

## OPTIMALISASI SUMBER NITROGEN ( $KNO_3$ ) PADA MEDIUM PERTUMBUHAN BAKTERI PENGURAI HIDROKARBON

Munawar  
Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sriwijaya

### ABSTRAK

*Penelitian tentang optimalisasi sumber nitrogen ( $KNO_3$ ) pada medium pertumbuhan bakteri pengurai hidrokarbon telah dilakukan. Medium dasar yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai komposisi (gram/liter) sebagai berikut: ekstrak ragi 0,01;  $K_2HPO_4$  0,1; dan akuades 1 liter. Pada medium tersebut ditambahkan sumber karbon berupa residu minyak bumi dengan konsentrasi 20 % (b/v).  $KNO_3$  yang digunakan sebagai sumber nitrogen (g/100 ml medium): 0,5; 1,0; dan 1,5. Dari hasil penelitian didapatkan bahwa medium dengan penambahan  $KNO_3$  1,0 g/100 ml medium menunjukkan pertumbuhan paling baik bagi bakteri pengurai hidrokarbon, dibandingkan dengan pada medium dengan penambahan  $KNO_2$  dengan konsentrasi yang lain.*

**Kata Kunci:**

*Optimalisasi, sumber-nitrogen, bakteri-pengurai, hidrokarbon.*

### ABSTRACT

*The research about optimalization of nitrogen sources ( $KNO_3$ ) on growth medium hydrocarbon degrading bacteria has been done. The basal medium has been used contain yeast extract 0.01 g;  $K_2HPO_4$  0.1 g; and distilled water 1 litre, as well as added oil residual with concentration 20 % (w/v) as carbon source. Nitrogen source ( $KNO_3$ ) has been used concentration: (g/100 ml medium): 0,5; 1,0; and 1,5. The result showed medium with added of  $KNO_3$  as nitrogen source levels of 1,0 g/100 ml medium the best medium for growing of hydrocarbon degrading bacteria.*

**Key Words:**

*Optimalization, nitrogen-source, degrading-bacteria, hydrocarbon.*

## 1. PENDAHULUAN

Karbon dan nitrogen merupakan unsur makro yang harus tersedia pada medium pertumbuhan bakteri. Kedua unsur tersebut mendominasi komposisi komponen seluler, baik komponen seluler struktural maupun fungsional. Oleh karena itu medium pertumbuhan yang baik bagi bakteri termasuk bakteri pengurai hidrokarbon harus mengandung sumber karbon dan sumber nitrogen yang cukup dan seimbang (Floodgate, 1972).

Bakteri dalam pertumbuhannya membutuhkan sumber karbon dan energi yang dapat dipenuhi oleh senyawa yang mengandung karbon diantaranya dengan cara memecah senyawa hidrokarbon menjadi fraksi tertentu (Whittenbury, 1971). Medium untuk pertumbuhan bakteri disarankan memenuhi rasio C:N:P berturut-turut 120:10:1 (Thomas, dkk., 1992). Secara teori untuk mengubah 1 gram senyawa hidrokarbon menjadi senyawa komponen sel dibutuhkan sekitar 150 mg nitrogen dan 30 mg fosfor. Nutrien yang sering ditambahkan sebagai sumber N dan P berupa garam mineral dan senyawa organik. Garam mineral yang sering digunakan antara lain  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , dan  $\text{MgNH}_4\text{PO}_4$ , sedangkan

senyawa organiknya yang biasa digunakan berupa urea, mineral yang didukung oleh parafin ("paraffin supported mineral"), dan oktil fosfat (Rosenberg & Gutnick, 1986, Wrenn, dkk., 1994).

Bakteri-bakteri yang sudah diketahui dapat memecah senyawa hidrokarbon antara lain *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, dan kelompok bakteri cocci (Alexander, 1977). Bakteri-bakteri tersebut umumnya aktifitas pertumbuhannya masih perlu ditingkatkan, laju degradasi maksimum. Salah satu cara untuk meningkatkan pertumbuhannya adalah dengan memformulasi medium yang sesuai, diantaranya adalah dengan mensuplai sumber karbon dan nitrogen yang cukup dan seimbang.

## 2. BAHAN DAN METODE

### 2.1. Bakteri

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Achromobacter* sp., *Pseudomonas vesicularis*, dan *Bacillus brevis*, ketiganya merupakan bakteri yang sudah teruji kemampuannya untuk mendegradasi senyawa hidrokarbon berupa residu minyak bumi. Masing-masing

diisolasi dari rizosfir hutan bakau Cilacap - Jawa Tengah.

## 2.2. Medium pertumbuhan

Medium pertumbuhan menggunakan medium dasar yang mempunyai komposisi (g/liter) ekstrak khamir 0,01;  $K_2HPO_4$  0,1 dan residu minyak bumi sebagai sumber karbon sebanyak 200.

## 2.3. Sumber nitrogen

Sumber nitrogen yang digunakan berupa  $KNO_3$  dengan konsentrasi (g/100 ml medium): 0,5; 1,0; dan 1,5.

## 2.4. Tata Kerja

### 2.4.1. Optimalisasi sumber N

Masing-masing isolat terpilih yang telah diremajakan pada medium agar miring umur sekitar 48 jam dibuat suspensi dengan cara menginokulasikan sebanyak 1 ose ke dalam 10 ml larutan garam fisiologis dan dikocok sampai homogen. Selanjutnya suspensi bakteri diinokulasikan sebanyak 10% (v/v) ke dalam medium pertumbuhan yang mengandung  $KNO_3$  dengan konsentrasi (g/100 ml medium): 0,5; 1,0; dan 1,5. Kultur diinkubasi pada suhu 30 °C selama lima hari dan dilakukan penghitungan jumlah bakteri.

### 2.4.2. Penentuan kurva pertumbuhan isolat bakteri

Penentuan kurva pertumbuhan dilakukan dengan cara menginokulasikan masing-masing bakteri pada medium pertumbuhan dengan kandungan nitrogen yang optimal. Kultur diinkubasi pada suhu 30 °C dan dihitung jumlah sel masing-masing bakteri setiap hari sampai menunjukkan jumlah yang menurun. Data jumlah sel masing-masing bakteri pada setiap waktu pengamatan yang diperoleh dibuat grafik sehingga diketahui fase-fase pertumbuhannya. Setiap kurva pertumbuhan yang diperoleh ditentukan waktu generasi terpendek pada fase pertumbuhan eksponensialnya (Brock, 1974). Persamaan yang dipakai untuk menentukan waktu generasi adalah persamaan berikut:

$$g = \frac{\log 2 (t)}{\log X_t - \log X_0}$$

$g$  = waktu generasi

$X_t$  = jumlah sel bakteri pada waktu akhir  
( $t_x$ )

$X_0$  = jumlah sel bakteri pada waktu awal  
( $t_0$ )

$t$  = waktu inkubasi dari  $t_0 - t_x$

### 2.4.3. Pengukuran Variabel

Variabel yang diukur berupa jumlah bakteri. Penghitungan jumlah bakteri dilakukan menggunakan metode angka lempeng total dan pelaporannya menggunakan angka lempeng standar. Data jumlah sel bakteri yang diperoleh dibuat kurva sehingga dapat ditunjukkan hubungan antara jumlah sel dengan waktu. Masing-masing kurva yang diperoleh ditentukan laju pembelahannya ( $r$ ) dengan

$$r = \frac{3,32[\log x_t - \log x_0]}{t}$$

dimana:

$X_t$  = jumlah sel bakteri pada waktu akhir  
( $t_x$ )

$X_0$  = jumlah sel bakteri pada waktu awal  
( $t_0$ )

$t$  = waktu inkubasi dari  $t_0 - t_x$

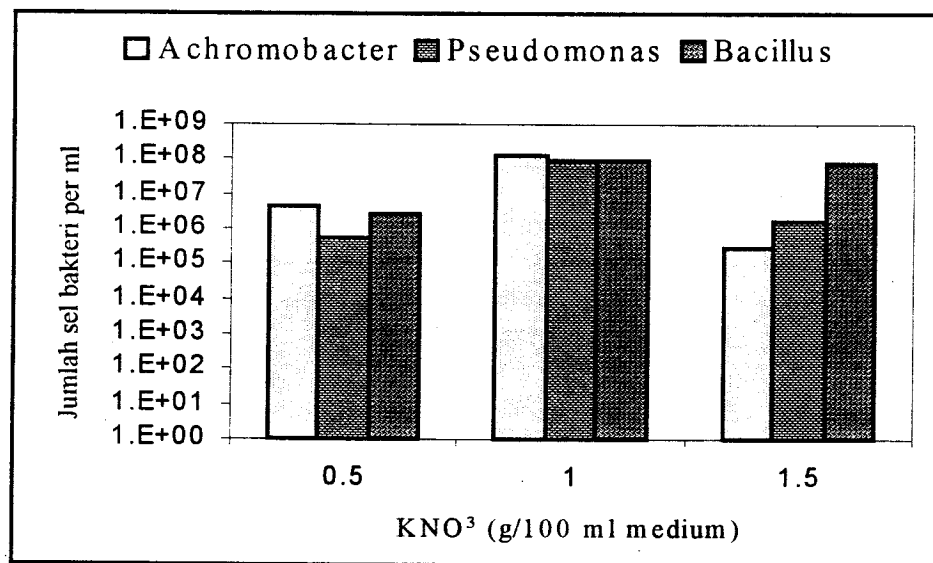
sehingga dapat ditentukan kenaikan jumlah sel per unit waktu (Doelle, 1994).

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil optimalisasi sumber N pada medium pertumbuhan menunjukkan

bahwa medium dengan kandungan  $KNO_3$  1,0 g/100 ml merupakan medium yang paling baik untuk pertumbuhan ketiga bakteri, karena pada medium tersebut menunjukkan jumlah sel ketiga bakteri paling tinggi dibandingkan dengan jumlah sel pada medium dengan kandungan  $KNO_3$  yang lain. Hasil selengkapnya jumlah sel masing-masing bakteri pada medium dengan kandungan  $KNO_3$  yang dicoba tercantum pada gambar 1.

Fenomena tersebut menunjukkan adanya perbedaan kebutuhan sumber N pada proses degradasi hidrokarbon oleh bakteri. Hal ini diduga berkaitan dengan penggunaan sumber N untuk sintesis enzim yang dimiliki oleh bakteri tersebut. Bakteri yang memiliki banyak enzim baik kualitas maupun kuantitas akan membutuhkan sumber N lebih banyak dibandingkan dengan bakteri yang memiliki sedikit enzim (Moat & Foster, 1995). Unsur N dibutuhkan dalam biosintesis asam amino yang merupakan monomer protein. Protein selain sebagai komponen pembentuk enzim, juga merupakan penyusun struktur sel bersama-sama dengan lemak dalam bentuk lipoprotein.



Gambar 1. Jumlah sel masing-masing bakteri pada medium pertumbuhan dengan berbagai kandungan sumber N (KNO<sub>3</sub>) selama masa inkubasi 5 hari.

Unsur C diperlukan oleh bakteri sebagian besar untuk menyusun struktur sel misalnya dalam bentuk karbohidrat, lemak dan protein, sedangkan unsur N disamping sebagai penyusun struktur sel seperti protein struktural juga sebagai penyusun enzim dalam bentuk protein enzim atau protein fungsional. Dengan demikian proporsi kebutuhan kedua unsur tersebut bagi bakteri secara berurutan adalah C > N dalam rasio tertentu (Moat & Foster, 1995).

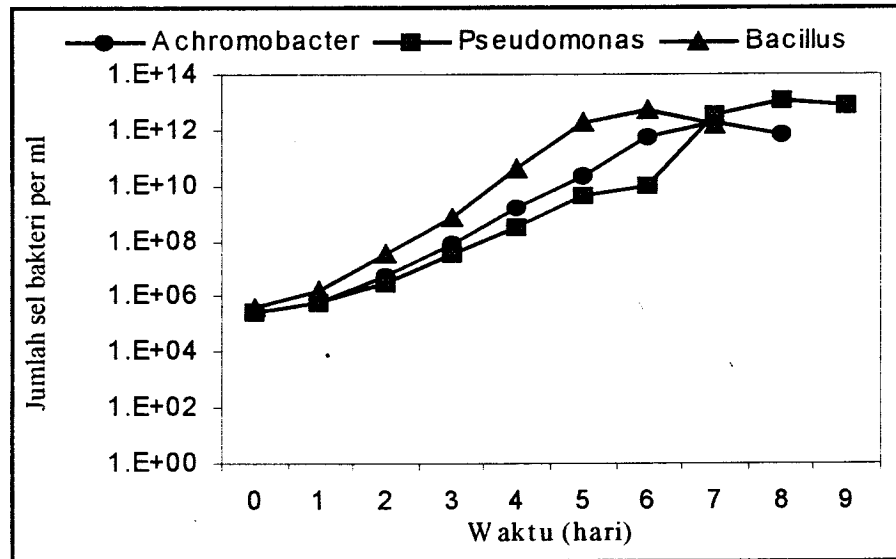
Kurva pertumbuhan masing-masing bakteri yang ditanamkan dalam medium pertumbuhan yang mengandung sumber karbon 20 g/100 ml medium dan sumber

nitrogen 1,0 g/100 ml medium tercantum pada gambar 2. Kurva pertumbuhan tersebut menunjukkan bahwa bakteri yang mampu menggunakan residu sebagai sumber karbon dan energi selama fase pertumbuhan eksponensial mencapai jumlah sel berkisar antara  $10^5 - 10^{13}$  per ml dan lama waktu yang dibutuhkan pada fase eksponensial berkisar antara 6 - 8 hari. Disamping itu waktu generasi terpendek yang dicapai pada fase eksponensial oleh masing-masing bakteri adalah berbeda.

*Achromobacter* sp., fase eksponensialnya dimulai sehari setelah waktu inokulasi dan berlangsung selama 7

hari. Jumlah sel bakteri tersebut selama fase eksponensial berkisar antara  $10^5 - 10^{12}$  per ml. Sedangkan waktu generasi terpendeknya pada fase eksponensial adalah

6 jam dengan jumlah sel  $5,5 \times 10^{11}$  per ml yang dicapai pada hari ke 6 setelah inokulasi.



Gambar 2. Kurva pertumbuhan ketiga bakteri pada medium pertumbuhan yang mengandung 20 g/100 ml medium sumber C (residu minyak bumi) dan 1,0 g/100 ml medium sumber N ( $KNO_3$ )

*Pseudomonas vesicularis*, memulai fase eksponensialnya juga sehari setelah waktu inokulasi dan berlangsung selama 8 hari. Jumlah sel selama fase eksponensial berkisar antara  $10^5 - 10^{13}$  per ml dan waktu generasi terpendeknya pada fase eksponensial adalah 6,5 jam dengan jumlah sel  $3,0 \times 10^{12}$  per ml yang dicapai pada hari ke-7 setelah inokulasi.

*Bacillus brevis*, juga memulai fase eksponensialnya sehari setelah waktu inokulasi dan berlangsung selama 6 hari. Jumlah sel selama fase eksponensial berkisar antara  $10^6 - 10^{12}$  per ml. Waktu generasi terpendek pada fase eksponensial adalah 4,8 jam dengan jumlah sel  $4,6 \times 10^{12}$  per ml yang dicapai pada hari ke-5 setelah inokulasi.

Waktu generasi yang dibutuhkan oleh bakteri berbanding terbalik dengan kecepatan pertumbuhannya. Semakin singkat waktu generasi yang dibutuhkan maka semakin cepat pertumbuhan bakteri tersebut (Brock, 1974). Berdasarkan waktu generasi terpendek pada fase eksponensial, maka masing-masing bakteri mempunyai kecepatan pertumbuhan yang berbeda. Bakteri yang memiliki pertumbuhan paling cepat adalah *Bacillus brevis*, disusul oleh *Achromobacter* sp kemudian *Pseudomonas vesicularis*.

Pertumbuhan bakteri merupakan proses perbanyakan sel yang dilakukan dengan pembelahan biner sangat dipengaruhi oleh faktor-faktor lingkungan disamping juga dipengaruhi oleh faktor genetik. Berdasarkan kurva pertumbuhan bakteri yang dibuat pada kondisi lingkungan yang sama diperoleh kecepatan pertumbuhan bakteri yang berbeda. Berarti perbedaan kecepatan pertumbuhan masing-masing bakteri disebabkan oleh faktor genetik. Salah satu faktor genetik yang mempengaruhi kecepatan membelah adalah genom bakteri. Semakin panjang DNA genom yang dimiliki oleh sel bakteri, maka semakin lama waktu pembelahan selnya, karena proses replikasinya membutuhkan waktu lebih lama (Moat & Foster, 1995).

Jadi ketiga isolat terpilih yang mampu menggunakan residu sebagai sumber karbon dan energi secara genetik memiliki kecepatan yang berbeda pada proses pembelahan selnya.

#### 4. KESIMPULAN DAN SARAN

##### 4.1. Kesimpulan

Konsentrasi  $\text{KNO}_3$  1,0 g/100 ml medium yang mengandung residu minyak bumi 20 % (b/v) merupakan sumber nitrogen yang optimal pada medium pertumbuhan bakteri pengurai hidrokarbon. Dari tiga bakteri pengurai hidrokarbon yang ditumbuhkan mempunyai kecepatan pertumbuhan yang berbeda pada medium pertumbuhan yang optimal. Bakteri yang memiliki pertumbuhan paling cepat adalah *Bacillus brevis*, disusul oleh *Achromobacter* sp. kemudian *Pseudomonas vesicularis*.

##### 4.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan berbagai nitrogen yang berbeda, dan menentukan kecepatan penguraian senyawa hidrokarbon masing-masing bakteri yang digunakan.

Waktu generasi yang dibutuhkan oleh bakteri berbanding terbalik dengan kecepatan pertumbuhannya. Semakin singkat waktu generasi yang dibutuhkan maka semakin cepat pertumbuhan bakteri tersebut (Brock, 1974). Berdasarkan waktu generasi terpendek pada fase eksponensial, maka masing-masing bakteri mempunyai kecepatan pertumbuhan yang berbeda. Bakteri yang memiliki pertumbuhan paling cepat adalah *Bacillus brevis*, disusul oleh *Achromobacter* sp kemudian *Pseudomonas vesicularis*.

Pertumbuhan bakteri merupakan proses perbanyakan sel yang dilakukan dengan pembelahan biner sangat dipengaruhi oleh faktor-faktor lingkungan disamping juga dipengaruhi oleh faktor genetik. Berdasarkan kurva pertumbuhan bakteri yang dibuat pada kondisi lingkungan yang sama diperoleh kecepatan pertumbuhan bakteri yang berbeda. Berarti perbedaan kecepatan pertumbuhan masing-masing bakteri disebabkan oleh faktor genetik. Salah satu faktor genetik yang mempengaruhi kecepatan membelah adalah genom bakteri. Semakin panjang DNA genom yang dimiliki oleh sel bakteri, maka semakin lama waktu pembelahan selnya, karena proses replikasinya membutuhkan waktu lebih lama (Moat & Foster, 1995).

Jadi ketiga isolat terpilih yang mampu menggunakan residu sebagai sumber karbon dan energi secara genetik memiliki kecepatan yang berbeda pada proses pembelahan selnya.

#### 4. KESIMPULAN DAN SARAN

##### 4.1. Kesimpulan

Konsentrasi  $\text{KNO}_3$  1,0 g/100 ml medium yang mengandung residu minyak bumi 20 % (b/v) merupakan sumber nitrogen yang optimal pada medium pertumbuhan bakteri pengurai hidrokarbon. Dari tiga bakteri pengurai hidrokarbon yang ditumbuhkan mempunyai kecepatan pertumbuhan yang berbeda pada medium pertumbuhan yang optimal. Bakteri yang memiliki pertumbuhan paling cepat adalah *Bacillus brevis*, disusul oleh *Achromobacter* sp. kemudian *Pseudomonas vesicularis*.

##### 4.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan berbagai nitrogen yang berbeda, dan menentukan kecepatan penguraian senyawa hidrokarbon masing-masing bakteri yang digunakan.



## 5. DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, M. 1977. Introduction to Soil Microbiology. 2<sup>nd</sup>. John Wiley and Sons. Toronto.
- Brock, T.D. 1974. Biology of Microorganisms. Prentice-Hall, Inc. New Jersey.
- Doelle, H.W. 1994. Microbial Process Development. World Scientific. Hongkong.
- Floodgate, G.D. 1972. Biodegradation of Hydrocarbons in The Sea. Dalam: *Water Pollution Microbiology*. R. Mitchell (ed.). John Wiley & Sons. Inc.
- Moat, A.G. & Foster, J.W. 1995. Microbial Physiology. A John Wiley & Sons Inc. Publication, New York.
- Rosenberg, E. dan D.L. Gutnick. 1986. The Hydrocarbon Oxiding Bacteria. Dalam *The Prokaryota*.
- Thomas, J.M.; C.H. Ward; R.L. Raymond; J.T. Wilson & R.C. Loehr. 1992. Bioremediation. Dalam: *Encyclopedia of Microbiology*. Vol. 1. Academic Press, Inc.
- Whittenbury, R. 1971. Hydrocarbon as Carbon Substrates. Dalam P. Hepple (ed.). *Proceeding: Mycobiology*. Institut of Petroleum. London.
- Wrenn, B.A., J.R. Haines, A.D. Venosa, M. Kadkhodayan and M.T. Suidan. 1994. Effects of Nitrogen Source on Crude Oil Biodegradation. *Journal of Industrial Microbiology*. No. 13.