

Analisis Variasi Komponen Fotoprotein dan Aldehid Pada Reaksi Bioluminesen Bakteri Luminesen *Vibrio ordalii* Asal Perairan Laut Papua

EVA PAPILAYA^{1*} DAN RITA SINAGA²

¹Jurusan Fisika FMIPA Universitas Cenderawasih, Jayapura-Papua

²Jurusan Kimia, FMIPA Universitas Cenderawasih, Jayapura-Papua

Diterima: tanggal 14 Juli 2010 - Disetujui: tanggal 22 September 2010

© 2010 Jurusan Biologi FMIPA Universitas Cenderawasih

ABSTRACT

Riset pemancaran cahaya yang dilakukan pada bakteri luminesen semakin banyak dipelajari. Hal ini disebabkan bakteri ini sangat mudah untuk dikerjakan di laboratorium, dan mudah diperoleh. Salah satu bakteri yang telah diisolasi dari laut lokal Papua adalah spesies *Vibrio ordalii*, dan karakteristik biologi dan fisiknya telah dilakukan. Pemancaran cahaya yang dilakukan oleh bakteri ini terjadi melalui reaksi kimia, yang dikenal sebagai reaksi bioluminesen, yang melibatkan tiga komponen fotoprotein, yaitu lusiferase, lusiferin, dan oksigen. Pada riset ini dilakukan variasi terhadap dua komponen, lusiferase dan lusiferin, dan aldehid sebagai komponen pendukung dalam reaksi bioluminesen. Tujuan yang dicapai adalah untuk mengetahui pengaruh variasi kedua komponen terhadap pemancaran cahaya bakteri. Metode yang digunakan adalah metode assay ditionit dan spektrometri dengan menggunakan spektrofotometer uv-vis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aldehid dengan konsentrasi di atas 0,01% tidak meningkatkan luminesen.

Key words: bioluminescent, *Vibrio ordalii*, fotoprotein, aldehid, lusiferin, lusiferase.

PENDAHULUAN

Bakteri merupakan mikroorganisme yang mempunyai ukuran diameter sangat kecil yaitu 0,5–1,0 μm dan mempunyai berbagai macam bentuk seperti bulat, batang, dan spiral. Berdasarkan kebutuhan oksigen untuk tumbuh, bakteri dikelompokkan menjadi bakteri yang bersifat aerob dan anaerob (Pelczar, *et al.*, 1986). Beberapa bakteri dapat memancarkan cahaya dan disebut bakteri luminesen. Salah satu jenis bakteri yang dapat melakukan kejadian tersebut dan telah berhasil diisolasi berasal dari perairan laut Papua

dan diidentifikasi sebagai spesies *Vibrio ordalii* (Papilaya, *et al.*, 2008a). Secara umum, bakteri luminesen sangat mudah ditangani dan tidak memerlukan peralatan khusus dalam skala laboratorium (Madden & Lidesten, 2001).

Pemancaran cahaya oleh sebuah atom atau molekul terjadi karena adanya proses fluoresensi, fosforisensi, dan kemiluminesensi. Fluoresensi terjadi karena adanya energi yang diserap dari sumber cahaya eksternal oleh molekul, dan dengan segera langsung dipancarkan pada panjang gelombang yang lebih besar. Fosforisensi sama dengan fluoresensi, kecuali bahwa eksitasi lanjut masih terjadi, sehingga hasil eksitasi molekul tersebut lebih stabil daripada jika berfluoresensi, namun waktu yang dibutuhkan lebih lama. Kemiluminesensi merupakan pemancaran cahaya yang terjadi karena adanya reaksi-reaksi kimia, sedangkan bioluminesensi

*Alamat Korespondensi:

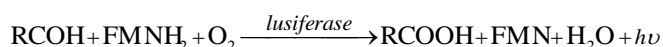
Jurusan Fisika FMIPA, Jln. Kamp Wolker, Kampus
Baru UNCEN-WAENA, Jayapura Papua. 99358
Telp:+62967572115, e-mail: evapapilaya@yahoo.com

merupakan bagian dari kemiluminesensi yang terjadi di dalam tubuh makhluk hidup. Reaksi kimia pada bioluminesensi dikatalisis oleh sebuah enzim. Fenomena pemancaran cahaya yang dilakukan bakteri luminesen sangat menarik untuk diteliti, karena cahaya yang dihasilkan merupakan suatu proses fisika yang terjadi di dalam bakteri tersebut. Proses pemancaran cahaya melibatkan transpor elektron, dimana elektron yang berada dalam keadaan dasar akan tereksitasi ke tingkat energi yang lebih tinggi akibat terjadinya reaksi kimia dan beberapa saat kemudian kembali ke tingkat dasar sambil memancarkan cahaya.

Untuk kepentingan pemanfaatan, bakteri luminesen sangat sensitif terhadap kehadiran material-material kimia berbahaya atau logam-logam berat, seperti tembaga, kobalt, mangan, merkuri, dan lainnya, yang berada di lingkungan sekitarnya. Fakta inilah yang umum dipakai sehingga kehadirannya sering dipakai untuk mendeteksi kehadiran logam-logam tersebut dan hal ini dapat dijadikan dasar biosensor (Madden & Lidesten, 2001; Papilaya, *et al.*, 2004; Papilaya, *et al.*, 2008b; Repetto *et al.*, 2000; Hasting, *et al.*, 1978).

Proses bioluminesensi melibatkan tiga komponen utama dalam proses pemancaran cahaya, yaitu sebuah molekul organik yang dikenal sebagai senyawa lusiferin (FMNH₂) berfungsi sebagai substrat untuk mengkatifkan enzim, molekul oksigen (O₂) untuk mengoksidasi substrat, dan enzim lusiferase untuk mengkatalisis reaksi. Ketiga komponen ini membentuk kompleks yang disebut fotoprotein. Pemancaran cahaya akan selalu kontinyu bila terjadi dibawah kondisi aerob yang diasosiasikan dengan pemakaian oksigen (Madden & Lidesten, 2001; Turley, 1982).

Reaksi kimia yang dilakukan bakteri luminesen, atau reaksi bioluminesen, adalah (Madden & Lidesten, 2001; Hasting, *et al.*, 1978; Abu-Soud *et al.*, 1993; Nunes-Halldorson & Duran, 2003; Wegrzyn & Czyz, 2002; Sato & Sasaki, 2006):



Substrat akan membentuk senyawa kompleks dengan enzim, dan selanjutnya bereaksi dengan oksigen menghasilkan lusiferin teroksidasi dan lusiferase tereksitasi. Enzim lusiferase pada keadaan tereksitasi akan memiliki elektron yang tidak stabil sehingga dengan segera kembali ke keadaan dasar sambil melepaskan foton dalam bentuk cahaya. Cahaya yang dipancarkan berada pada daerah panjang gelombang 460–490 nm (Papilaya, *et al.*, 2008a; Madden & Lidesten, 2001; Turley, 1982). Hasil reaksi berupa energi dalam bentuk cahaya, bukan energi panas sehingga reaksi-reaksi bioluminesen disebut dengan penghasil cahaya dingin (Frye, 1999). Selain mengoksidasi lusiferin, oksigen juga mengoksidasi aldehid (RCOH) menjadi asam karbosilat (RCOOH). Aldehid akan mempercepat menaikkan intensitas cahaya dan merupakan hal yang sangat esensial untuk memberikan luminesen yang tinggi (Turley, 1982; Hastings *et al.*, 1978).

Dengan mengetahui reaksi bioluminesen pada bakteri luminesen, maka sangat penting untuk dilakukan penelitian terhadap komponen fotoprotein dan komponen pendukung lainnya dari reaksi bioluminesen. Hal ini untuk mendapatkan besar intensitas cahaya dalam reaksi bioluminesen tersebut. Oleh karena hal itu dapat digunakan sebagai informasi untuk penelitian lanjutan dalam kebioluminesenan. Dengan demikian, tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui jumlah optimum komponen fotoprotein (lusiferin dan lusiferase) dan komponen pendukung (aldehid) terhadap aktivitas pemancaran cahaya. Enzim lusiferase yang digunakan berasal dari spesies *Vibrio ordalii* asal laut lokal Papua.

METODE PENELITIAN

Bufet fosfat 0,05 M pH 7,0

Sebanyak 6,9 gram NaH₂PO₄.H₂O dilarutkan dalam akuades hingga mencapai volume 1 liter (larutan A1), dan 7,1 gram Na₂HPO₄ dilarutkan dalam akuades hingga mencapai volume 1 liter (larutan B1). Sebanyak 34 ml larutan A1 dan 366

ml larutan B1, kedua larutan ini dilarutkan dan pHnya ditetapkan hingga mencapai pH 7,0 dengan menggunakan larutan NaOH 0,05 M.

Media NA padat (Nutrien agar)

Sebanyak 0,5 gram pepton, 0,5 gram NaCl, 0,2 gram ekstrak ragi, 0,1 gram ekstrak daging, 100 ml aquades, dan 2 gram agar.

Media luminesen

Sebanyak 1 gram CaCO_3 , 5 gram tripton, 5 gram ekstrak ragi, 3 ml gliserol, dan 1 liter akuabides. Sedangkan untuk pembuatan media pertumbuhan padat harus ditambahkan sebanyak 10 gram agar per liter larutan. Semua bahan tersebut dicampur dan disterilisasi dengan autoklaf. Sterilisasi dilakukan pada suhu 121 °C, 15 lb/inci² selama 20 menit. Selanjutnya media dibiarkan beku. Bahan untuk media tanam dan media fermentasi adalah sama.

Larutan FMNH₂ tereduksi

Untuk menghilangkan oksigen dilakukan dengan menambahkan sodium ditionat ke dalam flavin sebanyak beberapa serbuk.

Isolasi Bakteri

Bakteri yang diperoleh berasal dari bakteri yang telah diisolasi sebelumnya yang ditanam di media agar miring. Bakteri ditanam kembali di media agar miring. Penanaman di media agar ini dilakukan sebanyak tiga kali masing-masing selama 20 jam sehingga terbentuk koloni tunggal. Dari media agar miring ketiga, bakteri ditanam dalam media fermentasi (media luminesen cair). Media fermentasi dibagi 2 bagian, masing-masing 50 ml dan 950 ml. Dari media agar miring ketiga, bakteri ditanam di media aktifasi selama 20 jam, yaitu media fermentasi yang 50 ml, sambil di shaker dengan kecepatan 180 rpm. Sebanyak 9,5 ml bakteri ditanam dalam media inokulum, yaitu media fermentasi yang 950 ml. Penanaman sambil dishaker dengan kecepatan 180 rpm selama 20 jam. Dari sini diperoleh sel bakteri.

Pengendapan Sel

Sel bakteri yang telah diperoleh, disentrifuge dengan kecepatan putar 6000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C. Endapan sel dipisahkan dari supernatant dengan cara dicuci dengan air suling dingin sebanyak tiga kali. Sedangkan supernatant dibuang. Setiap kali pencucian dilakukan sentrifuge dan penimbangan untuk mengetahui berat basah endapan sel. Selanjutnya endapan sel disuspensi selama 20 jam dalam buffer fosfat 0,02 M pH 7 dengan perbandingan 1 : 4. Artinya 1 gram sel sebanding dengan 4 mL larutan buffer.

Pemecahan Sel

Hasil suspensi dipecah dengan sonikasi selama 2 jam dalam keadaan dingin dengan alat ultrasonikasi. Setiap 5 menit pemecahan sel dihentikan. Selama pemecahan sel, kondisi harus dingin. Hasil sonikasi kemudian disentrifuge selama 20 menit pada kecepatan putar 12000 rpm dan temperatur 4°C. Hasil sentrifuge adalah endapan dan filtrat. Endapan ini dikenal dengan debris sel, sedangkan filtrate dikenal dengan ekstrak kasar lusiferase (crude enzim luciferase). Untuk mengetahui kadar protein yang ada pada ekstrak enzim digunakan metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

Pengukuran Aktifitas Lusiferase

Pengukuran dilakukan dengan metode standar assay ditionit, yaitu sebanyak 1 ml FMNH₂ (50 µM) dimasukkan ke dalam 1 mL buffer fosfat (50 mM) pH 7,0 yang berisi lusiferase (=1 mL). Setelah pengikatan E-FMN kompleks, emulsi aldehyd (0,01% v/v) diinjeksi untuk memberikan luminesen yang lebih optimum. Aktivitas pemancaran cahaya diukur dengan menggunakan spektrofotometer uv-vis. Untuk mengetahui pengaruh komponen aldehyd dan fotoprotein pada reaksi bioluminesen, dilakukan variasi pengukuran terhadap satu komponen sedangkan komponen lain dibuat tetap.

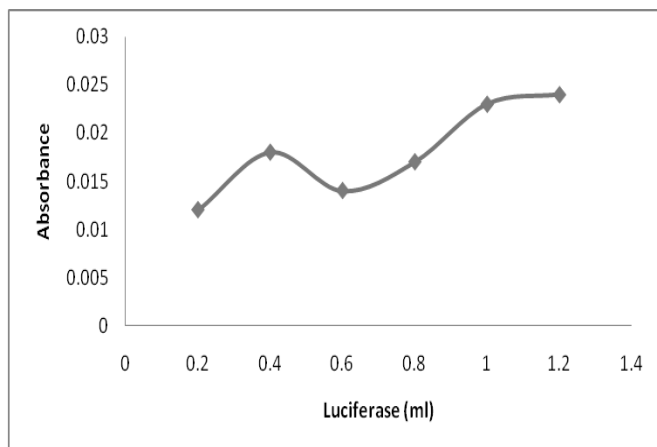
Pengukuran variasi komponen reaksi bioluminesen

Dilakukan dengan metode standar. Untuk lusiferase, dilakukan beberapa variasi, yaitu dengan 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, dan 1,2 ml. Untuk

lusiferin tereduksi, dilakukan variasi 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, dan 1,2 ml. Dan untuk variasi aldehyd dilakukan variasi 0,004, 0,005, 0,008, 0,01, dan 0,02%. Setelah itu, dilakukan pengukuran.

HASIL DAN PEMBAHASAN

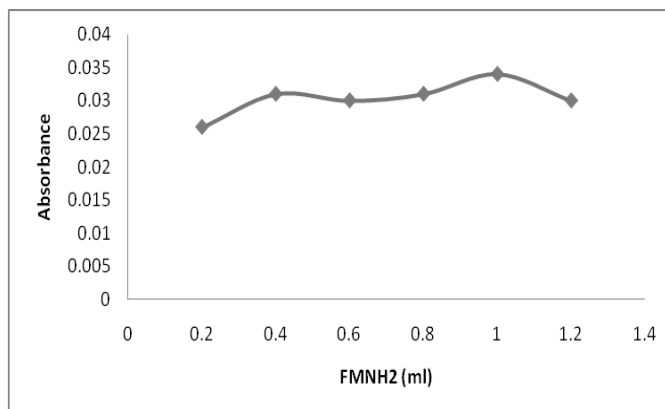
Hasil pengukuran dengan variasi lusiferase diperlihatkan seperti gambar 1 dengan komponen lain dibuat tetap. Semakin banyak lusiferase yang ditambahkan, semakin tinggi aktivitas yang dilakukan lusiferase yang ditandai dengan semakin tingginya nilai absorbansi. Hal ini disebabkan karena lusiferase dibutuhkan untuk mengkatalisis lusiferin, dan ini mengakibatkan semakin cepat reaksi berlangsung. Hasil menunjukkan bahwa enzim sangat mempengaruhi pemancaran cahaya pada reaksi bioluminesen.



Gambar 1 Variasi LU pada reaksi bioluminesen bakteri *Vibrio ordali*.

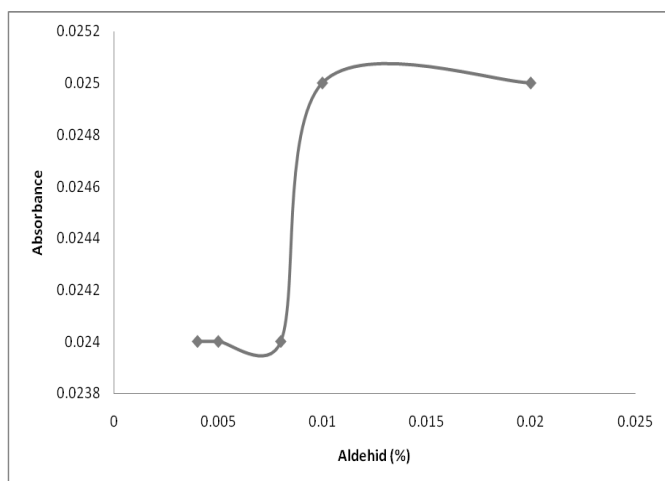
Hasil pengukuran dengan variasi lusiferin diperlihatkan seperti gambar 2. Semakin banyak lusiferin, aktivitas yang dilakukan tidak menunjukkan perubahan absorbansi yang berarti. Semakin banyak lusiferin yang ditambahkan, semakin tinggi aktivitas yang dilakukan. Hal ini dapat dilihat pada gambar, yaitu variasi lusiferin yang ditambah sekitar 0,2–1 ml mengalami kenaikan, yaitu dengan nilai absorbansi yang semakin tinggi. Pada keadaan ini, jumlah enzim 1 ml sehingga enzim masih dapat melakukan

aktivitasnya. Namun pada variasi 1,2–1,5 ml tidak terjadi kenaikan nilai absorbansi. Ini menunjukkan bahwa enzim yang ada pada reaksi lebih sedikit dibanding substrat. Oleh karena itu, jika substrat ditambah maka enzim harus juga ditambah pada reaksi bioluminesen.



Gambar 2. Variasi FMNH₂ pada reaksi bioluminesen bakteri *Vibrio ordali*.

Hasil pengukuran dengan variasi konsentrasi aldehyd diperlihatkan seperti gambar 3. Dari gambar terlihat bahwa penambahan konsentrasi aldehyd mengalami peningkatan saat konsentrasi aldehyd 0,008–0,01, selebihnya penambahan konsentrasi aldehyd tidak menunjukkan perubahan yang berarti. Dari gambar bahwa aldehyd hanya cukup beberapa persen saja, karena lebih dari 0,01 % aldehyd tidak menunjukkan adanya aktivitas.



Gambar 3. Variasi aldehyd pada reaksi bioluminesen bakteri *Vibrio ordali*.

KESIMPULAN

Pada rekasi bioluminesen, lusiferase memegang peranan yang penting untuk mengkatalis reaksi bioluminesen sehingga dibutuhkan lusiferase yang cukup banyak. Penambahan lusiferase pada reaksi bioluminesen yang lebih akan semakin mempercepat reaksi bioluminesen, sedangkan penambahan lusiferin tereduksi harus diikuti dengan penambahan lusiferase. Sedangkan aldehyd yang dibutuhkan cukup sedikit karena hanya untuk menaikkan intensitas cahaya atau pada reaksi bioluminesen berfungsi untuk memberikan luminesen yang tinggi.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis menyampaikan rasa terima kasih kepada Teddy dan Sriyanto atas bantuannya selama proses penelitian di laboratroiium. Juga kepada DP2M yang telah memberikan bantuan dana penelitian tahun 2009.

DAFTAR PUSTAKA

- Abu-Soud, H.M., A.C. Clark, W.A. Francisco, T.O. Baldwin, and F.M. Raushel. 1993. Kinetic Destabilization of the Hydroperoxy Flavin Intermediate by Site-directed Modification of the Reactive Thiol in Bacterial Luciferase*. *Biological Chemistry* 268(11):7699–7706.
- Frye, M. 1999. Bioluminescence, A Glowing Report. *Biophysics*.
- Hastings, J.W., T.O. Baldwin, and M.Z. Nicoli. 1978. Bacterial Luciferase: Assay, Purification, And Properties. *Methods In Enzymology* LVII(57).
- Lowry, O.H, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, and J.R. Randall. 1951. Protein Measurement with Folin Phenol Reagent. *Biol.Chem.* 193: 265–275.
- Madden, D. and B.M. Lidesten. 2001. Bacterial Illumination, Culturing Luminous Bacteria. *Bioscience Explained* 1(1).
- Nunes-Halldorson, V.S. and N.L. Duran. 2003. Bioluminescent Bacteria: Lux Genes as Environmental Biosensors. *Braz. Microbiology* 34(2).
- Papilaya, E., I. Arif, & I.N.P. Aryantha. 2008a. Isolation and Identification Luminescent Bacterial *Vibrio ordalii* from Squid Symbiont from The Seas Around Papua. *Proceeding of New Guinea Biology Conference (NGBC-9)*. pages 125–129.
- Papilaya, E., M. Bunga', and E. Haryati. 2008b. Physical Characterization of Luciferase Enzyme of Luminescent Bacteria *Vibrio ordalii*, Originated from Papuan Seas. *Proceeding of New Guinea Biology Conference (NGBC-9)*. pages 98–101.
- Papilaya, E., Ratnawulan, and I. Arif. 2004. Heavy Metal Effect to Light Intensity Bacterial Luminesent *Photobacterium phosphoreum*. *Proceeding of Annual Physics Seminar 2004*. ITB, Bandung. Indonesia. page 72–73.
- Pelczar, M.J., Jr., E.C.S. Chan, and N.R. Krieg. 1986. Microbiology. International Student Edition, 5th Edition. McGraw-Hill Inc. Singapore.
- Repetto et al. 2000. Alternative Ecotoxicological Methods for The Evaluation, Control, and Monitoring of Environmental Pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Restoration* 3:1.
- Sato, Y. and O. Sasaki. 2006. Control of the Bioluminescence Starting Time by Inoculated Cell Density. *The Japan Society for Analytical Chemistry*. 22: 1237–1239.
- Turley, C.M. 1982. An Illuminating Demonstration of Bacterial Luminescence. *The Society for General Microbiology*.
- Wegrzyn, G. and A. Czyz. 2002. How Do Marine Bacteria Produce Light, Why are They Luminescent and Can We Employ Bacterial Luminescence In Aquatic Biotechnology?. *Oceanology*. 44(3): 291–305.

