

## ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS BAKTERI ICE NUCLEATION ACTIVE PADA TUMBUHAN *Pinus merkussi* DI JALUR PENDAKIAN CEMORO SEWU GUNUNG LAWU

Arti Wahyu Utami

Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Tujuh Belas

E-mail:

[Artiwahyu270216@gmail.com](mailto:Artiwahyu270216@gmail.com)

### ABSTRAK

Bakteri Ice Nucleation Active (INA) adalah bakteri yang menyebabkan luka beku (frost injury) pada tanaman. Pada perkembangannya sekarang, bakteri INA berperan dalam proses biopresipitasi, yaitu dapat memengaruhi curah hujan. Gunung Lawu merupakan pegunungan hujan tropis yang kaya akan vegetasi dan mempunyai suhu relatif rendah. Salah satu vegetasi yang banyak ditemukan di Gunung Lawu adalah tanaman *Pinus merkussi*. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menguji aktivitas nukleasi es bakteri INA pada tumbuhan berdaun jarum di jalur pendakian Cemoro Sewu. Pengambilan sampel dilakukan dengan metode purposive sampling dalam tiga ketinggian  $\pm 2300$ mdpl;  $\pm 2.500$ mdpl. Isolasi bakteri INA dilakukan dengan menggunakan media agar nutrisi dan 2,5% gliserol dan King'B. Uji aktivitas bakteri INA menggunakan metode tube freezing. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 1 dari bakteri INA dapat diisolasi dari tumbuhan *Pinus merkussi* di jalur pendakian Cemoro Sewu Gunung Lawu.

**Kata Kunci:** Bakteri Ice Nucleation Active (INA), isolasi, aktivitas nukleasi es

## ISOLATION AND ASSESSMENT OF ICE NUCLEATION ACTIVE BACTERIA ON *Pinus merkussi* PLANT ON THE CEMORO SEWU HIKING TRAIL, MOUNT LAWU

### ABSTRACT

Ice Nucleation Active (INA) bacteria are bacteria that cause frost injury on plants. In its current development, INA bacteria play a role in the bioprecipitation process, which can affect rainfall. Mount Lawu is a tropical rain mountain that is rich in vegetation and has a relatively low temperature. One of the vegetation found on Mount Lawu is *Pinus merkussi*. This study aims to isolate and test the ice nucleation activity of INA bacteria on the *Pinus merkussi* plant on the Cemoro Sewu hiking trail. Sampling was carried out by purposive sampling method at three altitudes of  $\pm 2300$ m above sea level;  $\pm 2,500$ m above sea level. Isolation of INA bacteria was carried out using nutrient agar media and 2.5% glycerol and King'B.

**Keywords:** Bakteri Ice Nucleation Active (INA), isolasi

## PENDAHULUAN

Bakteri adalah mikroorganisme prokariot bersel tunggal yang hanya dapat dilihat morfologinya dengan bantuan mikroskop. Keragaman bakteri dilihat dari berbagai sudut pandang seperti morfologi, fisiologi, dan genetik. Tiap-tiap habitat yang berbeda memberikan keragaman yang berbeda pula. Contoh habitat yang sering dihuni oleh bakteri adalah daun. Salah satu bakteri filosof yang dapat ditemukan pada permukaan daun adalah bakteri Ice Nucleation Active (INA) (Lindow dan Brandl, 2003).

Bakteri pembentuk inti es (INA) merupakan kelompok bakteri yang memiliki kemampuan mengkatalis pembentukan es pada suhu di atas  $-10^{\circ}\text{C}$ . Bakteri INA memainkan peranan penting dalam mengatur curah hujan. Bakteri INA dipengaruhi oleh curah hujan dan untuk lokasi geografis aktivitas dan konsentrasi bakteri ini terkait dengan musim dan kimia curah hujan (Christner et al., 2008). Habitat bakteri INA sebagian besar berada di permukaan daun atau filosof. Total keseluruhan luas permukaan daun yang dapat dihuni oleh bakteri 0,1-1%, dan dari jumlah tersebut lebih dari 90% bakteri mati karena terpapar sinar UV dari matahari (Morris, 2001).

Bakteri yang hidup di permukaan daun dihadapkan pada lingkungan yang mudah berubah. Bila siang hari banyak bakteri diterbangkan oleh angin dan terpapar sinar UV yang dapat menyebabkan bakteri tersebut mati. Akan tetapi, bakteri yang dapat membentuk kristal es akan jatuh ke permukaan tanah atau daun-daun yang merupakan habitat alaminya. Dalam hal ini secara tidak langsung bakteri pembentuk kristal es yang secara tidak langsung berperan dalam memelihara iklim mikro di sekitar tanaman-tanaman inangnya (Christner et al., 2008).

Lindow et al., (1978) meneliti distribusi bakteri INA ditemukan pada 74 spesies tanaman yang telah diambil sebagai sampel dari California, Colorado, Florida, Louisiana, Wisconsin, dan Amerika Serikat bahwa semua bakteri pembentuk inti es yang mereka isolasi mewakili spesies *P. syringae* dan *E. herbicola* yang jumlahnya melimpah. Stephanie dan Waturangi (2011) mengemukakan bahwa

bakteri INA diisolasi dari air hujan antara Maret hingga Mei 2008 dari Jakarta, Bogor, Bekasi, Tangerang, dan Depok. Hasil tertinggi bakteri INA dari air hujan ditemukan pada sampel dari Jakarta dan diikuti oleh sampel dari Bogor. Persentase bakteri INA dari air hujan lebih tinggi daripada udara untuk semua sampel dari daerah yang berbeda. Hal ini menunjukkan bahwa distribusi bakteri INA berbeda untuk setiap lokasi. Keberadaan bakteri INA di air hujan dan udara mungkin memainkan peran penting dalam proses nukleasi yang diperlukan untuk induksi hujan.

Distribusi bakteri INA telah banyak ditemukan di daerah subtropis. Bakteri INA di Jepang ditemukan pada tanaman brokoli, murbei, dan kubis, sedangkan di Amerika Serikat bakteri INA ditemukan pada tanaman jagung, jeruk tomat, gandum, dan beberapa tanaman keras (Arwiyanto, 2009). Data distribusi bakteri INA di daerah subtropis telah banyak ditemukan baik di permukaan daun ataupun di atmosfer yang berperan dalam kondensasi dan pembentukan inti es di awan. Bakteri INA juga ditemukan berlimpah pada sampel air hujan dan salju (Morris et al., 2004; Christner et al., 2008).

Bakteri INA umumnya tumbuh pada permukaan daun tanaman, beberapa di antaranya yang telah ditemukan adalah *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas viridiflava*, *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia herbicola*, dan *Xanthomonas campestris* (Edwards et al., 1994). Wahyudi (1995) menyatakan bahwa sebagian dari bakteri INA secara potensial memainkan peranan dalam pembentukan salju, perubahan cuaca, dan pembentukan inti es di awan serta menstimulasi terjadinya hujan. Bakteri INA berpartisipasi dalam siklus biopresipitasi, yaitu membantu dalam memengaruhi pembentukan awan dan hujan (Morris et al., 2004).

Bakteri INA yang terdapat pada daun terbawa oleh angin ke awan dan akan membantu dalam memengaruhi terjadinya hujan, sebaliknya hujan akan menguntungkan bagi pertumbuhan bakteri yang terdapat pada permukaan tanaman karena kebutuhannya akan air terpenuhi. Suhu merupakan faktor yang memengaruhi struktur dan komposisi vegetasi

tumbuhan. Rata-rata suhu di permukaan laut kawasan tropis adalah 26,3°C, kemudian setiap naik 100mdpl, suhu akan turun 0,61°C. Ketinggian 2000mdpl suhu menjadi 14,1°C, lalu setiap 100mdpl suhu akan turun 0,52°C. Pada ketinggian 4700mdpl, suhu menjadi 0°C (Steenis, 1972). Setiap spesies memiliki tanggapan yang berbeda terhadap suhu sehingga terbentuk zonasi distribusi. Zonasi vertikal karena ketinggian serupa dengan zonasi horizontal karena garis lintang (Wood, 1971; Steenis, 1972; Odum, 1983).

Gunung Lawu merupakan pegunungan vulkanik tua yang sudah tidak aktif. Secara geografis terletak pada posisi sekitar 111°15'BT dan 7°30'LS dan meliputi areal seluas sekitar 15.000ha. Lereng barat terletak di Provinsi Jawa Tengah, meliputi Kabupaten Karanganyar, Sragen, dan Wonogiri. Lereng timur terletak di Provinsi Jawa Timur, meliputi Kabupaten Magetan dan Kabupaten Ngawi. Gunung Lawu memanjang dari utara ke selatan. Topografi bagian utara berbentuk kerucut dengan puncak Argo Dumilah setinggi 3.265mdpl. Bagian selatan terdiri dari bukit-bukit curam dengan puncak Jobolarangan 2.298mdpl (Lawrence, 1955). Gunung Lawu merupakan salah satu bentuk habitat yang eksotis. Gunung ini menjadi batas antara lingkungan Jawa Timur yang cenderung kering dan gersang dengan Jawa Tengah yang mulai basah sebelum mencapai Jawa Barat yang basah dan dingin. Sebagai kawasan peralihan, tempat ini ditumbuhi spesies-spesies khas Jawa Timur, tapi tidak ditemukan di Jawa Barat dan sebaliknya (Steenis, 1972).

Gunung Lawu merupakan kawasan yang sangat subur, karena merupakan daerah tangkapan hujan. Kondisi ini sangat berpengaruh terhadap biodiversitas vegetasi tumbuhan di Gunung Lawu, salah satunya adalah tumbuhan *Pinus mercurii*. *P. mercurii* termasuk ke dalam kelas Coniferopsida dan familia Pinaceae. Pinus ini mempunyai ciri habitusnya adalah pohon berkayu dengan pola percabangan monopodial, memiliki daun seperti jarum yang panjang dengan duduk daun tersebar.

## METODE PENELITIAN

### Pengambilan sampel

Sampel tumbuhan berdaun jarum di jalur pendakian Cemoro Sewu Gunung Lawu pada tiga titik ketinggian berbeda, yaitu 2.300mdpl, 2.500mdpl. Teknik pengambilan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode *purposive sampling*, yaitu penarikan sampel dengan pertimbangan tertentu. Pertimbangan tersebut didasarkan pada tujuan penelitian. Penentuan sampel menggunakan metode *purposive sampling* dengan kriteria perbedaan ketinggian dan keberadaan sampel pada masing-masing pengambilan sampel.

### Isolasi bakteri

Lima gram sampel daun tumbuhan berdaun jarum dipotong kecil dimasukkan dalam 500ml tabung Erlenmeyer berisi 200ml 0.1 M bufer fosfat dengan pH 7.0 dan 0.1% peptone (Difco) (Waturangi dan Amelia, 2009). Bufer fosfat pH 7.0 dibuat dari bahan 0,6g Monosodium Phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) dan 1,6g Disodium Phosphate Hepta Hydrate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Tabung Erlenmeyer yang berisi 200ml 0.1 M bufer fosfat dengan pH 7.0 dan 0.1% peptone (Difco) dan 5gr tumbuhan berdaun jarum dikocok pada *rotary shaker* selama 2 jam dengan kecepatan 150rpm. Setelah di-*shaker* kemudian dilakukan seri pengenceran hingga 10<sup>-3</sup> dengan 9ml aquades steril. Seri pengenceran diambil 0,1ml *dispread plate* pada media NA + 2,5% gliserol dan media King's B, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam (King et al., 1954). Koloni bakteri berbeda yang tumbuh di media NAG dan media King's B diambil dengan ose digores kembali pada media miring NAG dan media King's B.

### Uji aktivitas bakteri INA

Aktivitas bakteri INA ditentukan dengan menggunakan metode *tube-freezing*, yaitu memasukkan 100µl suspensi bakteri berumur 4-6 hari ke dalam supercool water (Lindow et al., 1978). Supercool water dibuat dengan mengisi 400µl buffer masing-masing ke microtube kemudian disimpan di dalam *circulating alcohol bath* pada suhu -10°C selama 30 menit. Bakteri pada agar miring diambil menggunakan ose kemudian dimasukkan dalam supercool water dan disimpan di dalam *circulating alcohol bath* pada suhu -5°C hingga -10°C selama 15 menit. Suatu isolat dianggap mengandung inti es aktif pada -5°C jika supercool water yang ditetesi suspensi bakteri membeku dalam waktu 15 menit (Govindarajan dan Lindow, 1988). Bakteri INA dikelompokkan menjadi tiga kelas, yaitu kelas A membentuk inti es pada suhu >-2°C hingga -5°C, kelas B aktif pada suhu -5°C hingga -7°C, kelas C aktif pada suhu -7°C hingga -10°C (Rugless et al., 1993).

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Jumlah Isolat Bakteri *Ice Nucleation Active* pada Sampel Tumbuhan Berdaun Jarum di Jalur Pendakian Cemoro Sewu

Bakteri INA diisolasi dari tumbuhan *Pinus mercusii* yang terdapat di dua ketinggian, yaitu 2.300 mdpl dan 2.500 mdpl. Media yang digunakan dalam isolasi bakteri INA adalah media King's B dan media NAG. Seluruh isolat diuji aktivitas nukleasi esnya menggunakan *circulating alcohol bath* selama 10 menit dengan suhu -5°C sampai suhu -10°C. Jumlah isolat flosfer yang didapat dari isolasi tumbuhan, *P. mercusii*, 25 isolat. Sejalan dengan pendapat Lindow (1990), bakteri INA umumnya mampu menginisiasi pembentukan inti es pada suhu di atas -10°C. Satu isolat positif bakteri INA yang diisolasi pada tumbuhan *P. mercusii* dapat dilihat di Tabel 1.

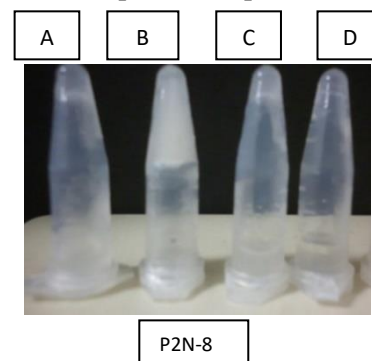
Tabel 1. Jumlah isolat bakteri yang diperoleh hasil isolasi dari daun jarum di jalur pendakian Cemoro Sewu Gunung Lawu

Stasiun	Jenis sampel dari tumbuhan berdaun jarum	Jumlah isolat flosfer yang diperoleh	Jumlah isolat positif INA	Kode isolat
1	<i>Pinus mercusii</i>	12	-	-
2	<i>Pinus mercusii</i>	13	1	P2N-8
	Jumlah	25	1	

Perolehan isolat yang positif bakteri INA lebih sedikit dari jumlah total isolat yang diisolasi, karena pada tahap pengenceran hanya mengambil 10µl sampel dalam larutan bufer 200ml untuk penanaman bakteri.

#### Aktivitas Bakteri INA pada Sampel Tumbuhan *P. mercusii* di Jalur Pendakian Cemoro Sewu

Aktivitas nukleasi es akan terlihat ketika suspensi bakteri yang berada di dalam *microtube* akan membeku setelah dimasukkan kedalam *circulating alcohol bath*. Isolat yang positif bakteri INA dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. B: Isolat P2N-8 menunjukkan adanya aktivitas nukleasi es. A, C, D: tidak menunjukkan aktivitas nukleasi es

Isolat yang dikategorikan bakteri INA adalah bakteri yang mempunyai aktivitas nukleasi es. Gambar 1 menunjukkan hanya ada satu isolat yang membeku, yaitu isolat P2N-8. Isolat yang tidak membeku menunjukkan tidak ada aktivitas nukleasi es pada isolat tersebut.



Isolat P2N-8 merupakan isolat dari *Pinus mercurii*. Rugless *et al* (1993) menjelaskan protein INA dibagi atas tiga kelas, yaitu kelas A, B, dan C. Kelas A membentuk inti es pada suhu  $>-2^{\circ}\text{C}$  hingga  $-5^{\circ}\text{C}$ , kelas B aktif pada suhu  $-5^{\circ}\text{C}$  hingga  $-7^{\circ}\text{C}$ , kelas C aktif pada suhu  $-7^{\circ}\text{C}$  hingga  $-10^{\circ}\text{C}$ . Isolat P2N-8 dari sampel *P. mercurii* diklasifikasikan dalam kelas C, karena isolat tersebut membeku pada suhu  $-10^{\circ}\text{C}$ .

Penelitian lain yang telah dilakukan di Indonesia menunjukkan bakteri INA berhasil diisolasi dari tanaman *Fragaria vesca* sebanyak 5 bakteri dan 10 bakteri INA berhasil diisolasi dari 7 spesies daun *Ficus thunbergi*, *Morinda citrifolia*, *Piper betle*, *Carica papaya*, *Allium fistulosum*, *Lactuca sativa*, dan *Fragaria vesca* (Waturangi dan Amelia, 2009).

#### SIMPULAN DAN SARAN

Bakteri INA yang berhasil diisolasi dari tumbuhan berdaun jarum di jalur pendakian Cemoro Sewu Gunung Lawu sebanyak 3 isolat. Isolat C1N-5 dan C1N-1 merupakan bakteri INA kelas B aktif pada suhu  $-5^{\circ}\text{C}$  hingga  $-7^{\circ}\text{C}$ , sedangkan isolat P2N-8 merupakan bakteri INA, kelas C aktif pada suhu  $-7^{\circ}\text{C}$  hingga  $-10^{\circ}\text{C}$ .

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang identifikasi bakteri INA supaya diketahui spesies bakteri INA pada tumbuhan berdaun jarum di jalur pendakian Cemoro Sewu Gunung Lawu.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Christner, B.C., Cai R., Morris C.E., McCarter K.S., Foreman C.M., Skidmore M.L., Montross S.N., and Sands D.C. 2008. Geographic, Seasonal, and Precipitation Chemistry Influence on The Abundance and Activity of Biological Ice Nucleators in Rain and Snow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 105 (48): 1-6.
- Edwards, A.R., Ronald, A., Wichman H.A., and Orser C.S. 1994. Unusual Pattern of Bacterial Ice Nucleation Gene Evolution. *Mol. Biol. Evol.* 11:911- 920.
- Govindarajan, A.G., and Lindow S.E. 1988. Size of Bacterial Ice Nucleation Sites Measured in Situ Low Radiation Inactivation Analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58: 1334-1338.
- King, E.O., Ward M.K., and Raney E.D. 1954. Two Simple Media for the Demonstration of Pyocyanin and Fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44: 301-307
- Lindow, S.E., Amy D.C., and Upper C.D. 1978. Distribution of Ice Nucleation-Active Bacteria on Plants in Nature. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 1-838.
- Lindow, S.E. 1990. Bacterial Ice nucleation Activity. p 428-434. In Z. Clement, K. Rudolph, and DC Sand (Ed). *Methods in Phytobacteriology*. Budapest: Academiai Kiado
- Lindow, S.E. and Brandl, M.T. 2003. Microbiology of the Phyllosphere. *Appl Environ Microbiol* 69:1875-1883.
- Morris, C.E. 2001. *Encyclopedia for Life Sciences*. Nature Publishing Group. London.
- Morris, C.E., Gergakopoulos D.G., and Sands D.C. 2004. Ice Nucleation Active Bacteria and Their Potential Role in Precipitation. *J. Phys. IV France* 121:87-103.
- Ruggles, J.A., Marshall M.N., and Fall R. 1993. Kinetics of Appearance and Disappearance of Classes of Bacterial Ice Nucleation Support and Aggregation Model for Ice Nucleus Assembly. *J. Bacteriol.* 175:7216-7221.
- Wahyudi, A.T. 1995. Pembentukan Inti Es oleh Bakteri. *Hayati*. 2:55-59.
- Waturangi, D.E., and Amelia T. 2009. Isolation, Characterization, and Genetic Diversity of Ice Nucleation Active Bacteria on Various Plants. *Hayati* 16 (2):54-58.