

PENYIMPANAN ISOLAT BAKTERI FOTOSINTETIK ANOKSIGENIK DALAM GLISEROL PADA KONSENTRASI DAN SUHU YANG BERBEDA

M. Badjoeri , Tri Widiyanto dan Vidya Indarwati

PENDAHULUAN

Bakteri fotosintetik anoksigenik (BFA) termasuk kelompok bakteri fototrofik karenanya kelompok bakteri ini bila masih ada sumber cahaya dapat melakukan fotosintesis tanpa menggunakan H_2O sebagai sumber elektron sehingga dalam proses tersebut tidak dihasilkan oksigen, namun dalam keadaan tidak ada cahaya (gelap) bakteri ini akan melakukan proses fermentasi atau respirasi anaerobik. Beberapa jenis BFA bersifat autotrof yaitu menggunakan CO_2 sebagai sumber karbon dan H_2S atau senyawa sulfur tereduksi lainnya sebagai reduktan. (Brock dan Madigan, 1991 dalam Widiyanto, 1996).

Menurut Imhoff (1988) dan Pfennig (1977) kelompok BFA banyak ditemukan dan hidup pada berbagai habitat perairan, baik perairan tawar maupun perairan laut. BFA juga ditemukan pada habitat yang mempunyai pH, salinitas dan suhu yang ekstrim seperti perairan asam atau perairan basa, sumber mata air panas dan danau "arctic", beberapa jenis BFA juga berhasil diisolasi dari sampel tanah. Namun demikian habitat normalnya ialah BFA hidup pada perairan yang masih terdapat intensitas cahaya (zona fotik), banyak mengandung H_2S dan kandungan oksigen rendah.

Kelompok bakteri fotosintetik anoksigenik karena kemampuan aktivitas metabolismenya mempunyai peranan ekologi yang cukup penting dalam lingkungan perairan, seperti sebagai produsen primer karena kemampuannya melakukan fotosintesis, menurunkan kandungan senyawa H_2S yang bersifat toksik karena mampu mereduksi senyawa H_2S . Bahkan kemampuan aktivitas metabolisme BFA telah dimanfaatkan sebagai biokontrol, seperti untuk menekan pertumbuhan bakteri *Vibrio harveyi* penyebab penyakit pada udang (invitro) dan menekan terjadinya blooming plankton (Atlas dan Bartha, 1987; Tjahjadi *et al*, 1994). BFA dilaporkan juga mampu menekan kematian larva udang windu yang terserang bakteri *Vibrio harveyi* (Widiyanto, 1996).

Suhu merupakan salah satu faktor yang penting dalam kehidupan mikroorganisme, beberapa mikroorganisme dapat hidup pada daerah rentang suhu yang sangat luas sedang jenis lainnya pada daerah rentang suhu yang sempit (terbatas), sehingga setiap jenis mikroorganisme mempunyai nilai suhu minimum, optimum dan maksimum. Berdasarkan kemampuan bakteri untuk hidup dan tumbuh terhadap daerah rentang suhu, maka bakteri digolongkan atas 3 golongan yaitu: bakteri golongan psikofil (kryofil) dapat tumbuh pada habitat habitat yang dingin dengan rentang suhu antara 0 °C - 30 °C dengan suhu optimumnya 15 °C. Bakteri golongan mesofil tumbuh pada daerah dengan rentang suhu 15 °C - 55 °C dengan suhu optimumnya 25 °C - 37 °C dan bakteri golongan termofil tumbuh pada daerah dengan rentang suhu 40 °C - 75 °C dengan suhu optimumnya 55 °C - 60 °C (Suriawiria, 1993).

Kematian bakteri pada suhu rendah disebabkan oleh terjadinya perubahan keadaan koloidal protoplasma yang tidak reversibel. Penurunan suhu yang mendadak hingga melewati batas titik beku dapat menyebabkan kematian bakteri, akan tetapi jika penurunan suhu dilakukan secara perlahan-lahan (bertingkat) hanya akan menyebabkan bakteri menjadi dorman, dimana kegiatan metabolisme bakteri berhenti untuk sementara. Proses penurunan suhu dibawah titik beku dan didalam hampa udara secara bertingkat, sering digunakan untuk mengawetkan isolat bakteri, yang disebut dengan proses lyofilisasi.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan hidup bakteri fotosintetik anoksigenik (BFA) yang disimpan dalam gliserol pada suhu dibawah titik beku. Sasarannya ialah untuk mendapatkan teknik pengawetan isolat BFA pada suhu rendah.

BAHAN DAN METODE

Telah dilakukan penelitian kemampuan hidup dari 2 isolat BFA yang disimpan pada suhu yang berbeda (-15 °C dan -20 °C) dalam gliserol dengan konsentrasi berbeda (15%, 25% dan 35%). Penelitian ini dilakukan di laboratorium mikrobiota Puslitbang Limnologi-LIPI, selama 3 bulan (November 1997 - Februari 1998).

Pembuatan media SWC

Komposisi media Sea Water Complete (SWC), yaitu

Bahan	Jumlah
1. Bakto pepton	5 gram
2. Ekstrak yeast	1 gram
3. Gliserol	3 gram
4. Aquadest	250 ml
5. Air laut (30 promil)	750 ml
6. Bakto agar	15 gram

Disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C pada tekanan 1 atm selama 20 menit.

Pengayaan isolat BFA

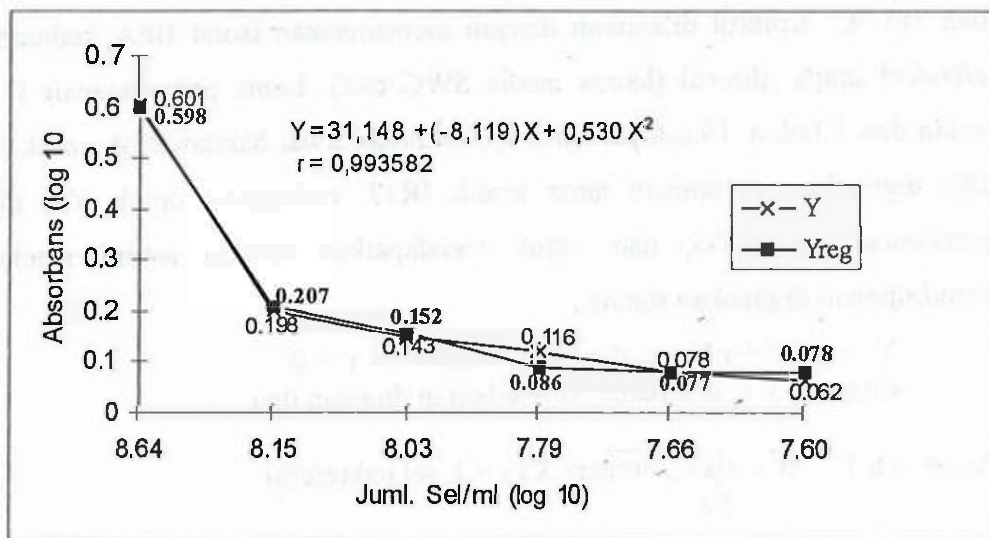
Isolat yang akan digunakan ditumbuhkan dalam media SWC cair (100%) sebanyak 15 ml dalam tabung reaksi bertutup ulir, isolat diinkubasi selama 2 hari pada suhu ruang.

Pembuatan grafik standar pertumbuhan BFA

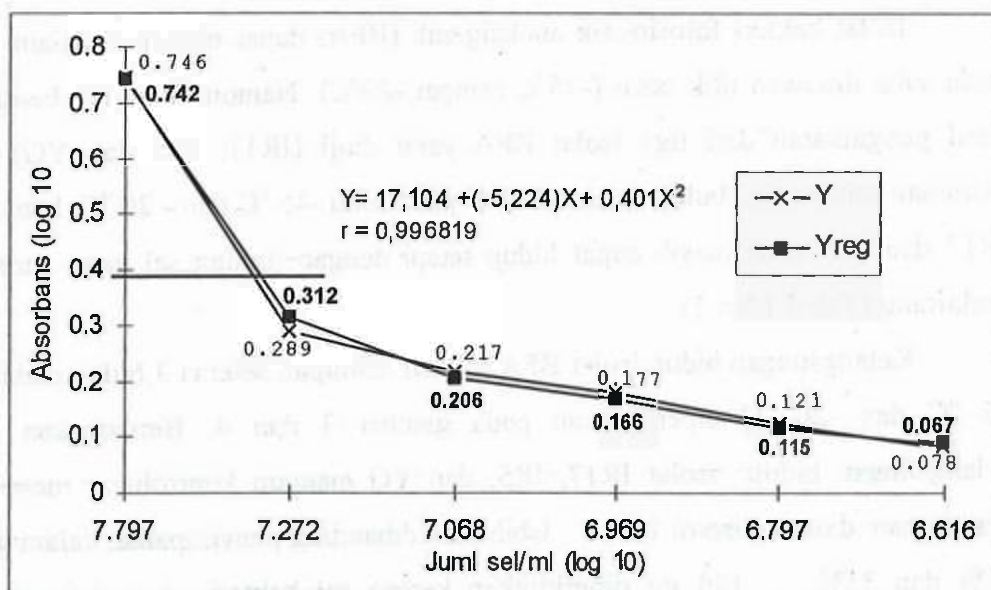
Untuk mengetahui jumlah populasi bakteri awal yang di inokulasikan dalam gliserol, dilakukan langkah-langkah berikut : pembuatan ratio (perbandingan) antara isolat BFA: Media SWC cair, ratio yang dibuat yaitu 1:1, 1:5, 1:10, 1:15 dan 1:18. Selanjutnya dilihat absorbansinya dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 620 nm. Sedangkan untuk menghitung populasi BFA dilakukan penanaman (inokulasi) dalam media SWC agar secara merata sebanyak 25 µl dengan teknik cawan sebar, duplo, dengan pengenceran dari 10^{-3} sampai 10^{-6} . Diinkubasi selama 24-48 jam dalam inkubator pada suhu 37°C. Selanjutnya koloni bakteri yang tumbuh dihitung dengan menggunakan *counter* yang jumlahnya 30 - 300 koloni. Untuk menghitung jumlah sel BFA/ ml digunakan rumus :

$$\text{Juml sel/ml} = (1000/\text{volume bakteri yang diinokulasi}) \times \text{Jumlah koloni yang tumbuh} \times \text{pengenceran.}$$

Selanjutnya dibuat korelasi dan regresi kuadratik antara jumlah sel/ml dengan absorbansinya, dengan persamaan garis $Y = a + b X + c X^2$. Gambar 1 dan 2 memperlihatkan grafik regresi kuadratik bakteri BFA (YG dan IR17).



Gambar 1. Grafik regresi kuadratik Bakteri fotosintetik anoksigenik (IR 17)



Gambar 2. Grafik regresi kuadratik Bakteri fotosintetik anoksigenik (YG)

Penyimpanan Isolat BFA

Isolat BFA (IR5, IR17 dan YG) yang sudah murni dibiakan dalam media SWC cair selama 2 hari , kemudian dilihat absorbansnya (ratio= 1:1) dengan menggunakan spektrofotometer pada gelombang 620 nm (untuk mengetahui jumlah populasi BFA awal yang ditanam), Absorbans YG = 0,586; IR17 = 803; dan IR5= 1,235 selanjutnya biakan dimasukan kedalam tabung efendorf sebanyak 1 ml yang berisi gliserol 15%, 25% dan 35%, dengan pengencer larutan air laut : aquadest = 3:1. Biakan dalam tabung efendorf di homogenisasi dengan menggunakan fortex selama 1-2 menit. Biakan dalam efendorf disimpan dalam lemari es pada suhu -20 °C

dan -15 °C. Kontrol dilakukan dengan memamsukan isolat BFA kedalam tabung efendorf tanpa gliserol (hanya media SWC cair). Lama penyimpanan 1 bulan, 2 bulan dan 3 bulan. Untuk penghitungan populasi awal bakteri BFA untuk IR17 dan IR5 digunakan persamaan garis grafik IR17, sedangkan untuk YG digunakan persamaan garis YG, dan untuk mendapatkan jumlah sel/ml setelah masa penyimpanan digunakan rumus :

$$Y = aX^2 + bX + c, \text{ dan } aX^2 + bX + c - Y = 0$$

dimana: Y = absorbans BFA sebelum ditanam dan

$$X_{1,2} = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}, \text{ dimana } X_{1,2} = \Sigma \text{ sel bakteri/ml}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat bakteri fotosintetik anoksigenik (BFA) dapat disimpan dalam gliserol pada suhu dibawah titik beku (-15°C sampai -20°C). Namun demikian berdasarkan hasil pengamatan dari tiga isolat BFA yang diuji (IR17, IR5 dan YG) setelah disimpan selama tiga bulan dalam gliserol pada suhu -15 °C dan - 20 °C, hanya isolat IR17 dan IR5 yang masih dapat hidup tetapi dengan jumlah sel yang sudah jauh berkurang (Tabel 1 dan 2).

Kelangsungan hidup isolat BFA setelah disimpan selama 3 bulan pada suhu - 15 °C dan -20 °C diperlihatkan pada gambar 3 dan 4. Berdasarkan tingkat kelangsungan hidup isolat IR17, IR5, dan YG maupun kontrolnya, menunjukan penyimpan dalam gliserol 15% lebih baik dibanding penyimpanan dalam gliserol 25% dan 35%. Hal ini diperkirakan karena sel bakteri yang disimpan pada konsentrasi gliserol 15 % masih dapat bertahan lebih baik. Isolat BFA IR17 bahkan hanya bertahan disimpan selama 1 bulan pada gliserol 35% baik pada suhu -15 °C maupun -20°C, sedangkan IR5 dan YG setelah disimpan selama 1 bulan pada gliserol 35% selnya sudah mati, hal ini diduga konsentrasi gliserol 35% terlalu pekat untuk menyimpan sel bakteri sehingga sel bakteri setelah 1 bulan disimpan akan mengalami kerusakan karena terganggunya proses metabolisme basal. Menurut Suriawira (1993) suhu rendah dapat menyebabkan terganggunya metabolisme sel bakteri akan tetapi tergantung dari jenis, suhu dan cara perlakuan. Kematian bakteri pada suhu rendah karena terjadinya perubahan keadaan koloidal protoplasma yang tidak reversibel, kematian biasanya dikarenakan penurunan suhu yang tiba-tiba.

Tabel 1. Jumlah populasi BFA (sel/ml) setelah disimpan selama 3 bulan pada suhu -15 °C

ISOLAT BFA	GLISEROL	POPULASI AWAL (Sel/ml)	Populasi sel akhir (sel/ml) setelah penyimpanan			Persentasi kelangsungan hidup (%) setelah penyimpanan		
			1 bulan	2 bulan	3 bulan	1 bulan	2 bulan	3 bulan
IR 17	15 %	7,04X 10 ⁸	4,52x 10 ⁸	5,78 x 10 ⁷	3,39 x 10 ⁹	64.20	8.21	0.48
	25 %		3,67x10 ⁸	7,53 x 10 ⁶	6,47 x 10 ⁶	52.13	1.07	0.92
	35 %		1,02x 10 ⁶	0	0	0.14	0	0
	KONTROL		8,82 x 10 ⁶	6,65 x 10 ⁶	4,23 x 10 ⁵	1.25	0.94	0.06
IR 5	15 %	1,42X 10 ⁹	3,16x 10 ⁸	2,26 x 10 ⁸	4,04x 10 ⁴	22.25	15.92	28.45
	25 %		7,8x10 ⁷	3,2x10 ⁷	2,38 x 10 ⁸	5.49	2.25	16.76
	35 %		0	0	0	0	0	0
	KONTROL		2,8x10 ⁵	6,4x10 ⁷	7 x 10 ⁷	0.02	4.51	4.93
YG	15 %	2,62 X 10 ⁵	2,6x 10 ³	0	0	99.24	0	0
	25 %		8x10 ⁴	0	0	30.53	0	0
	35 %		0	0	0	0	0	0
	KONTROL		1,6 x 10 ⁵	0	0	61.07	0	0

Tabel 2. Jumlah populasi BFA (sel/ml) setelah disimpan selama 3 bulan pada suhu -20 °C

ISOLAT BFA	[GLISEROL]	POPULASI AWAL (Sel/ml)	Populasi sel akhir (sel/ml) setelah penyimpanan			Persentasi kelangsungan hidup (%) setelah penyimpanan		
			1 bulan	2 bulan	3 bulan	1 bulan	2 bulan	3 bulan
IR 17	15 %	7,04X 10 ⁸	6,70 x 10 ⁸	4,28 x 10 ⁷	2,89 x 10 ⁹	95.17	6.08	0.41
	25 %		3,97x 10 ⁸	9,56 x 10 ⁶	7,07x 10 ⁶	56.39	1.36	1.00
	35 %		3,12x10 ⁶	0	0	0.44	0	0
	KONTROL		5,72x10 ⁶	5,35x10 ⁶	3,13 x 10 ⁵	0.81	0.76	0.04
IR 5	15 %	1,42X 10 ⁹	2x10 ⁸	2,26 x 10 ⁸	3,56 x 10 ⁸	14.08	15.92	25.07
	25 %		9,8x10 ⁷	8,6 x 10 ⁷	2,66 x 10 ⁸	6.90	6.060	18.73
	35 %		3,4x 10 ⁵	0	7,8 x 10 ⁷	0.02	0	5.48
	KONTROL		3,4x10 ⁵	0	0	0.02	0	0
YG	15 %	2,52X 10 ⁵	8x10 ⁴	0	0	30.53	0	0
	25 %		0	0	0	0	0	0
	35 %		0	0	0	0	0	0
	KONTROL		4 x 10 ⁴	0	0	15.27	0	0

Kematian isolat IR5 dalam gliserol 35% pada suhu -15 °C dan isolat YG dalam gliserol 25% dan 35% pada suhu -20 °C sebelum penyimpanan selama 1 bulan, diduga karena terjadinya penurunan suhu yang mendadak sehingga cairan sel membeku. Sedangkan penurunan populasi yang sangat cepat (drastis) pada sel BFA kontrol dikarenakan media SWC sudah membeku pada suhu -15 °C dan -20 °C dan sel Isolat tidak siap untuk aktivitas fisiologis sehingga mati, sehingga penyimpanan isolat BFA pada suhu rendah harus dilakukan secara bertingkat dan diharapkan sel bakteri sempat melakukan adaptasi terhadap perubahan suhu lingkungannya. Proses penurunan suhu sampai dibawah titik beku dan dalam keadaan hampa udara secara bertingkat digunakan untuk proses lyofilisasi (pengawetan sel pada suhu rendah dan hampa), pada proses lyofilik ini sangat mudah menarik cairan sel dan tidak

menyebabkan denaturasi protein karena molekul air protoplasma langsung diubah menjadi uap air tanpa melalui fasa cair (sublimasi), (Suriawira, 1993).

KESIMPULAN

1. Penyimpanan isolat BFA dalam gliserol dalam konsentrasi 15 % pada suhu -15°C dan -20 °C lebih baik dibandingkan pada konsentrasi gliserol 25% dan 35%.
2. Penyimpanan isolat BFA pada konsentrasi gliserol 25% dan 35% sebaiknya dilakukan tidak lebih dari 1 bulan.
3. Isolat IR5 adalah isolat yang paling tahan setelah disimpan selama 3 bulan dalam gliserol 15% pada suhu -15 °C dengan kelangsungan hidup mencapai 28,45%.

DAFTAR PUSTAKA

- Atlas, R.M. and R. Bartha, 1987 *Microbial Ecology, Fundamentals and Applications*. The Benjamin/Cummings Publ. Co. Menlo Park. California.
- Imhoff, J.F. 1988. Anoxygenic Phototrophic Bacteria . *in* *Methods in Aquatic Bacteriology*. Austin, B. (Ed). A. wiley-interscience Publication. New York. p. 207-239.
- Pfennig, N. 1977. Phototrophic green dan purple bacteria: A Comparative Systematic Survey. *Annual Review of Microbiology*, p. 275-297.
- Tjahjadi, R.M., S.L. Angka, and A. Suwanto. 1994. Isolation and Evaluation of Marine Bacteria for Biocontrol of Luminous Bacterial Disease in Tiger Shrimp Larvae (*Penaeus monodon* Fab.). *Aspac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 2:347-352.
- Suriawira, U. 1993. *Mikrobiologi Air dan Dasar-dasar Pengolahan Limbah Buangan Secara Biologis*. Penerbit Alumni. Bandung. 329 hal.
- Widiyanto, T. 1996. Bakteri Fotosintetik Anoksigenik Sebagai Biokondisioner di Tambak Udang : Pengurangan Produksi H₂S dan Pengaruhnya pada Pertumbuhan *Vibrio harveyi*. Program Pasca Sarjana. IPB. Bogor. 68 hal.