

**ANALISIS PERTUMBUHAN *Pseudomonas aeruginosa* DAN *Bacillus subtilis*
PADA MEDIA KNO₃****ANALYSIS OF *Pseudomonas aeruginosa* AND *Bacillus subtilis* GROWTH IN
KNO₃ MEDIA**

Afifah Nurazizatul Hasanah¹, Fitri Afina Radityani^{1*}, Devi Faustine Elvina
Nuryadin¹, Yesika Sipahutar², Putri Nadia², Jeaneatte Gracia², Sella Oktavia²

¹ Program Studi Ilmu Kelautan, Universitas Sultan Ageng Tirtayasa

² Program Studi Ilmu Perikanan, Universitas Sultan Ageng Tirtayasa

*e-mail: fitriafinaradityani@untirta.ac.id

ABSTRAK

Ammonia, nitrit, dan nitrat merupakan bentuk dari nitrogen anorganik yang bila melebihi baku mutu perairan dapat mencemari lingkungan dan bersifat toksik bagi biota akuatik. Namun sifat toksik pada senyawa nitrogen di air dapat dikendalikan oleh mikroorganisme melalui proses nitrifikasi dan denitrifikasi. Pada penelitian ini digunakan dua jenis bakteri denitrifikasi yaitu *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus subtilis*. Kedua jenis bakteri ditumbuhkan secara anaerob dalam media *Nutrient Broth* (NB) yang sudah ditambahi pupuk KNO₃ sebagai bahan pencemar untuk diamati selama 7 hari. Penelitian ini dilakukan untuk membandingkan performa dari *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa* dalam proses denitrifikasi. Hasil yang diperoleh dari pengamatan performa *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa* dalam proses denitrifikasi adalah kedua bakteri mampu menurunkan konsentrasi nitrat secara signifikan dalam waktu 2 hari, dengan performa terbaik ditunjukkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* yaitu sebesar 99,91% mampu menurunkan konsentrasi nitrat pada media, sedangkan *Bacillus subtilis* mampu menurunkan sebanyak 99,77% konsentrasi nitrat pada media.

Kata kunci: *Bacillus subtilis*; denitrifikasi; *Pseudomonas aeruginosa*

ABSTRACT

*Ammonia, nitrite, and nitrate are forms of inorganic nitrogen which if they exceed the water quality standards it can pollute the environment and be toxic to aquatic biota. However, the toxicity of nitrogen compounds in water can be controlled by microorganisms through nitrification and denitrification processes. In this study, two types of denitrifying bacteria were used *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. Both types of bacteria were grown anaerobically in *Nutrient Broth* (NB) media which had been added by KNO₃ fertilizer as a pollutant to be observed for 7 days. This research aimed to find the difference between *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* performa in the denitrification process. The results from observing the performance of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* in the denitrification process were that both bacteria were able to reduce the nitrate concentration significantly within 2 days. The best performance shown by *Pseudomonas aeruginosa*, which was 99.91% able to reduce the nitrate concentration in the media, while *Bacillus subtilis* was able to reduce as much as 99.77% of the nitrate concentration in the media.*

Keywords: Bacillus subtilis; denitrification; Pseudomonas aeruginosa

PENDAHULUAN

Peningkatan pertumbuhan penduduk menjadi penyebab utama meningkatnya kebutuhan akan air bersih, ditunjukkan dengan adanya peningkatan urbanisasi yang masif, industrialisasi, dan kebutuhan irigasi untuk sektor agrikultur. Adanya peningkatan aktivitas antropogenik mengakibatkan meningkatnya volume limbah organik yang dihasilkan, terutama dalam bentuk limbah cair atau limbah cair domestik (Sulistia dan Septisya 2020). Air yang sudah tercemar limbah domestik baru dapat dimanfaatkan setelah melalui proses pengolahan (Gufran dan Mawardi 2019). Hal ini dikarenakan air limbah domestik dapat membawa polutan organik, anorganik, logam berat, hingga mikroorganisme patogen (Al Kholif 2020). Pengurangan penggelontoran air limbah murni ke badan air merupakan hal yang patut menjadi prioritas negara di dunia (Dhewa *et al.*, 2015).

Level pencemaran suatu perairan dapat ditentukan berdasarkan nilai parameter kualitas air yang dianalisis, seperti parameter pH, DO, Nitrogen, Fosfor, COD, dan lain-lain. Hasil analisis parameter kualitas air tersebut kemudian harus dibandingkan dengan baku mutu perairan yang sudah diatur dalam PP No 21 Tahun 2021 tentang penyelenggaraan perlindungan dan pengelolaan lingkungan hidup. Jika hasil dari analisis parameter kualitas air melampaui baku mutu kualitas air, perairan dapat dikategorikan sudah tercemar.

Nitrogen dan fosfor sebagai salah satu parameter kualitas air juga merupakan elemen pembatas yang keberadaannya mempengaruhi kesuburan suatu perairan (Yogaswara 2020). Adapun senyawa nitrogen di perairan dapat ditemukan dalam dua bentuk, yaitu nitrogen organik dan anorganik. Ammonia, nitrit, dan nitrat merupakan bentuk dari nitrogen anorganik yang bila melebihi baku mutu perairan dapat mencemari lingkungan dan bersifat toksik bagi biota akuatik. Sifat toksik pada senyawa nitrogen di air dapat dikendalikan oleh mikroorganisme melalui proses nitrifikasi dan denitrifikasi (Syahputra *et al.* 2011).

Adapun proses pengendalian bahan pencemar menggunakan agen biologis dikenal dengan istilah bioremediasi.

Bioremediasi merupakan pemanfaatan organisme biotik untuk mengurangi bahan pencemar atau polutan di lingkungan (Priadie 2012). *Bacillus* dan *Pseudomonas* merupakan salah satu kelompok bakteri fakultatif yang mampu mereduksi nitrat menjadi nitrit dalam kondisi anaerob (Suryani dan Taufiqurrahman 2021). Pada penelitian ini digunakan dua jenis bakteri sebagai agen biologis dalam proses bioremediasi, bakteri *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp., yang merupakan kelompok bakteri saprofitik. Bakteri saprofitik yaitu kelompok bakteri yang mampu menguraikan bahan organik pada air limbah (Kholif, 2020). Salah satu agen biologis yang dapat dimanfaatkan dalam proses bioremediasi adalah mikroorganisme yang bersifat saprofitik. *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa* merupakan dua jenis bakteri yang termasuk ke dalam kelompok tersebut dan diketahui memiliki kemampuan untuk mereduksi nitrat. Adanya perbedaan kemampuan setiap jenis bakteri saprofitik dalam memanfaatkan bahan pencemar, maka pada penelitian ini dilakukan analisis kurva pertumbuhan dari bakteri *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp. pada media yang sudah ditambahkan senyawa Nitrogen sebagai bahan pencemar, sehingga dapat diketahui perbandingan kemampuan masing-masing bakteri dalam mereduksi nitrat.

METODOLOGI

Waktu dan tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli - Agustus 2023 di laboratorium Fakultas Pertanian, Universitas Sultan Ageng Tirtayasa dan laboratorium produktivitas lingkungan perairan Departemen Manajemen Sumberdaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan IPB.

Alat dan Bahan

Pada penelitian ini, bahan yang kami gunakan adalah isolat bakteri *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa* yang diperoleh secara komersil dari PT Agritama Sinergi Inovasi sebagai objek penelitian, tabung Eppendorf (Onemed) sebagai wadah untuk menumbuhkan bakteri, akuades, paraffin cair, medium *Nutrient Broth* (NB), pupuk kalium nitrat (KNO_3), larutan *brucine*, serta asam sulfat pekat (H_2SO_4). Adapun alat yang digunakan adalah tabung reaksi (PYREX), botol Duran 1000 mL (SCHOTT), mikropipet, vortex, inkubator, autoclave (GEA YX-18LDJ), laminar *air flow*, serta spektrofotometer (HACH DR-3900) untuk mengukur OD bakteri dan konsentrasi nitrat selama masa perlakuan. Isolat bakteri didapat secara komersil, kemudian dikultur di Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan, Universitas Sultan Ageng Tirtayasa.

Metode

Limbah cair yang digunakan merupakan limbah buatan, diperoleh dari media NB yang ditambahi pupuk KNO_3 sebanyak 500 ppm. Limbah cair tersebut ditampung dalam botol duran kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen. Analisis kurva pertumbuhan bakteri dan nitrat dilakukan di Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan dan Laboratorium Agroekoteknologi, Universitas Sultan Ageng Tirtayasa.

Uji Pertumbuhan Bakteri dan Uji Kuantitatif Aktivitas Denitrifikasi

Bacillus dan *Pseudomonas* ditumbuhkan dalam tabung eppendorf (Onemed) menggunakan media denitrifikasi berupa medium *Nutrient Broth* (NB) + 500 ppm KNO_3 dengan volume total 30 mL. Untuk menciptakan kondisi aerob, ditambahkan paraffin cair sebanyak 15 mL ke dalam tabung eppendorf 50 mL. Limbah cair yang sudah diisi koloni bakteri kemudian dipindahkan dari tabung eppendorf sebanyak 5-10 mL ke tabung

reaksi. Pertumbuhan bakteri diukur menggunakan metode *optical density* (OD) dengan panjang gelombang 600 nm menggunakan spektrofotometer HACH DR-3900. Adapun blanko yang digunakan berupa media denitrifikasi + paraffin cair.

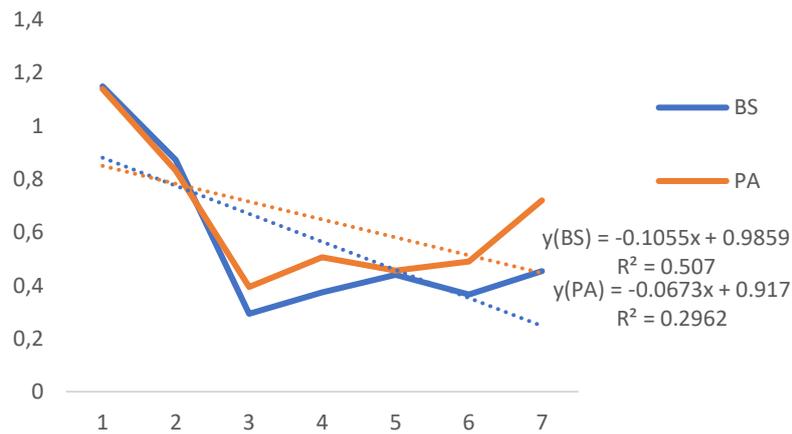
Analisis nitrat dilakukan menggunakan metode *brucine* yang mengacu pada APHA (2017). Sebanyak 1 mL contoh diambil dari tabung eppendorf *Bacillus* anaerob dan tabung Eppendorf *Pseudomonas* anaerob, kemudian diencerkan dengan 4 mL aquades. Analisis konsentrasi nitrat pada sampel menggunakan metode *brucine*. Adapun blanko yang digunakan berupa media denitrifikasi + paraffin cair yang juga dianalisis dengan metode *brucine*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Kurva Pertumbuhan Bakteri

Pengukuran laju pertumbuhan bakteri dilakukan setiap 24 jam selama 7 hari berdasarkan hasil pada kurva pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa* seperti yang disajikan pada Gambar 3.1. Diketahui bahwa pertumbuhan *Bacillus subtilis* mengalami penurunan / fase kematian sel pada hari ke-1 hingga ke-3, kemudian meningkat di hari ke-4 dan hari ke-5, kemudian mengalami sedikit penurunan kembali di hari ke-6 dan kembali meningkat di hari ke-7. Sementara *Pseudomonas aeruginosa* setelah mengalami fasi kematian pada hari ke-1 hingga hari ke-3, *Pseudomonas aeruginosa* mengalami fase pertumbuhan yang lebih stabil, yakni pada hari ke-4 hingga ke-7. Pada hari ke-7, diketahui adanya peningkatan pertumbuhan pada kedua bakteri. Berdasarkan nilai R^2 pada Gambar 3.1 diketahui bahwa hubungan antara OD *Bacillus subtilis* dengan waktu amatan erat, yaitu sebesar 0,507. Adapun hubungan antara OD *Pseudomonas aeruginosa* dengan waktu amatan kurang erat, yaitu 0,2962.

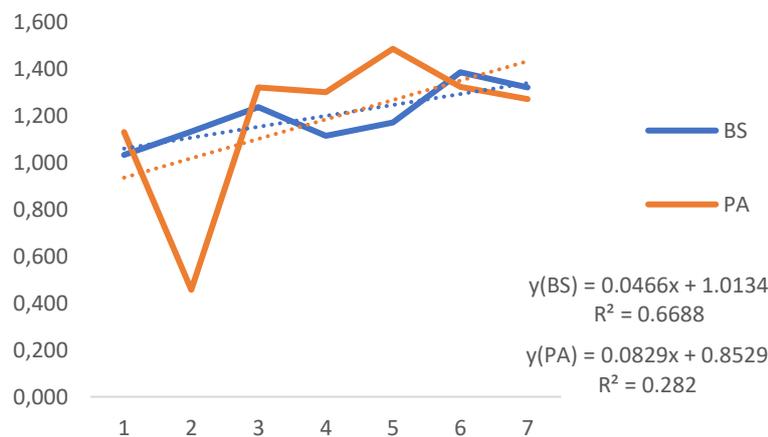


Gambar 3.1 Kurva pertumbuhan bakteri selama masa perlakuan

Analisis Nitrat

Berdasarkan hasil analisis nitrat, terjadi penurunan konsentrasi nitrat dari 500 ppm menjadi 1,3 ppm di hari ke-7 untuk perlakuan kedua bakteri. Meskipun terjadi penurunan konsentrasi nitrat yang signifikan sejak hari pertama, setelah diamati dalam waktu 7 hari terlihat adanya perbedaan kemampuan pada kedua jenis bakteri dalam proses denitrifikasi. Pada Gambar 3.2 diduga bahwa kedua jenis bakteri membutuhkan waktu untuk beradaptasi selama 6 hari, dari

media awal hidup, yang merupakan media aerob, ke media uji, yang merupakan media anaerob, untuk kemudian kedua bakteri sama-sama menunjukkan kemampuan dalam menurunkan konsentrasi nitrat pada hari ke-7. Nilai R^2 pada hasil proses denitrifikasi oleh *Bacillus subtilis* sebesar 0,6688 menunjukkan adanya hubungan yang erat antara pertambahan jumlah waktu amatan dengan perubahan konsentrasi nitrat, sedangkan pada hasil proses denitrifikasi oleh *Pseudomonas aeruginosa* adalah kurang erat, yaitu 0,282.



Gambar 3.2 Perubahan konsentrasi nitrat selama masa perlakuan

Berdasarkan hasil analisis konsentrasi nitrat untuk perlakuan kedua jenis bakteri, diketahui bahwa persentase penurunan konsesntrasi nitrat oleh *Bacillus subtilis*

berkisar antara 99,72% - 99,79% sedangkan pada *Pseudomonas aeruginosa* berkisar antara 99,70 % - 99,91%.

Tabel 1. Persentase penurunan konsentrasi nitrat oleh *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa*

Hari ke-	BS Nitrat	PA Nitrat
1	99.79%	99.77%
2	99.77%	99.91%
3	99.75%	99.74%
4	99.78%	99.74%
5	99.77%	99.70%
6	99.72%	99.74%
7	99.74%	99.75%

Pembahasan

Berdasarkan hasil penelitian pada Gambar 3.1, diketahui bahwa *B. subtilis* dan *P. aeruginosa* mulai mampu hidup pada medium KNO_3 dalam kondisi anaerob di hari ke-7. *B. subtilis* merupakan bakteri yang diketahui mampu mereduksi nitrat menjadi nitrit (Gordon 1973). *B. subtilis* termasuk dalam klan bakteri aerobik fakultatif, yaitu bakteri yang berhasil bertahan hidup pada kondisi dengan atau tanpa oksigen (Rokhim 2023). Menurut Bohin *et al.* (1976), kultur *B. subtilis* dalam kondisi anaerob dapat memicu sel untuk menghasilkan enzim nitrat reduktase yang terikat pada membran sel, sehingga adanya nitrat pada medium pertumbuhan menyebabkan *B. subtilis* dapat tetap hidup meskipun tanpa aerasi.

P. aeruginosa sebagai bakteri denitrifikasi juga mampu hidup pada kondisi anaerob. Hal ini dikarenakan *P. aeruginosa* merupakan bakteri yang cenderung mengutamakan respirasi aerob meskipun termasuk dalam klan bakteri anaerob fakultatif. *P. aeruginosa* mampu hidup pada kondisi anaerob apabila terdapat nitrat (NO_3^-) yang bertindak sebagai akseptor elektron terakhir (Schreiber *et al.* 2007).

Apabila dilihat dari kemampuan kedua jenis bakteri denitrifikasi dalam mendegradasi nitrat (Gambar 3.1 dan 3.2), kedua bakteri tersebut mampu menurunkan konsentrasi nitrat yang terkandung dalam medium pertumbuhan secara signifikan pada hari pertama. Namun, diduga karena adanya penurunan konsentrasi nitrat pada media secara signifikan menyebabkan munculnya

persaingan dalam populasi pada masing-masing bakteri dalam memanfaatkan konsentrasi nitrat yang tersisa di media, sehingga menyebabkan penurunan jumlah bakteri pada hari ke-1 sampai ke-3 (Gambar 3.1). Dugaan ini didasarkan pada pendapat dari Aimia dan Ratin JAR (2023) yang menyatakan bahwa bakteri denitrifikasi dapat melakukan proses denitrifikasi dengan baik pada kondisi optimum dalam waktu 8-10 jam, sedangkan jika kondisi kurang baik maka proses denitrifikasi dapat terjadi dalam waktu 2-3 hari. Adapun Su *et al.* (2019) menyatakan bahwa menurunnya jumlah bakteri bersamaan dengan penurunan nitrat diindikasikan karena sebagian bakteri sudah mencapai waktu lisis akibat berkurangnya substrat atau sumber energi untuk tumbuh.

Pada Gambar 3.1 dan gambar 3.2 diketahui terdapat aktivitas denitrifikasi pada hari ke-3 hingga ke-7. Kondisi ini sesuai dengan pendapat dari Aimia dan Ratin JAR (2023) yang menyatakan bahwa proses denitrifikasi pada kondisi yang kurang baik dapat berlangsung dalam 2-3 hari. Berdasarkan Gambar 3.2 diketahui pula bahwa kemampuan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dalam proses denitrifikasi dari hari ke-0 sampai dengan hari ke-2 lebih baik daripada *Bacillus subtilis*. Berdasarkan hasil perhitungan persentase penurunan konsentrasi nitrat oleh *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa* pada Tabel 1 diketahui bahwa proses denitrifikasi dengan penurunan konsentrasi nitrat terbesar terjadi pada hari ke-2 oleh *Pseudomonas aeruginosa* yaitu sebesar 99,91%, sedangkan pada hari yang sama penurunan

konsentrasi nitrat oleh *Bacillus subtilis* sebesar 99,77%. Adanya perbedaan kemampuan dalam proses denitrifikasi oleh kedua bakteri sesuai dengan pendapat yang disampaikan oleh Suryani dan Taufiqurrahman (2021) bahwa beberapa *Pseudomonas* memiliki tahap reaksi reduksi lebih lengkap, yaitu $\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2 \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Hasil yang didapatkan dari pengamatan performa *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa* dalam proses denitrifikasi adalah kedua bakteri mampu menurunkan konsentrasi nitrat secara signifikan dalam waktu 2 hari, dengan performa terbaik ditunjukkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* yaitu sebesar 99,91% mampu menurunkan konsentrasi nitrat pada media, sedangkan *Bacillus subtilis* mampu menurunkan sebanyak 99,77% konsentrasi nitrat pada media.

Saran

Sebaiknya dilakukan pengamatan performa bakteri dalam proses denitrifikasi dengan interval waktu yang lebih rapat, misalnya setiap 6 jam, untuk melihat tren pertumbuhan bakteri serta penurunan nitrat yang tidak terlalu jauh. Selain itu, perlu juga dilakukan penelitian lanjutan mengenai kinetika penurunan konsentrasi nitrat setiap 3 jam selama 24 jam.

Ucapan Terima kasih

Ucapan terima kasih diberikan kepada Fakultas Pertanian Universitas Sultan Ageng Tirtayasa sebagai pemberi dana riset dalam kompetisi Peneliti Dosen Pemula (PDP) tahun anggaran 2022/2023, Kepala Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan Program Studi Ilmu Perikanan Kepala Laboratorium Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Sultan Ageng Tirtayasa, dan

Kepala Departemen Manajemen Sumberdaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor yang telah menjadi sponsor utama dan mengizinkan penulis melaksanakan penelitian ini sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Aimia TA dan Ratni JARN. 2023. Penyisihan cod, tss, dan tn pada lindi tpa klotok menggunakan *anoxic-oxic moving bed biofilm reactor*. *Insologi: Jurnal Sains dan Teknologi*. 2(4): 771-779. DOI: 10.55123/insologi.v2i4.2418.
- Al Kholif M. 2020. *Pengelolaan Air Limbah Domestik*. Surabaya: Scopindo Media Pustaka.
- APHA, AWWA, WEF. 2017. *Standard Method for Examination of Water and Wastewater 23rd Edition*. Washington (AS): American Public Health Association.
- Bohin JP, Bohin A, dan Shaeffer P. 1976. "Increased nitrate reductase A activity as a sign of membrane alteration in early blocked asporogenous mutants of *Bacillus subtilis*". *Biochimie* 58, 99–108
- Dhewa, T. 2015. "Biosensor for environmental monitoring: An update". *International Journal of Environmental Research*, 3(2), 212–218.
- Gordon RE, Haynes WC, dan Pang CH. 1973. *The Genus Bacillus. Agricultural Handbook No. 427*. US Department of Agriculture: Washington, DC
- Gufran M dan Mawardi. 2019. Dampak pembuangan limbah domestik terhadap pencemaran air tanah di kabupaten pidie jaya. *Serambi*

- Engineering*. 4(1): 416-425. ISSN: 2528-3561.
- Kholif, M.A. 2020. *Pengelolaan Air Limbah Domestik*. Surabaya: Scopindo Media Pustaka.
- Priadie B. 2012. "Teknik Bioremediasi sebagai Alternatif dalam Upaya Pengendalian Pencemaran Air". *Jurnal Ilmu Lingkungan*, 10(1), 38-48.
- Rokhim N. 2023. Isolation of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus* sp. on garbage at tpasegawe, tulungagung regency. *Asian Journal of Natural Sciences*. 2(1): 1-8. DOI: <https://doi.org/10.55927/ajns.v2i1.3005>.
- Schreiber K, Krieger R, Benkert B, Eschbach M, Arai H, Schobert M, dan Jahn D. 2007. "The Anaerobic Regulatory Network Required for *Pseudomonas aeruginosa* Nitrate Respiration". *Journal of Bacteriology* 189(11). <https://doi.org/10.1128/jb.00240-07>
- Su J, Gao C, Huang T, Gao Y, Bai X, & He L. 2019. Characterization and mechanism of the Cd(II) removal by anaerobic denitrification bacterium *Pseudomonas* sp. H117. *Chemosphere*. 222: 970-979. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.192>.
- Sulistia S dan Septisya AC. 2020. Analisis kualitas air limbah domestik perkantoran. *Jurnal Rekayasa Lingkungan*. 12(1): 41-57. Doi: <https://doi.org/10.29122/jrl.v12i1.3658>.
- Suryani Y dan Taufiqurrahman O. 2021. *Mikrobiologi Dasar*. Bandung: LP2M UIN SGD Bandung.
- Syahputra K, Rusmana I, dan Widyastuti U. 2011. Isolasi dan karakterisasi bakteri denitrifikasi sebagai agen bioremediasi nitrogen anorganik. *J. R. Akuakultur*. Vol 6 (2): 197-209.
- Yogaswara D. 2020. Distribusi dan siklus nutrient di perairan estuari serta pengendaliannya. *Oseana* 45(1): 28-39. p-ISSN: 0216-1877.