

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI TERMOFILIK PEREDUKSI SULFAT DI AIR PANAS SARONGSONG KOTA TOMOHON

Dany Posumah^{1*}, Dewianti A.Rondonuwu²

^{1,2} Prodi Ilmu Biologi FMIPA Universitas Negeri Manado

*E-mail: danyposumah@unima.ac.id

ABSTRACT

Sulfate Reducing bacteria play a role in biodegradation of land contaminated. These bacteria can be found in geothermal areas rich in sulfur content, as well as in the hot spring location of Tomohon city sarongsong. The existence of this type of sulphate reducing bacteria in this area has not been widely known, so it needs to be isolated and identification of microbes. Identification based on phenotype character has to be done to knowing the type of bacteria. The objective of this research is to get some isolate of sulfate reducing bacteria in clear water, cloudy water and mud in Tomohon hot spring water location. The identification was used profile matching method. The sulfate reducing thermophilic bacteria was isolated from the Tomohon Sarongsong hot spring location using the modified postgate b liquid medium and then purified by dilution method. Phenotypic characteristics of sulfate reducing thermophilic bacteria isolates tested included colony morphology, cell morphology and biochemical character. The result of isolation at Sarongsong hot spring obtained 4 isolates of sulfate reducing thermophilic bacteria seen from color change on selective media. Based on the identification using the profile matching method showed that the four isolates were suspected to be included in the members of the genus *Desulfotomaculum* (isolates of AK4D3 and L4D1), genus *Desulfomicrobium* (isolate AJ4D5) and genus *Desulfobulbus* (isolate L5D2).

Keywords: *Characteristic; Identification; Isolation; Phenotypic.*

PENDAHULUAN

Bakteri pereduksi sulfat (BPS) merupakan salah satu bakteri yang memanfaatkan senyawa anorganik sebagai elektron donor atau elektron akseptor dalam aktivitas metabolismenya. Bakteri jenis ini memanfaatkan ion sulfur dalam bentuk sulfat dan tiosulfat sebagai akseptor elektron terminal dalam respirasi metabolismenya, yang kemudian direduksi menjadi sulfida. Spesies bakteri pereduksi sulfat paling banyak ditemukan di dalam sedimen laut karena kandungan sulfat cukup tinggi (Muchamad *et al.*, 2009).

Bakteri pereduksi sulfat memiliki banyak peranan untuk mengurangi tingkat pencemaran lingkungan seperti mereduksi sulfat terlarut yang bisa memulihkan tingkat keasaman badan air menjadi pH 6-7, memicu terjadinya pengendapan logam berat sehingga akan menghilangkan pencemaran logam berat yang terlarut dalam perairan (Fahhrudin dan Abdullah, 2013). Bakteri ini efektif digunakan dalam proses bioremediasi tanah bekas tambang batubara. Bioremediasi tanah menggunakan BPS akan sangat membantu kegiatan rehabilitasi lahan bekas tambang (Widyati, 2007).

Di desa Sarongsong terdapat salah satu lumbung mikroba yang memiliki sumber daya alam

yang bermanfaat yaitu mata air panas bumi yang dijadikan sebagai tempat pemandian air panas untuk masyarakat yang berada disekitar, berdekatan dengan lokasi kegiatan usaha pertamina *geothermal energy*.

Karakteristik air panas Sarongsong terlihat dari warna airnya yang keruh dan berbau telur busuk yang merupakan indikator adanya gas hidrogen sulfida (H_2S) (Casey *et al.*, 2006 dalam Taroreh *et al.*, 2015). Kehadiran sulfat di daerah itu juga dibuktikan dengan hasil pengukuran kadar sulfat di dua titik (LHD-05 dan LHD-23) di geothermal Lahendong yang berjarak ± 1.13 s/d 2.05 km dari pusat geothermal Lahendong, yakni danau Linouw. Kandungan sulfat di dua lokasi tersebut yaitu 6,9-27,4 mg/L di LHD-05 dan 5371609mg/L di LDH-23.

Berbagai penelitian telah membuktikan kehadiran bakteri pereduksi sulfat di sumber air panas yang mengandung sulfur, seperti hasil penelitian Suhartanti (2004) tentang bakteri pereduksi sulfat pada air panas Kamojang, Jawa Barat dan Alawiyah (2007) di air panas Gedong Songo yang menemukan adanya bakteri pereduksi sulfat yang juga dapat mereduksi besi (III). Di alam, BPS sering berasosiasi dengan bakteri pereduksi besi (*iron*

reduction bacteria) dalam bioremediasi lingkungan. Keduanya dapat dijumpai di lingkungan tanpa oksigen. Jika BPS menggunakan sulfat sebagai akseptor elektron, maka bakteri pereduksi besi (BPB) menggunakan besi(III) sebagai akseptor elektron terminal (Luef *et al.*, 2013)

Kehadiran BPS di lokasi pemandian air panas Saronsong juga sudah dibuktikan keberadaannya oleh Taroreh *et al.* (2015) dimana adanya indikasi kehadiran BPS di lokasi tersebut dibuktikan melalui rangkaian uji reduksi kandungan sulfat sampel air panas yang diduga disebabkan oleh aktivitas bakteri BPS, tetapi penelitian ini tidak mengkaji jenis bakteri apakah yang memiliki kemampuan reduksi sulfat tersebut. Hal ini memberikan indikasi kuat tentang keberadaan BPS termofilik di area *geothermal* Sarongsong.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi BPS di air jernih, air keruh dan lumpur di lokasi pemandian air panas Sarongsong kota Tomohon.

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai dengan Agustus 2017 di Laboratorium Biologi Mikrobiologi dan Laboratorium Bioaktivitas dan Molekuler Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Manado. Tempat pengambilan sampel yaitu di lokasi pemandian air panas Sarongsong kota Tomohon Sulawesi Utara. Alat yang digunakan dalam penelitian ini

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Alat yang digunakan dalam penelitian ini berupa inkubator, autoklaf, plastic silika gel, mikropipet, timbangan analitik, vortex, hot plat, batang pengaduk, almunium foil, magnetic stirrer, Bunsen, jarum ose, *laminar air flow* (LAF), tissue, macis, besi pelubang, tabung reaksi, label, Erlenmeyer, cawan petri, rak tabung reaksi, kaca objek, gelas beaker, selotip kertas, handskun steril, masker, mikroskop, kamera, termos, kayu, lakmus.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah media NB, bakto agar, Media cair Postgate B yang dimodifikasi, aquades, gram A, gram B, gram C, gram D, spritus, *Malacid green*, sampel air dan lumpur dari lokasi pemandian air panas Saronsong Kota Tomohon.

Prosedur Penelitian

a. Pengambilan sampel

Sampel diambil dengan menggunakan botol yang sudah dimodifikasi seperti gayung. Sampel

diambil pada titik pertama dilokasi pemandian air panas sebanyak 100ml pada kedalaman ± 25 cm. Sampel air jernih dan air keruh dimasukan ke dalam termos air panas agar suhunya terjaga. Sampel lumpur diambil sebanyak 100g dan dimasukan di dalam termos air panas agar suhunya terjaga, lalu ditutup rapat dan diberi label.

b. Isolasi Bakteri Pereduksi Sulfat

Sampel lumpur ditimbang sebanyak 1 gram dan sampel air jernih dan air keruh dipipet sebanyak 1 ml. Isolasi bakteri yang diambil yaitu pada angka pengenceran 10^{-3} – 10^{-5} , dan dari setiap angka pengenceran diambil sebanyak 1 ml untuk dituang ke dalam tabung anaerob yang sudah berisi media selektif *Postgate b* dengan komposisi media terdiri dari K_2HPO_4 1 (g/L) NH_4Cl 2 (g/l), $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ 1.3(g/l) , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 4 (g/l) asam laktat (88%) 2.7 (g/l) dengan besi berkarat Ismail *et al.* (2014). Selanjutnya tabung ditutup, diberi label dan diinkubasi pada suhu $37^\circ C$ Kehadiran BPS ditentukan berdasarkan perubahan pada media selektif akibat terbentuknya sulfida, yang menunjukkan aktivitas BPS. Pengamatan dilakukan saat terjadi perubahan warna.

c. Pemurnian

Pemurnian isolat dilakukan dengan metode pengenceran menurut Stanier, *et al.*, 1982 dalam (Muchamad *et al.*, 2009). Isolat yang diperoleh dikocok hingga terbentuk suspensi. Pengenceran dilakukan hingga tingkatan 10^{-12} dengan cara memindahkan suspensi isolat sebanyak 1 ml ke dalam tabung reaksi yang sudah berisi aquades steril sebanyak 9 ml Selanjutnya, pada tingkat pengenceran 10^{-12} diambil 1 ml dituang ke dalam tabung anaerob yang sudah berisi media selektif. Tabung ditutup, diberi label dan diinkubasi pada suhu $37^\circ C$.

d. Karakterisasi dan Identifikasi Isolat Bakteri termofilik Pereduksi Sulfat (BPS)

Karakterisasi dan Identifikasi dilakukan pada level genus (*Generic Assignment*) untuk 4 isolat BPS berdasarkan karakter morfologi yang terdiri atas bentuk koloni, warna koloni, pewarnaan gram, pewarnaan endospore, uji motilitas, sedangkan karakter biokimia meliputi apakah bakteri aerob/anaerob, penghasil sulfida atau bukan. Identifikasi sampai pada level genus menggunakan metode *profile matching* yang mengacu pada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi bakteri pereduksi sulfat dari lokasi pemandian air panas Sarongsong Kota Tomohon menunjukkan kehadiran BPS sulfat pada 2 titik pengambilan sampel. pH rendah pada lokasi pengambilan sampel menunjukkan keasaman lingkungan, dan ini sesuai dengan habitat untuk pertumbuhan BPS. Bakteri pereduksi sulfat yang didapat mempunyai karakteristik yang berbeda, dilihat dari waktu yang dibutuhkan dalam mereduksi sulfat.

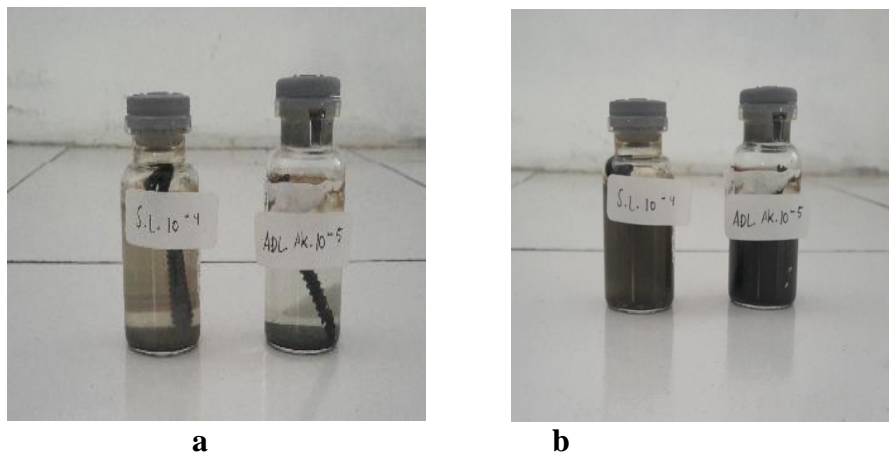
Kemampuan bakteri pereduksi sulfat diindikasikan dengan perubahan menjadi warna hitam pada proses isolasi yakni pada sampel air keruh dan lumpur. Perubahan warna menjadi hitam pada media selektif disebabkan oleh perubahan sulfat (SO_4) menjadi gas hidrogen sulfida (H_2S) yang disebabkan aktivitas bakteri pereduksi sulfat. Munawar (2011) mengatakan bahwa, pada kondisi reduktif, sulfat akan tereduksi menjadi sulfida (H_2S) dengan bantuan bakteri pereduksi sulfat, reaksi reduksi ini akan berlangsung dengan baik jika tanahnya mempunyai kandungan bahan organik tinggi.

Keragaman karakteristik kelompok BPS tersebut disebabkan oleh perbedaan ekosistem

tempat tumbuhnya, seperti pH. Hasil pengukuran pH pada kedua titik lokasi pengambilan sampel memperlihatkan perbedaan yaitu pH 4,5 untuk sampel air jernih dan pH 5 untuk sampel air keruh dan lumpur. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian lain yang mengemukakan bahwa faktor lingkungan mempengaruhi keragaman jenis dan karakteristik BPS, antara lain yaitu keasaman lingkungan (Bractova *et al.*, 2002).

Isolasi BPS dari sampel lumpur, air keruh dan air jernih memperlihatkan bahwa bakteri ini ditemukan pada semua lokasi pengambilan sampel. Karakteristik hidrokimia sampel air panas yang diambil dapat dilihat dari karakteristik bau telur busuk, pada suhu 50°C untuk sampel lumpur dan air keruh dengan pH 4,5 dan suhu 65°C pada sampel air jernih dengan pH 5. Lokasi habitat ini sangat sesuai untuk pertumbuhan bakteri pereduksi sulfat yang bersifat termofilik.

Isolasi bakteri dari pemandian air panas Sarongsong menghasilkan empat kelompok bakteri yang mempunyai karakteristik yang berbeda, dilihat dari waktu tumbuh dan kemampuan mereduksi sulfat yang diamati lewat perubahan warna hitam pada media selektif.



Gambar 1. Indikasi terjadinya reduksi sulfat di air panas Sarongsong Tomohon, (a) sampel awal masih berwarna terang, (b). sampel telah berwarna hitam pekat saat 4 hari berada dalam media

Tabel 1. Hasil karakteristik fenotipik isolat bakteri

No	Pengamatan	Kode Isolat			
		L4D1	L5D2	AK4D3	AJ4D4
1	Bentuk sel	Batang	Batang pendek	Batang pendek	Batang pendek
2	Panjang sel (μm)	0,349-0,513	1,390-2,512	0,533-0,770	0,960-1,333
3	Lebar sel (μm)	0,173-0,232	1,173-1,346	0,290-0,301	0,607-0,839
4	Motilitas	Positif	Negatif	Positif	Negatif
5	Reaksi gram	Positif	Negatif	Positif	Negatif
6	Endospora	Positif	Positif	Positif	Positif
7	Penghasil sulfida	+	+	+	+
8	Anaerob	+	+	+	+

Tabel 2. Hasil identifikasi level genus berdasarkan metode *Profile Matching*.

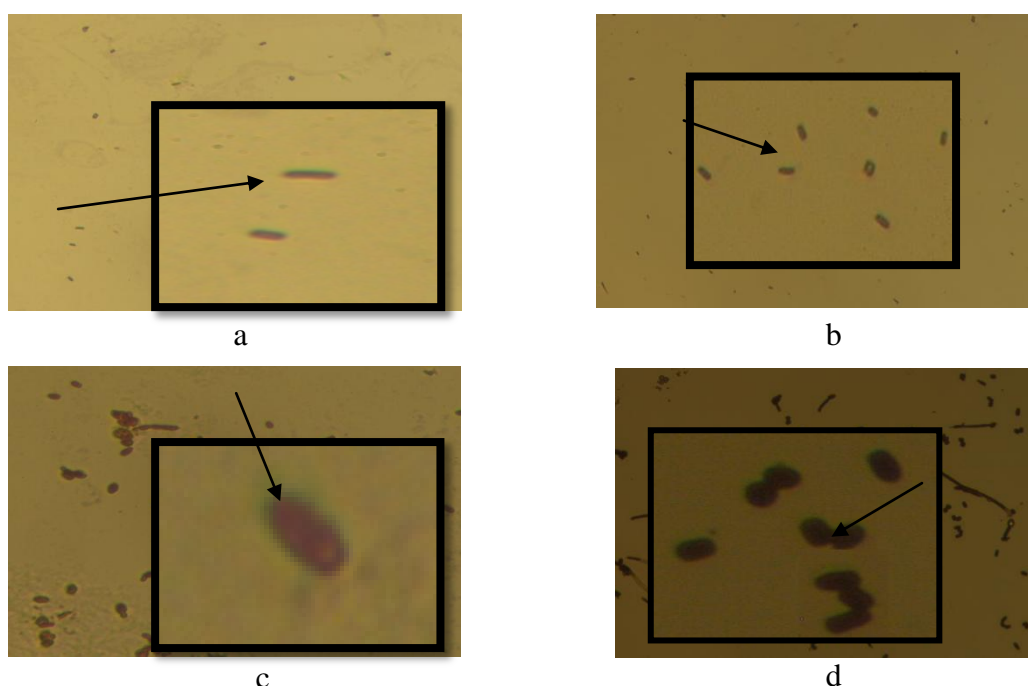
Karakter kunci	<i>Desulfomicrobium</i>	<i>Desulfobulbus</i>	<i>Desulfotomaculum</i>	L4D1	L5D2	AK4D3	AJ4D4
Bentuk sel	Batang pendek	Batang pendek	Batang	Batang	Batang pendek	Batang pendek	Batang pendek
Panjang	0,6 µm	1,5-2,5µm	2-9 µm	0,349-0,513 µm	1,390-2,512 µm	0,533-0,770 µm	0,960-1,333 µm
Lebar	1,3 µm	0,6-1,3 µm	0,5-2 µm	0,173-0,232 µm	1,173-1,346 µm	0,290-0,301 µm	0,607-0,839 µm
Penghasil sulfide	+	+	+	+	+	+	+
Endospora	+	+	+	+	+	+	+
Motilitas	-	-	+	+	-	+	-
Anaerobik	+	+	+	+	+	+	+
Gram	-	-	+	+	-	+	-

Berdasarkan karakteristik fenotipik 4 isolat bakteri pereduksi sulfat yaitu (L4D1, L5D2, AK4D3, AJ4D4) mempunyai karakter morfologi yang hampir sama yaitu bentuk koloni bulat, dan warna koloni putih-kekuningan. Isolat L4D1 mempunyai karakter morfologi sel, batang, motilitas positif, reaksi gram positif, dan endospora positif. Isolat L5D2 mempunyai karakter morfologi sel, batang pendek, motilitas negatif, reaksi gram negatif dan endospora positif. Isolat AK4D3 mempunyai karakter morfologi sel, batang pendek, motilitas positif reaksi gram positif dan endospora positif.

Isolat AJ4D4 mempunyai karakter morfologi sel, batang pendek, motilitas negatif, reaksi gram negatif, dan endospora positif. Hasil uji biokimiawi

untuk semua isolat merupakan bakteri yang tidak memerlukan udara untuk hidup (anaerob), positif penghasil sulfida yang terbukti melalui media selektif yang ditandai dengan adanya perubahan warna hitam.

Bakteri pereduksi sulfat merupakan bakteri obligat anaerob yang menggunakan H_2 sebagai donor elektron (*chemolithotrophic*). BPS dapat mereduksi sulfat pada kondisi anaerob menjadi sulfida, selanjutnya H_2S yang dihasilkan dapat mengendapkan logam-logam toksik (Cu, Zn, Cd) sebagai logam sulfida. BPS memerlukan substrat organik yang berasal dari asam organik berantai pendek seperti asam piruvat. Dalam kondisi alamiah, asam tersebut dihasilkan oleh aktivitas anaerob lainnya (Hanafiah *et al.*, 2009).



Gambar 2. Morfologi isolat bakteri pereduksi sulfat dan Gambar (a) isolat L4D1, (b) isolat L5D2, (c) isolat AJ4D4, (d) isolat AK4D3

Hasil identifikasi pada Tabel 2. Isolat AJ4D4 diduga termasuk dalam anggota genus *Desulfomicrobium* karena mempunyai bentuk sel batang pendek, penghasil sulfida, endospora positif, motilitas negatif, anaerobik, sumber karbon laktat dan gram negatif. Isolat L5D2 diduga termasuk anggota genus *Desulfobulbus* karena mempunyai bentuk sel batang pendek, penghasil sulfida, endospora positif, motilitas negatif, anaerobik, sumber karbon laktat dan gram negatif. Isolat AK4D3 dan isolat L4D1 diduga termasuk anggota genus *Desulfotomaculum* karena mempunyai bentuk sel batang-batang pendek, penghasil sulfida, endospora positif, motilitas positif, anaerobik, sumber karbon laktat dan gram positif.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil isolasi dan karakterisasi maka disimpulkan bahwa isolat AK4D3 dan L4D1 diduga termasuk dalam kelompok genus *Desulfotomaculum*, isolat AJ4D4 diduga termasuk dalam kelompok genus *Desulfomicrobium* dan isolat L5D2 diduga termasuk dalam kelompok genus *Desulfobulbus*.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Bractova, S. Groudev, S. Georgiev, P. (2002). The effect of some essential environmental factors on microbial dissimilatory sulphate reduction. Annual of the University of Mining and Geology St Ivan Ritski, Vol 44-45, pp 123-127.
- [2] Fahrudin, Abdullah, A. (2013) Dinamika Populasi Bakteri Pada Sedimen Yang Diperlakukan Dengan Air Asam Tambang. Jurnal Alam dan Lingkungan, Vol.4 (7) 2086-4604.
- [3] Hanafiah A,S,T. Sabrina, H. Guchi (2009) Ekologi dan Biologi Tanah. USU Press. Medan.
- [4] Holt, J,G. Kriegh N,R. Sneath, P,H,A. Stanley, J,T. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th Ed. Williams dan Wilkins, Baltimore.
- [5] Ismail, M. Yahaya, N. Bakar, A. Noor, M. (2014). Cultivation Of Sulphate Reducing Bacteria In Different Media. Malaysian journal of Civil Engineering 26(3):456-465
- [6] Luef, Birgit., Sirine ,F. Roseann ,C. Kelly ,W. Kenneth ,W. Michael, W. Kenneth, D. Philip, L. Louis, C. Jillian, B. (2012). Iron-Reducing Bacteria Accumulate Ferric Oxyhydroxide Nanoparticle Aggregates that may Support Planktonic Growth. The ISME Journal (7), 338-350
- [7] Muchamad Y, Lay B, Fauzi A, Santosa D, (2009). Isolasi dan identifikasi bakteri pereduksi sulfat pada area pertambangan batu bara muara enim, Sumatera Selatan. Sekolah Pascasarjana. Institusi Pertanian Bogor. Hal 26-35
- [8] Munawar, A. (2011) Kesuburan Tanah dan Nutrisi Tanaman. IPB Press. Bogor.
- [9] Suhartanti, D. (2004). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Pereduksi Sulfat dari Kawasan PLTP Kamojang Jawa Barat. Prodi Biologi FMIPA Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Prosiding Seminar Nasional
- [10] Taroreh, F,L. Karwur, F,F. Mangimbulude ,J,C. (2015). Reduksi Sulfat oleh Bakteri Termofilik dari Air Panas Saronong Kota Tomohon. Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia “Kejuangan” Pengembangan Teknologi Kimia Untuk Pengelolaan Sumber Daya Alam Indonesia. Yogyakarta
- [11] Widyati, E. (2007). Pemanfaatan Bakteri Pereduksi Sulfat untuk Bioremediasi Tanah Bekas Tambang Batubara. Volume 8, Nomor 4, Halaman 283-286.