

# VIABILITAS DAN KERIAP *Bacillus* sp. BK17 DAN *Enterobacter* sp. BK15 PADA SUMBER KARBON DAN NITROGEN YANG BERBEDA

Sirma Novita Nasrah<sup>1</sup> Dwi Suryanto<sup>2</sup>, It Jamilah<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Sarjana, Departemen Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Sumatera Utara Jln. Bioteknologi No.1, Kampus USU, Padang Bulan, Medan 20155

<sup>2</sup>Departemen Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Sumatera Utara Jln. Bioteknologi No.1, Kampus USU, Padang Bulan, Medan 20155. Email: d.suryanto@lycos.com

## Abstract

To propagate bacterial cell for biocontrol purpose, suitable nutrient have to be determined in which carbon and nitrogen source was often as limited factor of bacterial growth. Proper storage for biocontrol agent such as bacterial cell should also be considered in order to keep the cell viable when used. The aim of this study is to find out suitable carbon and nitrogen sources for viability and swarming of chitinolytic bacterial *Bacillus* sp. BK17 and *Enterobacter* sp. BK15. The highest population of bacterial growth ( $3.7 \times 10^8$  cfu/ml) was found in molasses-sodium nitrate (MS) medium and the lowest population was found in crab shell-sodium nitrate (CS) growth ( $2.4 \times 10^8$  cfu/ml) after 25 days of incubation. The swarming activity of the isolates were varied to some extent with the highest was 51 mm in 2% agar molasses-urea after 5 days of incubation. Molasses-sodium nitrate (MS) medium is suitable carbon and nitrogen source for the viability of *Bacillus* sp. and *Enterobacter* sp. Meanwhile, agar molasses-urea medium with 2% agar is suitable medium for swarming ability for both bacteria.

Keywords : *Bacillus*, C and N-source, *Enterobacter*, swarming, viability

## Pendahuluan

Pada dasarnya mikroorganisme dapat memanfaatkan berbagai komponen organik sebagai sumber karbon dan energi yang digunakan untuk pertumbuhannya (Volkering *et al.*, 1998). Hal ini terjadi apabila substrat yang terkandung dalam media telah memenuhi syarat media yang dapat dimanfaatkan untuk pertumbuhan bagi mikroba (Pitt dan Hocking, 1997). Media merupakan sumber nutrisi bagi mikroorganisme. Nutrisi tersebut digunakan untuk menghasilkan energi yang baik dalam melakukan berbagai aktivitas seperti pertumbuhan, pembentukan zat, serta hasil akhir dari biosintesis mikroorganisme tersebut (Abou-Zeid, 1980).

Seperti halnya bakteri lain, biomassa pertumbuhan bakteri kitinolitik juga sangat bergantung pada kandungan nutrisi yang ada pada media yang dikonsumsi oleh mikroorganisme (Volkering *et al.*, 1998). Nutrisi yang sangat penting dalam menunjang pertumbuhan bakteri kitinolitik ini ialah sumber karbon dan nitrogen (Horowitz *et al.*, 2005). Menurut Muharni (2007) penggunaan

sumber karbon dan nitrogen yang baik dalam media dapat meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan pada mikroorganisme.

Pertumbuhan dan pergerakan bakteri kitinolitik pada medium biasanya dipengaruhi oleh substrat yang terkandung dalam media seperti kitin. Pergerakan yang dilakukan ini dapat membantu bakteri kitinolitik tersebut dalam memanfaatkan substrat dari media untuk pertumbuhannya dan juga dalam hal menghasilkan enzim kitinase yang dapat digunakan untuk mendegradasi kitin pada jamur (Hirano, 1990). Disamping itu untuk keperluan misalnya biokontrol diperlukan perbanyak jumlah sel bakteri yang memadai. Pengujian kemampuan bakteri kitinolitik dalam pengendalian hayati jamur *Fusarium oxysporum* penyebab penyakit layu *Fusarium* dan jamur *Ganoderma boninense* penyebab busuk pangkal batang serta jamur *Phytium citrinum* penyebab busuk pasca panen pada sejumlah buah-buahan dan hasil tanaman lainnya telah dilakukan (Suryanto dan Munir, 2008).

Dalam penelitian ini dilakukan pengujian variasi sumber karbon dan nitrogen untuk menumbuhkan bakteri kitinolitik dari sumber karbon dan nitrogen yang murah, seperti cangkang kepiting, molase, tubuh buah jamur *Ganoderma* dan koloidal kitin. Sumber karbon dan nitrogen merupakan komponen nutrisi yang penting bagi pertumbuhan dan perbanyakan sel bakteri (Suryanto *et al.*, 2011).

## **Bahan dan Metode**

### **Isolat bakteri**

Isolat bakteri yang digunakan adalah koleksi Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi, FMIPA USU yang merupakan bakteri tanah yang berasal dari daerah Bangka yaitu *Bacillus* sp. BK17 dan *Enterobacter* sp. BK15 yang telah diketahui berpotensi menghasilkan enzim kitinase dalam aktivitas menghambat pertumbuhan jamur patogen (Suryanto dan Munir, 2008).

### **Perbanyakan dan pembuatan suspensi bakteri**

Biakan bakteri disubkultur dalam media nutrient agar (NA) dan media garam minimum dengan 2% koloidal kitin (MGMK) dan diinkubasi pada suhu kamar pada pH 6,5-7 selama  $\pm$  2 hari. Hasil subkultur biakan bakteri diambil dengan jarum ose dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml akuades steril. Setelah itu dihomogenkan dengan cara *divorteks* dan disamakan kekeruhannya dengan standart Mac Farland sehingga diperoleh suspensi bakteri dengan kerapatan sel  $\sim 10^8$  cfu/ml.

### **Sumber karbon dan sumber nitrogen**

Sumber karbon yang digunakan adalah molase dari tetes tebu, serbuk cangkang kepiting, serbuk tubuh buah *Ganoderma* kering masing-masing sebanyak 2% dan koloidal kitin sebanyak 2%. Sumber nitrogen yang digunakan adalah urea dan sodium nitrat dengan konsentrasi 0,3%. Media divariasi sebagai berikut: koloidal kitin-urea (KU), koloidal kitin-sodium nitrat (KS), molase-urea (MU), molase-sodium nitrat (MS), cangkang kepiting urea (CU), cangkang kepiting-sodium nitrat (CS), tubuh buah jamur ganoderma-urea (JU), tubuh buah jamur ganoderma-sodium nitrat (JS), dan natrium broth (NB). Masing-masing variasi sumber karbon dan nitrogen dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang telah berisi MGMK, dikocok. Nilai pH disesuaikan menjadi 6,5-7. Media dipanaskan di atas penangas dan disterilkan

dengan otoklaf selama 15 menit pada suhu 121<sup>0</sup>C pada tekanan 15 psi.

### **Viabilitas jumlah sel bakteri kitinolitik**

Untuk mengetahui viabilitas sel, isolat bakteri ditumbuhkan pada masing-masing media dengan sumber karbon dan sumber nitrogen yang bervariasi, dan media NB. Sebanyak 10% inokulum cair isolat bakteri ( $\approx 10^8$  sel/ml), diinokulasikan ke dalam media secara aseptis. Kultur bakteri diinkubasi pada suhu kamar. Kultur bakteri dikocok setiap hari. Pertumbuhan sel pada media biakan diamati sebagai koloni pada hari ke 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, dan 45 hari. Hal yang sama dilakukan pada kultur bakteri yang ditumbuhkan pada media cair yang diinkubasi pada suhu 4<sup>0</sup>C selama 60 hari. Kedua isolat bakteri ini ditumbuhkan pada suhu 4<sup>0</sup>C. Pengamatan dilakukan pada hari ke 0, 15, 30, 45 dan ke 60. Perhitungan jumlah sel dilakukan dengan cawan sebar menggunakan media agar MGMK (Suryanto, 2001).

### **Asai keriap**

Kemampuan pergerakan bakteri diuji dengan menggunakan metode asai keriap (Suryanto *et al.*, 2011). Pengamatan ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam kolonisasi lingkungan dengan mengukur panjangnya pergerakan bakteri tersebut. Asai keriap dilakukan dengan menginokulasikan isolat bakteri sebanyak 30  $\mu$ l pada agar MGMK dan NA sebagai pembanding, dengan masing-masing konsentrasi agar yang digunakan 0,25, 0,5, 1, dan 2%. Hal yang sama juga dilakukan dengan memvariasikan sumber karbon dan nitrogen pada media. Kultur tersebut diinkubasi pada suhu kamar selama lima hari. Asai keriap diukur sebagai jarak dari titik awal bakteri diinokulasi sampai jarak koloni keluar pada hari ke-5.

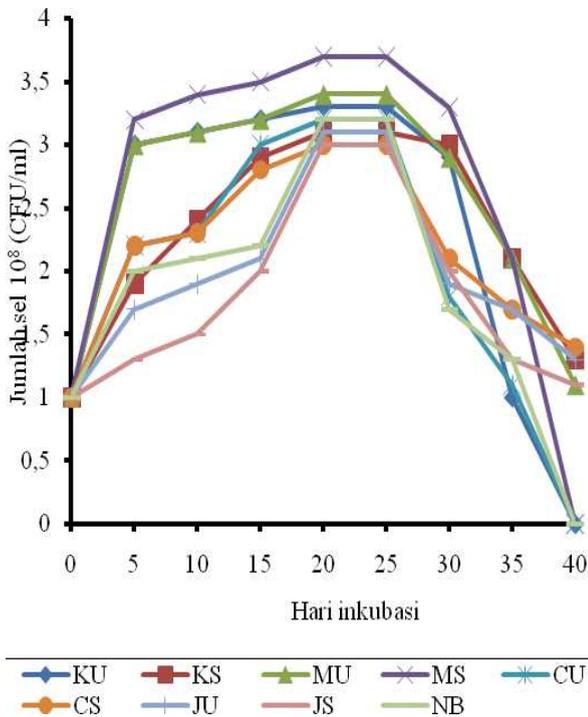
## **Hasil dan Pembahasan**

### **Viabilitas sel bakteri kitinolitik pada suhu kamar**

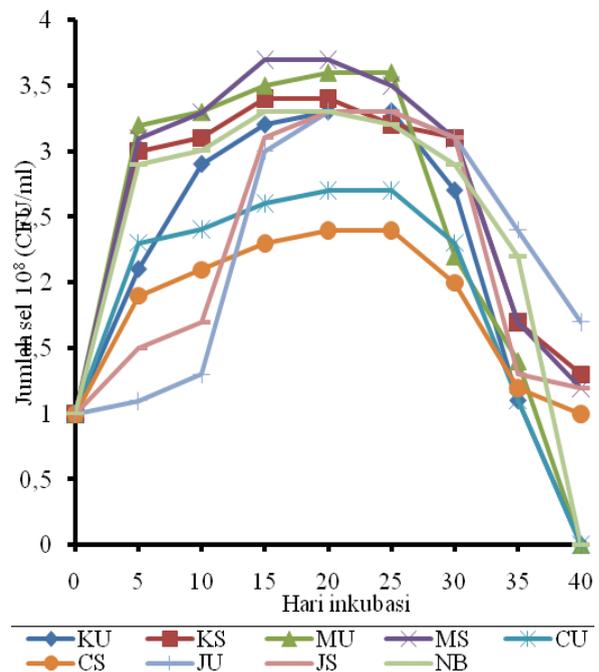
Pertumbuhan dari kedua isolat bakteri *Bacillus* sp. BK17 dan *Enterobacter* sp. BK15 pada suhu kamar menunjukkan pertumbuhan yang fluktuatif (Gambar 1 dan 2). Pada media MS dan MU, pertumbuhan kedua bakteri lebih baik dibandingkan pada jenis media lainnya. Pertumbuhan yang paling rendah terjadi pada CS dan JS. Selain itu jumlah sel bakteri pada suhu

kamar dan suhu 4<sup>0</sup>C juga mengalami perbedaan jumlah sel. Pada suhu kamar jumlah sel yang optimum sebesar 3,7x10<sup>8</sup> cfu/mL pada hari ke-25 inkubasi sedangkan pada suhu 4<sup>0</sup>C jumlah sel 3,3x10<sup>8</sup> cfu/mL setelah hari ke-45 inkubasi. Hal ini dikarenakan suhu dapat menyebabkan lambatnya pertumbuhan.

Jumlah sel yang optimum pada *Bacillus* sp BK17 didapatkan pada media MU sebesar 3.6x10<sup>8</sup> cfu/mL dan *Enterobacter* sp. BK15 didapatkan pada MS sebesar 3.7x10<sup>8</sup> cfu/mL, sedangkan jumlah sel kedua bakteri pada hari ke-0 sebesar 1x10<sup>8</sup> cfu/mL. Kandungan molase kaya polisakarida baik bagi pertumbuhan sel. Jumlah sel terendah pada *Enterobacter* sp. BK15 didapatkan pada JS sebesar 3x10<sup>8</sup> cfu/mL, sedangkan pada *Bacillus* sp. BK17 didapatkan pada media CS sebesar 2.4x10<sup>8</sup> cfu/mL dengan waktu inkubasi pada hari ke-25. Penurunan jumlah sel ini terjadi karena isolat bakteri tersebut tidak diaerasi secara terus menerus melainkan hanya dikocok sekali-sekali.



Gambar 1. Grafik jumlah sel bakteri kitinolitik *Enterobacter* sp. BK15 suhu kamar



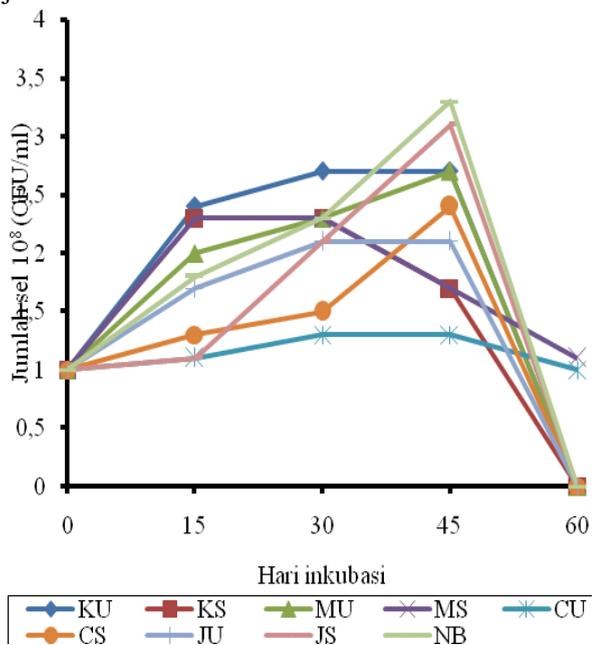
Gambar 2. Grafik jumlah sel bakteri kitinolitik *Bacillus* sp. Bk17 pada suhu kamar

**Viabilitas sel bakteri kitinolitik pada suhu 4<sup>0</sup>C**  
 Pertumbuhan dari kedua isolat *Bacillus* sp. BK17 dan *Enterobacter* sp. BK15 pada suhu 4<sup>0</sup>C menunjukkan jumlah sel yang bervariasi. Dari data diketahui bahwa pertumbuhan kedua isolat bakteri pada suhu 4<sup>0</sup>C menunjukkan pertumbuhan yang fluktuatif pada awal inkubasi sampai hari ke-60 inkubasi dengan media yang telah divariasikan sumber karbon dan nitrogennya (Gambar 3 dan 4).

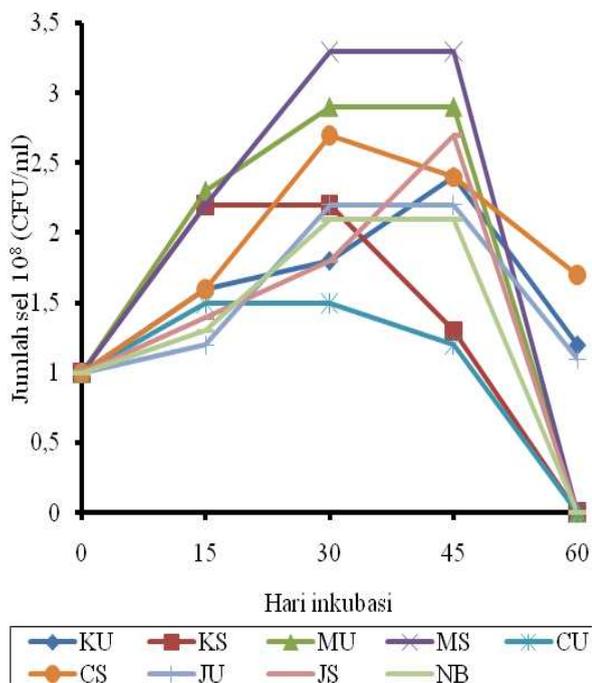
Jumlah selnya bervariasi, seperti terlihat pada Gambar 3 dan 4, jumlah sel *Enterobacter* sp. BK15 optimum didapatkan pada media NB sebesar 3,3x10<sup>8</sup> cfu/mL sedangkan pada *Bacillus* sp. BK17 juga sebesar 3.3x10<sup>8</sup> cfu/mL pada media MS. Hal ini terjadi karena media NB merupakan media cair yang kaya nutrisi yang digunakan untuk media pertumbuhan bakteri, sedangkan MS mengandung polisakarida sebagai sumber karbon dan juga mengandung fosfor dan sulfur.

Jumlah sel terendah pada *Enterobacter* sp. BK15 dan *Bacillus* sp. BK17 didapatkan pada media CU masing-masing sebesar 1.3x10<sup>8</sup> cfu/mL dan 1.2x10<sup>8</sup> cfu/mL pada hari ke-45 inkubasi. Serbuk cangkang kepiting yang digunakan sebagai media tumbuh belum terlalu halus, sehingga kitin yang

digunakan sebagai sumber karbon sulit digunakan karena masih terikat dengan partikel lain dan membutuhkan waktu yang lama dalam mendegradasi kitin sebagai sumber karbon bagi pertumbuhan bakteri dalam memperbanyak jumlah sel.



Gambar 3. Grafik jumlah sel bakteri kitinolitik *Enterobacter* sp. BK15 pada suhu 4°C



Gambar 4. Grafik jumlah sel bakteri kitinolitik *Bacillus* sp. BK17 pada suhu 4°C

Selain itu pada akhir pengamatan terjadi penurunan pH dari 6,8-7 menjadi 4-6,0. Pada pH 6,5-7, pertumbuhan sel bakteri *Bacillus* sp. BK17 dan *Enterobacter* sp. BK15 akan baik, karena kedua isolat merupakan bakteri netrofil yang menyukai lingkungan yang dengan tingkat pH optimal yaitu 6,8-8 untuk pertumbuhan (Hirano, 1990).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Kaushish *et al.*, (2009) yang menggunakan sumber karbon minyak mentah pertumbuhan *Bacillus subtilis* strain BMT4i yang diinkubasi pada suhu 30°C selama 10 jumlah sel hari sangat tinggi ( $5 \times 10^{10}$  cfu/mL). Hal ini terjadi karena kultur diaerasi dengan goyangan 200 rpm. Pertumbuhan yang optimum dapat terjadi apabila kandungan nutrisi yang ada pada media terpenuhi, seperti adanya sumber karbon, nitrogen dan oksigen bagi bakteri aerob. Nutrisi yang ada pada media tersebut digunakan sebagai energi. Jika sumber karbon dan nitrogen terpenuhi pembentukan dinding sel bakteri menjadi lebih baik, komposisi media juga harus mengandung polisakarida (Paturau, 1969).

Perbedaan pertumbuhan pada tiap media dimungkinkan karena adanya perbedaan dari kemampuan masing-masing jenis bakteri dalam menggunakan nutrisi pada media untuk proses pertumbuhan dan metabolismenya (Rodrigues *et al.*, 2006). Kitin merupakan polisakarida yang tidak larut di dalam air. *Bacillus* sp. dan *Enterobacter* sp. merupakan bakteri yang menghasilkan enzim kitinase dan kitin digunakan sebagai sumber karbon dan energi bagi pertumbuhan dan memperbanyak jumlah sel bakteri (Suryanto dan Munir, 2008). Menurut Lay (1994), perbedaan laju pertumbuhan disebabkan oleh banyak faktor antara lain tipe dan jenis bakteri itu sendiri maupun kemampuan bakteri tersebut dalam menggunakan nutrisi yang ada pada media serta aktivitas enzim yang dihasilkan.

Menurut Imas *et al.*, (1989) pertumbuhan bakteri kitinolitik juga dipengaruhi oleh pH. Bakteri kitinolitik tidak dapat tumbuh pada pH 4-5,5 karena aktivitas pertumbuhannya akan menurun dan terhambat, karena bakteri kitinolitik yang digunakan merupakan bakteri netrofil yang tumbuh optimum pada pH yang netral yaitu pH 6,8-8. Apabila pH yang rendah, membran sel menjadi jenuh oleh ion hidrogen sehingga

membatasi transport membran dan dapat menyebabkan keracunan.

### Asai Keriap

Kemampuan gerak mikroorganisme dapat dilihat pada pertumbuhan koloni bakteri yang ditanam pada media padat dan media semi solid. Hasil pengamatan asai keriap bakteri tersebut dapat dilihat pada Tabel.1 di bawah ini:

**Tabel 1. Asai keriap bakteri kitinolitik *Bacillus* sp. BK17 dan *Enterobacter* sp. pada media MGMK, NA dan Variasi sumber C dan N**

Bakteri	Media Keriap	Konsentrasi agar dan Keriap bakteri pada hari ke-5 (mm)			
		0,25 %	0,5%	1%	2%
<i>Enterobacter</i> sp. BK15	MGMK	42	45,5	33	43,5
	KU	45,5	34,5	30,5	47,5
	KS	35,8	33,5	45,5	44,5
	CU	30,0	34,5	21,5	43,5
	CS	31,0	33,5	40,5	45,1
	MU	47,5	34,0	41,5	51,0
	MS	50,5	44,2	45,2	50,5
	JU	31,0	40,5	40,2	43,0
	JS	30,1	44,2	32,5	44,7
NA	-	-	-	52,5	
<i>Bacillus</i> sp. BK17	MGMK	40	41	33	41,5
	KU	31,0	31,0	33,4	43,2
	KS	35,5	21,0	35,0	45,5
	CU	32,5	40,0	21,5	32,5
	CS	34,0	24,5	33,5	44,2
	MU	43,0	44,5	32,5	46,5
	MS	45,5	47,5	37,5	48,5
	JU	35,5	33,7	21,5	42,7
	JS	35,0	35,5	22,5	42,5
NA	-	-	-	45,3	

Tabel 1 menunjukkan bahwa setelah pengamatan 5 hari kemampuan keriap bakteri *Bacillus* sp. BK17 sebesar 51,5 mm dan *Enterobacter* sp. BK15 sebesar 45,3 mm pada media NA, sedangkan kemampuan keriap bakteri terendah pada *Bacillus* sp. BK17 dan *Enterobacter* sp. BK15 sebesar 33 mm pada media MGMK dengan konsentrasi agar 1%. Keriap *Bacillus* sp. BK17 pada media MS, pada konsentrasi agar 0,25% keriap sejauh 45,5 mm, pada konsentrasi agar 0,5% mencapai 47,5 mm, pada konsentrasi agar 1% mencapai 3,72 mm, sedangkan pada konsentrasi agar 2% mencapai 48,5 mm pada pengamatan ke-5. Keriap terendah pada media KU dengan konsentrasi agar 0,25% berkeriap

sejauh 31 mm, pada konsentrasi agar 0,5% sejauh 31 mm, pada konsentrasi agar 1% sejauh 33,4 mm, sedangkan pada konsentrasi agar 2% sejauh 43,2 mm pada pengamatan ke-5.

Pada *Enterobacter* sp. BK15 kemampuan keriap bakteri terjauh pada media MS pada konsentrasi agar 0,25% sejauh 50,5 mm, pada konsentrasi agar 0,5% mencapai 44,2 mm, dan pada konsentrasi agar 1% mencapai 45,2 mm, sedangkan pada konsentrasi agar 2% mencapai 50,5 mm pada pengamatan ke-5. Keriap terendah pada media CU, pada konsentrasi agar 0,25% sejauh 3 mm, pada konsentrasi agar 0,5% mencapai 34 mm, dan pada konsentrasi agar 1% mencapai 21,5 mm, sedangkan pada konsentrasi agar 2% mencapai 43,5%.

Keriap bakteri terjadi jika bakteri ingin menjauhi atau mendekati ransangan. Dalam hal bakteri mengambil nutrisi, bakteri tersebut bergerak mendekati substrat yang nantinya digunakan sebagai sumber energi dan karbon bagi pertumbuhan. Kemampuan gerak mikroorganisme dapat dilihat pada pertumbuhan koloni yang ditanam pada media padat dan media semi solid dengan memvariasikan sumber karbon dan nitrogen.

Menurut Prihatna (2003), keriap bakteri dapat berperan penting dalam pengendalian hayati karena sifat berkeriap dari bakteri digunakan untuk menguasai (mengkolonisasi) relung ekologi tertentu. Keriap yang baik pada bakteri menunjukkan bahwa aktivitas keriap dapat memberikan sumbangan yang baik terhadap kemampuan bakteri dalam menghambat pertumbuhan jamur patogen dan untuk mendapatkan sumber energi untuk aktivitas gerak pada lingkungan sekitarnya dalam menggunakan substrat media untuk menghasilkan metabolit sekunder pada mikroorganisme tersebut Selain untuk pertumbuhan sumber karbon juga digunakan sebagai sumber energi dalam aktivitas gerak pada lingkungan sekitarnya dalam menggunakan substrat media untuk menghasilkan metabolit sekunder pada mikroorganisme tersebut (Suryanto *et al.*, 2011).

### Daftar pustaka

Abou-zeid, M. R. 1980. Production of the microorganisms communicating current

- research and educational topics and trends. *J. App. Microbiol.* **7(2)** : 340-347.
- Hirano, S. 1990. Chitin biotechnology applications. *J. Biotechnol.* **2(1)** : 237-239.
- Horowitz, A., D. Gutnick, E. Rosenberg. 2005. Sequential growth of bacteria on crude oil. *J. App. Microbiol.* **30(1)**: 10-19.
- Imas, T., R. S. Hadioetomo, A. G. Gunawan, Y. Setiadi. 1989. *Mikrobiologi Tanah II*. PAU IPB. Bogor. hlm 68
- Kaushish, M. L., A. Bahyana, K. Dangwal, V. Garg. 2009. Degradation of benzopyrene by a norel strain *Bacillus subtilis* BMT4i (MT CC9447). *J. Brazilian Microbiology.* **40(1)**: 884-892.
- Lay, B.W. 1994. *Analisis Mikropa di Laboratorium*. Penerbit Rajawali Press. Jakarta. hlm 75.
- Muharni, E. Nurnawati, 2007. Pengujian aktivitas kitinase *Bacillus circulans* untuk dikembangkan sebagai agen biokontrol pada penyakit tanaman, *J. Penelitian Sains* **1(2)**:144 – 150.
- Paturau, M. J. 1969. Products of the cane sugar industry, and introduction utilization. London: Elsevier Publ. Amsterdam. hlm 33-53.
- Pitt, J. L., A. D. Hocking. 1997. Fungi and Food Spoilage. Second Edition. Blackie Academic and Professional. New York. hlm. 252-254.
- Prihatna, C. 2003. Antagonisme *Serratia marcescens* DS-8 dan *Aeromonas caviae* WS7b terhadap *Fusarium oxysporum*. [Skripsi]. Bogor. IPB.. hlm 12.
- Rodrigues, L., J. Teixeira, R. Oliveira, H. J. Van Der. 2006. Response surface optimization of the medium components for the production of biosurfactants by probiotic bacteria. *J. Process Biochemistry.* **41(1)** : 1–10.
- Suryanto, D., E. Munir. 2008. Potensi pemanfaatan isolat kitinolitik lokal untuk pengendalian hayati jamur. Di dalam *Prosiding Seminar Hasil-hasil Penelitian*. Medan: FMIPA USU.
- , 2001. Selection and Characterization of Bacterial isolates for Monocyclic Aromatic Degradation. [Disertasi]. Bogor. IPB.
- , I. Netti, E. Munir. 2011. Isolation and characterization of chitinolytic bacteria and their potential to inhibit plant pathogenesis fungi. *Hayati J. Bioscience.* **5 (3)**: 120.
- Volkering, D., G. Cooper, N. Koric. 1998. Effect of nitrogen sources on surfactans production by Microorganisms ATCC 19558. *J. Microbiol Enhanced Oil Recovery.* **16 (3)**: 66-71.