

## ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENGURAI SULFIDA DARI LUMPUR MANGROVE HUTAN LINDUNG ANGKE KAPUK

### *Isolation and Identification of Sulfide-degrading Bacteria in Mud from Mangrove Forest in Hutan Lindung Angke Kapuk*

Eni Lestari<sup>a</sup>, Dedy Darnaedi<sup>a</sup>, Safendri Komara Ragamustari<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Fakultas Biologi, Universitas Nasional, Jakarta Selatan, DKI Jakarta Indonesia, email: enilestari007@gmail.com

#### Abstrak

Mangrove memiliki mikroorganisme salah satunya bakteri. Lumpur mangrove memiliki kandungan hidrogen sulfida. Bakteri aerobik memetabolisme hidrogen sulfida ini menjadi senyawa sulfat. Isolasi menggunakan medium Thiosulfat Mineral Medium. Isolat yang diamati secara makroskopis. Isolat dipilih dari hasil pengamatan mikroskopik, uji katalase dan uji motilitas. Isolat diuji juga kinerja penurunan sulfida. Isolat dengan kinerja penurunan sulfida terbaik dilanjutkan untuk uji sekuensing 16S rRNA. Hasil sekuensing menunjukkan isolat dari lumpur mangrove yang memiliki kinerja penurunan sulfida terbaik dengan nilai 30,58% adalah bakteri spesies *Bacillus aryabhatai*

Kata kunci : mangrove, sulfida, bakteri, aerobik, Bacillus

#### Abstract

*Mangroves have a diversity of microorganisms, one of which is bacteria. Mangrove mud contains hydrogen sulfide. Aerobic bacteria metabolize this hydrogen sulfide to sulfate compounds. Isolation used thiosulfate mineral medium. The growing isolates observed macroscopically. Selected isolates from microscopic observation, catalase test and motility test. The isolates also tested for their sulfide reduction performance. The isolates with the best sulfide reduction performance continued for 16S rRNA sequencing assay. The best sulfide reduction performance is 30,58% and the bacteria species based result sequencing is *Bacillus aryabhatai**

*Keywords: mangrove, sulfide, bacteria, aerobic, Bacillus*

#### Pendahuluan

Mikroorganisme tersebar dengan sangat luas di bumi ini, salah satunya adalah bakteri. Banyak spesies bakteri yang diketahui memiliki kemampuan metabolisme senyawa organik maupun senyawa anorganik, hidup dalam kondisi ekstrim, mampu memproduksi enzim dan sebagainya. Karena kemampuannya tersebut, bakteri berperan penting dan dimanfaatkan untuk

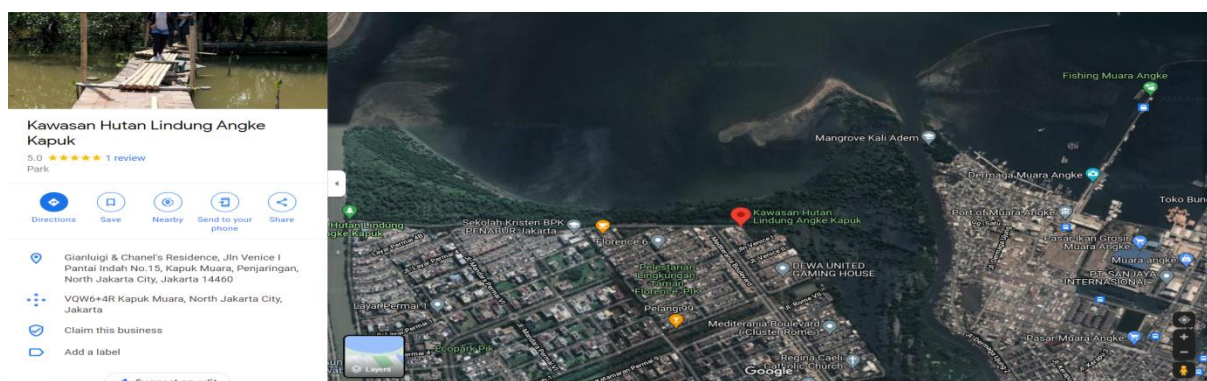
keselamatan lingkungan seperti penanggulangan pencemaran lingkungan, caranya yakni menguraikan polutan melalui proses biodegradasi dan bioremediasi (Irianto, 2016). Indonesia memiliki keanekaragaman mikroorganisme yang tinggi. Banyak mikroorganisme baik dari laut atau pesisir dan mikroorganisme endofitik belum dieksplorasi lebih dalam (Rooshero dan Wahyudi, 2017).

Sumber pencemaran domestik semakin tahun semakin meningkat namun pengelolannya belum optimal, akibatnya sungai dan air tanah dapat tercemar. Hal ini dapat menimbulkan banyak masalah. Salah satu masalahnya adalah bau busuk dari produksi hidrogen sulfida. Sumber hidrogen sulfida dalam perairan antara lain berasal dari proses dekomposisi bahan organik pada pH rendah dan kondisi anaerob (Widyaningsih, 2013). Hidrogen sulfida bersifat toksik, iritan dan berbau busuk. Konsentrasi besar berefek meningkatkan keasaman air sehingga dapat menyebabkan korosifitas pada pipa-pipa logam. Toksisitas akut pada manusia karena menghirup gas dengan konsentrasi tinggi, iritasi pada mata diakibatkan paparan padakonsentrasi 15-30 mg/m<sup>3</sup>. Kadar maksimum dalam air yang diperbolehkan adalah 0,05 mg/liter (Waluyo, 2009).

Pengelolaan limbah dengan kandungan sulfida ini dapat dilakukan dengan menggunakan bantuan bakteri atau yang sering disebut sebagai bioremediasi (Fahrudin, 2014). Eksplorasi bakteri pengurai sulfida ini diambil dari lumpur mangrove hutan lindung Angke Kapuk. Karakter lumpur mangrove yang berbau khas sulfida pada kawasan ini terjadi karena penguraian bahan organik pada kondisi anoksik tidak dapat berjalan secara sempurna dan dapat menimbulkan senyawa berbahaya seperti hidrogen sulfida, bahkan jumlah hidrogen sulfida dapat meningkat seiring bertambahnya bahan organik dan menurunnya oksigen terlarut. Kondisi tersebut menjadi buruk dengan keadaan lingkungan mangrove yang biasa selalu tergenang air laut (Purnomo *et al*, 2013). Kondisi lingkungan kawasan mangrove seperti ini menjadi habitat alami bakteri pengurai sulfida.

## Material dan metode

Lokasi pengambilan lumpur mangrove yakni di Hutan Lindung Angke Kapuk. Waktu penelitian selama 3 bulan dari Maret 2021 sampai Juni 2021



Gambar 1. Lokasi pengambilan sampel lumpur hutan mangrove

#### 1. Pengambilan sampel lumpur

Lumpur diambil pada kedalaman sekitar 10 cm dari permukaan lantai mangrove menggunakan modified mud sampler sebanyak 100 gram. Kemudian sampel dimasukkan ke dalam plastik steril.

#### 2. Pengkayaan menggunakan Thiosulphate Mineral Medium

Sebanyak 50 gram lumpur dimasukkan ke dalam 500 ml Thiosulfat Mineral Medium kemudian diinkubasi selama 5 hari suhu 37°C menggunakan aerasi. Komposisi bahan yang ditimbang antara lain (g/L): 2.0 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.0 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4 NH<sub>4</sub>Cl, 0.2 MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.01 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O dan 8.0 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O. Media tersebut kemudian disterilisasi dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit (Vikromvarasiri *et al*, 2015).

#### 3. Uji Angka Lempeng Total menggunakan metode pour plate

Sesudah tahap pengkayaan dilanjutkan dengan uji angka lempeng total menggunakan Luria Bertani dengan tambahan Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> dengan metode pour plate. Komposisi media Luria Bertani dengan Natrium Tiosulfat (g/L): Tryptone 10 gram, Yeast Extract 5 gram, NaCl 10 gram, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 8 gram, Agar Base 15 gram dan Aquadest 1 liter. Media agar ini kemudian disterilisasi dengan menggunakan autoklaf bersuhu 121 °C selama 15 menit. Pengenceran dilakukan 10<sup>-1</sup> sampai 10<sup>-7</sup> menggunakan pelarut NaCl 0,85% .

#### 4. Uji Mikroskopis Bakteri

Hasil uji makroskopis dengan melakukan pengamatan bentuk, elevasi, tepi koloni, ukuran dan warna didapatkan 15 terpilih, kemudian dilanjutkan dengan pewarnaan sederhana menggunakan larutan Kristal violet 2% dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000× (uji mikroskopik). Hasilnya didapatkan 15 isolat berbentuk batang.

#### 5. Uji Katalase

Uji katalase menggunakan hidrogen peroksida dengan konsentrasi 3%. 1 sampai 2 tetes Hidrogen Peroksida 3% diletakan pada kaca preparat berisi 1 ose isolat bakteri. Diamati timbulnya gelembung - gelembung gas yang terjadi karena adanya reaksi enzim peroksidase dalam sel bakteri.

#### 6. Uji Motilitas

Motilitas diamati berdasarkan rata tidaknya pertumbuhan bakteri pada media di dalam tabung reaksi contain Luria Bertani Agar. Bakteri motil akan bergerak dan menyebar di sekitar daerah tusukan. Bakteri yang tidak motil hanya tumbuh terbatas pada bekas tusukan (Feliatra,2018)

#### 7. Uji Kinerja Penurunan Sufida

Prinsip pengerjaannya adalah dalam suasana asam, senyawa dimetil p-fenildiamin berubah menjadi garam diammonium dengan adanya katalisator FeCl<sub>3</sub>. Garam ini kemudian bereaksi dengan senyawa sulfida membentuk senyawa tiasin yang berwarna biru. Banyaknya senyawa tiasin yang terbentuk ekuivalen dengan kadar sulfida dalam contoh air. Reagen yang digunakan adalah asam sulfat (1:1), larutan N,N-dimetil-p-fenildiamin dihidroklorida, Larutan FeCl<sub>3</sub> dan Larutan diammonium 3solate3 fosfat 40%. Kurva 3solate3 dibuat pada konsentrasi 0,0 ppm ; 0,2 ppm ; 0,4 ppm ; 0,6 ppm ; 0,8 ppm dan 1,0 ppm. Hasil perhitungan regresi linier

didapatkan  $y = 0,462x$  dimana nilai X adalah konsentrasi larutan 4isolat4 sulfida dan nilai y adalah nilai besarnya absorbansi spektrofotometer.

*Perhitungan kinerja penurunan sulfida didapatkan dengan rumus =*

$$\frac{(\text{Konsentrasi larutan sulfida baku 2 ppm} - \text{Konsentrasi sulfida akhir})}{\text{Konsentrasi larutan sulfida baku 2 ppm}} \times 100\%$$

## 8. Analisis sekuensing 16S rRNA

Proses pengerjaan antara lain ekstraksi DNA menggunakan teknik konvensional kemudian diambil target untuk PCR selanjutnya dilakukan purifikasi produk PCR (membuang sisa-sisa reagen PCR terutama kedua primer), konsentrasi produk PCR dikur menggunakan spektrofotometer (ng/ $\mu$ l). Setelah itu dilakukan cycle sequencing (dengan Big Dye Terminator Kit). Purifikasi produk cycle sequencing untuk membuang sisa-sisa reagen cycle sequencing terutama ddNTP sisa. Run dilakukan di 310/3130/3130xlGA. Analisis data dengan *Sequencing Analysis Software*

## Hasil dan Diskusi

Hasil isolasi dan pengamatan makroskopis koloni dari lumpur mangrove didapatkan 15 isolat yang diduga memiliki kinerja penurunan sulfida karena kemampuan tumbuh dalam medium mengandung Natrium tiosulfat. Penggunaan Natrium tiosulfat untuk sumber sulfida mengingat muatan ion  $S^{2-}$  dalam tiosulfat sama dengan ion sulfida. Semua isolat memiliki bentuk batang, 3 isolat menunjukkan hasil uji katalase negatif, yang berarti isolat tidak memiliki enzim katalase sedangkan isolat lain memiliki enzim katalase, 1 isolat memiliki sifat motil dan 14 isolat lainnya bersifat non motil. Pada pengujian penurunan sulfida didapatkan hasil tidak semua isolat dapat memiliki kinerja penurunan sulfida pada konsentrasi sulfida 2 ppm dalam waktu inkubasi 2 hari kondisi semiaerobik. Hanya 8 isolat yang memiliki kinerja penurunan sulfida pada konsentrasi sulfida 2 ppm. Isolat lainnya kemungkinan membutuhkan waktu lebih lama untuk menurunkan konsentrasi sulfida atau kinerja penurunan sulfida dapat terjadi pada konsentrasi sulfida kurang dari 2 ppm. Isolat dengan kinerja penurunan sulfida paling besar diidentifikasi menggunakan molecular sekuensing 16S rRNA dan diperoleh hasil isolat memiliki similariti tinggi dengan spesies *Bacillus aryabhataii*.

Tabel 1. Hasil penelitian bakteri lumpur mangrove

Kode Isolat	Uji mikroskopis	Uji Katalase	Uji Motilitas	Uji Penurunan sulfida (%)
P1.1	Batang	Positif	Motil	30,58
P1.2	Batang	Positif	Non Motil	0
P1.3	Batang	Negatif	Non Motil	9,17
P2.1	Batang	Positif	Non Motil	0
P2.2	Batang	Positif	Non Motil	0
P2.3	Batang	Negatif	Non Motil	3,88
P3.1	Batang	Positif	Non Motil	21,84
P3.2	Batang	Negatif	Non Motil	0
P3.3	Batang	Positif	Non Motil	9,17

P4.1	Batang	Positif	Non Motil	0
P4.2	Batang	Positif	Non Motil	10,68
P4.3	Batang	Positif	Non Motil	13,59
P5.1	Batang	Positif	Non Motil	8,74
P5.2	Batang	Positif	Non Motil	0
P5.3	Batang	Positif	Non Motil	0

### Kesimpulan

Hasil sekunsing 16s rRNA pada isolat yang memiliki kinerja penurunan sulfida terbaik mendapatkan hasil bahwa isolat yang berasal dari lumpur mangrove tersebut adalah *Bacillus aryabhatai*. Spesies bakteri ini memiliki karakter koloni berwarna putih kekuningan, cembung, bulat dan berukuran sedang, memiliki enzim katalase, non motil dan berbentuk batang. Kinerja penurunan sulfida oleh bakteri ini adalah 30,58%. Spesies bakteri ini ditemukan pertama kali di tabung krio yang digunakan untuk menyerap udara pada ketinggian antara 27-41 km diatas permukaan laut ketika penerbangan menggunakan balon udara (Shivaji *et al.*, 2009). Bakteri ini ditemukan pula oleh peneliti Balingtang yang berasal dari tanah Karawang dan mempunyai kemampuan dalam mendegradasi cemaran Pestisida (Wahyuni *et al.*, 2011). Bakteri ini memiliki gram positif, dapat hidup pada suhu antara 4-37°C, mampu bertahan dibawah paparan sinar UV hingga 30 menit, dan tidak memproduksi antibiotik (Ray,S *et al.*,2012). Mengingat adanya potensi penting dari peran *Bacillus aryabhatai* dalam mengurangi kandungan sulfida, maka penelitian lebih lanjut keberadaan *B. aryabhatai* pada media lainnya yang tercemar perlu dilakukan. Selain itu perlu juga dilakkan uji aplikasi pada instalasi pengolah limbah dan akuakultur.

### Daftar Pustaka

- Fahrudin.(2014).*Bioteknologi Lingkungan*. Penerbit Alfabeta, Bandung
- Feliatra.(2018).*Probiotik Suatu Tinjauan Keilmuan Baru Bagi Pakan Budi Daya Perikanan*. Prenadamedia Group, Jakarta
- Irianto, I.K.(2016). *Pemanfaatan Bakteri Untuk Keselamatan Lingkungan*
- Purnomo, P.W., M. Nitisupardjo, dan Y. Purwandari.(2013).Hubungan Antara Total Bakteri Dengan Bahan Organik, NO<sub>3</sub> dan H<sub>2</sub>S pada Lokasi Sekitar Eceng Gondok dan Perairan Terbuka Di Rawa Pening. *Management of Aquatic Resources. Volume 2 (3)*: 85-92.
- Ray, S., Datta, R., Bhadra, P., Chaudhuri, B., & Mitra, A. K. (2012). From space to Earth: *Bacillus aryabhatai* found in the Indian sub-continent. *Biosci. Discov*, 3, 138-145
- Roosheroe, I. G., & Wahyudi, P.(2017). *Mengenal Biodiversitas Mikroorganisme Indonesia untuk Kesejahteraan Bangsa*. Jakarta: Yayasan Pustaka Obor Indonesia.

- Shivaji, S., Chaturvedi, P., Begum, Z., Pindi, P. K., Manorama, R., Padmanaban, D. A., & Narlikar, J. V. (2009). *Janibacter hoylei* sp. nov., *Bacillus isronensis* sp. nov. and *Bacillus aryabhatai* sp. nov., isolated from cryotubes used for collecting air from the upper atmosphere. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(12), 2977-2986.
- Vikromvarasiri, N., Boonyawanich, S., & Pisutpaisal, N. (2015). Optimizing sulfur oxidizing performance of *Paracoccus pantotrophus* isolated from leather industry wastewater. *Energy Procedia*, 79, 629-633.
- Wahyuni, S., Indratin, I., & Poniman, P. (2011). Pengkayaan Mikroba Konsorsia pada Urea Berlapis Arang Aktif Dapat Mempercepat Penurunan Insektisida Aldrin di Lahan Sawah. *In Proceeding Biology Education Conference: Biology, Science, Enviromental, and Learning (Vol. 11, No. 1, pp. 402-407)*.
- Waluyo, L. (2009). *Mikrobiologi Lingkungan*. Universitas Muhammadiyah Malang Press. Malang.
- Widyaningsih, T.S. (2013). Pengembangan Ekoteknologi Dengan Proses Aerasi Filtrasi Untuk Menurunkan Kadar H<sub>2</sub>S Pada Limbah Cair Pasar Ikan. *Jurnal; Rekayasa Lingkungan Vol.13 No.2*.

