE 12 (Gambar 2). Syahputra *et al.* (2011) menyebutkan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dapat digunakan sebagai agen bioremediasi yang ramah lingkungan untuk pengendalian pencemaran limbah



Gambar 2. Hasil PCR 16SrRNA bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi. Pada gambar hasil PCR terdapat pita DNA pada panjang sekitar 1.300 bp ukuran tersebut mengacu pada 1 Kb DNA ladder.

Figure 2. Results PCR 16SrRNA from the selected nitrifying and denitrifying bacteria. The PCR results showed the length of DNA band is roughly 1,300 bp the size refers to 1 Kb DNA ladder.

Tabel 5. Hasil BLAST N dari sekuen 16SrRNA

Table 5. BLASTN results from 16S rRNA sequence

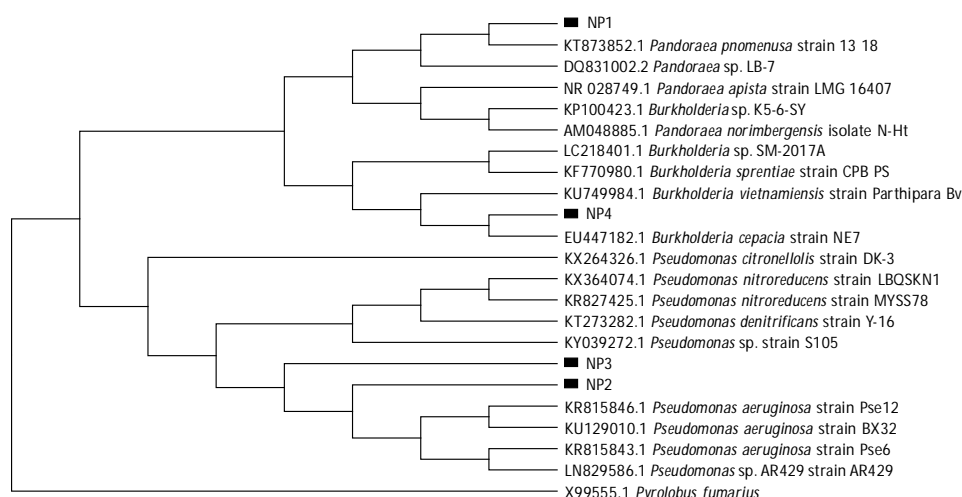
Isolat <i>Isolate</i>	Asal isolat <i>Isolates initial</i>	Homologi bakteri (Blast N) <i>Bacterial homology</i>	Kemiripan <i>Similarity (%)</i>	Nomor akses <i>Accession number</i>
DP1	Jambi	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> strain TPL14	100	EU373389.1
DP2	Jambi	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> strain BTY	100	GU265557.1
DP3	Riau	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain BHWSL2	99	KX212258.1
DP4	Riau	<i>Ochrobactrum intermedium</i> strain: SQ 20	98	KC195785.1
NP1	Jambi	<i>Pandoraea pnomenusa</i> strain 1318	99	KT873852.1
NP2	Jambi	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain PSE12	99	KR815846.1
NP3	Jambi	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain PSE12	99	KR815846.1
NP4	Jambi	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> strain NE 7	98	EU447182.1

nitrogen anorganik seperti nitrat dan nitrit. Bakteri jenis *Pseudomonas* sp. merupakan bakteri yang dominan berperan sebagai bakteri nitrifikasi dan paling banyak digunakan sebagai probiotik pengolahan air limbah industri perikanan, karena kemampuannya dalam mendegradasi senyawa nitrogen (Kumar *et al.*, 2013). *Pseudomonas* sp. diketahui cukup toleran terhadap logam Cd dan resisten terhadap antibiotik (Patra *et al.*, 2010). Bakteri ini dapat mereduksi nitrat dengan produk akhir berupa gas nitrogen (N) karena didukung dengan kelengkapan enzim yang dimilikinya (Rusmana, 2006).

Isolat bakteri nitrifikasi NP 4 (Gambar 4) menunjukkan kekerabatan terdekat dengan jenis *Burkholderia vietnamiensis* strain NE 7. Bakteri jenis

ini berperan penting dalam proses nitrifikasi perairan dan merupakan bakteri yang dominan (Sombatjinda *et al.*, 2011). Bakteri nitrifikasi heterotrof seperti *Burkholderia cepacia* NH-17 dapat mengkonversi nitrit (NO_2^-) menjadi nitrat (NO_3^-) yang selanjutnya mengubah nitrit (NO_2^-) menjadi NO dengan bantuan enzim nitrit reduktase. NO yang sudah terbentuk diubah lebih lanjut menjadi nitrat (NO_3^-) oleh enzim NO dioksigenase dalam kondisi aerob (Matsuzaka *et al.*, 2003).

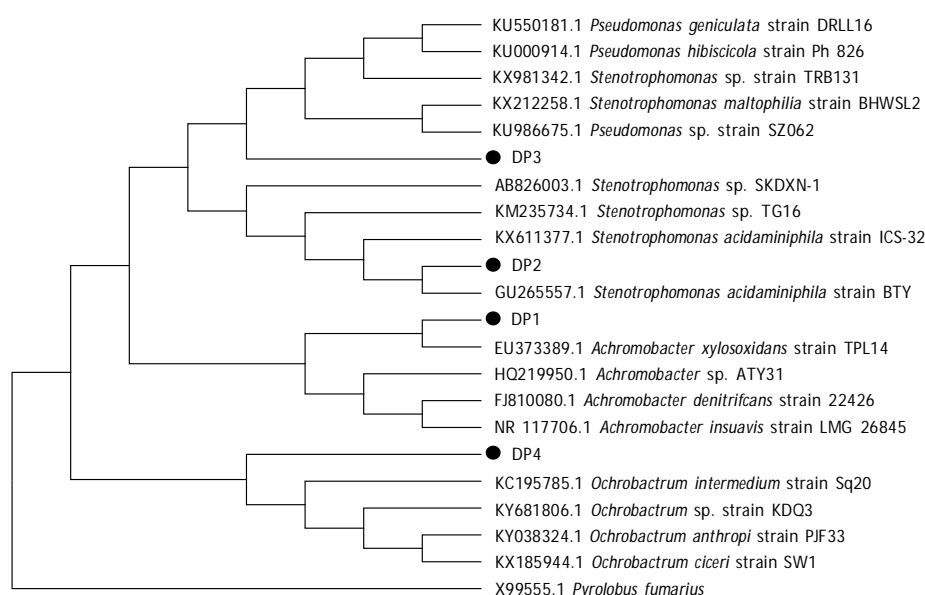
Hasil sekuen isolat bakteri denitrifikasi DP3 menunjukkan bahwa bakteri tersebut memiliki kedekatan dengan jenis *Stenotrophomonas* sp. dan *pseudomonas* sp. Namun, kerabat yang terdekat adalah dengan jenis *Stenotrophomonas maltophilia* strain BHWSL2 (Gambar 4). Genus *Stenotrophomonas* secara



Gambar 3. Dendrogram filogeni isolate bakteri nitrifikasi berdasarkan sekuen 16S-rRNA.
Figure 3. Phylogeny dendrogram of nitrifying bacteria isolates based on 16S-rRNA sequence.

filogeni ditempatkan dalam gama proteobacteri yang awalnya dikenal dengan nama *Stenotrophomonas maltophilia* dan merupakan Xanthomonas yang termasuk ke dalam sub kelas proteobacteri (Anzai *et al.*, 2000). Genus *Stenotrophomonas* merupakan genus yang dominan di alam (air, tanah, dan tumbuhan) dan memiliki distribusi yang luas serta berperan penting dalam siklus nitrogen dan sulfur (Ryan *et al.*, 2009). Genus *Stenotrophomonas* baru diketahui ada 8 jenis (Yoon *et al.*, 2006).

Hasil sekuen isolat bakteri nitrifikasi DP4 menunjukkan bahwa bakteri tersebut memiliki kekerabatan dengan genus *Ochrobactrum* dan yang terdekat dengan jenis *Ochrobactrum intermedium* strain: SQ 20. Bakteri jenis *Ochrobactrum anthropi* merupakan bakteri denitrifikasi di tanah maupun di air (Bothe *et al.*, 2000). Bakteri *O. anthropi* memiliki bentuk seperti batang atau basil, gram negatif, dan merupakan bakteri pereduksi NO_3 and NO_2 (Mahmood *et al.*, 2009; Bathe *et al.*, 2006). Bakteri jenis ini dapat hidup dalam



Gambar 4. Dendrogram filogeni isolat bakteri denitrifikasi berdasarkan sekuen 16S-rRNA.
Figure 4. Phylogeny dendrogram of nitrifying bacteria isolates based on 16S-rRNA sequence.

lingkungan ekstrim seperti lumpur dan air yang tercemar (Mahmood *et al.*, 2009; Kesseru *et al.*, 2002). *Onchrobactrum* adalah organisme mesofilik yang dapat tumbuh pada kisaran suhu 4-40°C dan kisaran pH 3-9, tetapi optimal pada suhu 30°C dan pH kisaran 6-7 (Lebuhn *et al.*, 2000).

Berdasarkan hasil seleksi dan karakterisasi bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi, diperoleh masing-masing empat isolat sebagai kandidat probiotik untuk pengendalian senyawa nitrogen pada lingkungan budidaya ikan. Hasil yang sama juga telah dilakukan oleh Saputra *et al.* (2011) yang mengisolasi bakteri denitrifikasi dari muara Sungai Cisadane dengan memperoleh isolat *Pseudomonas aeruginosa* di mana dari bakteri ini dapat berperan nitrifikasi dengan uji *couple process*.

Berdasarkan hasil seleksi dan karakterisasi bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi, diperoleh masing-masing empat isolat sebagai kandidat probiotik untuk pengendalian senyawa nitrogen pada lingkungan budidaya ikan.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh bakteri kandidat probiotik pengendali senyawa nitrogen pada budidaya ikan air tawar dari kelompok nitrifikasi antara lain: *Pandoraea pnomenusa* strain 1318 (NP1); *Pseudomonas aeruginosa* strain PSE12 (NP2); *Pseudomonas aeruginosa* strain PSE12 (NP3); *Burkholderia vietnamiensis* strain NE 7 (NP4) dan kelompok denitrifikasi yaitu: *Achromobacter xylosoxidans* strain TPL14 (DP1); *Stenotrophomonas acidaminiphila* strain BTY (DP2); *Stenotrophomonas maltophilia* strain BHWSL2 (DP3); *Ochrobactrum intermedium* strain: SQ 20 (DP4).

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan, Bogor yang telah membiayai penelitian ini melalui APBN 2013. Ucapan terima kasih kepada Bapak Hernowo dari Dinas Perikanan dan Kelautan Provinsi Jambi dan Bapak Hasiben dari Dinas Perikanan Kabupaten Kampar Provinsi Riau.

DAFTAR ACUAN

Agustiyani, D., Kayadoe, R.M., & Imamuddin, H. (2010). Oksidasi nitrit oleh bakteri heterotrofik pada kondisi aerobik. *Jurnal Biologi Indonesia*, 6(2), 265-275.

Anzai, Y., Kim, H., Park, J.Y., Wakabayashi, H., & Oyaizu, H. (2000). Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol*, 50, 1563-1589.

Azhar, H.M., Ulkhaq, M.F., Suciyo, dan Prayogo. 2017. Kelimpahan dan keanekaragaman bakteri pada pembenihan ikan lele (*Clarias gariepinus*) dengan sistem air tertutup (*close water system*). *Journal of Aquaculture Science*, 2(4), 81-89.

Badjoeri, M. & Widiyanto, T. (2008). Penggunaan bakteri nitrifikasi untuk bioremediasi dan pengaruhnya terhadap konsentrasi amonia dan nitrit di tambak udang. *Oseanologi dan Limnologi di Indonesia*, 34(2), 261-278.

Bathe, S., Achouak, W., Hartmann, A., Heulin, T., Schlöter, M., & Lebuhn, M. (2006). Genetic and phenotypic microdiversity of *Ochrobactrum* spp. *FEMS microbiology ecology*, 56(2), 272-280.

Bock, E., Koops, H.P., & Harms, H. (1989). Nitrifying bacteria. In H.G. Schlegel and B. Bowien (Editors), *Autotrophic Bacteria*. Science Tech Publishers, Madison, WI, 81-96.

Bothe, H., Jost, G., Schlöter, M., Ward, B., & Karl-Paul, W. (2000). Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 673-690.

Clesceri, L.S., Greenberg, A.E., & Eaton, A.D. (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th Edition. American Public Health Association, Washington, D.C., 1325 pp.

Djokosetiyanto, D., Sunarma, A., & Widanarni. (2006). Perubahan amonia (NH-N) nitrit (NO₂-N) dan nitrat (NO₃-N) pada media pemeliharaan ikan nila merah (*Oreochromis* sp.) di dalam sistem resirkulasi. *Jurnal Akuakultur Indonesi*, 5(1), 13-20.

United States Environmental Protection Agency (EPA). (1971). Method 352.1: Nitrogen, Nitrate (Colorimetric, Brucine) Spectrophotometer.

Fu, L.X., Yu, J.M., Cheng, Z.W., Jiang, Y.F., Chen, J.M., Gu, X.N., & Zhu, R.Y. (2012). Characteristics of dichloromethane degradation by *Pandoraea pnomenusa* LX-1. *Journal Enviromen Science*, 32(7), 563-571.

Hogg & Stuart. (2013). *Essential Microbiology* (2nd ed.). Wiley-Blackwell. 86 p.

Jun, X., Xiuzheng, X., & Tongbing, Y. (2000). Physico-chemical factors & bacteria in fish ponds. *The ICLARM Quartel*, 23(4), 16-20.

Kesseru, P., Kiss, I., Bihari, Z., & Polyak, B. (2002). The effects of NaCl and some heavy metals on the denitrification activity of *Ochrobactrum anthropi* *Journal of basic microbial*, 42(4), 268-276.

Khasani, I. (2008). Isolasi dan skrining bakteri nitrifikasi serta aplikasinya pada biofiltrasi media pemeliharaan larva udang galah *Macrobrachium rosenbergii* de Man. *Jurnal Riset Akuakultur*, 3(3), 413-430.

- Kumar, V.J.R., Sukumaran, V., Achuthan, C., Joseph, V., Philip, R., & Singh, S.B. (2013). Molecular characterization of the nitrifying bacterial consortia employed for the activation of bioreactors used in brackish and marine aquaculture systems. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 78, 74-81.
- Lebuhn, M., Achouak, W., Schlöter, M., Berge, O., Meier, H., Barakat, M., & Heulin, T. (2000). Taxonomic characterization of *Ochrobactrum* sp. isolates from soil samples and wheat roots, and description of *Ochrobactrum tritici* sp. nov. and *Ochrobactrum grignonense* sp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(6), 2200-2207.
- Long, A., Heitman, J., Tobias, C., Phillips, R., & Song, B. (2013). Anammox, denitrification, and codenitrification in agricultural soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79(1), 168-176.
- Mahmood, Q., Hu, B., Cai, J., Zheng, P., Azim, M., Jilani, G., & Islam, E. (2009). Isolation of *Ochrobactrum* sp. QZ2 from sulfide and nitrite treatment system. *Journal of Hazardous Materials*, 165(1), 558-565.
- Marchesi, J.R., Sato, T., Andrew, T., Weightman, Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J., & Wade, W.G. (1998). Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S-rRNA. *App Env of Microbiol.*, 64(2), 795-799.
- Matsuzaka, E., Nomura, N., & Maseda, H. (2003). Participation of nitrite reductase in conversion of NO₂⁻ to NO₃⁻ in a heterotrophic nitrifier, *Burkholderia cepacia* NH-17, with denitrification activity. *Microbes Environ.*, 18, 203-209.
- Michaud, L., Blancheton, J.P., Bruni, V., & Piedrahita, R. (2006). Effect of particulate organic carbon on heterotrophic bacterial populations and nitrification efficiency in biological filters. *Aquacultural Engineering*, 34, 224-233.
- Novita, L., Rusmana, I., & Widiyanto, T. (2014). Struktur pengoksidasi ammonia berdasarkan gen amoA di situ Sawangan Bojongsari, Jawa Barat. *Limnotek*, 21(1), 74-86.
- Patra, S., Das, T.K., Ghosh, S.C., Sarkar, D., & Jana, B.B. (2010). Cadmium tolerance and antibiotic resistance of *Pseudomonas* sp. isolated from water, sludges, and fish raised in wastewater-fed tropical ponds. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48, 383-393.
- Rodina, G.A. (1972). *Methods in aquatic microbiology*. Dalam Rita RC. Machael S. editor: University Park Press. Baltimore USA, 461 pp.
- Rusmana, I. (2003). Nitrous oxide formation in bacteria. *Journal Microbiology Indonesia*, 8, 63-66.
- Rusmana, I. (2006). Gaseous and products of nitrate and nitrite reduction by denitrifying pseudomonads isolated from estuarine sediment. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*, 11(2), 63-66.
- Ryan, R.P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M.B., Berg, G., Van der Lelie, D., & Dow, J.M. (2009). The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology*. Macmillan Publishers Limited, 7, 514-525.
- Sanders, E.R. (2012). Aseptic laboratory techniques: Plating methods. *Journal of Visualized Experiments*, (63), 3064.
- Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Welch, D.M., Huse, S.M., Neal, P.R., Arrieta, J.M., & Herndl, G.J. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 12115-12120.
- Sombatjinda, S., Boonapathchareon, N., Ruengjitchatchawalya, M., Wantawin, C., Withyachumnarnkul, B., & Techarnjanaruk, S. (2011). Dynamics of microbial communities in an earthen shrimp pond during the shrimp growing period. *Environment and Natural Resources Research*, 1(1), 171-180.
- Syahputra, K., Rusmana, I., & Widyastuti, U. (2011). Isolasi dan karakterisasi bakteri denitrifikasi sebagai agen bioremediasi nitrogen anorganik. *Jurnal Riset Akuakultur*, 6(2), 197-209.
- Widiyanto, T. (2006). *Seleksi bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi untuk bioremediasi di tambak udang*. Disertasi. Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor, 121 hlm.
- Yantos. (2016). Kebijakan pemerintah Kabupaten Kampar terhadap peningkatan daya sains UMKM Desa Koto Mesjid dalam menghadapi masyarakat ekonomi ASEAN (MEA). *Jurnal Risalah*, 27(1), 32-45.
- Yoon, J.H., Kang, S.J., Oh, H.W., & Oh, T.K. (2006). *Stenotrophomonas dokdonensis* sp. isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56, 1363-1367.
- Yu, J., Cai, W., Cheng, Z., & Chen, J. (2013). Degradation of dichloromethane by an isolated strain *Pandoraea promoussa* and its performance in a biotrickling filter. *Journal Environment Science*, 13, 1-23.
- Yuhana, M. (2010). Agen biokontrol dalam akuakultur: Produksi dan aplikasinya. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 9(1), 16-20.