

**KARAKTER AMILOLITIK,
PROTEOLITIK DAN TOLERANSINYA TERHADAP SULFIDA
DARI BAKTERI FOTOSINTETIK ANOKSIGENIK**

Iman Rusmana dan Tri Widiyanto

Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Institut Pertanian Bogor
Puslitbang Limnologi, LIPI, Cibinong

ABSTRAK

Dari 27 isolat BFA yang diuji menunjukkan bahwa semua isolat tidak mempunyai aktivitas proteolitik pada semua kondisi inkubasi (anaerob terang, aerob terang, dan aerob gelap).

Hasil uji Amilolitik dari 27 isolat diperoleh 15 isolat yang menunjukkan adanya aktivitas amilolitik pada kondisi inkubasi aerob terang dan aerob gelap. Sedangkan pada inkubasi anaerob terang semua isolat tidak menunjukkan adanya aktivitas amilolitik.

Dari 18 isolat BFA yang diuji, 13 isolat dapat tumbuh pada medium SWC yang mengandung Na_2S 100 ug/ml. Ke-13 isolat tersebut lebih toleran terhadap sulfida dibandingkan isolat MW4.

Isolat IR1 lebih baik dalam mereduksi sulfida dibandingkan isolat MW4, karena pada isolat IR1 konsentrasi sulfida yang tersisa 0,650 ug/ml sedangkan isolat MW4 0,800 ug/ml.

PENDAHULUAN

Pada penelitian sebelumnya telah diperoleh 27 isolat BFA yang berdasarkan sifat-sifatnya dapat dipastikan merupakan kelompok bakteri ungu nonsulfur (*Rhodospirillaceae*).

Bakteri ungu nonsulfur merupakan bakteri yang mempunyai sistem metabolisme yang beragam seperti respirasi aerobik, fotoheterotrof, dan fotoautotrof pada kondisi anaerobik, serta respirasi anoksigenik. Selain itu bakteri ungu nonsulfur juga merupakan bakteri penambat N_2 yang hidup bebas (Robert dan Ludden, 1992).

Bakteri ungu nonsulfur pada umumnya memproduksi pigmen karotenoid merah - ungu. Perkembangan proses fotosintesis tergantung pada kemampuan sel untuk melakukan fotoasimilasi senyawa organik sederhana. Pada umumnya

bakteri ini membutuhkan bahan organik untuk pertumbuhannya dan dapat menggunakan energi cahaya untuk sintesis ATP (Drew dan Imhoff, 1991).

Produksi energi oleh bakteri ungu nonsulfur umumnya terjadi secara fotoheterotrof. Bakteri ini peka terhadap H_2S , pertumbuhannya dihambat oleh konsentrasi sulfida yang rendah secara anaerobik fototrofik. Menurut Brock dan Madigan (1991), bakteri ini disebut bakteri ungu nonsulfur karena bakteri ini tidak dapat menggunakan sulfida sebagai donor elektron untuk mereduksi CO_2 menjadi bahan organik.

Beberapa spesies bakteri ungu nonsulfur dapat hidup pada kondisi anaerob tanpa cahaya dengan melakukan metabolisme fermentatif. Beberapa bakteri ini juga dapat menggunakan metanol sebagai satu-satunya sumber karbon pada pertumbuhan fototrofik (Brock dan Madigan, 1991). Pada penelitian ini dilakukan seleksi kemampuan amilolitik, proteolitik dan toleransinya terhadap sulfida beberapa isolat BFA hasil isolasi.

METODE PENELITIAN

Uji Aktivitas Amilolitik

Uji kemampuan amilolitik ini dilakukan duplo dan diinkubasi pada tiga kondisi yaitu kondisi anaerobik di depan cahaya lampu, aerobik didepan cahaya lampu, dan aerobik pada kondisi gelap. Medium yang digunakan adalah medium agar cawan SWC yang diberi pati/amilum.

Masing-masing isolat BFA hasil isolat ditotolkan menggunakan tusuk gigi steril ke medium agar cawan yang telah disiapkan sebelumnya. Setelah diinkubasi selama tujuh hari, permukaan medium agar cawan diberi larutan yodium. Diameter koloni dan zona bening yang terbentuk diukur dan kemampuan aktivitas amilolitiknya ditentukan berdasarkan nilai indeks amilolitik (NIA) yang dihitung dengan menggunakan rumus:

Diameter Zona Bening

$$NIA = \frac{\text{Diameter Zona Bening}}{\text{Diameter Koloni}}$$

Diameter Koloni

Uji aktivitas Proteolitik

Uji kemampuan Proteolitik ini dilakukan duplo dan diinkubasi pada tiga kondisi yaitu kondisi anaerobik di depan cahaya lampu, aerobik didepan cahaya lampu, dan aerobik pada kondisi gelap. Medium yang digunakan adalah medium agar cawan SWC yang diberi susu skim.

Masing-masing isolat BFA hasil isolat ditotolkan menggunakan tusuk gigi steril ke medium agar cawan yang telah disiapkan sebelumnya. Setelah diinkubasi selama tujuh hari, diameter koloni dan zona bening yang terbentuk diukur dan kemampuan aktivitas proteolitiknya ditentukan berdasarkan nilai indek proteolitik (NIP) yang dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{NIA} = \frac{\text{Diameter Zona Bening}}{\text{Diameter Koloni}}$$

Uji Toleransi terhadap Sulfida

Uji toleransi terhadap sulfida dilakukan duplo dengan menggunakan tabung reaksi bertutup ulir yang terisi penuh medium cair SWC 100 % steril. Secara aseptik, pada masing-masing medium ditambahkan Na_2S sehingga konsentrasi akhirnya 0, 10, 50, dan 100 ug/ml.

Isolat BFA yang telah disiapkan sebelumnya diinokulasikan pada masing-masing tabung uji sebanyak 100 ul. Inkubasi dilakukan di depan lampu tungsten 40 Watt dengan jarak 30 cm. Pertumbuhan BFA diamati secara visual setelah diinkubasi selama 7 hari.

Beberapa isolat yang toleran diukur kemampuannya dalam mereduksi sulfida dengan menggunakan pembanding isolat MW4.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Uji Amilolitik dan Proteolitik

Hasil uji amilolitik dan proteolitik dari isolat-isolat BFA hasil seleksi dapat dilihat pada Tabel 1 .

Dari 27 isolat BFA yang diuji menunjukkan bahwa semua isolat tidak mempunyai aktivitas proteolitik pada semua kondisi inkubasi (anaerob terang, aerob terang, dan aerob gelap). Hal ini bukan berarti bahwa isolat-isolat tersebut tidak mempunyai enzim protease, karena mungkin saja isolat-isolat tersebut hanya mempunyai enzim protease intrasuler.

Tabel 1. Hasil Uji Amilolitik dan Proteolitik Isolat-Isolat BFA.

No	Sandi Isolat	Amilolitik			Proteolitik		
		Anaerob terang	Aerob terang	Aerob gelap	anaerob terang	Aerob terang	Aerob gelap
1	IR 1	-	+	+	-	-	-
2	IR 2	-	+	+	-	-	-
3	IR 3	-	-	-	-	-	-
4	IR 4	-	-	-	-	-	-
5	IR 5	-	-	-	-	-	-
6	IR 7	-	+	+	-	-	-
7	IR 8	-	-	-	-	-	-
8	IR 9	-	-	-	-	-	-
9	IR 10	-	-	-	-	-	-
10	IR 11	-	-	-	-	-	-
11	IR 12	-	-	-	-	-	-
12	IR 13	-	+	+	-	-	-
13	IR 14	-	-	-	-	-	-
14	IR 16	-	+	+	-	-	-
15	IR 17	-	+	+	-	-	-
16	IR 18	-	+	+	-	-	-
17	IR 19	-	+	+	-	-	-
18	RUS11	-	+	+	-	-	-
19	RUS12	-	+	+	-	-	-
20	RUS 13	-	+	+	-	-	-
21	RUS 21	-	+	+	-	-	-
22	RUS22	-	+	+	-	-	-
23	RUS 23	-	+	+	-	-	-
24	RUS24	-	+	+	-	-	-
25	RUS3 1	-	-	-	-	-	-
26	RUS32	-	-	-	-	-	-
27	RUS33	-	-	-	-	-	-

Hasil uji Amilolitik dari 27 isolat diperoleh 15 isolat yang menunjukkan adanya aktivitas amilolitik pada kondisi inkubasi aerob terang

dan aerob gelap. Ke 15 isolat tersebut adalah IR1, IR2, IR7, IR13, IR16, IR17, IR18, IR19, RUS11, RUS12, RUS13, RUS21, RUS22, RUS23, dan RUS24. Sedangkan pada inkubasi anaerob terang semua isolat tidak menunjukkan adanya aktivitas amilolitik. Hal ini disebabkan karena pada kondisi anaerob terang, isolat-isolat BFA tersebut melakukan proses fotosintesis anoksigenik.

Nilai indeks amilolitik dari 15 isolat yang mempunyai aktivitas amilolitik dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Nilai Indeks Proteolitik 15 Isolat BFA yang Mempunyai Aktivitas Amilolitik.

NO	Sandi Isolat	Aerob Terang	Aerob Gelap
1	IR1	3	2,7
2	IR2	2,4	3,3
3	IR7	1,2	1,1
4	IR13	1,1	1,1
5	IR16	1,2	1,1
6	IR17	1,1	1,1
7	IR18	1,1	1,1
8	IR19	1,1	1,2
9	RUS11	1,1	1,1
10	RUS12	1,2	1,1
11	RUS13	1,1	1,1
12	RUS21	2,5	2,0
13	RUS22	2,1	1,8
14	RUS23	3,3	3,1
15	RUS24	2,2	1,8

Dari hasil di atas terlihat bahwa tidak terlihat perbedaan yang nyata nilai indeks proteolitiknya dari kedua macam inkubasi tersebut (Aerob terang dan aerob gelap). Ada enam isolat yang nilai indeks amilolitiknya mencapai lebih dari dua yaitu isolat : IR1, IR2, RUS21, RUS22, RUS23, dan RUS24. Diharapkan isolat-isolat yang mempunyai nilai indeks proteolitik yang besar dapat mendegradasi amilum/pati dengan baik, sehingga apabila isolat-isolat BFA tersebut diaplikasikan ditambak udang maka dapat mengurangkan kadar bahan organik terlarut di air tambak.

Toleransi terhadap Sulfida

Sebagian besar mikroorganisme menggunakan sulfat sebagai sumber sulfur untuk mensintesis bahan organik sulfur (R-SH) (Atlas dan Bartha, 1987 ; Brock dan Madigan, 1991). Pada sintesis bahan organik sulfur ini, sulfat terlebih dahulu direduksi menjadi sulfida dan kemudian dibentuk menjadi bahan organik sulfur. Sebagian besar organisme tidak dapat menggunakan sulfida secara langsung karena sifat H_2S yang sangat toksik (Atlas dan Barta, 1987).

Bakteri ungu nonsulfur umumnya peka terhadap sulfida dan tidak dapat menggunakan sulfida sebagai donor elektron untuk proses fotosintesis anoksigeniknya. Akan tetapi ada beberapa galur yang dapat menggunakan sulfida sebagai donor elektronnya (Brock dan Madigan, 1991). *Rhodobacter marinus* merupakan salah satu bakteri ungu nonsulfur asal laut yang sangat peka terhadap sulfida (Burgess *et al.*, 1994). Sebaliknya *Rhodovulum sulfidophilum* (*Rhodobacter sulfidophilus*) merupakan bakteri ungu nonsulfur asal laut yang dapat menggunakan sulfida sebagai donor elektronnya (Heising, *et al.*, 1996).

Dari 18 isolat BFA yang diuji, 13 isolat dapat tumbuh pada medium SWC yang mengandung Na_2S 100 ug/ml. Ke-13 isolat tersebut lebih toleran terhadap sulfida dibandingkan isolat MW4 (Tabel 3). Menurut Widiyanto (1996), isolat MW4 mampu menurunkan H_2S sampai 59 %, oleh karena itu ke 13 isolat itu diharapkan mampu mengurangi konsentrasi H_2S diperairan lebih baik dari pada isolat MW4.

Sebanyak 2 isolat dan satu isolat Pembanding (MW4) diukur kemampuan mereduksi sulfida dengan menggunakan alat HACH Spektrofotometer. Konsentrasi awal Na_2S yang diberikan adalah 50 ug/ml, dan setelah diinkubasi empat hari maka konsentrasi sulfida yang ada seperti yang tercantum pada Tabel 4.

Tabel 3. Toleransi Isolat- Isolat BFA terhadap Sulfida

No	Sandi Isolat	Kadar Na ₂ S (ug/ml)			
		0	10	50	100
1	MW4	++	+	+	-
2	IR1	++	++	+	-
3	IR2	++	++	++	++
4	IR3	++	++	++	++
5	IR4	++	++	++	++
6	IR6	++	++	++	++
7	IR7	++	++	++	++
8	IR8	++	++	++	++
9	IR9	++	++	++	+
10	IR10	++	++	++	++
11	IR11	++	++	++	+
12	IR12	++	++	++	++
13	IR13	++	++	++	++
14	IR14	++	++	++	-
15	IR16	++	++	++	-
16	IR17	++	++	++	-
17	IR18	++	++	++	++
18	IR19	++	++	++	+

Tabel 4. Konsentrasi Sulfida setelah Diinkubasi empat Hari.

No	Sandi Isolat	Konsentrasi sulfida (ug/ml)		
		Ulangan 1	Ulangan 2	Rata-Rata
1	MW4	0,775	0,525	0,650
2	IR1	0,850	0,950	0,800
3	IR13	1,475	1,375	1,425

Dari hasil di atas terlihat bahwa isolat IR1 lebih baik dalam mereduksi sulfida dibandingkan isolat MW4, karena pada isolat IR1 konsentrasi sulfida yang tersisa 0,650 ug/ml sedangkan isolat MW4 0,800 ug/ml. Oleh karena itu apabila diaplikasikan diharapkan isolat IR1 lebih baik dari MW4 dalam mereduksi sulfida perairan.

KESIMPULAN

Dari 27 isolat BFA yang diuji menunjukkan bahwa semua isolat tidak mempunyai aktivitas proteolitik pada semua kondisi inkubasi (anaerob terang, aerob terang, dan aerob gelap).

Hasil uji Amilolitik dari 27 isolat diperoleh 15 isolat yang menunjukkan adanya aktivitas amilolitik pada kondisi inkubasi aerob terang dan aerob gelap. Sedangkan pada inkubasi anaerob terang semua isolat tidak menunjukkan adanya aktivitas amilolitik.

Dari 18 isolat BFA yang diuji, 13 isolat dapat tumbuh pada medium SWC yang mengandung Na₂S 100 ug/ml. Ke-13 isolat tersebut lebih toleran terhadap sulfida dibandingkan isolat MW4.

Isolat IR1 lebih baik dalam mereduksi sulfida dibandingkan isolat MW4, karena pada isolat IR1 konsentrasi sulfida yang tersisa 0,650 ug/ml sedangkan isolat MW4 0,800 ug/ml.

DAFTAR PUSTAKA

- Atlas, R.M. and R. Bartha. 1987. Microbial Ecology, Fundamental and Application. The Benjamin/Cumming Publ. Co. California.
- Brock, T.D. and M.T. Madigan. 1991. Biology of Microorganisms. Prentice Hall. New Jersey.
- Fuhrman, J.A., K. Mc Callum, and A.A. Davis. 1993. Phylogenetic diversity of surface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific oceans. Appl. Environ. Microbiol. 59:1294-1302
- Lee, J.K. and S. Kaplan. 1992. Molecular genetic of elements involve in oxygen and light control of *puc* operon transcription in *Rhodobacter sphaeroides*. J. Bacteriol. 174:1505-1514.
- Mandelstam, J., J. K. Mc Quillen and I. Dawes. 1986. Biochemistry of Bacterial Growth. Blackwell Scientific Publication. Oxford.
- Neidle, E.L. and S. Kaplan. 1993. Expression of the *Rhodobacter sphaeroides* *hemA* and *hemT* genes, encoding two amino levulinic acid synthase isozyme. J. Bacteriol. 173:2292-2303.
- Overman, J., S. Lehmann and N. Pfennig. 1991. Gas vesicle formation and buoyancy regulation in *Pelodyctyon phaeoelatitiforme* (green sulfur bacteria). Arch. Microbiol. 157:29-37.

Pfennig, N. and H.G. Truper. 1989. Anoxygenic phototrophic bacteria. In J.T. Staley, M.P. Bryant, N. Pfennig, and J.G. Holt. Eds. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology. William and Wilkins. Baltimore.

Robert, G.P. and P.W. Ludden. 1992. Nitrogen fixation by photosynthetic bacteria. In G. Stacey, R.H. Burris, and H.J. Evans. Eds. Biological Nitrogen Fixation. Chapman and Hall Inc. USA. P. 135-165.

Van Der Werf, M.J. and J.G. Zeikus. 1996. Amino levulinate production by *Eschechia coli* containing the *Rhodobacter sphaeroides hema* gene. Appl. Environ. Microbiol. 62:3560-3566.

Widiyanto, T. 1996. Bakteri Fotosintetik Anoksigenik sebagai Biokondisioner di Tambak Udang: Pengurangan produksi H₂S dan Pengaruhnya pada Pertumbuhan *Vibrio harveyi*. Tesis S2 Program Pascasarjana IPB. Bogor.