

**KARAKTERISASI MORFOLOGIS ISOLAT BAKTERI TERMOFILIK DARI SUMBER AIR
PANAS PINCARA**
*(Morphological Characterization of Thermophilic Bacteria Isolate From Pincara Hot
Springs)*

Pauline Destinugrainy Kasi¹, Suhaeni¹, Sasa¹

¹Program Studi Biologi, Fakultas Sains, Universitas Cokroaminoto Palopo, Sulawesi Selatan

Corresponding Author : destinugrainy@gmail.com

Abstrak

Sumber air panas merupakan salah satu habitat alami dari bakteri termofilik. Bakteri termofilik adalah kelompok bakteri yang mampu tumbuh pada suhu lingkungan yang tinggi, berkisar antara 45°-90°C. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jumlah dan karakterisasi morfologi isolat bakteri termofilik yang dapat diisolasi dari sumber air panas Pincara. Metode penelitian yang dilakukan adalah deskriptif eksploratif, dengan mengambil sampel pada sumber air panas Pincara. Isolasi dan karakterisasi morfologis dilakukan di Laboratorium Sel dan Jaringan Fakultas Sains Universitas Cokroaminoto Palopo. Isolat dikulturkan pada medium Luria Bertani Agar (LBA) dan diinkubasi pada suhu ±50°C selama 3x24 jam. Sebanyak 3 isolat murni bakteri termofilik ditemukan dengan karakteristik bervariasi. Semua isolat bakteri merupakan bakteri Gram positif dan berbentuk basil. Isolat P1 memiliki karakteristik morfologi koloni dengan pigmentasi putih krem, bentuk *circular*, tepi *entire*, dan elevasi *convex*. Isolat P2 memiliki karakteristik morfologi koloni dengan pigmentasi putih krem, bentuk *circular*, tepi *entire*, dan elevasi *flat*. Isolat P3 memiliki karakterisasi morfologi koloni dengan pigmentasi putih krem, bentuk *irreguler*, tepi *undulate*, dan elevasi *flat*.

Kata Kunci: bakteri termofilik, karakterisasi, morfologi, air panas Pincara.

Abstract

Hot springs are one of the natural habitats of thermophilic bacteria. Thermophilic bacteria are a group of bacteria that are able to grow at high ambient temperatures, ranging from 45 ° -90 ° C. This study aims to determine the number and morphological characterization of thermophilic bacterial isolates that can be isolated from Pincara hot springs. The research method used was descriptive exploratory, by taking samples at Pincara hot springs. Morphological isolation and characterization were carried out at the Laboratory and Cell Laboratory of the Faculty of Science, Cokroaminoto University, Palopo. The isolate was cultured on Luria Bertani Agar (LBA) medium and incubated at ± 50°C for 3x24 hours. A total of 3 pure thermophilic bacterial isolates were found with varied characteristics. All bacterial isolates were Gram positive bacteria and bacilli. P1 isolate has colony morphological characteristics with creamy white pigmentation, circular shape, entire edge, and convex elevation. The P2 isolate has colony morphological characteristics with creamy white pigmentation, circular shape, entire edges, and flat elevation. Whereas P3 isolate had colony morphological characterization with creamy white pigmentation, irregular shape, undulate edge, and flat elevation.

Keywords : thermophilic bacteria, characterization, morphology, Pincara hot spring

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan kawasan tektonik dengan lebih dari 70 gunung berapi yang aktif dan banyak daerah geothermal (Tuntun & Huda, 2010). Pada daerah geothermal, umumnya sering dijumpai mata air panas. Sumber air panas atau mata air panas adalah mata air yang dihasilkan akibat keluarnya air tanah dari kerak bumi setelah mengalami pemanasan geotermal. Salah satu sumber geothermal yang dapat dijumpai di Sulawesi Selatan terdapat di Desa Pincara, Kecamatan Masamba. Secara umum daerah ini ditutupi oleh batuan granit, granodiorit yang berumur Pliosen, sekis dan gneis berumur mesozoikum (Sumardi & Sundhoro, 2005). Lingkungan dengan suhu ekstrem seperti ini merupakan habitat alami bakteri termofilik.

Bakteri termofilik adalah bakteri yang mampu bertahan hidup pada suhu tinggi, sekitar 45°-90°C (Tuntun & Huda, 2010). Bakteri termofilik memiliki habitat yang bermacam-macam seperti di letupan hidrothermal, sumber air panas, tumpukan kompos, atau pemanas air (Nuritasari *et al.*, 2017). Dalam banyak kasus bakteri termofilik tidak hanya beradaptasi terhadap suhu tinggi, namun juga membutuhkan kondisi ini untuk memproduksi (Mahmudah *et al.*, 2016). Hal ini disebabkan karena bakteri termofilik memiliki kandungan enzim, ribosom dan protein yang lebih stabil dibandingkan bakteri mesofil (Suryani *et al.*, 2015).

Eksplorasi terhadap bakteri termofilik terutama karena bakteri ini memiliki kemampuan menghasilkan enzim yang dapat berperan sebagai katalis pada suhu tinggi (Noll, 2013). Enzim ini disebut bersifat termostabil. Enzim termostabil dibutuhkan dalam industri berbasis bioteknologi, proses pengolahan limbah, maupun pelapukan mineral (Tuntun & Huda, 2010). Salah satu enzim yang banyak digunakan dan berasal dari bakteri termofilik adalah enzim *Taq polymerase* yang diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus*. Enzim ini digunakan dalam proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk proses replikasi DNA (Noll, 2013).

Bakteri termofilik dapat ditemukan pada berbagai sumber misalnya pada sumber air panas, kawah gunung berapi (Fitriani *et al.*, 2013), kompos pertanian (Alam *et al.*, 2013), rawa asin, dan tanah gurun (Aanniz *et al.*, 2015). Bakteri termofilik banyak diisolasi dari sumber air panas di Indonesia, misalnya *Thermus* sp, *Acetogenium* sp, *Bacillus* sp, *Thermotrix* sp, *Thermodesulfobacterium* sp, *Thermomicrobium* sp, *Pseudomonas* sp dan *Sulfobacillus* sp (Mahmudah *et al.*, 2016). Di Indonesia beberapa penelitian isolasi bakteri termofilik pada sumber air panas telah dilakukan, antara lain dari sumber air panas Tanjung Sakti Lahat Sumatera Selatan (Muharni, Juswardi, & Prihandayani, 2013), sumber air panas Sarogsong Tomohon (Posumah & Rondonuwu, 2018), sumber air panas Sungai Medang Kerinci Jambi (Sari, Agustien, & Nurmiati, 2012), sumber air panas Lejja Kabupaten Soppeng (Mahmudah *et al.*, 2016), sumber air panas Panggo Kabupaten Sinjai (Natsir, Natsir, & Dali, 2014), dan masih banyak lagi.

Isolasi dan identifikasi bakteri merupakan langkah awal dalam upaya pemanfaatan bakteri *indigenous* atau lokal. Melalui penelitian ini, ingin diketahui potensi bakteri termofilik pada sumber air panas Pincara. Untuk itu dilakukan prosedur isolasi dan karakterisasi morfologis isolat bakteri termofilik dari sumber air panas Pincara.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret - Juni 2020. Lokasi pengambilan sampel air panas adalah di sumber air panas Desa Pincara, Kecamatan Masamba, Kabupaten Luwu Utara. Isolasi dan karakterisasi bakteri dilakukan di Laboratorium Sel dan Jaringan, Fakultas Sains Universitas Cokroaminoto Palopo.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu enkas, autoklaf, cawan petri, bunsen, jarum ose, erlenmeyer, gelas ukur, neraca analitik, spatula, inkubator, botol sampel, mikro pipet, tabung reaksi, rak tabung reaksi, kompor, batang pengaduk, kulkas, *object glass*, *deck glass*, pipet tetes, batang segitiga, mikroskop, spoit, termos, termometer dan kamera.

Bahan yang digunakan sampel air panas dari sumber air panas Desa Pincara Kecamatan Masamba, media Luria Bertani Agar (Ekstrak yeast 5 g, pepton 5 g, NaCl 5 g, bacto agar 5 g),

alkohol 70%, akuades, NaOH, HCl, kapas, lertas label, kertas bekas, plastik, karet gelang, aluminium foil, tissue, larutan crystal violet, larutan lugol, larutan safranin, dan alkohol acetone.

Metode Kerja

Sterilisasi Alat dan Bahan

Semua alat dibungkus dengan menggunakan kertas bekas, kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik lalu diikat dengan menggunakan karet gelang. Selanjutnya semua alat disterilisasi dengan autoklaf pada tekanan 15 psi dan suhu 121°C selama 15 menit.

Pembuatan Medium Luria Bertani Agar (LBA)

Sebanyak 18 gram medium LBA dimasukkan kedalam gelas piala lalu ditambahkan 450 liter akuades. Selanjutnya dididihkan dengan menggunakan *hot plate* dan *magnetic stirrer* sampai semua bahan larut. Kemudian pH diatur menjadi 7 dengan menambahkan HCl atau NaOH 1N lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 15 psi. Medium yang telah disterilkan dituang ke cawan petri masing-masing 20 mL. Cawan petri berisi medium dan medium yang tersisa disimpan dalam lemari pendingin sampai akan digunakan.

Pengambilan Sampel

Sebanyak masing-masing 100 mL air panas diambil dari tiga titik di sumber air panas. Air panas tersebut disimpan di dalam botol steril, diberi label lalu dimasukkan ke dalam termos untuk mempertahankan suhu. Pada masing-masing titik juga dilakukan pengukuran suhu dan pH air. Selanjutnya sampel air dibawa ke Laboratorium Sel dan Jaringan Fakultas Sains Universitas Cokroaminoto Palopo untuk diteliti.

Isolasi Bakteri dan Pemurnian Isolat

Isolasi bakteri dilakukan dengan metode *spread plate* secara aseptis. Sumber isolat berasal dari pengenceran 10^{-5} , sebanyak 0,1 mL sampel diinokulasikan pada medium LBA dalam cawan petri. Kemudian diinkubasi selama 3x24 jam dengan temperatur $\pm 50^{\circ}\text{C}$. Bakteri yang tumbuh dan berkembang biak dengan baik pada medium LBA selanjutnya dimurnikan pada medium agar yang baru. Tujuan pemurnian adalah untuk memisahkan isolat bakteri agar tidak bercampur dengan isolat lainnya. Pemurnian dilakukan dengan cara mengambil 1 ose koloni bakteri yang terpisah dan digores pada medium LBA yang baru kemudian diinkubasi pada suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam. Dari koloni yang tumbuh dilakukan penggoresan kembali pada medium LBA untuk mendapatkan isolat yang benar-benar murni.

Karakterisasi Bakteri

Pengamatan morfologinya dilakukan dengan mengamati penampakan koloni berupa pigmentasi, bentuk koloni, tepi koloni, dan elevasi. Selanjutnya dilakukan pengecatan Gram yang dilakukan untuk melihat bentuk-bentuk sel bakteri dan untuk mengetahui golongan bakteri dari isolat yang dihasilkan.

Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara yaitu isolat yang telah murni diambil sebanyak 1 ose, kemudian diletakkan di atas gelas obyek yang telah dibersihkan terlebih dahulu, lalu ditambahkan 1 tetes akuades, kemudian diratakan sehingga membentuk lapisan tipis kemudian difiksasi di atas api bunsen. Selanjutnya tahap pewarnaan, gelas obyek yang siap dicat, ditetesi larutan kristal violet sebanyak 1-2 tetes menggunakan spoit pada permukaan lapisan tipis bakteri sampai tertutup rata dan didiamkan selama 30 detik, kemudian dibilas dengan akuades dan dikeringkan di udara. Setelah kering ditetesi dengan larutan lugol lalu didiamkan selama 1 menit, kemudian dibilas dengan akuades dan dikeringkan di udara. Setelah kering dilanjutkan pada penambahan larutan alkohol 70% sebagai larutan peluntur hingga menutupi permukaan bakteri dan didiamkan selama 5-15 detik, kemudian dibilas dengan akuades. Setelah kering ditambahkan larutan safranin lalu didiamkan selama 1 menit, kemudian dibilas dengan menggunakan akuades lalu dikeringkan setelah kering, gelas obyek yang berisi hasil pengecatan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 10x100.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sumber air panas Pincara yang merupakan lokasi sumber isolat bakteri termofilik memiliki suhu 67°-69°C, dengan pH 6-7. Perbedaan suhu pada sumber air panas Pincara terjadi karena adanya peningkatan suhu air saat bergerak masuk ke dalam batuan dan berbenturan dengan batuan panas. Perbedaan pH pada sumber air panas Pincara karena semakin lama pH air akan semakin menurun menuju suasana asam yang disebabkan oleh adanya CO₂ bebas akibat penguraian senyawa organik. Tinggi atau rendahnya pH air dipengaruhi oleh senyawa yang terkandung dalam air tersebut.

Dalam proses pengambilan sampel, air panas yang dimasukkan ke dalam botol steril lalu dimasukkan ke dalam termos untuk menjaga agar suhu air tetap panas. Namun, saat sampai di laboratorium terjadi penurunan suhu air sampel menjadi 55°-60°C. Selanjutnya air sampel dipreparasi untuk dilakukan proses isolasi bakteri termofilik. Isolasi bakteri termofilik dari sumber air panas Desa Pincara menggunakan media Luria Bertani Agar (LBA) yang mengandung komponen nutrisi untuk pertumbuhan bakteri. Inkubasi dilakukan selama 3x24 jam dengan suhu ±50°C. Isolat bakteri yang telah tumbuh pada media LBA dimurnikan untuk mendapat isolat murni, dengan cara menginokulasikan kembali pada media LBA yang baru dan diinkubasi selama 2x24 jam pada suhu ±50°C. Proses pemurnian dilakukan sebanyak tiga kali untuk memperoleh isolat murni. Dalam penelitian ini diperoleh 3 isolat, yaitu isolat P1, isolat P2 dan isolat P3.

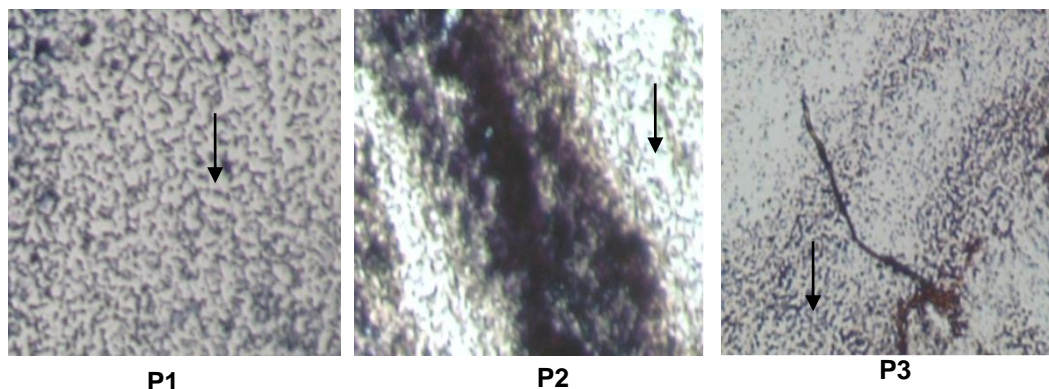
Pengamatan makroskopis koloni meliputi pigmentasi, bentuk koloni, tepi koloni, dan elevasi. Karakter makroskopis morfologi koloni ketiga isolat bakteri tersebut menunjukkan pigmentasi warna yang sama yaitu putih krem. Namun bentuk koloni isolat P1 dan P2 adalah circular, sedangkan isolat P3 berbentuk irregular. Tepian koloni isolat P1 dan P2 adalah entire, sedangkan isolat P3 adalah undulate. Sementara elevasi koloni isolat P1 adalah convex, sementara isolat P2 dan P3 adalah flat (Tabel 1).

Tabel 1. Karakteristik Morfologi Koloni Bakteri Termofilik

Kode Isolat	Pigmentasi	Bentuk	Tepi	Elevasi
P1	Putih krem	Circular	Entire	Convex
P2	Putih krem	Circular	Entire	Flat
P3	Putih krem	Irregular	Undulate	Flat

Sumber : Data primer

Pengamatan karakter mikroskopis untuk ketiga isolat diawali dengan melakukan pengecatan Gram. Berdasarkan hasil pewarnaan Gram menunjukkan ketiga isolat bersifat Gram positif (Gambar 1). Warna zat kristal violet yang terikat oleh dinding sel bakteri akan tetap dipertahankan, sehingga bakteri Gram positif berwarna ungu. Bentuk bakteri dari ketiga isolat adalah berbentuk batang atau basil.



Gambar 1. Hasil pewarnaan Gram isolat bakteri termofilik. Tanda panah menunjukkan becri termofilik

Penelitian yang dilakukan Tuntun dan Huda (2014) menemukan bakteri termofilik Gram positif berbebtuk basil pada sumber air panas Way Panas Bumi Natar Lampung. Bakteri termofilik Gram positif berbentuk basil juga ditemukan di sumber air panas Sungai Medang Jambi (Wahyuna, Agustien, & Periadnadi, 2012). Beberapa bakteri *Bacillus* memiliki sifat poteolitik dan dapat hidup hingga suhu maksimum 82°C (Brock, 1978). Sebanyak 97% bakteri termofilik yang pernah ditemukan merupakan genus *Bacillus*. Lima spesies *Bacillus* yaitu *B. licheniformis*, *B. aerius*, *B. sonorensis*, *B. subtilis* dan *B. amyloliquefaciens* umum dijumpai pada sumber air panas (Aanniz *et al.*, 2015). Hal ini disebabkan karena bakteri dari kelompok *Bacillus* dapat membentuk spora yang bisa bertahan terhadap cekaman lingkungan (Connor *et al.*, 2010).

Meskipun ketiga isolat yang ditemukan di sumber air panas Pincara menunjukkan ciri menyerupai genus *Bacillus*, masih perlu dilakukan analisis sifat biokimia maupun molekuler untuk mendukung pernyataan tersebut. Analisis molekuler dapat dilakukan dengan melakukan isolasi genom bakteri isolat yang ditemukan.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Jumlah isolat bakteri termofilik yang dapat diisolasi dari sumber air panas Desa Pincara Kecamatan Masamba terdiri dari 3 isolat bakteri termofilik.
2. Karakteristik morfologi koloni bakteri termofilik yang diisolasi dari sumber air panas Desa Pincara Kecamatan Masamba merupakan bakteri Gram positif dan berbentuk basil. Karakter koloni isolat P1, yaitu pigmentasi putih krem, bentuk circular, tepi entire, dan elevasi convex. Koloni isolat P2 memiliki karakter, yaitu pigmentasi putih krem, bentuk circular, tepi entire, dan elevasi flat. Sedangkan isolat P3, yaitu pigmentasi putih krem, bentuk irregular, tepi undulate, dan elevasi flat.

SARAN

Perlu dilakukan analisis lanjutan secara biokimia dan molekuler terhadap isolat bakteri termofilik yang ditemukan di sumber air panas Pincara, Kecamatan Masamba.

DAFTAR PUSTAKA

- Aanniz, T., Ouadghiri, M., Melloul, M., Swings, J., Elfahime, E., Ibijbijen, J., ... Amar, M. (2015). Thermophilic bacteria in Moroccan hot springs, salt marshes and desert soils. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 443–453. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246220140219>
- Alam, M. S., Sarjono, P. R., & Aminin, A. L. N. (2013). Isolasi dan karakterisasi selulase dari bakteri selulolitik termofilik kompos pertanian Desa Bayat, Klaten, Jawa Barat. *Jurnal Sains Dan Matematika.*, 21(2) : 48-53
- Brock, T. D. (1978). *Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperatures*. (M. P. Starr, Ed.) (1 st). USA: Springer-Verlag.
- Connor, N., Sikorski, J., Rooney, A. P., Kopac, S., Koepfel, A. F., Burger, A., ... Cohan, F. M. (2010). Ecology of speciation in the genus *Bacillus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5), 1349–1358. <https://doi.org/10.1128/AEM.01988-09>
- Fitriani, A., Supriyanti, F. M. T., & Heryanto, T. E. (2013). Penentuan Aktivitas Amilase Kasar Termofil *Bacillus subtilis* Isolat Kawah Gunung Darajat Garut. *Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati Dan Fisik*, 15(2), 107–113.
- Mahmudah, R., Baharuddin, M., & Sappewali. (2016). Identifikasi isolat bakteri termofilik dari sumber air panas Lejja, Kabupaten Soppeng. *Al-Kimia*, 4(1), 31–42.
- Muharni, Juswardi, & Prihandayani, I. (2013). Penghasil Protease Dari Sumber Air Panas Tanjung Sakti Lahat Sumatera Selatan. In *Prosiding Semirata FMIPA Universitas Lampung* (pp. 139–

144). Lampung: Fakultas MIPA Univeristas Lampung.

- Natsir, N. A. N., Natsir, H., & Dali, S. (2014). Eksplorasi dan karakterisasi bakteri termofil penghasil enzim amilase dari sumber air panas Panggo, Sulawesi Selatan. In *Prosiding Seminar Nasional Biokimia UIN SYarif Hidayatullah Jakarta* (pp. 72–81). Jakarta: UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Noll, K. M. (2013). Thermophilic Bacteria. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, 1V(4), 63–65. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01535-7>
- Nuritasari, D., Sarjono, P. R., & Aminin, A. L. N. (2017). Isolasi bakteri termofilik sumber air panas Gedongsongo dengan media pengaya MB (Minimal Broth) dan TS (Taoge Sukrosa) serta identifikasi fenotip dan genotip. *Jurnal Kimia Sains Dan Aplikasi*, 20(2), 84–91.
- Posumah, D., & Rondonuwu, D. A. (2018). Isolasi dan identifikasi bakteri termofilik pereduksi sulfat di Air Panas Sarongsong Kota Tomohon. *Jurnal Biota*, 4(1), 36–40. <https://doi.org/10.19109/biota.v4i1.1654>
- Sari, U. M., Agustien, A., & Nurmiati. (2012). Penapisan dan karakterisasi bakteri selulolitik termofilik sumber air panas Sungai Medang Kerinci Jambi. *Jurnal Biologi Andalas*, 1(2), 166–171.
- Sumardi, E., & Sundhoro, H. (2005). *Geologi Daerah Pincara, Masamba, Kabupaten Luwuk Utara, Sulawesi Selatan. Pemaparan Hasil Kegiatan Lapangan Subdit Panas Bumi 2005*.
- Suryani, Ambarsari, L., & Harahap, E. S. (2015). Amplifikasi gen 16S rRNA bakteri termofilik dari sumber air panas Gunung Pancar Bogor. *Jurnal Riset Kimia*, 3(1), 83–89. <https://doi.org/10.25077/jrk.v3i1.97>
- Tuntun, M., & Huda, M. (2010). Isolasi dan identifikasi bakteri termofilik dari sumber air panas Way Panas Bumi Natar Lampung Selatan. *Jurnal Analis Kesehatan*, 3(1), 297–304.
- Wahyuna, D., Agustien, A., & Periadnadi. (2012). Isolasi dan karakterisasi bakteri termo-proteolitik sumber air panas Sungai Medang, SUngai Penuh, Jambi. *Jurnal Biologi Andalas*, 1(2), 93–98.