

Optimasi Sumber Karbon Dan Nitrogen Sebagai Co-Substrat Untuk Pertumbuhan Bakteri Probiotik *Pseudomonas* sp.

Livvy Doresti*, Willis Ari Setyati, Ita Widowati

Departemen Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro
Jl.Prof.H.Soedarto S.H, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah 50275 Indonesia
*Corresponding author, e-mail: ivy_tanahatu@yahoo.co.id

ABSTRAK : Pencemaran limbah organik pada sistem tambak udang merupakan salah satu faktor yang menyebabkan terjadinya penurunan produksi. Limbah organik seperti sisa pakan dan feses terakumulasi pada substrat perairan sehingga kualitas air menurun dan timbul penyakit. *Pseudomonas* sp. merupakan bakteri probiotik yang dapat menghasilkan enzim pendegradasi protein dan amilum, limbah organik yang banyak ditemukan di sistem tambak. Penelitian ini dilakukan penentuan jenis dan optimasi sumber karbon dan nitrogen untuk pertumbuhan *Pseudomonas* sp. dalam upaya mengetahui komposisi medium yang lebih baik untuk produksi biomassa bakteri probiotik. Eksperimen yang dilakukan berupa penentuan sumber karbon yang meliputi glukosa, fruktosa dan molase. Penentuan sumber nitrogen meliputi ammonium nitrat, ammonium klorida dan urea. Pengamatan pertumbuhan dilakukan dengan metode spektrofotometri berdasarkan perubahan optical density pada kultur bakteri. Pertumbuhan *Pseudomonas* sp. memiliki fase lag (adaptasi) pada jam ke-0 hingga jam ke-6. Hasil penelitian penentuan jenis sumber karbon diperoleh glukosa dengan nilai OD laju pertumbuhan tertinggi yaitu 0.118 ± 0.001 dan penentuan jenis sumber nitrogen diperoleh ammonium nitrat dengan nilai OD laju pertumbuhan 0.117 ± 0.000 . Sumber karbon glukosa optimum pada konsentrasi 4% dengan nilai OD laju pertumbuhan 0.106 ± 0.000 dan sumber nitrogen ammonium nitrat optimum pada konsentrasi 0.5% dengan nilai OD laju pertumbuhan 0.112 ± 0.002 .

Kata Kunci: Optimasi, Karbon, Nitrogen, *Pseudomonas* sp, Pertumbuhan

Optimization of Carbon and Nitrogen Sources as Co-Substrate for the Growth of Probiotic Bacteria *Pseudomonas* sp.

ABSTRACT : The contamination of organic waste in the shrimp pond system is one of the factors that lowering shrimp production. Organic waste such as leftover feed and fecal matter accumulated in the waters substrate decreasing the water quality and emerging disease. *Pseudomonas* sp. is a probiotic bacteria which can produce enzymes that degrade proteins and amylum-an organic waste commonly found in pond systems. This study was conducted to determine the type and optimization of carbon and nitrogen source for the growth of *Pseudomonas* sp. in an effort to know the composition of a better medium for probiotic biomass production. Experiments were carried out in the form of determination of carbon sources include glucose, fructose and molasses. Determination of nitrogen sources include ammonium nitrate, ammonium chloride and urea. The observations of growth rate was done by spectrophotometric method based on optical density in a bacterial culture. The growth of *Pseudomonas* sp. reached lag phase (adaptation) on 0 up to 6 hours. Then, on 6 up to 36 hours the bacterium has exponential phase which is characterized by the significant growth. The results of the determination of carbon source obtained glucose was the highest growth rate 0.118 ± 0.001 and determination of the nitrogen source obtained ammonium nitrate with growth rate 0.117 ± 0.000 by the OD value. Optimization carbon source was at 4% concentration of glucose with the growth rate 0.106 ± 0.000 , and also the optimization nitrogen source was at 0.5% concentration of ammonium nitrate with growth rate of 0.112 ± 0.002 by the OD value.

Keywords: Optimization, Carbon, Nitrogen, *Pseudomonas* sp, Growth Rate

PENDAHULUAN

Salah satu faktor penyebab kegagalan budidaya udang adalah akibat pencemaran limbah organik yang terakumulasi pada sistem tambak itu sendiri. Limbah organik berupa penumpukan sisa pakan dan kotoran udang yang mengendap pada substrat dasar tambak dapat merusak kondisi lingkungan perairan budidaya sehingga menimbulkan wabah penyakit terhadap biota budidaya (Garno, 2004).

Upaya pengendalian lingkungan perairan budidaya secara biologis dapat dilakukan dengan penggunaan bakteri probiotik untuk memperbaiki kualitas perairan dan menghambat pertumbuhan patogen. Berdasarkan karakteristik formula pakan udang, bakteri probiotik yang efektif dalam melakukan bioremediasi tambak udang harus memiliki kemampuan mendegradasi komponen pakan terutama protein dan amilum. *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp. merupakan bakteri yang dapat menghasilkan enzim pendegradasi protein dan amilum (Slepecky dan Hemphill, 2006; Alariya, 2011).

Sumber karbon dan nitrogen merupakan komponen utama dalam suatu media kultur yang dibutuhkan bakteri untuk proses pertumbuhan sel. Setiap organisme memiliki kondisi optimal yang berbeda dalam pertumbuhan dan perkembangannya. Bakteri memiliki kondisi tertentu agar enzim yang dihasilkan optimal. Dalam medium pertumbuhan bakteri seperti Zobell 2216E telah tersedia nutrisi yang mampu mencukupi keberlangsungan hidup bakteri, namun diperlukan penambahan nutrisi agar pertumbuhan optimal sesuai dengan jenis bakterinya. Optimasi dan kebutuhan nutrisi yang berbeda menjadi hal yang penting dalam pertumbuhan, dimana sumber karbon dan nitrogen yang ada pada nutrisi memiliki konsentrasi yang baik dapat mempercepat produksi metabolit dari bakteri.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui komponen sumber karbon dan nitrogen sebagai co-substrat pada pertumbuhan bakteri *Pseudomonas* sp. yang berpotensi sebagai bakteri probiotik dengan kemampuan aktivitas bioremediasi. Selain itu, mengetahui komposisi nutrisi untuk produksi biomassa bakteri probiotik secara efektif.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini menggunakan isolat bakteri yang didapatkan dari koleksi Laboratorium Kelautan dengan kode isolat B319 yang diambil dari sedimen mangrove. Penelitian terdahulu mengidentifikasi bahwa isolat B319 memiliki kemiripan dengan *Pseudomonas* sp. Medium untuk pertumbuhan menggunakan Zobell 2216E broth. Alat yang digunakan untuk pengukuran pertumbuhan yaitu Spektrofotometer UV/Vis. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratorium. Metode eksperimen termasuk dalam metode kuantitatif yang dilakukan dalam laboratorium dengan adanya perlakuan (*treatment*) dalam kondisi yang terkendali (Sugiyono, 2012). Penelitian dilakukan pada bulan Oktober sampai Desember 2015. Penelitian dilakukan dengan beberapa tahap yaitu proses sterilisasi, peremajaan isolat, pembuatan medium starter hingga eksperimen dilakukan di Laboratorium Obat Bahan Alam, Universitas Diponegoro, Semarang. Pengukuran turbiditas atau *Optical Density* (OD) dengan spektrofotometer dilakukan di Laboratorium Kimia, Universitas Diponegoro.

Medium Kultur Bakteri

Bakteri *Pseudomonas* sp. diambil dari kultur stok kemudian ditumbuhkan dalam medium Zobell 2216E broth double strength yang tersusun dari 0,5 gr pepton dan 0,1 gr yeast dengan medium dasar air laut 70%.

Penentuan Jenis Sumber Karbon dan Nitrogen

Metode penentuan jenis sumber karbon dan nitrogen mengikuti prosedur Polack–Bereka *et al.* (2010). Sumber karbon yang digunakan meliputi glukosa, fruktosa dan molase, serta sumber nitrogen yang digunakan meliputi ammonium nitrat, ammonium klorida dan urea, masing-masing pada konsentrasi 1%. Semua medium diatur pada pH 7 dan diinkubasi pada suhu kamar selama 48 jam. Pengambilan sampel dilakukan setiap 6 jam sebanyak 7 ml kemudian melakukan pengukuran turbiditas (OD) dengan panjang gelombang A_{600} .

Optimasi Konsentrasi Sumber Karbon dan Nitrogen

Optimasi dilakukan dengan 3 variasi konsentrasi. Sumber karbon dilakukan pada 1%, 2% dan 4%, serta sumber nitrogen dilakukan pada 0.5%, 1% dan 1.5%. Pemilihan variasi ini berdasarkan literatur yang menyebutkan bahwa rasio C:N:P optimal adalah 100:10:1 (Alexander, 1994). Semua medium diatur pada pH 7 dan diinkubasi pada suhu kamar selama 48 jam. Pengambilan sampel dilakukan setiap 6 jam sebanyak 7 ml kemudian melakukan pengukuran turbiditas (OD) dengan panjang gelombang A_{600} (Setyati et al. 2014).

Analisis Data

Semua data pertumbuhan ditentukan berdasarkan kepadatan sel melalui pengukuran OD pada A_{600} kemudian dianalisis secara deskriptif dan analisis One Way Anova dengan Uji Tukey $p=0.05$ menggunakan program SPSS .

HASIL DAN PEMBAHASAN

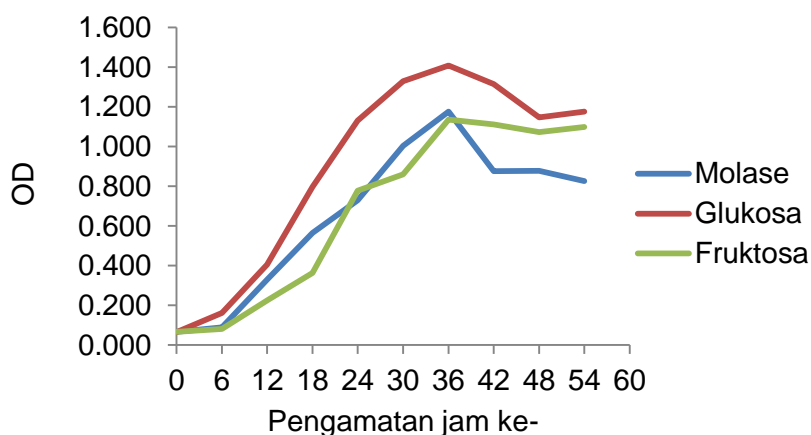
Hasil pengukuran OD pada seleksi sumber karbon menunjukkan bahwa glukosa mendapati kepadatan populasi tertinggi dengan nilai 1.408. Grafik kepadatan sel (OD) pada seleksi co-substrat sumber karbon menunjukkan bahwa bakteri *Pseudomonas* sp. mengalami fase lag pada jam ke-0 hingga jam ke-6, kemudian fase eksponensial glukosa, fruktosa dan molase berlangsung pada jam ke-6 hingga jam ke-36 ditunjukkan pada Gambar 1. Fase eksponensial pertumbuhan bakteri *Pseudomonas* sp. yang diberikan co-substrat glukosa mengalami pertumbuhan yang signifikan. Kepadatan populasi pada co-substrat glukosa mendapatkan nilai OD tertinggi dibandingkan fruktosa dan molase.

Menurut hasil penelitian Polak & Berecka (2010) glukosa merupakan sumber karbon yang paling baik dibandingkan monosakarida dan gula-gula yang lain dengan urutan dari yang terbaik adalah sebagai berikut, glukosa, fruktosa, galaktosa, laktulose, saccharosa dan maltose. *Pseudomonas* sp. tumbuh optimal dengan glukosa sebagai co-substrat sumber karbon karena *Pseudomonas* sp. mampu melakukan fermentasi pada glukosa dikarenakan glukosa merupakan gula sederhana yang dapat langsung dimetabolisme.

Analisis Laju pertumbuhan ditunjukkan pada Tabel 1. Dimana terlihat nilai jumlah generasi dan waktu generasi dari *Pseudomonas* sp. Hasil analisis laju pertumbuhan menunjukkan bahwa *Pseudomonas* sp tumbuh optimum pada co-substrat glukosa dengan nilai laju pertumbuhan tertinggi yaitu 0.118 ± 0.001 .

Penentuan Jenis Nitrogen

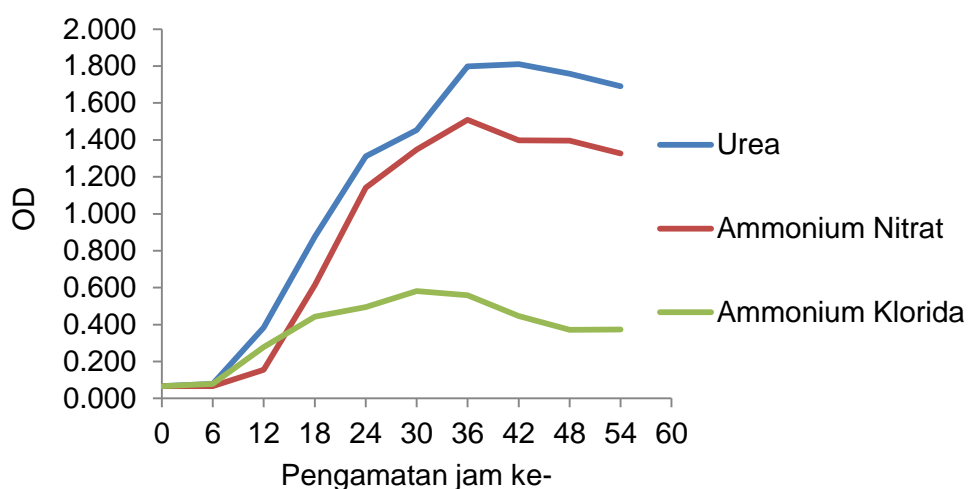
Hasil pengukuran OD pada seleksi sumber nitrogen menunjukkan bahwa urea mendapati nilai *Optical Density* (OD) tertinggi sebesar 1.811. Pada jam ke-36 didapatkan nilai OD tertinggi untuk Ammonium Nitrat yaitu 1.509 dan nilai OD tertinggi untuk Ammonium Klorida yaitu 0.559 pada jam ke-30 ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 1. Grafik Kepadatan Sel (OD) Bakteri *Pseudomonas* sp. pada Seleksi Sumber Karbon

Tabel 1. Laju Pertumbuhan Bakteri *Pseudomonas sp* pada Seleksi Co-substrat Karbon

<i>Pseudomonas sp.</i>	Pertumbuhan pada Sumber Karbon			
	Perlakuan	Jumlah Generasi	Waktu Generasi (Jam)	Laju Pertumbuhan (μ). (Jam)
Kontrol		6.423 \pm 4.466	8.408 \pm 12.090	0.082 \pm 0.001 ^a
Glukosa 1%		6.129 \pm 5.132	5.874 \pm 7.015	0.118 \pm 0.001 ^d
Fruktosa 1%		5.641 \pm 6.329	6.382 \pm 5.688	0.109 \pm 0.000 ^b
Molase 1%		5.737 \pm 4.813	6.275 \pm 7.480	0.110 \pm 0.001 ^c

**Gambar 2.** Grafik Kepadatan Sel (OD) Bakteri *Pseudomonas sp.* pada Seleksi Sumber Nitrogen

Secara umum terlihat bahwa urea mendapati nilai kepadatan populasi tertinggi dan memiliki laju pertumbuhan tercepat. Namun waktu yang dibutuhkan oleh pada co-substrat ammonium nitrat dan ammonium klorida untuk mencapai pertumbuhan maksimal lebih cepat jika dibandingkan pada urea. Fase berikutnya adalah fase eksponensial ammonium nitrat dan urea memiliki laju pertumbuhan tercepat. Fase eksponensial dicirikan dengan adanya pertumbuhan yang signifikan. Namun demikian fase eksponensial berlangsung lama yaitu 30 jam. Fase eksponensial adalah keadaan pertumbuhan yang cepat dengan laju pertumbuhan spesifik (μ) konstan, komposisi selular tetap, sedangkan komposisi kimiawi media biakan berubah akibat terjadinya sintesis produk dalam penggunaan substrat (Judoamidjojo, 1990).

Analisis Laju pertumbuhan ditunjukkan pada Tabel 2. Dimana terlihat nilai jumlah generasi dan waktu generasi dari *Pseudomonas sp.* Hasil analisis laju pertumbuhan menunjukkan bahwa *Pseudomonas sp* tumbuh optimum pada co-substrat ammonium nitrat. Ammonium nitrat dinyatakan optimum karena memiliki laju pertumbuhan bakteri yang cepat pada fase eksponensial dan fase stasioner yang cenderung stabil.

Optimasi Co-Substrat Karbon

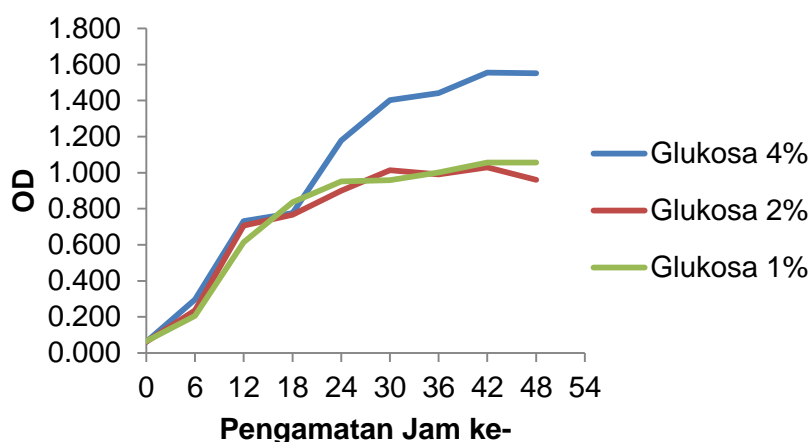
Hasil penelitian menunjukkan *Pseudomonas sp.* mengalami fase lag pada jam ke-0 hingga jam ke-6. Fase eksponensial sudah berhenti pada pengamatan jam ke-12 pada konsentrasi glukosa 1% dan 2%, berbeda dengan konsentrasi glukosa 4% yang terus mengalami pertumbuhan sel. Pada fase eksponensial bakteri tumbuh dengan cepat dan kebutuhan akan energi lebih tinggi. Kecepatan pertumbuhan ini dipengaruhi oleh medium pertumbuhan, suhu, pH dan kandungan nutrisi.

Grafik kepadatan sel (OD) pada optimasi co-substrat sumber karbon yaitu glukosa menunjukkan bahwa bakteri *Pseudomonas* sp. dengan konsentrasi 4% memiliki kepadatan populasi tertinggi dengan nilai 1.441, kemudian konsentrasi 1% dengan nilai OD sebesar 1.057 dan konsentrasi 2% didapatkan nilai OD 1.030. Grafik kepadatan sel ditunjukkan pada Gambar 3.

Fase stationer yang terjadi pada konsentrasi glukosa 1% dan 2% berlangsung cukup lama hingga jam ke-48. Pada fase stasioner jumlah populasi sel tetap karena jumlah sel yang membelah sama dengan jumlah sel yang mati. Mangunwidjaja dan Suryani (1994) menyatakan bahwa ukuran sel pada fase stasioner menjadi lebih kecil karena sel tetap melakukan pembelahan meskipun zat nutrisi dalam media sudah mulai habis. Selanjutnya adalah fase kematian, terjadi penurunan jumlah populasi yang disebabkan oleh berkurangnya nutrisi dalam medium yang dibutuhkan untuk metabolisme bakteri.

Tabel 2. Laju Pertumbuhan Bakteri *Pseudomonas* sp. pada Seleksi Co-substrat Nitrogen

<i>Pseudomonas</i> sp.	Pertumbuhan pada Sumber Nitrogen			
	Perlakuan	Jumlah Generasi	Waktu Generasi (Jam)	Laju Pertumbuhan (μ). (jam)
Kontrol		6.423 \pm 4.466	8.408 \pm 12.090	0.082 \pm 0.001 ^a
Amonium Clorida 1%		4.629 \pm 3.576	6.481 \pm 8.389	0.107 \pm 0.001 ^c
Amonium Nitrat 1%		6.057 \pm 6.668	5.943 \pm 5.399	0.117 \pm 0.000 ^d
Urea 1%		6.393 \pm 4.395	6.570 \pm 9.556	0.106 \pm 0.002 ^b



Gambar 3. Grafik Kepadatan Sel (OD) Bakteri *Pseudomonas* sp. pada Optimasi Sumber Karbon

Tabel 3. Laju Pertumbuhan Bakteri *Pseudomonas* sp pada Optimasi Co-substrat Karbon

<i>Pseudomonas</i> sp.	Pertumbuhan pada Sumber Karbon			
	Perlakuan	Jumlah Generasi	Waktu Generasi (Jam)	Laju Pertumbuhan (μ). (jam)
Glukosa 1 %		5.607 \pm 6.094	8.560 \pm 7.876	0.081 \pm 0.000 ^a
Glukosa 2 %		5.874 \pm 4.506	7.150 \pm 9.320	0.097 \pm 0.001 ^b
Glukosa 4 %		6.437 \pm 6.247	6.525 \pm 6.724	0.106 \pm 0.000 ^c

Analisis Laju pertumbuhan ditunjukkan pada Tabel 3. Dimana terlihat nilai jumlah generasi dan waktu generasi dari *Pseudomonas* sp. Hasil analisis laju pertumbuhan menunjukkan bahwa *Pseudomonas* sp tumbuh optimum pada co-substrat glukosa 4% dengan nilai laju pertumbuhan tertinggi yaitu 0.106 ± 0.000 . Hal ini dikarenakan pertumbuhan populasi pada konsentrasi 4% berlangsung konstan dan cepat.

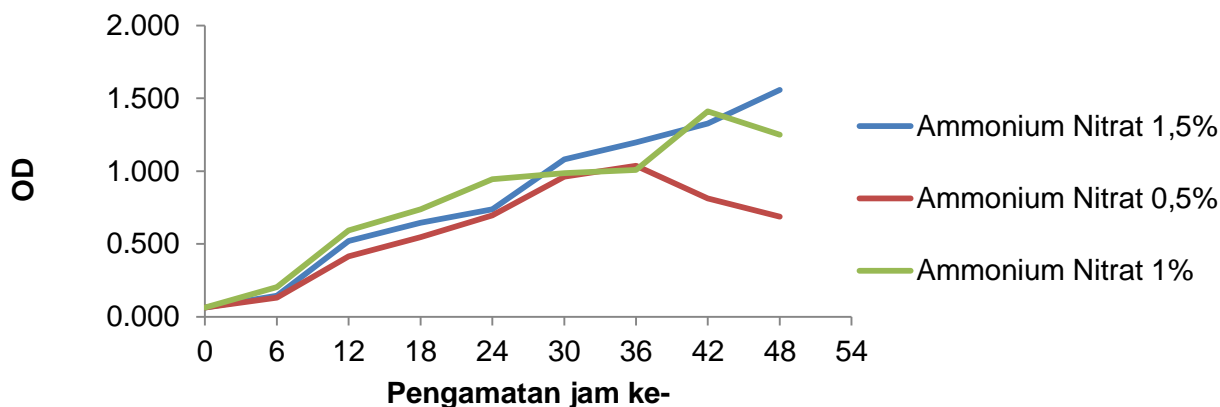
Optimasi Co-Substrat Nitrogen

Grafik kepadatan sel (OD) pada optimasi co-substrat sumber nitrogen menunjukkan bahwa *Pseudomonas* sp. tumbuh optimum pada ammonium nitrat 0.5% Grafik kepadatan sel ditunjukkan pada Gambar 4.

Hasil seleksi co-substrat nitrogen pada Gambar 4 menunjukkan bahwa fase lag terjadi dari jam ke-0 hingga jam 6, kemudian fase eksponensial yang terjadi pada ketiga konsentrasi yang diberikan terjadi dari jam ke-6 hingga jam ke-36. Nilai kepadatan populasi dari ketiga konsentrasi yang diberikan tidak jauh berbeda. Analisis laju pertumbuhan didapatkan bahwa *Pseudomonas* sp. optimum pada ammonium nitrat 0.5% dengan nilai laju pertumbuhan sebesar 0.117 ± 0.000^d . Analisis laju pertumbuhan ditunjukkan pada Tabel 4.

KESIMPULAN

Kondisi optimum formulasi medium dan faktor lingkungan untuk pertumbuhan dapat berbeda dan bersifat spesifik pada berbagai jenis bakteri probiotik. Berdasarkan hasil penelitian ini, glukosa memberikan efek lebih baik dibandingkan fruktosa dan molase sebagai sumber karbon. Penambahan ammonium nitrat memberikan efek yang lebih baik dibandingkan sumber nitrogen lain (ammonium klorida dan urea) dan konsentrasi yang dibutuhkan untuk glukosa sebagai co-substrat karbon adalah 4% dan ammonium nitrat sebagai co-substrat nitrogen adalah 0.5% dalam peningkatan pertumbuhan dan kepadatan sel sebagai upaya memproduksi biomassa bakteri probiotik *Pseudomonas* sp.



Gambar 4. Grafik Kepadatan Sel (OD) Bakteri *Pseudomonas* sp. pada Optimasi Sumber Nitrogen

Tabel 4. Laju Pertumbuhan Bakteri *Pseudomonas* sp pada Optimasi Co-substrat Nitrogen

<i>Pseudomonas</i> sp.	Pertumbuhan pada Sumber Nitrogen			
	Perlakuan	Jumlah Generasi	Waktu Generasi (Jam)	Laju Pertumbuhan (μ). (jam)
Amonium Nitrat 0,5 %		5.805 ± 3.549	6.202 ± 10.143	0.112 ± 0.002^c
Amonium Nitrat 1 %		6.165 ± 5.361	6.812 ± 7.835	0.102 ± 0.000^b
Amonium Nitrat 1,5 %		6.311 ± 4.227	7.606 ± 11.356	0.091 ± 0.001^a

DAFTAR PUSTAKA

- Alariya, S.S., S. Sethi, S. Gupta, and B.L. Gupta. 2013. Amylase Activity of a Starch Degrading Bacteria Isolated from Soil. Archives of Applied Science Research., 5 (1):15 – 24.
- Alexander, Martin. 1994. "Biodegradation and Bioremediation". United States of America: Academic Press, Inc.
- Atlas, R. M. 2010. Handbook of Microbiological Media. Ed ke-4. Washington(US): ASM Pr.672 pp.
- Bissett, A., Burke, C., Cook, P.L.M., Bowman, J.P. 2007. Bacterial community shifts in organically perturbed sediments. Environmental Microbiology. 9(1): 46 – 60.
- Garno, Y.S. 2004. Biomanipulasi Paradikma Baru Dalam Pengendalian Limbah Organik Budidaya Perikanan di Waduk dan Tambak. Orasi ilmiah Pengukuhan Ahli Peneliti Utama Bidang Manajemen Kualitas Perairan. BPPT: Jakarta. Page: 58
- Judoamidjojo, M., A.A. Darwis & E.G. Sa'id. 1990. Teknologi Fermentasi Rajawali Pers: Jakarta. 333 hlm.
- Karigar, C. S. & S. S. Rao., 2011, Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review. Enzyme Res. Article ID 805187, 11p. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/805187>
- Mangunwidjaja, D. & A. Suryani. 1994. Teknologi Bioproses. Penerbit Swadaya: Jakarta. 394 hlm.
- Polack-Berecka, M., A. Wasko, M. Kordowska-Wiater, M. Podlesny, Z. Targonski, A. Kubikomar. 2010. Optimization of Medium Composition for Enhancing Growth of *Lactobacillus rhamnosus* PEN Using Response Surface Methodology. Polish Journal of Microbiology. 59: 113-118.
- Setyati, W.A & Subagiyo, 2012, Isolasi dan Seleksi Bakteri Penghasil Enzim Ekstraseluler (proteolitik, amilolitik, lipolitik dan selulolitik) yang Berasal dari Sedimen Kawasan Mangrove. Ilmu Kelautan. 17(3):164-169.
- Setyati, W. A., M. Erni, A. Triyanto, Subagiyo dan M. Zainuddin. 2014. Selection Identification and Optimization of the Growth Water Probiotic Consortium of Mangrove Ecosystems as Bioremediation and Biocontrol in Shrimp Ponds, J. Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia. 17(3):242-252.
- Setyati, W. A., M. Erni, A. Triyanto, Subagiyo dan M. Zainuddin. 2015. Kinetika Pertumbuhan dan Aktivitas Protease Isolat 36k dari Sedimen Ekosistem Mangrove, Karimunjawa, Jepara. Ilmu Kelautan. 20(3):163-169.
- Slepecky, R.A. and H. E. Hemphill. 2006. The Genus Bacillus–Nonmedical Prokaryotes. 4:530 – 562.
- Subagiyo. 2015. Pengaruh Penambahan Berbagai Jenis Sumber Karbon, Nitrogen Dan Fosfor pada Medium deMan, Rogosa and Sharpe (MRS) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat Terpilih Yang Diisolasi Dari Intestinum Udang Penaeid. Jurnal Kelautan Tropis. 18(3):127–132
- Sugiyono, A. J. Lintang, R. A. Sabe. 2003. Penapisan dan Karakterisasi Protease Bakteri Termofilik Asal Mata Air Laut Panas Poso Sulawesi Tengah.