LAPORAN AKHIR
PROGRAM KREATIVITAS MAHASISWA

PEMANFAATAN BAKTERI PROTEOLITIK SEBAGAI BIOKONTROL SIANOBAKTERI TOKSIK *Microcystis sp.* DI PERAIRAN TAWAR

BIDANG
PKM PENELITIAN

Oleh

Encah Ewi Mulyeti	G34104004/2004
R. Desy Yusniawati	G34104050/2004
Yunanto Tri Cahyo	G34051797/2005
Vitria Melani	G34050386/2005

INSTITUT PERTANIAN BOGOR

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi
Departemen Pendidikan Nasional
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah
Program Kreativitas Mahasiswa
Nomor 001/SP2H/PKM/DP2M//II/2008 tanggal 26 Februari 2008

LEMBAR PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR PROGRAM KREATIVITAS MAHASISWA

1. Judul Kegiatan: Pemanfaatan Bakteri Proteolitik sebagai Biokontrol Sianobakteri Toksik *Microcystis* sp. di Perairan Tawar
2. Bidang Kegiatan : PKMP
3. Bidang Ilmu : MIPA
4. Ketua Pelaksana Kegiatan
   a. Nama Lengkap : Encah Ewi Mulyeti
   b. NIM : G34104004
   c. Departemen : Biologi
   d. Universitas : Institut Pertanian Bogor
   e. Alamat Rumah/HP : Bogor & (0251) 621153/081381826438
   f. Alamat email : e2m_87@yahoo.co.id
5. Anggota Pelaksana Kegiatan/Penulis : 3 orang
6. Dosen Pendamping
   a. Nama Lengkap dan Gelar : Dr. Nisa Rachmania Mubarik, M.Si.
   b. NIP : 132 045 531
   c. Alamat Rumah dan No Tel./HP : Jalan Bijaksana No. 16 Kedung Badak Baru, Bogor 16710, HP 08158321972
7. Biaya Kegiatan Total : Rp. 4 984 000.00
   a. Dikti : Rp. 4 984 000.00
   b. Sumber lain : -
8. Jangka Waktu Pelaksanaan : 5 bulan

Bogor, 03 Juli 2008

Menyetujui

Ketua Departemen Biologi

Prof. Dr. Ir. Alex Hartana
NIP. 130 516 351

Ketua Pelaksana Kegiatan

Encah Ewi Mulyeti
NIM. G34104004

Wakil Rektor Bidang Akademik dan Kemahasiswaan

Prof. Dr. Ir. Yonny Koesmaryono, MS
NIP. 131 473 999

Dosen Pendamping

Dr. Nisa Rachmania Mubarik, M.Si
NIP. 132 045 531

ABSTRAK

ENCAH EWI MULYETI, R DESY YUSNIAWATI, YUNANTO TRI CAHYO, VITRIA MELANI. Pemanfaatan Bakteri Proteolitik sebagai Biokontrol Sianobakteri Toksik *Microcystis* sp. di Perairan Tawar. Dibimbing oleh NISA RACHMANIA MUBARIK.

Sianobakteri merupakan kelompok fitoplankton yang umum dijumpai di perairan tawar. Sianobakteri seperti *Microcystis* sp., *Anabaena*, dan *Oscillatoria* menghasilkan mikrosistin, yaitu jenis toksin monosiklik heptapeptida penyebab kematian ikan air tawar. Sebanyak 31 isolat bakteri proteolitik telah berhasil diisolasi dari saluran pencernaan ikan nila dan merupakan probiotik yang dapat menghambat pertumbuhan organisme patogen. Penelitian ini bertujuan memanfaatkan bakteri proteolitik asal saluran pencernaan ikan nila GIFT dalam menghambat pertumbuhan sianobakteri toksik *Microcystis* sp.

Penapisan dari 30 isolat bakteri proteolitik menunjukkan ada dua isolat yang menghambat pertumbuhan *M. aeruginosa* BT-02, yaitu isolat NU-4 dan NU-8. Isolat NU-4 mencapai pertumbuhan maksimal pada jam ke-9 dengan log jumlah sel 9.97, sedangkan isolat NU-8 (*Aeromonas* sp.) mencapai pertumbuhan maksimal pada jam ke- 15 dengan log jumlah sel 8.37. Aplikasi bakteri NU-4 dan *Microcystis aeruginosa* BT-02 pada ikan air tawar tidak menyebabkan kematian ikan, tetapi menimbulkan gejala penyakit seperti bercak putih dan luka pada tubuh ikan.

A. JUDUL PENELITIAN

PEMANFAATAN BAKTERI PROTEOLITIK SEBAGAI BIOKONTROL SIANOBAKTERI TOKSIK *Microcystis* sp. DI PERAIRAN TAWAR

B. LATAR BELAKANG

Sianobakteri merupakan kelompok fitoplankton yang umum dijumpai di perairan tawar. Kelimpahan sianobakteri di perairan dapat menyebabkan ledakan populasi (*blooming*). Bakteri ini bersifat fotosintetik dan di antaranya dalam keadaan eutrofik menghasilkan metabolit berupa endotoksin, alkaloid neurotoksin, atau siklik peptida hepatotoksin (Christoferren 2002).

Microcystis sp. merupakan jenis sianobakteri toksik yang pernah ditemukan dalam keadaan berlimpah di waduk Saguling, Jawa Barat. Kepadatan sianobakteri ini di salah satu stasiun pengamatan pada bulan Desember 1986 mencapai 898 000 sel/liter dari sampel air yang diambil dari kedalaman 20 cm dari permukaan air (Soemarwoto *et* al. 1990).

Sianobakteri seperti *Microcystis* sp., *Anabaena*, dan *Oscillatoria* (Gupta & Guha 2006) menghasilkan mikrosistin, yaitu jenis toksin monosiklik heptapeptida. Mikrosistin dapat menyebabkan kelainan-kelainan histopatologi, hematologi, dan metabolisme ikan air tawar. Sebagai contoh, apabila mikrosistin masuk ke dalam hati maka akan menghambat kerja protein hepatoksit fospatase. Hal ini mengakibatkan terjadinya hiperfosforilasi pada sitokeratin yang menimbulkan tidak dapat dibentuknya mikrofilamen, pecahnya sel, dan pendarahan dalam hati (Bourne *et al.* 1996).

Ikan nila atau *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) Trewavas GIFT (*Genetic Improvement of Farm Tilapias*) merupakan salah satu jenis ikan air tawar yang mampu bertahan hidup pada kondisi eutrofikasi. Ikan nila tahan terhadap penyakit, kepadatan yang tinggi, dan kualitas air yang rendah. Konsentrasi *Microcystis* yang tinggi dapat meningkatkan pertumbuhan ikan nila di Waduk Saguling Jawa Barat karena sianobakteri ini merupakan pakan alaminya (Hadikusumah & Costa 1990).

Keberadaan bakteri proteolitik dalam saluran pencernaannya mampu menghambat pertumbuhan *Microcystis* sp. Sebanyak 31 isolat bakteri proteolitik telah berhasil diisolasi dari saluran pencernaan ikan nila dan merupakan probiotik yang dapat menghambat pertumbuhan organisme patogen (Mubarik *et al.* 2006).

C. PERUMUSAN MASALAH

Blooming sianobakteri mengakibatkan kematian ikan akibat kekurangan oksigen dan dihasilkannya senyawa toksin. Ikan nila GIFT merupakan jenis ikan air tawar yang tahan terhadap penyakit termasuk saat *blooming Microcystis* sp.

Bakteri proteolitik dalam saluran pencernaan ikan tersebut mampu menghambat pertumbuhan *Microcystis* sp. Bakteri tersebut menghasilkan enzim protease yang diduga dapat menghidrolisis ikatan peptida dari senyawa heptapetida siklik toksin mikrosistin.

Bakteri proteolitik yang berhasil diisolasi dapat dikembangkan sebagai biokontrol sianobakteri toksik *Microcystis* sp. sehingga dapat mencegah kematian ikan air tawar lainnya saat terjadi *blooming* sianobakteri.

D. TUJUAN PENELITIAN

Penelitian ini bertujuan: (1) memanfaatkan bakteri proteolitik asal saluran pencernaan ikan nila GIFT dalam menghambat pertumbuhan sianobakteri toksik *Microcystis* sp., (2) melakukan pengujian enzim protease yang dapat menghambat pertumbuhan *Microcystis* sp., dan (3) melakukan pengujian terhadap ikan air tawar (nila dan mas).

E. LUARAN YANG DIHARAPKAN

Luaran yang diharapkan dari penelitian ini ialah isolat bakteri proteolitik yang dapat dimanfaatkan untuk mengatasi permasalahan *blooming Microcystis* sp., dan tulisan ilmiah mengenai pemanfaatan bakteri proteolitik penghambat pertumbuhan *Microcystis* sp. yang diaplikasikan pada ikan air tawar (nila dan mas).

F. KEGUNAAN PENELITIAN

Manfaat dari penelitian ini yaitu tersedianya biokontrol yang mampu menghambat pertumbuhan *Microcystis* yang diharapkan dapat menguraikan toksin yang dihasilkannya selama *blooming*.

G. METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan sejak bulan Maret hingga Mei 2008, bertempat di laboratorium Mikrobiologi dan Zoologi, Departemen Biologi Fakultas MIPA, Institut Pertanian Bogor.

Peremajaan Isolat Bakteri Proteolitik Asal Saluran Ikan Nila

Sebanyak 30 isolat bakteri proteolitik koleksi Laboratorium Mikrobiologi diremajakan dengan metode cawan gores pada media NA (*Nutrient Agar*) yang mengandung susu skim dan diinkubasi pada suhu ruang.

Isolasi *Microcystis* sp. dari Perairan Tawar Eutrofik

Isolasi *Microcystis* sp. dilakukan dengan mengambil sampel air dari perairan tawar eutrofik. Sampel air dimasukkan ke dalam botol steril. Sebanyak 25 ml dipipet ke dalam 50 ml medium BG-11 cair (Tabel 1) dan diinkubasi pada suhu ruang selama ± 48 jam.

Tabel 1 Komposisi Media BG-11 yang telah dimodifikasi (Vanderloeg *et al.* 2000)

Bahan	Per Liter
Citric acid	6 gram
$NaNO_3$	170 gram
$MgSO_4.7H_2O$	73.94 gram
K_2HPO_4	41 gram
$CaCl_2.2H_2O$	36.76 gram
Na_2CO_3	20 gram
Ferric ammonium citrate	6 gram
Garam disodium EDTA	1 gram
$NaHCO_3$	84 gram
Trace metal mix	1 ml

Identifikasi *Microcystis* sp.

Identifikasi dilakukan berdasarkan pengamatan morfologi dengan melihat bentuk dan penataan sel di bawah mikroskop seperti yang dideskripsikan di dalam *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.* 1994).

Penapisan Isolat Proteolitik Penghambat Pertumbuhan *Microcystis* sp.

Sebanyak 30 isolat bakteri proteolitik ditumbuhkan dengan metode agar blok pada media agar yang mengandung kultur *Microcystis* sp. Setelah inkubasi selama 8 jam pada suhu 30°C, isolat yang dikelilingi zona hambat merupakan isolat yang menghasilkan enzim protease yang menghambat pertumbuhan *Microcystis* sp.

Uji Toksisitas *Microcystis* sp. terhadap Ikan Mas serta Aplikasi Bakteri Proteolitik

Uji toksisitas yang dilakukan berupa uji postulat Koch yang dimodifikasi (Salyers & Whitt 1994) pada ikan mas yang memiliki ukuran dan bobot yang sama yaitu ± 200 gram. Sebelum diberi perlakuan, ikan-ikan tersebut dipelihara selama satu minggu. Perlakuan diberikan dengan penyuntikan intraperitonial, perlakuan pertama sebanyak 10^8 sel/ml *Microcystis* sp. Perlakuan kedua 10^8 sel/ml. Perlakuan ketiga *Microcystis* sp. dan bakteri proteolitik dengan perbandingan 1: 1. Masing-masing perlakuan dilakukan duplo baik pada ikan mas, maupun kontrol.

Ikan-ikan tersebut dipelihara di dalam akuarium berukuran 30 × 60 x 40 cm selama satu bulan dengan kapasitas 4 ekor ikan untuk setiap akuarium. Selama pemeliharaan berlangsung diberikan pakan sebanyak 3% dari total bobot ikan yang dilakukan dua kali sehari. Penggantian air dilakukan satu bulan sekali dan digunakan *aerator filter* untuk menjaga sirkulasi O_2 di dalam akuarium dan menyaring kotoran ikan.

Analisis Histologi Hati Ikan

Analisis histologi dilakukan dengan mikroteknik. Sayatan jaringan hati ikan difiksasi di dalam larutan Bouin. Spesimen diwarnai dengan haematoxilin dan eosin dan diamati di bawah mikroskop (Gupta & Guha 2006).

H. HASIL

Isolasi dan Identifikasi *Microcystis* sp. dari Perairan Tawar Eutrofik

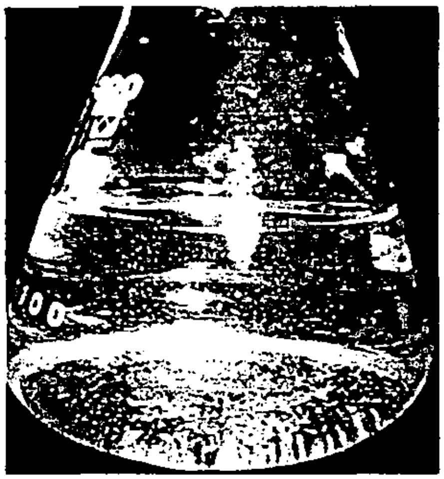
Pengambilan sampel dilakukan di kolam ikan sekitar Fakultas Perikanan, IPB. Sampel diambil dari tiga lokasi masing-masing sejumlah ± 50 ml. Kondisi perairan sebagian besar berwarna hijau dan suhu tinggi (Tabel 2). Inkubasi 48 jam belum ada pertumbuhan sianobakteri. Pengamatan setelah inkubasi dua minggu menunjukkan adanya pertumbuhan mikroalga (Gambar 1). Mikroalga tersebut diduga ialah *Synechocystis* dan jenis yang mirip dengan *Microcystis* tetapi belum dapat dipastikan (Gambar 3). Isolasi dan pemurnian *Microcystis* sp. masih sulit dilakukan.

Isolat acuan digunakan untuk uji toksisitas terhadap ikan, yaitu kultur aksenik *Microcystis aeruginosa* BT-02 yang berasal dari danau Swan, Michigan, USA dan diperoleh dari Alan Wilson PhD (Wilson *et al.* 2005).

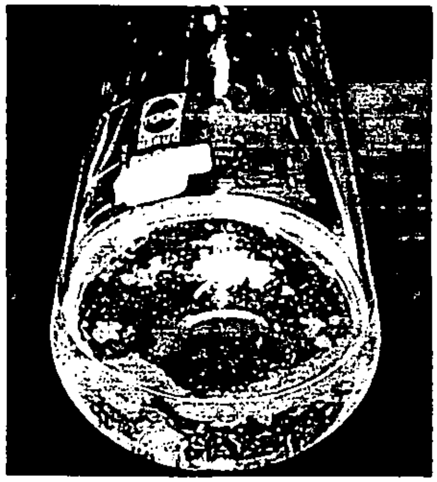
Tabel 2 Kondisi tempat pengambilan sampel

Lokasi	Suhu (°C)	pH	Warna
Titik 1	30	6	hijau muda
Titik 2	31.5	6	hijau
Titik 3	32	7	hijau muda

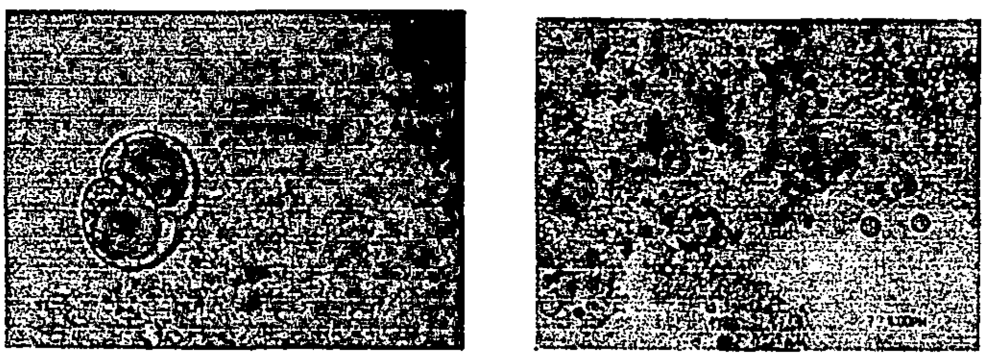
Kultur *M. aeruginosa* dapat tumbuh optimal pada media BG11 dengan perlakuan cahaya ± 1000 lux dan diinkubasi pada suhu ruang. Biakan ini diremajakan dalam tabung kultur dan erlenmeyer yang diisi dengan medium BG11 cair sebanyak sepertiga bagiannya. Koloni *M. aeruginosa* mengapung dipermukaan media (Gambar 2), dengan sel berbentuk bulat dan koloni berlendir (Gambar 4).



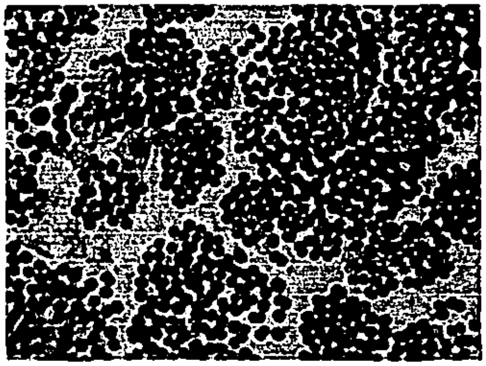
Gambar 1 Sampel air kolam dalam media BG-11.



Gambar 2 Koloni *Microcystis* dalam media BG-11.



Gambar 3 Sel mikroalga yang ditumbuhkan pada media BG-11 (1000x).



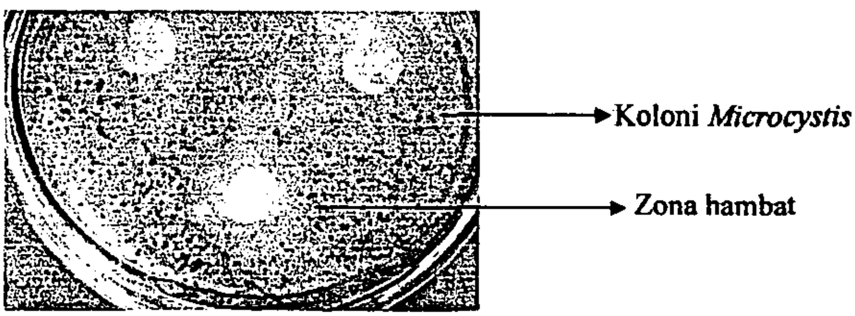
Gambar 4 Sel *Microcystis aeruginosa* di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x.

Penapisan Isolat Proteolitik Penghambat Pertumbuhan *Microcystis* sp.

Penapisan dari 30 isolat bakteri proteolitik dengan menggunakan agar-agar blok ternyata hanya ada dua isolat yang menghambat pertumbuhan *M. aeruginosa,* yaitu isolat NU-4 dan NU-8. Penghambatan ini ditandai dengan adanya zona hambat di sekitar koloni bakteri (Gambar 5). Zona hambat terbesar diperoleh isolat NU-8 (Tabel 3). Hasil pewarnaan gram menunjukkan bahwa NU-4 dan NU-8 berbentuk batang dan gram negatif (Gambar 6). NU-8 telah teridentifikasi sebagai *Aeromonas* (Mubarik *et al.* 2006).

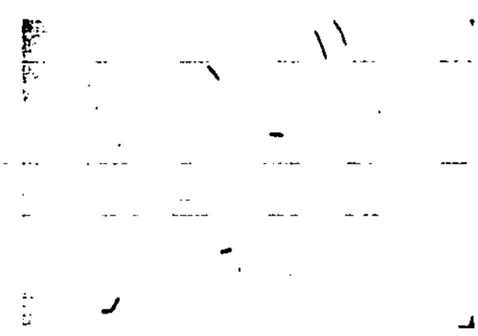
Tabel 3 Diameter zona bakteri dan penghambatan *M. aeruginosa* oleh bakteri proteolitik isolat NU-4 dan NU-8

No	Isolat bakteri	Gram	Zona hambat (cm)	Diameter koloni (cm)	Indeks penghambatan
1	NU-4	negatif	2.30	1	1.30
2	NU-8	negatif	2.60	1	1.60



Gambar 5 Zona hambat isolat bakteri proteolitik pada kultur *Microcystis* sp.

a

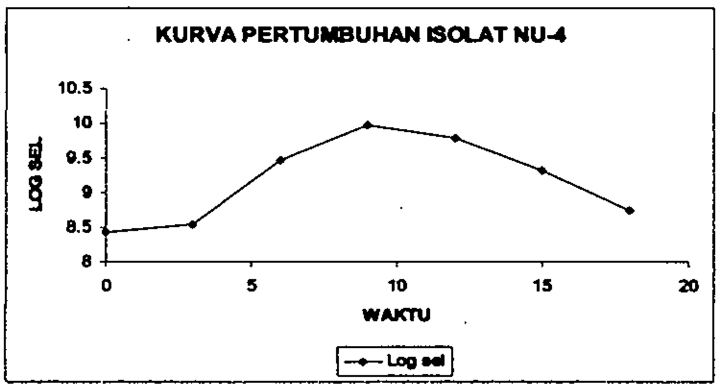


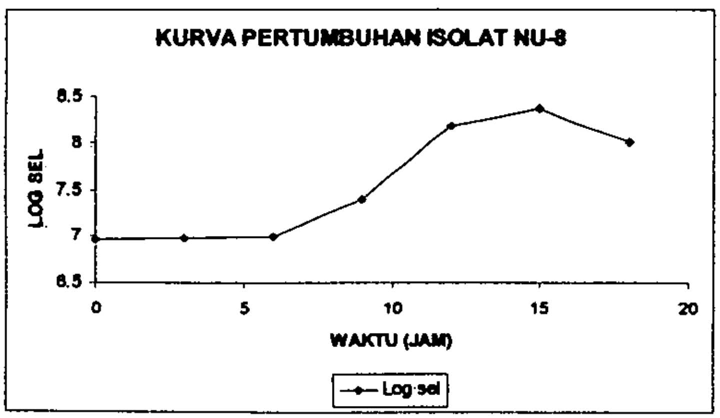
b

Gambar 6 Isolat bakteri proteolitik (a) NU-4 dan (b) NU-8 dengan perbesaran 1000x.

Pengukuran Kurva Tumbuh Isolat NU-4 dan NU-8

Sebelum kedua isolat bakteri proteolitik diaplikasikan untuk uji toksisitas *Microcystis* sp. terhadap ikan, maka dilakukan pengukuran pertumbuhan (Gambar 7). Isolat NU-4 mencapai pertumbuhan maksimal pada jam ke-9 dengan log jumlah sel 9.97, sedangkan isolat NU-8 (*Aeromonas* sp.)mencapai pertumbuhan maksimal pada jam ke- 15 dengan log jumlah sel 8.37.





Gambar 7 Kurva pertumbuhan isolat NU-4 dan NU-8 pada media *Nutrient Broth*