

Isolasi dan Determinasi Bakteri Luminesensi yang Bersimbiosis pada Cumi-cumi *Loligo duvauceli*

Delianis Pringgenies* dan Sri Sejati

Jurusan Ilmu Kelautan, FPIK Universitas Diponegoro
Kampus Tembalang Semarang. Telp. / Fax 024.7474698

Abstrak

Bioluminesensi merupakan fenomena alam, yaitu cahaya yang ditimbulkan oleh suatu organ sebagai hasil dari reaksi kimia yang melibatkan tiga komponen, yakni luciferin (substrat), luciferase (enzim) dan molekul oksigen. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri simbiosis pada organ luminesensi cumi *L. duvauceli* adalah bakteri luminesen dari jenis bakteri *Photobacterium phosphoreum* dan bakteri memancarkan warna biru. Jenis bakteri ini merupakan bakteri yang paling terang memancarkan cahaya di bandingkan dengan jenis bakteri luminesensi lainnya. Hasil penelitian terhadap jumlah total bakteri memperlihatkan bahwa bakteri dapat memancarkan cahaya pada konsentrasi $4,6 \cdot 10^9$ CFU/ml dengan diameter koloni bakteri pada 0,075 cm, sedangkan pada konsentrasi lebih rendah yaitu $2,0 \cdot 10^4$ dengan diameter koloni bakteri 0,025 cm memperlihatkan bakteri luminesensi tidak memancarkan cahaya. Jadi konsentrasi bakteri sangat berperan dalam proses pemancaran cahaya pada bakteri luminesensi *P. phosphoreum*.

Kata kunci: Isolasi bakteri, luminesensi, cumi-cumi (*Loligo duvauceli*)

Abstract

Bioluminescence refers to the visible light emission in living organisms that accompanies the oxidation of organic compounds (luciferins), mediated by an enzyme catalyst (luciferase). Result on the identification of bacteria live in the cuttlefish of *L. duvauceli* showed species of *Photobacterium phosphoreum* and the colony emits a blue lights. *P. phosphoreum* is the brightest bacteria in terms of emitting lights compared to other species of luminous bacteria. The total bacterial count gives $4.6 \cdot 10^9$ CFU/ml with diameter of colony of 0.075 cm which able to emit lights, while lower concentration at $2.0 \cdot 10^4$ CFU/ml and colony diameter of 0.025 cm give no emission of light. In respect to this, it suggest that concentration of luminous bacteria has role in the process of light emission by *P. phosphoreum*.

Key words: Bacteria isolation, bioluminescence bacteria determination, squid (*Loligo duvauceli*)

Pendahuluan

Salah satu penyebab terjadinya peristiwa bioluminesensi pada beberapa hewan laut adalah karena adanya bakteri yang bersimbiosis pada organ cahayanya. Hasil penelitian pendahuluan yang sudah dilakukan membuktikan bahwa Cumi jenis *Loligo duvauceli* mempunyai organ cahaya yang menempel pada kantong tintanya dan pada organ tersebut mengandung banyak bakteri. Peristiwa bioluminesensi pada hewan Cumi dan cumi-cumi merupakan salah satu hasil interaksi antara bakteri dan organ cahaya yang dimilikinya. Informasi tentang interaksi antara kehidupan bersama dua organisme yang berbeda (simbiosis) belum banyak diungkapkan. Identifikasi bakteri luminesen dari inang organ cahaya Cumi merupakan masalah dasar yang harus diketahui untuk penentuan karakteristik dari bakteri tersebut. Penelitian

ini akan dijadikan sebagai dasar informasi yang sangat penting untuk mengetahui langkah lanjut tentang interaksi antara bakteri dan Cumi serta proses bioluminesensi yang terjadi pada Cumi *L. duvauceli*.

Hingga saat ini, informasi tentang organ cahaya cumi jenis *L. duvauceli* sudah dilaporkan (Pringgenies dan Jørgensen, 1994 dan Pringgenies *dkk*, 2001). Namun jenis Cumi *L. duvauceli* yang hidup di daerah tropis secara general belum pernah diungkapkan, begitu juga dengan kehadiran bakteri dalam kantong organ tersebut.

Untuk mengungkapkan peristiwa bioluminesensi pada hewan Cumi, determinasi bakteri perlu dilakukan sehingga diketahui karakter dari bakteri simbiosis pada Cumi tersebut. Hasil penelitian ini dapat dijadikan sebagai informasi dasar di Indonesia khususnya tentang pengetahuan bioluminesensi sebagai akibat dari

interaksi antara bakteri dan Cumi *L. duvauceli*.

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari jenis bakteri luminesen yang bersimbiosis pada inang organ cahaya Cumi *L. duvauceli*

Materi dan Metode

Sampel Cumi berorgan cahaya *Loligo duvauceli* yang di koleksi dari laut dengan menggunakan bagan apung langsung di masukkan ke dalam termos es dan di bawa ke laboratorium Mikrobiologi. Sampel kantong organ cahaya sebagai media simbiosis bakteri di pisahkan dari cumi dan di hancurkan. Sampel bakteri yang berupa hancuran kantong organ di ambil 1 gram dan dicampur dengan pelarut pepton hingga volume 100 ml. 1 ml larutan sampel di campurkan ke dalam 99 ml larutan tiga garam (*trisalt*) Selanjutnya larutan tersebut di kultur ke dalam media agar untuk selanjutnya dilakukannya identifikasi bakteri luminesensi.

Identifikasi bakteri dilakukan dengan referensi acuan Norris *dkk.* (1971), Baumann *dkk.* (1994). Kriteria pengamatan meliputi : pengamatan morfologi bakteri, uji luminesensi bakteri, pengecatan flagela, uji oksidase, uji sensitif terhadap 2-4 di amino, uji gelatin, uji indole, uji sukrose, uji laktose, uji VP Vox dan uji 2-3 butanidiol.

Hasil dan Pembahasan

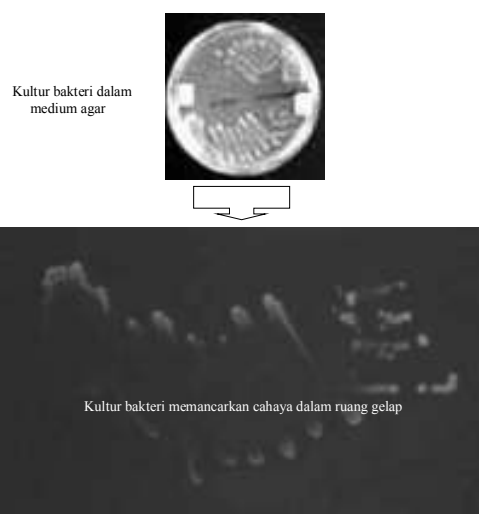
Isolasi bakteri simbiosis dari organ cahaya dilakukan pada Cumi *L. duvauceli* berukuran panjang total (TL) \pm 12 cm. Bakteri dari organ cahaya diisolasi ke dalam medium nutrisi agar. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa koloni bakteri yang tumbuh dalam media nutrisi agar dapat bercahaya bila di dalam ruangan gelap.

Setelah diketahui bahwa bakteri simbiosis pada organ cahaya Cumi *L. duvauceli* termasuk dalam kelompok bakteri luminesen, maka identifikasi bakteri selanjutnya difokuskan kepada karakteristik kelompok bakteri luminesensi yang terdapat dalam air laut yaitu genus *Vibrio* dan *Photobacterium* (Nensis, 1982).

Karakteristik bakteri hasil identifikasi sampai tahap ini adalah, bakteri: tidak tumbuh pada media TCBSA; tergolong ke dalam kelompok bakteri gram negatif; berbentuk batang 'bacillus'; tidak berflagela; memancarkan cahaya. Berdasarkan data diketahui bahwa bakteri tersebut bukan termasuk kedalam kelompok bakteri genus *Vibrio* tapi masuk dalam kelompok bakteri genus *Photobacterium*. Hasil uji biokimia yang bertujuan untuk mendapatkan karakteristik bakteri luminesensi yang bersimbiosis pada

organ cahaya cumi adalah dengan uji oksidase, uji indole, uji penggunaan sukrose, uji penggunaan laktose, uji voges- proskauer.

Pada uji oksidase yang dilakukan memperlihatkan sampel tidak menunjukkan reaksi atau reaksinya negatif. Selanjutnya proses identifikasi bakteri simbiosis menggunakan uji tes indole, pada hasil uji tersebut tidak terbentuk cincin warna merah muda sampai tua pada lapisan permukaan setelah ditetesi reagen Kovac yang artinya hasil reaksi adalah negatif.



Gambar 1. Isolasi bakteri simbiosis cumi-cumi *L. duvauceli* pada media nutrisi agar dalam cawan petri memperlihatkan bakteri memancarkan cahaya kebiruan dalam ruangan gelap.

Uji untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan gula sukrosa menunjukkan hasil warna kuning artinya terjadi reaksi basa (negatif) pada proses tersebut. Begitu juga yang terjadi pada uji laktosa, yaitu untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan gula laktose. Reaksi ini menunjukkan hasil dengan warna merah, artinya terjadi reaksi basa (negatif).

Kemudian uji tes MR-VP pada bakteri luminesensi yang bersimbiosis pada organ cahaya cumi menunjukkan reaksi pada media tetap berwarna jernih yang mendekati warna tembaga, artinya reaksi menunjukkan positif terhadap uji tes MR-VP Vox.

Hasil uji karakteristik bakteri simbiosis dari organ cahaya cumi dapat di lihat pada Tabel.1 dan Tabel. Berdasarkan karakteristiknya bakteri luminesensi yang hidup bersimbiosis pada organ cahaya Cumi *L. duvauceli* adalah bakteri luminesen dari jenis *Photobacterium phosphoreum*.

Tabel 1. Karakteristik bakteri genus *Photobacterium* (Baumann et al., 1984)

	Flagela	Oksidase	Luminisensi
<i>Photobacterium</i>	Polar (jazangberflagela)	d	+
<i>Lucibacterium</i>	Petrochonus	+	+
<i>Vibrio</i>	Polar (satusel atau lebih)	+	d
<i>Aeromonas</i>	Polar (satusel)	+	-
<i>Pseudomonas</i>	Polar (satusel)	+	-
<i>Alcaligenes</i>	Petrichous	-	-
<i>Enterobacterium</i>	Petrichous	-	-

Determinan (d) = artinya bisa positif atau negatif
 Negatif (-) = tidak ada reaksi
 Positif (+) = ada reaksi

Tabel 2. Karakteristik spesies bakteri dari organ cahaya Cumi. *L. duvauceli*

Pengamatan morfologi dan uji biokimia	Hasil
Pewarnaan gram	-
Pewarnaan flagela	-
Uji oksidasi	d
Uji indole	-
Uji luminesensi	+
Uji fermentasi sukrosa	-
Uji fermentasi laktosa	-
Uji VP-MR	+

Determinan (d) = artinya bisa positif atau negatif
 Negatif (-) = tidak ada reaksi
 Positif (+) = ada reaksi

Hasil analisis diameter bakteri menunjukkan bahwa bakteri luminesensi yang dapat memancarkan cahaya memiliki diameter koloni adalah 0,075 cm lebih besar dari bakteri tidak memancarkan cahaya adalah 0,025 cm. Jumlah total bakteri yang memancarkan cahaya adalah $4,6.10^9$ (CFU/ml) lebih tinggi dibandingkan dengan jumlah total bakteri tidak memancarkan cahaya adalah $2,0.10^4$ (CFU/ml) (Tabel.3).

Tabel 3. Penghitungan total bakteri *P. phosphoreum* yang memancarkan cahaya

Diameter (cm)	Total Bakteri (CFU/ml)
0,025 (tidak bercahaya)	$2,0.10^4$
0,075 (bercahaya)	$4,6.10^9$
0,1 (bercahaya)	$8,0.10^9$
0,15 (bercahaya)	$8,4.10^9$
0,2 (bercahaya)	$1,34.10^{10}$
0,3 (bercahaya)	$2,2.10^{12}$

Selama melakukan inkubasi dan isolasi bakteri simbiosis dari organ cahaya Cumi *L. duvauceli* ditemukan kegagalan dalam teknik isolasi. Kegagalan

tersebut terjadi apabila bakteri diisolasi dari anakan cumi yang berukuran 2 cm. Tapi apabila organ cahaya berasal dari 3 ekor cumi yang berukuran 2 cm maka bakteri dapat tumbuh dalam media nutrisi agar. Hasil penghitungan jumlah total bakteri (CFU/ml) memperlihatkan bahwa bakteri memancarkan cahaya pada jumlah $4,5.10^9$ (CFU/ml) dan tidak memancarkan cahaya.

Menurut Baumann et al, (1984) bahwa, ada 2 genus bakteri yang diketahui hidup di laut yakni, genus bakteri *Photobacterium* dan *Vibrio*. Karakteristik signifikan yang dimiliki bakteri genus *Photobacterium* tampak memancarkan cahaya dalam medium agar. Selain genus *Photobacterium*, ada genus *Lucibacterium* tampak memancarkan cahaya dalam medium agar sedang genus *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Enterobacterium* tidak tampak. Untuk membedakan jenis bakteri *Photobacterium phosphoreum* dengan jenis bakteri *P. pierantoni*, *Vibrio albensis*, *V. fishery*, *Phosphoreum splendidum* dan *P. mandapamensis* adalah dari hasil uji flagela, uji indole, uji fermentasi sukrosa, uji laktosa, uji VP-MR dengan acuan Baumann et al, (1984) seperti ditampilkan pada tabel . 4. berikut ini.

Tabel 4. Karakteristik spesies bakteri luminesensi (Baumann et al. 1984)

	Flagela	Indole	Sukrosa	Laktosa	MR-VP
<i>Vibrio albensis</i>	+	+	+	-	+
<i>Phosphoreum splendidum</i>	+	+	-	-	-
<i>Ph. Mandapamensis</i>	+	-	-	-	+
<i>Vibrio fishery</i>	+	-	-	-	-
<i>Ph. Pierantoni</i>	-	-	+	+	-
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	-	-	-	-	+

Keterangan : Positif (+) = bereaksi
 Negatif (-) = negatif

Berdasarkan sifat Gram, bakteri *P. phosphoreum* termasuk Gram-negatif. Dinding sel bakteri gram-negatif mempunyai susunan kimia yang lebih rumit dari pada bakteri Gram positif, disamping mengandung peptidoglikan juga terdapat protein, fosfolipida, dan liposakarida (LPS) di luar lapisan peptidoglikan. Komponen liposakarida dinding sel bakteri Gram-negatif terutama yang patogen memiliki peranan toksisitas penting pada inang (Davis et al., 1980). Kerabat dekat genus *Phosphoreum* adalah *Vibrio* yang beberapa spesiesnya terkenal juga sebagai bakteri patogen pada manusia dan udang disamping

dapat memancarkan cahaya. Meskipun *P. phosphoreum* termasuk bakteri Gram negatif, sejauh ini belum ada laporan yang mengindikasikan bahwa bakteri ini termasuk patogen. Dalam hal ini, kemungkinan respon inang selama proses koevolusinya telah mengantisipasi keberadaan LPS bakteri dengan mensekresikan senyawa penetralisir melalui mikrovili-mikrovili dalam lumen.

Kultur murni bakteri hasil isolasi yang ditumbuhkan dalam media agar dapat memancarkan cahaya di dalam ruangan gelap. Fenomena ini membuktikan bahwa cahaya yang dipancarkan cumi-cumi memang berasal dari bakteri yang hidup dalam kantung organ cahaya. Butiran polihidroksibutirat dijumpai pada bakteri genus *Photobacterium* yang merupakan salah satu karakteristik khas dari bakteri luminesen ini dan sekaligus membedakannya dari 2 genus bakteri luminesen lain *Vibrio* dan *Xenorhabdus* (Holt *et al.*, 1993). Polihidroksibutirat ini merupakan sumber energi bagi sel bakteri (Brock, 1991).

Hasil identifikasi menggunakan uji biokimia mengarahkan, bakteri yang hidup pada organ cahaya Cumi *S. seculanta* adalah jenis bakteri *Photobacterium phosphoreum*. Ini berdasarkan pengelompokan spesies dalam genus *Photobacterium* oleh Nesis (1982). Sedangkan Ruby (1996) menyatakan bahwa, ada sekitar 12 jenis bakteri luminesen sudah ditemukan di laut, umumnya bakteri luminesen tersebut dari genus *Vibrio*. Jenis bakteri pada organ cahaya cumi-cumi *Euprymna morsei*, *E. scolopes* and *E. tasmania* adalah jenis bakteri *Vibrio fischeri*. Sedang Herring *et al.* (1981) mendapatkan jenis bakteri pada organ cahaya cumi-cumi *Sepia* sp, *Sepiolo atlantica* dan *Sepiolo robusta* adalah *Photobacterium fischeri*. Selanjutnya Pringgenies, dkk (2001) telah menemukan bakteri yang hidup pada organ cahaya cumi *Loligo duvauceli* adalah *Photobacterium phosphoreum*. Secara kebetulan bakteri yang terdapat pada organ cahaya cumi *L. duvauceli* dan *S. esculanta* adalah sama. Diduga kedua bakteri ini memiliki kesamaan dalam interaksi simbiosis antara bakteri dan inangnya.

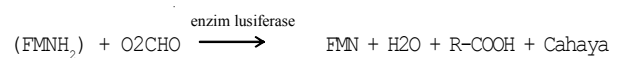
Hasil penelitian memperlihatkan bakteri *P. phosphoreum* memancarkan cahaya bila kerapatan bakteri mencapai $4,6 \cdot 10^9$ (CFU/ml). Sebaliknya, bakteri tidak memancarkan cahaya bila kerapatan selnya tidak mencapai jumlah tersebut. Di lautan yang sangat luas, bakteri tidak dapat berkolonisasi dalam kerapatan sangat tinggi sehingga bakteri tidak dapat memancarkan cahaya. Losick dan Kaiser (1997) menginformasikan bahwa, setelah kolonisasi terjadi

suatu kondisi yang disebut *quorum sensing*, yakni kondisi dimana *auto-inducer* yang bekerja dalam kerapatan sel bakteri yang sangat tinggi. Ruby (1996) menyatakan bahwa *auto-inducer* yang terdapat pada bakteri *Vibrio fischeri* disebut homoserin lakton. Pencapaian terjadi apabila konsentrasi bakteri cukup tinggi sehingga *auto-inducer* yang dihasilkan dapat menginduksi pencapaian ribuan kali lebih banyak.

Pengamatan langsung koloni bakteri dalam media agar memperlihatkan, bahwa bakteri memancarkan cahaya terus menerus selama 3 hari. Bila koloni bakteri dalam medium agar dimurnikan kembali, bakteri memancarkan cahaya kembali terus menerus selama 3 hari. Terdapat fenomena menarik mengapa bakteri memancarkan cahaya hanya dalam waktu tertentu?

Ada beberapa faktor yang menyebabkan bakteri luminesen melakukan reaksi untuk memancarkan cahaya yaitu: enzim lusiferase, lusiferin tereduksi atau flavin mononukleotida (FMN) tereduksi atau FMNH₂, oksigen dan senyawa kompleks aldehida (Colome, 1986).

Bentuk reaksi pada bakteri luminesen memancarkan cahaya adalah sebagai berikut:



Lusiferase bertindak sebagai enzim yang mengontrol kecepatan reaksi sehingga terbentuk lusiferase tereksitasi. Ketika terjadi reaksi elektron menyerap energi, elektron tersebut akan dieksitasikan dari tingkat energi terendah (*ground electron state*) ke tingkat energi di atasnya. Pada tingkat energi yang lebih tinggi, elektron akan tidak stabil dan akan kembali lagi ke keadaan dasarnya yang disebut relaksasi (*resting state*) sambil melepaskan paket energi yang disebut foton dalam bentuk cahaya (Werbiewe *et al.*, 1970). Dalam kasus bakteri *P. phosphoreum* maka dalam bentuk lusiferase terkesitasi, bakteri memancarkan cahaya, jadi dalam reaksi ini yang berperan adalah enzim lusiferase (Carey, *et al.*, 1984).

Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa: cahaya yang di timbulkan organ cahaya berasal dari bakteri luminesen. Hasil determinasi bakteri yang bersimbiosis pada organ cahaya cumi-cumi *Loligo* adalah jenis *Photobacterium phosphoreum*. Bakteri dapat memancarkan cahaya bila koloninya mencapai jumlah $4,6 \cdot 10^9$ (CFU/ml).

Daftar Pustaka

- Baumann, P., A.L. Furnis., and J.V. Lee. 1984. Facultatively an aerobic gram negative rods, in *Bergey's manual of systematic bacteriology*, N. R. Krieg (Ed), , Williams & Wilkns, Baltimore, USA, vol. 1, p. 518-538.
- Brock, T.D., and M.T. Mandigan. 1991. *Biology of microorganisme* (sixth ed), Prentice Hall International, Inc, p. 72-75
- Carey, L.M, A. Roddriguez, and E. Meighen. 1984. Generation of fatty acids by an acyl esterase in the bioluminescence system of *Photobacterium phosphoreum*. *J. Bio. Chem.* 259 (16):10216-10221.
- Colome, J. S., A. M, Kubinski, R. J, Cano, and D. V. Grady. 1986. *Laboratory exercise in Microbiology*, West Pub, Co., San Fransisco, p. 20-194.
- Davis, B.D., R. Dulbecco, H.N. Eise and H.S. Ginsberg. 1980. *Microbiology, Including Immunology and Molecular Genetics*, 3th ediotion, Harper and Row, Publishers, Philadelphia, p. 127-523
- Frye, M., 1999, Bioluminesence, <http://monster.educ.kent.edu/~compclub/i.7-98protists/bio2nd/bioluminescence.html>
- Hasting, J.W. and J.G. Morin. 1989. Bioluminescence, in Neural and Integrative Animal Physiology, C. Ladd. Prosser, Editor, Wiley-Liss, New York, p. 131-168
- Herring, P.J. 1977. Luminescence in cephalopods and fish, *Symp, Zool, Soc*, London. 38:127-159.
- Losick, R., and Kaiser, D. 1997. Why and how bacteria communication, *Scientific American*, 276:68-73.
- Madden, D., and B.M Lidesten. 2001. Bacterial illumination, culturing luminous bacteria, *Bioscience Explained*. 1 (1): 18.
- Nesis, K. N. 1982. Cephalopods of the world squids, Squids, Cuttlefishes, Octopuses and Allies, Moscow, p. 29-35.
- Norris, J.R., and D.W. Ribbons. 1971. Methods in microbiology. Acad. Press, London.
- Ruby, E.D. 1996. Lessons from a cooperative, bacterial-animal association: The *Vibrio fischery-Euprymna scolopes* light organ symbiosis. *J. Annu. Rev. Microbiol.* 50:591-624.
- Tett, P.B., and M.G. Kelly. 1973. Marine bioluminescence. *Oceanog. Mar. Biol.* 2: 89-173.
- Werbiewe., F. L., G.E. Holt., B.W. Scaron. 1970. Physics, A Basic Science, 5th edition, Am, Book, Comp, p. 357.