

**PENGARUH KONSENTRASI NITRAT TERHADAP PERTUMBUHAN DAN
AKUMULASI NITRIT PADA
KULTUR ALGA *ANKISTRIDESMUS CONVULUTUS***

**T. Chrismadha², S. H. Nasution², Rosidah²,
Y. Mardiaty², A. Kurniasih²**

ABSTRAK

Alga hijau, *Ankistrodesmus convolutus*, dikultur secara batch dengan variasi konsentrasi N-NO₃ (KNO₃) di dalam mediana, dan pertumbuhan serta akumulasi N-NO₂ dalam media tumbuhnya diamati. Hasilnya menunjukkan adanya fenomena akumulasi N-NO₂ pada kultur tersebut, yang terjadi akibat pemberian N-NO₃ berlebihan di dalam mediana. Konsentrasi N-NO₂ tersebut mulai menurun setelah konsentrasi N-NO₃ di dalam media hampir habis, yaitu berkisar antara 4 - 13 mg/l, dan saat mulai terjadinya penurunan tersebut dapat diprediksi tergantung dari banyaknya N-NO₃ yang diberikan, serta kemungkinan aklimatisasi fisiologis alga tersebut terhadap konsentrasi N-NO₃ yang ada. Biomasa maksimum yang dapat dicapai pada penelitian ini adalah 1,23 g/l pada kultur dengan konsentrasi N-NO₃ 2,5 mM, dimana penurunan konsentrasi N-NO₂-nya mulai terjadi pada hari ketujuh.

PENDAHULUAN

Mikroalga memegang peranan penting sebagai pakan alami untuk larva ikan dan berbagai hewan komoditi perairan lainnya (De Pauw & Persoone 1988; Notowinarto 1993). Komposisi biokimia mikroalga, seperti asam lemak esensial, diyakini berperan penting dalam meningkatkan daya tahan hidup serta laju pertumbuhan larva-larva tersebut (Chu & Dupuy 1980; Watanabe *et al.* 1983; De Pauw *et al.* 1984). Mikroalga juga dapat digunakan untuk pakan alami hewan-hewan planktonik, seperti rotifer dan udang-udangan tingkat rendah, bahkan telah dilaporkan dapat meningkatkan nilai nutrisi hewan-hewan planktonik tersebut (James *et al.* 1987; Rezeg & James 1987).

Meskipun dapat dengan mudah dilakukan di panti-panti benih ikan dan udang, kultur mikroalga masih menghadapi kendala tingginya kandungan nitrit (N-NO₂) dan ammonium (N-NH₄) pada fase awal pertumbuhannya, yang dapat berpengaruh buruk terhadap kesehatan anakan ikan dan udang (Cholik *et al.* 1988; Boyd 1982). Kendala tersebut sangat erat berkaitan dengan proses metabolisme nitrogen oleh sel-sel alga.

Telah diketahui bahwa pemberian urea untuk sumber nitrogen pada kultur *Chlorella ellipsoidea* menyebabkan kandungan N-NH₄ yang tinggi pada suspensi kulturnya (Little & Mah 1970), sementara *Skeletonema costatum* melepaskan N-NO₂ keluar selnya sebagai hasil antara metabolisme N-NO₃ dari medianya (Serra *et al.* 1978). Demikian juga affinitas sel-sel alga terhadap senyawa nitrogen di dalam medianya, dimana preferensi penyerapan terjadi pertama-tama terhadap N-NH₄, kemudian N-NO₃ dan yang terakhir N-NO₂ (Dortch *et al.* 1991; Cresswell & Syrett 1981) menyebabkan seringnya ditemui akumulasi N-NO₂ pada media kultur mikroalga.

Pada penelitian ini dikaji hubungan konsentrasi N-NO₃ yang diberikan dengan pertumbuhan dan kandungan N-NO₂ di dalam kultur alga *Ankistrodesmus convolutus*, sehingga dapat ditentukan konsentrasi N-NO₃ yang optimal bagi pertumbuhan alga tersebut dengan akumulasi N-NO₂ yang minimal.

BAHAN DAN CARA

Ankistrodesmus convolutus yang digunakan dalam penelitian ini merupakan koleksi dari Laboratorium Planktonologi Puslitbang Limnologi LIPI. Inokulum didapat dari kultur berumur 2 minggu yang tumbuh dengan media PHM (Tabel 1) di dalam botol kaca 500 ml yang dilengkapi aerasi. Sebanyak 10 ml kultur tersebut disentrifus secara aseptik pada 1000 rpm selama 15 menit, dan diambil sel-selnya yang mengendap untuk inokulum, sementara supernatannya dibuang untuk mengurangi faktor konsentrasi N-NO₃ dan N-NO₂ yang terbawa dari inokulum tersebut. Selanjutnya percobaan dilakukan dengan mengkultur alga tersebut secara *batch* aseptik dalam botol kaca 500 ml yang dilengkapi aerasi, dengan media PHM 400 ml selama 12 hari. Sumber cahaya didapat dari 2 buah lampu TL 40 watt dengan intensitas cahaya pada permukaan botol kultur 10.000 luks. Suhu ruang percobaan terukur 29 - 32°C, sementara pH kultur 5,5 - 8,0. Perlakuan konsentrasi N-NO₃ diberikan dengan memodifikasi konsentrasi N-NO₃ dari media PHM, yaitu 0, 1/16, 1/4, dan 1 kali media PHM normal, setara dengan konsentrasi N-NO₃ 0 mM, 0,625 mM, 2,5 mM dan 10 mM, masing-masing dengan tiga kali ulangan. Selama 4 hari pertama dilakukan sampling setiap hari untuk pengukuran konsentrasi N-NO₃ dan N-

Tabel 1. Komposisi media PHM termodifikasi

Komposisi	mg/l
KNO ₃	1000,000
K ₂ HPO ₄	200,000
MgSO ₄ .7H ₂ O	200,000
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,025
EDTA	0,019
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,002
H ₃ BO ₃	0,016
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,015
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,006
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,038

* Kedalam komposisi media tersebut juga ditambahkan 1 ml/l ekstrak tanah,

yang dibuat dengan cara mendidihkan 1000 g tanah di dalam 1000 ml air selama 1 jam, dan airnya kemudian disaring dengan kertas saring, setelah didinginkan dan diendapkan semalam. NO₂, yang selanjutnya dilakukan dua kali seminggu.

Disamping itu juga dilakukan sampling dua kali seminggu untuk analisa konsentrasi sel, biomasa, serta khlorofil.

Kepadatan sel kultur dihitung di bawah mikroskop pada haematositometer. Berdasarkan hasil penghitungan tersebut kemudian di hitung laju tumbuh sel-selnya dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\mu = \frac{\ln x_t/x_0}{t}$$

dimana: μ adalah laju tumbuh (pembelahan sel/hari), x_t kepadatan sel pada hari t (sel/ml), x_0 kepadatan awal sel (sel/ml) dan t adalah waktu (hari).

Berat organik kultur ditentukan dengan menyaring 10 ml sampel melalui filter Whatman GF/A yang sebelumnya telah dipanaskan pada 450°C semalam. Filter selanjutnya dioven pada 100 °C selama 1 jam, disimpan dalam desikator dan

ditimbang. Untuk menentukan berat organik filter kemudian diabukan pada suhu 450 °C semalam, dan setelah disimpan dalam desikator selama 5 jam, filter tersebut ditimbang kembali. Berat organik alga didapat dengan mengurangi berat filter setelah pemanasan 100 °C dengan beratnya setelah diabukan.

Untuk analisa kandungan N-NO₃ dan N-NO₂, suspensi kultur disaring dengan saringan Whatman GF/A, dan konsentrasi N-NO₃ dalam air media yang telah disaring tersebut selanjutnya ditentukan dengan metode *brucine* (Merck), sedangkan konsentrasi N-NO₂-nya ditentukan dengan metode kolorimetri (APHA 1995). Kandungan khlorofil kultur ditentukan dengan metode ekstraksi dengan larutan 90% aseton (Jeffrey & Humprey 1975).

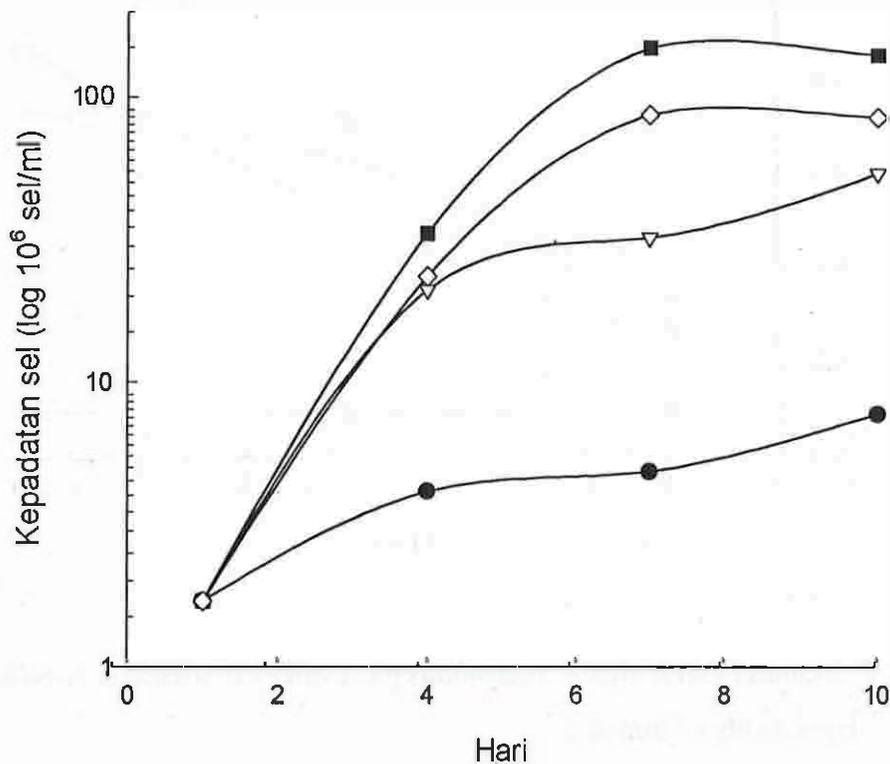
HASIL DAN PEMBAHASAN

Laju tumbuh alga *A. convolutus* meningkat sejalan dengan naiknya konsentrasi N-NO₃ sampai ke titik optimumnya. Pada kultur kontrol dimana kandungan N-NO₃ masih terdeteksi (rata-rata 0,442 mg/l) yang merupakan bawaan dari suspensi inokulumnya, laju tumbuhnya adalah 0,17 pembelahan sel/hari, sedangkan pada kultur dengan N-NO₃ 0,625 mM laju tumbuhnya 0,37 pembelahan sel/hari, dan kultur dengan N-NO₃ 2,5 mM laju tumbuhnya 0,46 pembelahan sel/hari. Selanjutnya kenaikan konsentrasi N-NO₃ menjadi 10 mM justru menurunkan laju tumbuh alga, yaitu menjadi 0,41 pembelahan sel/hari. Kepadatan sel maksimum yang dicapai berturut-turut adalah: 7,7 juta sel/ml pada kultur kontrol, 53,8 juta sel/ml pada kultur 0,625 mM N-NO₃, 140,6 juta sel/ml pada kultur 2,5 mM N-NO₃, dan 84,7 juta sel/ml pada kultur 10 mM N-NO₃ (Gambar 1).

Naiknya laju tumbuh alga sejalan dengan peningkatan konsentrasi N-NO₃ sampai dengan 2,5 mM merupakan indikasi bahwa sampai dengan konsentrasi tersebut N-NO₃ masih merupakan faktor pembatas bagi pertumbuhan alga tersebut, sedangkan konsentrasi optimumnya berada diantara konsentrasi 2,5 mM dan 10 mM. Hasil tersebut sejalan dengan Fabregas *et al* (1984) yang melaporkan bahwa konsentrasi optimum N-NO₃ untuk kultur *Tetraselmis suecica* adalah antara 2 - 9 mM, dimana pada konsentrasi tersebut kultur alga dapat mencapai kepadatan sel maksimum. Namun jenis alga lain, yaitu *Chlorella stigmatophora* memperlihatkan pertumbuhan maksimum pada konsentrasi N-NO₃ yang lebih tinggi, yaitu antara 16 -

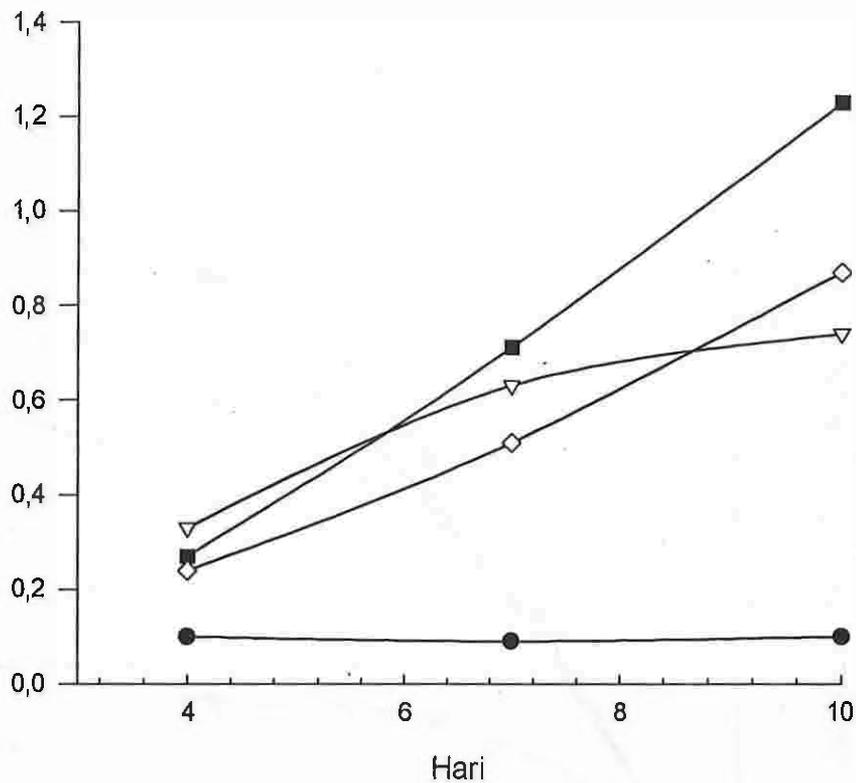
32 mM (Fabregas *et al* 1987). Hal ini nampaknya berkaitan erat dengan karakter spesifik tiap jenis alga.

Disamping itu Fabregas *et al* (1984) juga mengamati adanya hambatan laju tumbuh alga *T. suecica* pada konsentrasi N-NO₃ berlebihan, yang terlihat sangat



Gambar 1. Kurva pertumbuhan kepadatan sel *A. convolutus* pada variasi konsentrasi N-NO₃; legenda: ● = kontrol, ▽ = 0,625 mM N-NO₃, ■ = 2,5 mM N-NO₃, □ = 10 mM N-NO₃

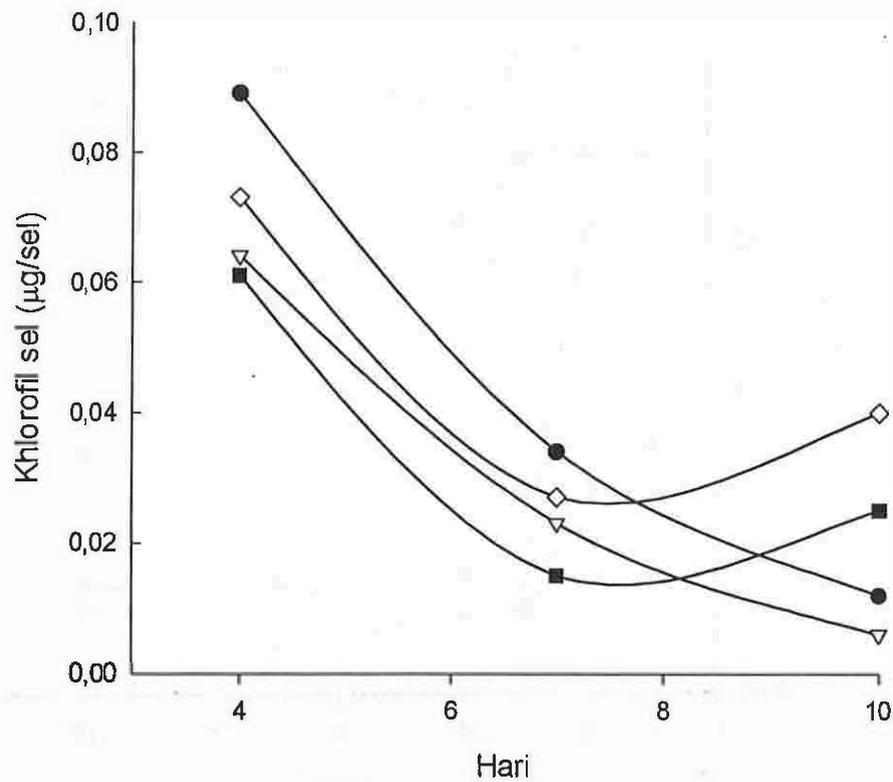
signifikan pada pemberian konsentrasi N-NO₃ mencapai 64 mM. Sementara fenomena yang sama dilaporkan juga terjadi pada jenis *Dunaliella viridis* (Spectrova *et al* 1982) dan *Phaeodactylum tricornutum* (Chrimadha 1993). Penurunan laju tumbuh alga *A. convolutus* pada konsentrasi N-NO₃ 10 mM nampak sejalan dengan hasil-hasil penelitian yang telah dilakukan sebelumnya tersebut, dan mempertegas



Gambar 2. Biomasa kultur alga *A. convolutus* pada variasi konsentrasi N-NO₃; legenda lihat Gambar 1.

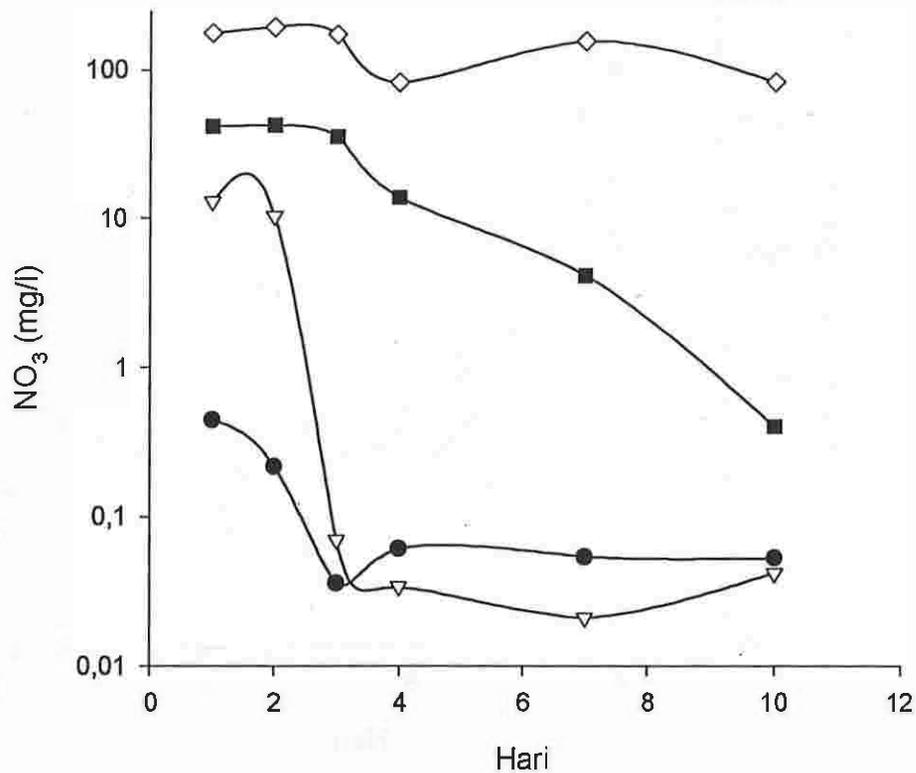
pentingnya memperhatikan faktor konsentrasi optimum nutrien, khususnya N-NO₃ untuk produktivitas maksimal kultur alga.

Gambar 2 memperlihatkan pertambahan biomasa yang diekspresikan sebagai berat organik kultur *A. convolutus* dengan variasi konsentrasi N-NO₃ dalam mediana. Pola pertambahan biomasa tersebut nampak sejalan dengan kurva laju pertambahan selnya. Konsentrasi maksimum biomasa yang dicapai adalah 1,23 g/l pada kultur 2,5 mM N-NO₃, sedangkan biomasa kultur kontrol, kultur 0,625 mM N-NO₃ dan kultur 10 mM N-NO₃ berturut-turut adalah 0,1 g/l, 0,74 g/l dan 0,84 g/l.



Gambar 3. Kandungan khlorofil sel alga *A. convolutus* pada variasi konsentrasi N-NO₃ ; legenda lihat Gambar 1.

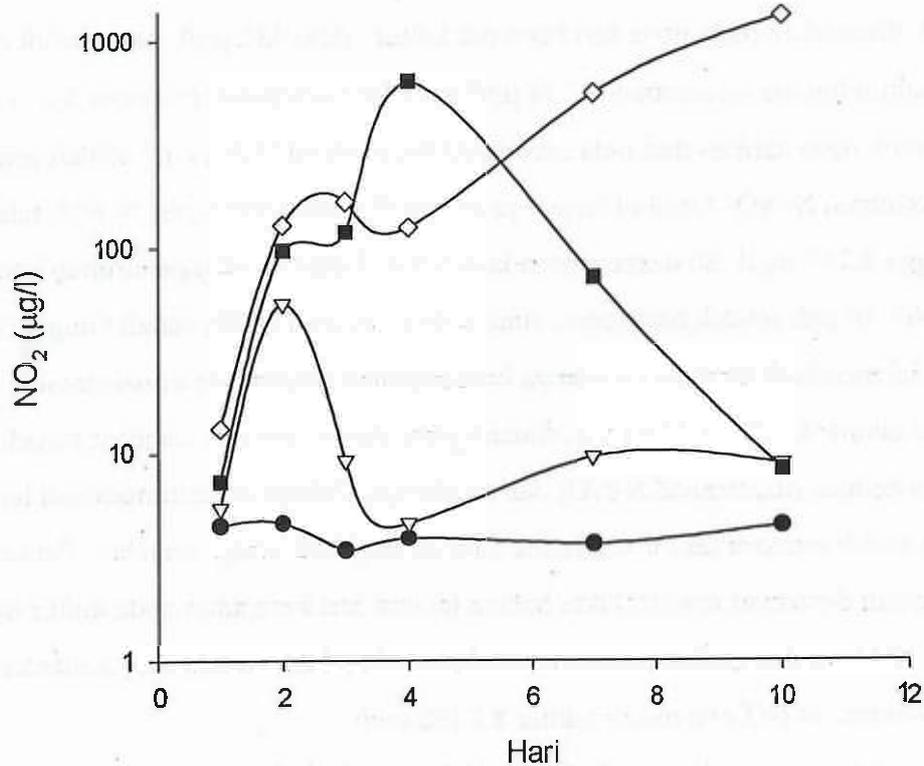
Kandungan khlorofil sel *A. convolutus* yang tumbuh pada medium dengan variasi konsentrasi N-NO₃ dapat dilihat pada Gambar 3. Pola respon kandungan khlorofil sel alga tersebut terhadap variasi konsentrasi N-NO₃ tidak jelas terlihat, meskipun bila dilihat konsentrasi khlorofil di dalam suspensi kulturnya memperlihatkan pola yang sama dengan kurva pertumbuhan selnya. Hal ini tidak sejalan dengan Fabregas *et al* (1987) yang melaporkan kandungan khlorofil sel



Gambar 4. Perilaku N-NO₃ kultur alga *A. convolutus* pada variasi konsentrasi N-NO₃ awal; legenda lihat Gambar 1.

maksimum pada kultur *C. stigmatophora* yang tumbuh dengan konsentrasi N-NO₃ optimal.

Kandungan N-NO₂ dalam media kultur alga nampak berhubungan positif dengan konsentrasi awal N-NO₃-nya. Pada kultur kontrol yang tidak diberi N-NO₃ ternyata masih dapat dideteksi kandungan N-NO₃ pada hari pertama kultur sebesar 0,442 mg/l. N-NO₃ yang terbawa dari suspensi inokulum ini dengan cepat terserap habis sejalan dengan pertumbuhan jumlah sel di dalam kulturnya. Beberapa penelitian



Gambar 5. Perilaku N-NO₂ kultur alga *A. convolutus* pada variasi konsentrasi N-NO₃; legenda lihat Gambar 1.

sebelumnya juga melaporkan kemampuan alga terus tumbuh pada kondisi tanpa nitrogen selama persediaan nitrogen didalam selnya mencukupi (Richardson *et al.* 1969). Dengan demikian tidaklah mengherankan pada kultur kontrol masih dapat dilihat pertumbuhan sel-sel alga yang cukup signifikan. Sedangkan bila diamati perkembangan kandungan N-NO₂ di dalam suspensi kulturnya, tidak terlihat adanya kenaikan kandungan senyawa tersebut selama masa kultur berlangsung (Gambar 4 dan 5). Kandungan N-NO₂ dalam kultur kontrol ini relatif sangat rendah, yaitu antara 3,201 - 6,718 µg/l.

Pada kultur dengan konsentrasi N-NO₃ 0,625 mM kenaikan konsentrasi N-NO₂ hanya terjadi pada hari kedua kultur, yaitu dari 5,663 µg/l pada hari pertama

menjadi 57,271 $\mu\text{g/l}$ pada hari kedua tersebut (Gambar 5). Sedangkan pada hari-hari berikutnya terjadi penurunan tajam konsentrasi N-NO₂ tersebut sejalan dengan penyerapan N-NO₃ dari media oleh sel-sel alganya.

Pada kultur dengan konsentrasi N-NO₃ 2,5 mM konsentrasi maksimum N-NO₂ ditemukan pada pada hari keempat kultur, yaitu 630 $\mu\text{g/l}$, dan setelah itu menurun hingga konsentrasi 8,348 $\mu\text{g/l}$ pada hari kesepuluh (Gambar 5). Yang menarik diperhatikan dari pola perubahan konsentrasi N-NO₂ ini adalah penurunan konsentrasi N-NO₂ tersebut terjadi pada hari dimana konsentrasi N-NO₃ telah turun hingga 4,167 mg/l. Sementara pada kultur 0,625 mM N-NO₃ penurunan konsentrasi N-NO₂ terjadi setelah hari kedua dimana konsentrasi N-NO₃ sudah tinggal 9,224 mg/l. Hal ini memberikan indikasi adanya kemungkinan suatu batas konsentrasi N-NO₃, yaitu antara 4,167 - 9,224 mg/l, dimana penyerapan senyawa tersebut terjadi bersama-sama dengan penyerapan N-NO₂ dari medianya. Diduga pada konsentrasi tersebut N-NO₃ sudah menjadi faktor pembatas tumbuh bagi kultur alga tersebut. Perkiraan demikian diperkuat dengan fakta bahwa hingga hari kesepuluh pada kultur dengan 10 mM N-NO₃ tidak terjadi penurunan kadar N-NO₂ dalam medianya, sementara konsentrasi N-NO₃nya masih sekitar 83,182 mg/l.

Fenomena pelepasan N-NO₂ kedalam media kultur yang terjadi sejalan dengan metabolisme N-NO₃ telah dilaporkan oleh Serra *et al* (1978) pada kultur *Skeletonema costatum*. Pada jenis ini pelepasan N-NO₂ bahkan telah terjadi pada konsentrasi awal N-NO₃ yang sangat rendah, sekitar 1 μM . Namun perlu diperhatikan bahwa sel-sel alga yang dipergunakan dalam penelitian tersebut telah diadaptasikan pada kondisi kekurangan nitrogen, sehingga kemampuan metabolisme nitrogen di dalam selnya telah sangat berkurang dibanding dengan sel-sel yang terbiasa dengan kondisi jenuh nitrogen seperti jenis *A. convolutus* yang digunakan dalam penelitian ini. Penelitian lebih lanjut masih diperlukan bagi konfirmasi fenomena batas konsentrasi penyerapan N-NO₃ dan N-NO₂ bersama-sama, serta mekanisme adaptasi sel-sel alga terhadap konsentrasi N-NO₃ yang ada.

Disamping mengkonfirmasi adanya kendala akumulasi N-NO₂ pada kultur alga seperti yang telah dilaporkan oleh Cholik *et al* (1988), hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa pengelolaan kultur alga untuk eliminasi kandungan N-NO₂ dapat dilakukan, sehingga bisa didapat pakan alami yang aman untuk akuakultur. Hal ini

dapat dilakukan dengan memprediksi waktu kultur alga mulai menyerap kembali lepasan N-NO₂-nya dari medianya. Seperti terlihat dari hasil penelitian ini, yaitu pada hari ketiga kultur pada konsentrasi N-NO₃ awal 0,625 mM, dan hari ketujuh pada konsentrasi N-NO₃ awal 2,5 mM. Sementara itu fenomena batas konsentrasi dimana terjadi penyerapan N-NO₃ dan N-NO₂ bersama-sama juga dapat digunakan sebagai acuan untuk pengendalian kultur kontinu yang dapat menyediakan pakan alami setiap saat, tanpa adanya kekhawatiran kendala konsentrasi N-NO₂ yang tinggi.

Disamping faktor konsentrasi N-NO₃, nampaknya masih perlu diperhatikan faktor fisiologis dari sel-sel alga yang dikultur. Dalam hal ini disarankan untuk mengaklimatisasikan stok kultur alga pada media jenuh N-NO₃, sehingga pada saat digunakan sebagai inokulum sel-sel alganya dapat mempergunakan konsentrasi N-NO₃ yang relatif tinggi untuk produksi biomasa tanpa melepaskan N-NO₂ kedalam medianya. Penelitian lebih lanjut juga masih diperlukan untuk mengkonfirmasi hal tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimous. The testing of water . 5th ed. E. Merck. Darmstadt. Germany. 99pp.
- Boyd, C.E. 1982. Water quality management for pond fish culture. Elsevier. Amsterdam: 318 pp
- Cholik, F.; I.A. Zafril, K.; dan Suwirya. 1988. Teknologi produksi benih udang monodon (*Penaeus monodon* Fabr.). Makalah disampaikan pada Seminar Nasional Pembenihan Ikan dan Udang, di Bandung 5 - 6 Juli 1988.
- Chu, F.E. dan J.L. Dupuy 1980. The fatty acid composition of three unicellular algal species used as food sources for larvae of American oyster (*Crassostrea virginica*). *Lipids*. 15: 356 - 364
- Chrimadha, T. 1993. Growth and lipid production of *Phaeodactylum tricorutum* in a tubular-photobioreactor. Master Thesis. Murdoch University. 211 pp
- Cresswell, R.S., dan P.J. Syrett. 1991. Uptake of nitrate by the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *J. of Exp. Botany*. 126: 19-25.
- De Pauw, N.; J. Morales; dan G. Persoone 1984. Mass culture of microalgae in aquaculture systems: Progress and constraints. *Hydrobiologia*. 116/117: 121 - 134

- De Pauw, N. dan G. Persoone 1988. Microalgae for aquaculture. Dalam: Microalgal Biotecnology. Borowitzka, M.A. and L.J. Borowitzka (Eds.). Cambridge University Press. Cambridge: 197-221.
- Dortch, Q., P.A. Thompson, dan P.J. Harrison. 1991. Short term interaction between nitrate and ammonium uptake in *Thalassiosira pseudonana*. Effect of preconditioning nitrogen source and growth rate. *Marine Biology*. 110: 183 - 193.
- Eaton, A.D., L.S. Clesceri, dan A.E. Greenberg (Eds.). 1995. Standard method for the examination of water and waste water. APHA, AWWA, WEF.
- Fabregas, J., J. Abalde, C. Herrero, B. Cabezas, dan M. Veiga. 1984. Growth of the marine microalga *Tetraselmis suica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture*. 42: 207-215.
- Fabregas, J., C. Herrero, B. Cabezas, dan J. Abalde. 1987. Growth and biochemical variability of the marine microalga *Chlorella stigmatophora* in batch cultures with different salinities and nutrient gradient concentrations. *British Phycological Journal*. 22: 269 -276.
- Fabregas, J., C. Herrero, J. Abalde, dan B. Cabezas. 1985. Growth, chlorophyll-a and protein of the marine microalga *Isochrysis galbana* in batch cultures with different salinities and high nutrient concentrations. *Aquaculture*. 80: 1 - 11.
- James, C.M.; P. Dias dan E. Salman 1987. The use of marine yeast (*Candida sp*) and baker yeast (*Saccharomyces cereviceae*) in combination with *Chlorella sp* for mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*. 147: 263 - 268
- Jeffrey, S.W. dan G.F. Humprey 1975. New spectrophotometric equation for determining chlorophyll a, b, c1 and c2 in higher plants, algae, and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanz*. 1967: 191- 194.
- Little, L.W., dan R.A. Mah. 1970. Ammonia production in urea grown cultures of *Chlorella ellipsoidea*. *J. Phycol.* 6: 277-280
- Notowinarto. 1993. Peranan mikroalga sebagai pakan teripang. Makalah disampaikan pada Pertemuan Produksi Masa Mikroalga untuk Bahan Pangan, Pakan, dan Pengendalian Lingkungan. Puslitbang Bioteknologi-LIPI, 9 - 11 November 1993, Bogor.

- Rezeq, T.A. dan C.M. James 1987. Production and nutrition quality of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed marine *Chlorella sp*at different cell densities. *Hydrobiologia*. 147: 257 -261
- Richardson, B.; D.M. Orcutt; H.A. Schwertner; C.L. Martinez; dan H.E. Wickline 1969. Effects of nitrogen-limitation on the growth and composition of unicellular algae in continuous culture. *Appl. Microbiol.* 18: 245-250
- Serra, J.L., M.J. Llana, dan E. Cadenas. 1978. Nitrate utilization by the diatom *Skeletonema costatum*. *Plant Physiology*. 62: 987- 990.
- Spektrova, L.; O.L. Goronkova; L.P. Nosova dan O.N. Albitskaya 1982. High density culture of marine microalgae - promising items for mariculture. I. Mineral feeding regime and instalation for culturing *Dunaliella tertiolecta* Butch. *Aquaculture*. 26: 289 - 302
- Watanabe, T.; C. Katajima dan S. Fujita 1983. Nutritional value of life organisms used in Japan for mass propagation of fish. *Aquaculture*. 34: 115 - 143