

Penapisan Mikroba Laut Perombak Senyawa Nitril dan Protein yang Diisolasi Dari Spons di Perairan Ternate

Rini Riffiani & Nunik Sulistinah

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Cibinong Science Center
Jl. Raya Jakarta-Bogor Km 46, Cibinong. E-mail : Rar4id@yahoo.com

ABSTRACT

Screening of Nitrile and Protein-Degrading Marine Bacteria Isolated from Sponge in Ternate Sea Water. Thirty three marine bacteria have been isolated from marine sponge in Ternate by enrichment culture. Screening bacteria-degrading nitrile was done by microtiter plate method based on growth ability tested by Iodonitrotetazolium chloride. Product of nitrile degradation was determined by Gas Chromatography (GC) and the potential bacteria-degrading protein was also screened by using selected media which contained casein. The results showed that twenty one isolates were able to show the clearing zone in selected media. Five isolates capable of utilizing acetamide as the sole source of carbon and nitrogen. Acetate and ammonia produced for hydrolysis acetonitrile by using resting cell of *Lysobacter* sp.

Key words: Nitrile, bacterium, sponge, Ternate

PENDAHULUAN

Lautan Indonesia merupakan bagian wilayah Indopasifik yang mempunyai keanekaragaman biota laut terbesar di dunia. Dilaporkan bahwa jenis biota laut di daerah tropis Indonesia 2-3 kali lebih besar dibandingkan biota laut di daerah sub tropis dan daerah beriklim dingin (Sujatmiko 2000). Terumbu karang merupakan salah satu sumber daya alam tersebut dan ekosistem terumbu karang merupakan bagian dari ekosistem laut yang menjadi sumber kehidupan bagi beraneka ragam biota laut. Di dalam ekosistem terumbu karang hidup lebih dari 300 jenis karang, 200 jenis ikan dan beberapa jenis moluska, krustasea, sponge, algae dan biota lainnya (Var Soest 1994). Spons merupakan salah satu organisme laut yang mempunyai potensi

cukup besar karena kandungan senyawa bioaktifnya. Binatang laut ini mampu hidup sampai kedalaman 50 meter di bawah permukaan laut. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa pada porus sponge (*Microcionia prolifera*) ditemukan beberapa jenis bakteri, seperti genus *Pseudomonas*, *Aerosomonas*, *Vibrio*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, dan *Micrococcus* (Madri *et al.* in Reinheimer 1991)

Saat ini eksplorasi mikroba banyak dilakukan karena mikroba mempunyai kemampuan mensintesis enzim-enzim tertentu yang dapat digunakan untuk kepentingan industri seperti industri pangan, obat, kimia maupun sebagai agen bioremediasi lingkungan tercemar. Beberapa mikroba perombak senyawa nitril baik alifatik maupun aromatik telah banyak ditemukan dan dimanfaatkan

untuk mensintesis senyawa-senyawa penting secara komersial, seperti misalnya untuk memproduksi akrilamida dan S-(+)-Ibuprofen (Yamamoto *et al.* 1990, Nawas *et al.* 1992). Dilaporkan juga oleh Sunarko *et al.* 2007 mikroba potensial pendegradasi nitril dapat dikembangkan dengan meningkatkan kemampuan *region*, *stereo*, dan kemoselektifitasnya untuk menghasilkan produk yang lebih spesifik.

Disamping mikroba pendegradasi nitril, beberapa mikroba yang mampu mensintesis enzim protease juga banyak dimanfaatkan untuk kepentingan industri, seperti industri deterjen, pengolahan susu, farmasi, dan makanan (Moon & Parulekar 1993). Enzim protease dilaporkan memiliki nilai ekonomi cukup tinggi karena aplikasinya sangat luas.

Penelitian ini merupakan studi awal untuk mengisolasi dan menapis mikroba laut potensial yang mampu mensintesis enzim pendegradasi nitril dan protease. Dari penelitian ini diharapkan diperoleh mikroba dari ekosistem laut yang nantinya dapat dimanfaatkan dan dikembangkan sebagai agen untuk mensintesis senyawa-senyawa organik maupun dimanfaatkan dibidang pangan, serta dapat memberikan informasi mengenai data mikroba laut potensial perairan laut, khususnya di Ternate.

BAHAN DAN CARA KERJA

Isolasi mikroba laut dari spons dilakukan dengan 3 metode. Metode pertama dilakukan dengan mengisolasi langsung spons (tanpa sterilisasi) melalui pengenceran bertingkat hingga 10^{-3} yaitu

$\pm 1,0$ gram sampel dimasukkan ke dalam 9 ml larutan NaCl 0,85%, dihomogenkan dengan menggunakan vortex selama 10 menit, kemudian 50 μ l sampel yang telah dihomogenkan diambil dan diinokulasikan ke dalam media *Marine Agar*. Koloni yang tumbuh diisolasi dan dimurnikan untuk pengujian lebih lanjut. Metode kedua dilakukan dengan mensterilisasi permukaan spons dengan cara merendam potongan spons ke dalam larutan alkohol 70% selama 10 menit, kemudian dibilas dengan akuades steril sebanyak 2 kali. Selanjutnya sampel diperlakukan sama dengan metode I. Metode ketiga dilakukan dengan memotong spons yang telah disterilkan menjadi bagian-bagian yang lebih kecil kemudian langsung ditanam pada media *Marine Agar*.

Media yang digunakan untuk isolasi mikroba laut adalah *Marine Agar* dengan komposisi sebagai berikut : 5,0 g pepton, 1,0 g yeast extract, 0,1 g ferric citrate, 19,45 g sodium chloride, 8,8 g MgCl, 3,24 g sodium sulfate, 1,88 g calcium chloride, 0,55 pottasium chloride, 0,16 g sodium bicarbonate, 15,0 g agar, 34,0 mg stronsium chloride, 22,0 mg boric acid, 4,0 mg sodium sillicate, 2,4 mg sodium flouride, 1,6 mg ammonium nitrat, dan 8 mg disodium phosphate, aquadest 1000 ml. pH media diatur $7,4 \pm 0,2$

Media penapisan yang digunakan adalah media mineral dengan komposisi sebagai berikut : Na_2HPO_4 0,357g, KH_2PO_4 0,1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001g, Yeast Extract 0,01g, Mikroelemen 1,0 ml, Aquadest ditambahkan sampai volume 1000 ml (Meyer & Schlegel 1983;

Pfennig 1974). Adapun komposisi mikroelemen : $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, H_3BO_3 , $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, $Na_2MO_4 \cdot 2H_2O$, Na_2SeO_3 , Aquadest 1000 ml.

Penapisan mikroba pendegradasi nitril dilakukan dengan menumbuhkan isolat bakteri hasil isolasi ke dalam *microtitter plate* steril yang berisi 1 ml media mineral yang mengandung senyawa nitril dengan konsentrasi yang berbeda (dalam hal ini asetonitril/asetamida 100 mM dan benzonitril/benzamida 25 mM). *Microtitter plate* yang telah diinokulasi tersebut diinkubasi di atas mesin pengocok pada kecepatan 110 rpm pada suhu 28 °C selama 72 jam. Pada 72 jam inkubasi, pertumbuhan mikroba diuji dengan larutan INT (Iodonitrotetrazolium) dan aktivitasnya diuji dengan reagen Nessler (Oliver *et al.* 1989).

Sebanyak 100 µl kultur ditambah dengan 14 µl larutan INT 0,5 mg/ml. Perubahan warna yang terbentuk mengindikasikan pertumbuhan mikroba. Semakin pekat warna yang terbentuk mengindikasikan pertumbuhan semakin tinggi.

Sebanyak 198 µl NaOH 0,1 N ditambahkan ke dalam 2 µl kultur, dihomogenkan kemudian ditambahkan 4 µl reagen Nessler. Selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang ± 28°C selama 20 menit. Aktivitas yang tinggi ditandai dengan terbentuknya warna kuning tua hingga kecoklatan.

Biomassa dari isolat bakteri terpilih diproduksi dalam erlenmeyer (1000 ml) yang berisi 500 ml media tumbuh yang mengandung 100 mM asetamida. Selanjutnya kultur diinkubasi di atas

shaker pada suhu ruang (± 28 °C) selama 72 jam. Sel dipanen dengan mensentrifuse kultur pada kecepatan 9000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Sel yang diperoleh dicuci dengan 50 mM buffer fosfat (KH_2PO_4) pH 7,2 sebanyak 2 kali. Sel tersebut selanjutnya digunakan untuk penentuan aktivitas enzim dan penentuan produk degradasi nitril.

Konsentrasi substrat dan produk degradasi ditentukan dengan menggunakan GC-Shimadzu 14 B, detektor FID, kolom Porapax Q, suhu kolom 225°C, suhu injektor 240 °C, suhu detektor 240 °C (Sunarko *et al.* 2000). Konsentrasi sampel ditentukan dengan rumus sebagai berikut: (sampel) = Luas area sampel/ Luas area standar X (standar)

Pengujian aktivitas enzimatik secara kualitatif dilakukan dengan menumbuhkan isolat bakteri terpilih pada media protease agar dan diinkubasi pada suhu ruang (28°C) selama 48 jam. Terbentuknya atau zona bening pada media mengindikasikan bahwa mikroba yang diuji mampu mensintesis protease. Pengujian aktivitas enzim secara kuantitatif dilakukan dengan menambahkan substrat casein 2% (480 i l) ke dalam 20 mM bufer fosfat pH 7 dan *crude* enzim sebanyak 120 i l, kemudian campuran reaksi tersebut dihomogenkan dan diinkubasi di atas *shaker* pada suhu 30°C selama 30 menit. Selanjutnya ditambahkan 600 i l TCA 10% dan diinkubasi dalam es selama 30 menit, disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm, selama 5 menit pada suhu 4°C dan supernatan diukur pada panjang gelombang 420 nm (Secades & Guijarro 1999).

Identifikasi dilakukan secara molekular dengan 16S rDNA. Analisis

molekuler yang dilakukan berupa ekstraksi DNA dan PCR amplifikasi, purifikasi PCR produk dan sekunsing. Ekstraksi DNA menggunakan *intragene matrix kit* (Biorad) dilanjutkan dengan amplifikasi. Hasil optimasi PCR diperoleh komposisi per reaksi sebesar 25 μ L dengan menggunakan Primer 9F (5'GAGTTTGATCCTGGCTCG) dan 1510R (5'GGCTACCTTGTTACGA CTT).

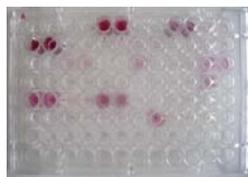
Analisis DNA menggunakan program *BioEdit* dan dilakukan *blast* pada Bank Gen *NCBI dataLibrary*. Analisis Filogenetik menggunakan program *multiple alignment* Clustal X versi 1.83. Konstruksi pohon filogenetik berdasarkan jarak kekerabatan genetik dengan metode *Neighbor joining* dan jarak evolusi dalam derajat kepercayaan menggunakan *bootstrap value* pada program NJ plot.

HASIL

Mikroba Pendegradasi Nitril

a. Isolasi dan Penapisan Bakteri Laut Pendegradasi Nitril

Diperoleh 33 isolat bakteri yang di isolasi dari spons yang diperoleh dari perairan laut Ternate. Penapisan mikroba pendegradasi nitril dengan *teknik microtitter plate* dan uji aktivitas bakteri secara kualitatif ditampilkan pada Tabel



Gambar 1. Pengujian pertumbuhan bakteri pada asetamida dan benzamida sebagai substrat dengan menggunakan *microtitter plate*. Asetamida (A) dan Benzamida (B)

1 dan Gambar 1 dan menunjukkan bahwa dari keseluruhan isolat yang diuji kemampuan tumbuhnya pada asetamida hanya 15 isolat bakteri yang mampu tumbuh. Sedangkan isolat bakteri yang tumbuh pada benzamida relatif lebih sedikit dan aktivitas enzimnya juga relatif lebih rendah dibandingkan pada asetamida (Tabel 1). Warna pink yang terbentuk pada saat penambahan indikator *Iodonitrotetrazolium chloride* (INT) pada kultur cair mengindikasikan pertumbuhan mikroba, semakin pekat warna yang terbentuk mengindikasikan pertumbuhan semakin tinggi (Gambar 1).

Secara umum dari hasil pengujian menunjukkan adanya korelasi positif antara pertumbuhan dan aktivitas enzim. Isolat yang tumbuh dengan baik memiliki aktivitas enzim yang relatif cukup baik pula. Hal ini mengindikasikan, bahwa isolat bakteri yang mampu tumbuh pada amida kemungkinan besar mampu mensintesis enzim pendegradasi senyawa nitril.

b. Pola Pertumbuhan Isolat bakteri ID 04TR dan ID 13TR pada Asetamida 100 mM

Pola pertumbuhan dua isolat bakteri terpilih ID.04.TR dan ID.13.TR pada asetamida 100 mM ditampilkan dalam Gambar 2.

Setelah masa pertumbuhan \pm 72 jam pertumbuhan nampaknya mencapai maksimal. Sedangkan bakteri ID.13.TR memerlukan fase lag yang cukup panjang yaitu \pm 20 jam kemudian masuk ke fase eksponensial. Pertumbuhan isolat ID.04.TR lebih baik dibanding isolat ID.13.TR. Dengan demikian untuk pengujian selanjutnya dipilih satu isolat (ID.04.TR) yang mempunyai kemampuan tumbuh dan aktivitas yang lebih baik.

c. Pola Degradasi Isolat bakteri ID04TR dan penentuan produk degradasi.

Pola degradasi dan produk degradasi asetonitril oleh isolat bakteri ID04TR ditampilkan pada Gambar 3. Degradasi asetonitril dengan menggunakan sel utuh (*whole cell*) tampaknya melalui 2 alur reaksi yang melibatkan enzim nitril hidratase dan amidase. Penurunan konsentrasi asetonitril selama proses degradasi dan terbentuknya asam asetat dan ammonia memperkuat dugaan terjadinya proses degradasi asetonitril oleh aktivitas enzim pendegradasi nitril.

Tabel 1. Pertumbuhan dan aktivitas isolat bakteri pada asetamida dan benzamida dengan teknik penapisan menggunakan *microtiter plate*

No	Isolat	Asetamida 100 mM		Benzamida 25 mM	
		Pertumbuhan	Aktivitas	Pertumbuhan	Aktivitas
1	ID.02.TR	++	++	++	-
2	ID.03.TR	+	+	-	-
3	ID.04.TR	++++	++++	-	-
4	ID.06.TR	-	++	+	-
5	ID.07.TR	+	+	-	-
6	ID.11.TR	+	-	-	-
7	ID.13.TR	++	+	-	-
8	ID.14.TR	-	-	-	-
9	ID.15.TR	+	+	-	-
10	ID.16.TR	+	-	++	+
11	ID.21.TR	+	-	-	-
12	ID.22.TR	++	+	++	+
13	ID.23.TR	+	++	-	-
14	ID.24.TR	++	+	+	-
15	ID.29.TR	-	++	-	-
16	ID.30.TR	-	++	-	-
17	ID.31.TR	+	+	+	+
18	ID.32.TR	-	++	-	-
19	ID.33.TR	-	++	-	-

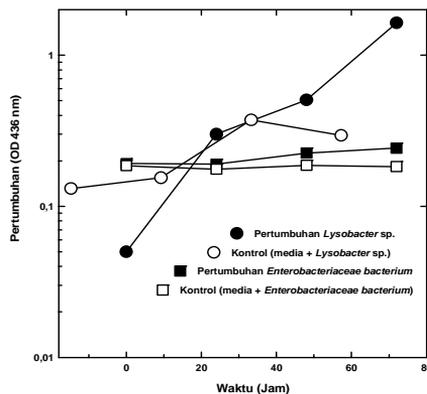
Profil degradasi asetonitril menggunakan *gas chromatografi* (GC) memperlihatkan adanya penurunan konsentrasi asetonitril selama 180 menit inkubasi (Gambar 4, Tabel 2).

Mikroba Perombak Protein

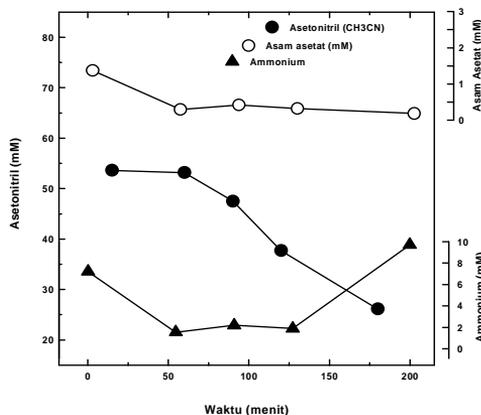
a. Penapisan Mikroba Laut Penghasil Enzim Protease

Hasil penapisan mikroba laut penghasil enzim protease terhadap 36 isolat bakteri menunjukkan bahwa dijumpai ada 21 isolat diantaranya

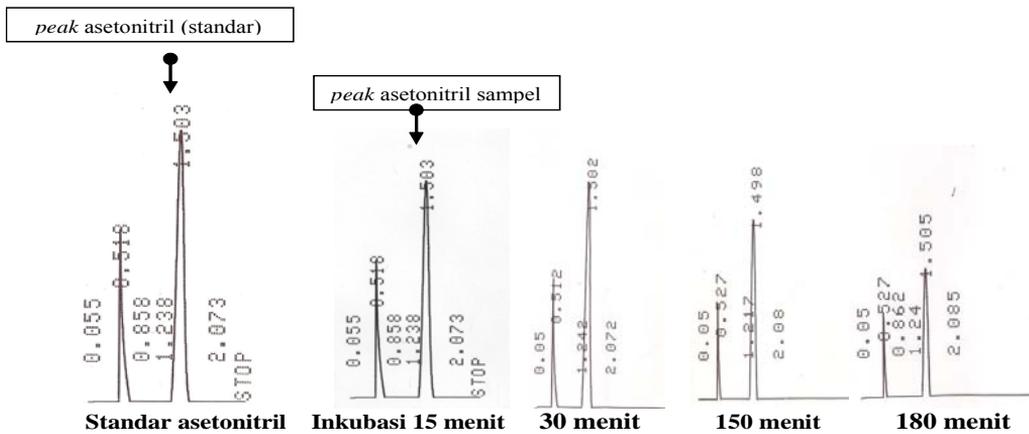
memberikan hasil positif yaitu terbentuknya *clearing zone* atau zona bening disekeliling koloni. Zona bening yang terbentuk merupakan indikasi awal bahwa isolat bakteri tersebut mampu mensintesis protease. Dari 21 isolat hanya 4 isolat yaitu ID.06.TR, ID.09.TR, ID.24.TR dan ID.31.TR mempunyai aktivitas tinggi dipilih untuk pengujian lebih lanjut secara kuantitatif. Selanjutnya, keempat isolat yang diduga mempunyai aktivitas protease tinggi ditumbuhkan dalam media cair yang



Gambar 2. Pertumbuhan *Lysobacter* sp. dan *Enterobacteriaceae bacterium* pada Asetamida (100mM)



Gambar 3. Degradasi asetonitril menggunakan resting cell *Lysobacter* sp. dan pembentukan produk metabolitnya.



Gambar 4. Penurunan konsentrasi asetonitril selama proses degradasi menggunakan *Gas Chromatografi* (GC)

Tabel 2. Konsentrasi substrat/produk biotransformasi kelima isolat

Waktu inkubasi	Konsentrasi substrat/produk biotransformasi (mM)		
	asetonitril	asam asetat	amonium
15	53,614	1,3754	7,2
60	53,167	0,2960	1,55
90	47,522	0,4232	2,22
120	37,692	0,323	1,90
180	26,144	0,1860	9,70

mengandung *casein* dan diinkubasi selama 48 jam dengan pengocokan. Hasil pengujian aktivitas memperlihatkan bahwa isolat bakteri ID.19.TR memiliki aktivitas enzim protease yang paling tinggi yaitu sebesar 226,85 (U/ml) dan aktivitas terendah ditunjukkan oleh isolat bakteri ID.31.TR sebesar 36,100 U/ml (Gambar 5)

b. Identifikasi dan Analisis Filogenetik Isolat Terpilih

Berdasarkan analisis penjajaran urutan nukleotida parsial gen pengkode

16S rDNA menggunakan program *BLAST* ditampilkan pada Tabel 3 .

PEMBAHASAN

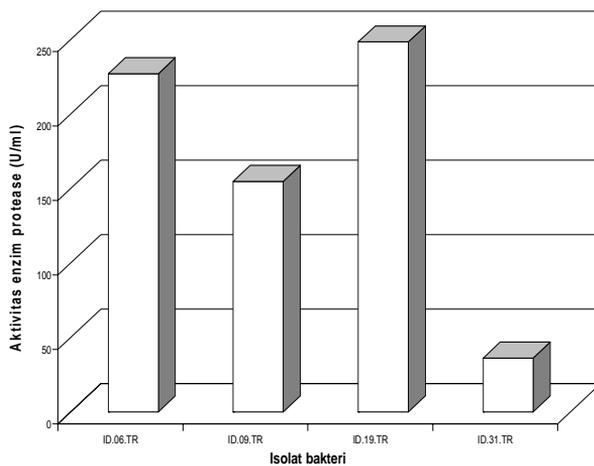
Penapisan bakteri laut perombak senyawa nitril dan amida

Hasil penapisan 33 isolat bakteri spons menggunakan asetamida dan benzamida menunjukkan bahwa isolat isolat bakteri ID.02.TR (*Micrococcus luteus* strain G3-6-08) ID.04.TR (*Lyso-bacter* sp.), ID.13.TR (*Enterobacteriaceae bacterium* B12), ID.22.TR

(*Arthrobacter* sp. WPCB190) ID.24.TR (*Sphingomonas* sp.) dan ID.31.TR (*Spons bacterium* IS8) mampu tumbuh dalam 100 mM asetamida dan mempunyai aktivitas enzim yang relatif lebih baik dibandingkan isolat-isolat yang lainnya. Dari Tabel 1 tampak bahwa isolat yang mempunyai kemampuan tumbuh yang baik memiliki aktivitas enzim yang baik mampu tumbuh pada asetamida kemungkinan juga mampu mensintesis enzim pendegradasi senyawa nitril. Tabel 1 tersebut juga menunjukkan, bahwa *Lysobacter* sp. menunjukkan kemampuan tumbuh dan aktivitas yang paling baik dibandingkan tiga isolat lain. Dengan demikian bakteri *Lysobacter* sp. merupakan isolat potensial untuk pengujian lebih lanjut.

Penapisan mikroba dengan menggunakan benzamida menunjukkan bahwa hanya 2 isolat bakteri yang mampu

tumbuh dengan baik pada benzamida yaitu ID.02.TR (*Micrococcus luteus* strain G3-6-08), dan ID.22.TR (*Arthrobacter* sp. WPCB190) dengan aktivitas enzim yang relatif rendah. Ketidakmampuan tumbuh isolat pada benzamida disebabkan karena benzamida merupakan senyawa turunan benzonitril dan tergolong dalam amida aromatik yang sangat toksik. Disamping itu benzamida dan benzonitril mempunyai kelarutan yang sangat rendah dibandingkan asetamida atau asetonitril, sehingga sulit didegradasi dan dimetabolisme sebagai sumber energi, karbon dan nitrogen untuk pertumbuhan mikroba. Dilaporkan sedikit mikroba yang mampu tumbuh pada benzonitril dan benzamida (Sunarko *et al.* 2000). Dengan demikian ditunjukkan bahwa kemampuan tumbuh isolat bakteri pada asetamida lebih tinggi dibandingkan pada benzamida karena asetamida merupakan senyawa alifatik



Gambar 5. Aktivitas enzim protease isolat ID.06.TR, ID.09.TR, ID.19.TR, ID.31.TR

Tabel 3. Identifikasi 9 isolat bakteri laut potensial hasil penapisan

No	ID Isolat	Hasil identifikasi (16S rDNA)	Homologi (100 %)	Kemampuan
1	ID.02.TR	<i>Micrococcus luteus strain G3-6-08</i>	98	amidase + protease +
2	ID.04TR	<i>Lysobacter sp.</i>	99	amidase + protease +
3	ID.12TR	<i>Vibrio harveyi</i>	96	protease +
4	ID.13.TR	<i>Enterobacteriaceae bacterium B12</i>	89	amidase +
5	ID.19.TR	<i>Sphingomonas phyllosphaerae strain FA2</i>	90	protease +
6	ID.22TR	<i>Arthrobacter sp. WPCB190</i>	98	amidase +
7	ID.23.TR	<i>Bacillus pumilus strain ST277</i>	96	protease +
8	ID.24. TR	<i>Sphingomonas sp.</i>	98	amidase +
9	ID.31.TR	<i>Sponge bacterium IS8</i>	99	amidase + protease +

amida yang cenderung lebih mudah dihidrolisis oleh mikroba.

Biodegradasi asetonitril

Degradasi asetonitril dengan menggunakan *resting cell Lysobacter sp.* yang ditumbuhkan dalam 100 mM tampaknya melalui 2 jalur reaksi yang melibatkan enzim nitril hidratase dan amidase. Hal ini terbukti dengan menurunnya konsentrasi asetonitril selama proses degradasi tersebut dengan terbentuknya asam asetat dan amonia memperkuat terjadinya proses degradasi asetonitril oleh aktivitas enzim pendegradasi nitril. Secara umum, biodegradasi senyawa nitril dilaporkan melalui dua alur reaksi yang menghasilkan asam karboksilat dan ammonia (NH₄⁺) sebagai produk akhirnya (Nagasawa *et al.* 1987; Kobayashi 1991). Pada alur reaksi pertama melibatkan enzim nitril hidratase

(E.C. 4.3.2.84) dan amidase (E.C. 3.5.1.4), sedangkan reaksi kedua melibatkan enzim nitrilase (E.C.3.5.5.1). Diketahui bahwa degradasi senyawa nitril alifatik melibatkan nitril-hidratase dan amidase, sedangkan degradasi nitril aromatik hanya melibatkan enzim nitrilase saja (Nagasawa *et al.* 1987; Banerjee *et al.* 2002).

Dari hasil persamaan regresi menunjukkan bahwa *Lysobacter sp* mampu menurunkan konsentrasi asetonitril (190 mM) sampai konsentrasi 0 mM dalam waktu 5 jam 35 menit (Gambar 6).

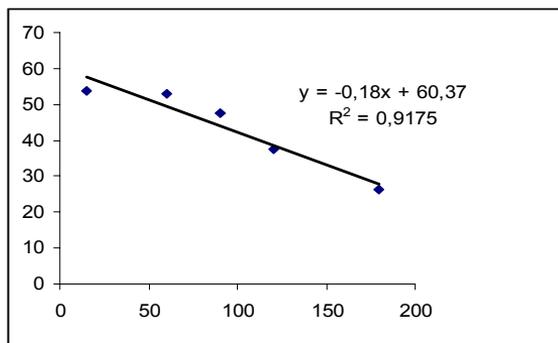
Berdasarkan Uji Korelasi menggunakan program SPSS versi 12 (P=0,05), menunjukkan bahwa penurunan konsentrasi asetonitril ternyata tidak berkorelasi dengan terbentuknya asetat dan amonia. Selanjutnya selama penelitian ini ditunjukkan bahwa penurunan asetonitril

tidak seiring dengan peningkatan asam asetat dan amonia. Hal ini kemungkinan karena asetat dan amonia yang terbentuk digunakan mikroba sebagai sumber karbon dan nitrogen untuk pertumbuhan. Dilaporkan oleh Langdahl *et.al.* (1996), asetat yang dihasilkan dari degradasi asetonitril oleh *Rhodococcus erythropolis* BL 1 digunakan sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan.

Kemampuan tumbuh *Lysobacter* sp. pada 100 mM asetamida relatif lebih rendah bila dibandingkan *Rhodococcus erythropolis* BL 1 yang diisolasi dari sedimen laut. *R. erythropolis* mampu tumbuh pada asetronil hingga konsentrasi 1 M, fase lag dicapai ± 50 amonia pada fase eksponensial (Langdahl *et al.* 1996). Dilaporkan juga oleh Sunarko *et al.* 2000 bahwa *Corynebacterium* sp. D5 yang diisolasi dari limbah kimia ASTRA juga mampu tumbuh pada asetonitril hingga 5% (± 950 mM). Nampak mikroba yang diisolasi dari lingkungan yang ekstrim mempunyai toleransi yang tinggi terhadap senyawa pencemar.

Bakteri Laut Perombak Protein

Beberapa bakteri yang memiliki enzim amidase juga memiliki aktivitas protease yaitu *Micrococcus luteus*, *Lysobacter* sp. dan *Spons bacterium*. Isolat bakteri dengan ID.19.TR teridentifikasi sebagai *Sphingomonas phyllosphaerae* strain FA2 memiliki aktivitas enzim protease tertinggi yaitu 226,85 (U/ml). Akan tetapi kemampuan *S. phyllosphaerae* menghasilkan enzim protease jauh lebih rendah bila dibandingkan dengan *Bacillus subtilis*. Safey & Raouf (2004) melaporkan bahwa *B. subtilis* memiliki aktivitas spesifik ekstraselular enzim protease sebesar 6381,71 (unit/mg prot/ml⁻¹). Protease adalah enzim yang menghidrolisis ikatan peptida pada protein. Enzim ini seringkali dibedakan menjadi proteinase dan peptidase. Protease mengkatalisis hidrolisis molekul protein menjadi fragmen-fragmen besar, sedangkan peptidase mengkatalisis hidrolisis fragmen polipeptida menjadi asam amino. Protease memegang peranan utama dalam banyak fungsi hayati, mulai dari tingkat sel, organ,



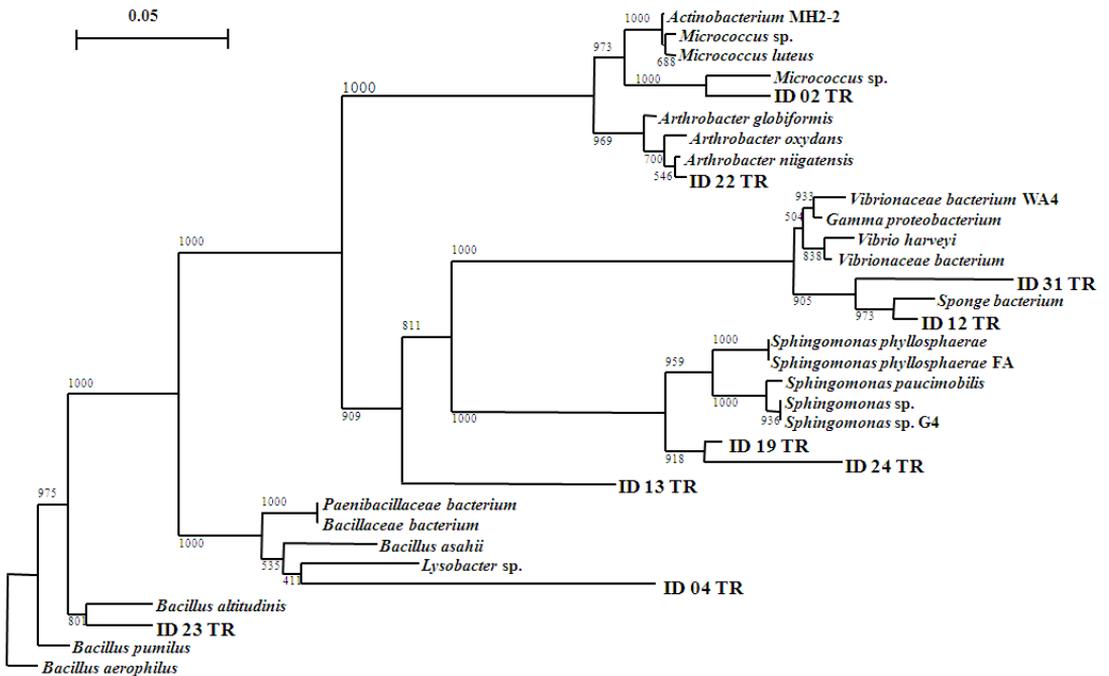
Gambar 6. Persamaan regresi penurunan konsentrasi asetonitril oleh *Lysobacter* sp.

sampai organisme, yaitu dalam melangsungkan reaksi metabolisme dan fungsi regulasi (Mell *et al.* 2000).

Berdasarkan hasil yang diperoleh menunjukkan beberapa bakteri laut yang telah diisolasi dari sampel spons dari perairan Ternate nampaknya selaras dengan penelitian yang dilakukan oleh Suryati *et al* (2000) bahwa kelimpahan jenis bakteri yang diisolasi dari spons di perairan Spermonde, Sulawesi Selatan didominasi oleh bakteri *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp., *Spingomonas* sp, *Flavobacterium* sp, *Acinetobacter* sp, dan *Bacillus* sp. Meyers *et al.* (2001) melaporkan bahwa terjadi hubungan simbiosis antara spons dan sejumlah

bakteri, dimana spons menyediakan dukungan dan perlindungan bagi bakteri sebagai simbion dan simbion menyediakan makanan bagi spons.

Hasil analisis filogenik bakteri laut potensial yang diisolasi dari spons asal Perairan Ternate dapat dilihat pada Gambar 7. Pohon filogeni menunjukkan bahwa bakteri potensial yang diisolasi dari spons terbagi menjadi enam kelompok bakteri yaitu kelompok bakteri *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Lysobacter*, *Micrococcus*, *Spingomonas*, dan *Spons bacterium*.



Gambar 7. Pohon kekerabatan bakteri potensial yang diisolasi dari sponge perairan Ternate

KESIMPULAN

Isolat bakteri ID04TR teridentifikasi sebagai *Lysobacter* sp mampu tumbuh dan memanfaatkan (100mM) asetonitril sebagai satu-satunya sumber karbon, energi, dan nitrogen. Proses degradasi asetonitril dengan menggunakan resting sel *Lysobacter* sp melibatkan enzim nitril hidratase dan amidase. Asam asetat dan amonium merupakan produk degradasi.

Isolat bakteri dengan ID 19TR teridentifikasi sebagai *Sphingomonas phyllosphaerae* strain FA2 mampu merombak protein dan memiliki aktivitas enzim protease tertinggi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Ibnu Maryanto sebagai koordinator Proyek IPTEKDA KHUSUS yang telah mendanai kegiatan penelitian ini. Ucapan terima kasih juga disampaikan Arief Nurkanto, S.Si dan Munir yang telah banyak membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Banerjee, A., R. Sharma, UC. Banerjee. 2002. The nitrile degrading enzymes: current status and future prospect. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60 : 33-34
- Kobayashi, M. 1991. Studies on Enzymes Involved in Nitrile Metabolism in *Rhodococcus rhodochrous*. PhD [Thesis].
- Langdahl, BR., P. Bisp & K. Ingvorsen. 1996. Nitrile hydrolysis by *Rhodococcus erythropolis* BL1, an acetonitrile-tolerant strain isolated from a marine sediment. *Microbiol. Letter.* 142 : 145-154
- Mel, SF, K. Fuller, S. Wimer-Mackin, W. Lencer., & J. Mekalanos. 2000. Association of protease activity in *Vibrio cholerae* Vaccine Strains With Decreases in Transcellular Epithelial Resistance of Polarized T84 Intestinal Epithelial Cells. *Infect Immune* 68(11):6487-92.
- Moon, SH & SJ Parulekar. 1993. Some observation on protease producing in continuous suspension cultures of *Bacillus firmus*. *Biotech. Bioengin.* 41, 43-54
- Meyer, O. & HG Schlegel. 1983. Biology of aerobic carbon monoxide oxidizing bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 37 :277-310.
- Nagasawa, T., H. Nanba, K. Ryuno, K. Takeuchi & H. Yamada. 1987. Nitrile Hydratase of *Pseudomonas chlororaphis* B23. *Eur. J. Biochem.* 162 : 1305-1312.
- Nawaz, MS., TM. Heinze & C.A Cerniglia. 1992. Metabolism of Benzonitrile and Butyronitrile by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 27-31
- Oliver, MH., NK. Harison, JE. Bishop, PJ. Cole & GJ. Lauren. 1989. A rapid and convenient assay for counting cells cultured in microwell plates : Application for assessment

- of growth factors. *J. Cell. Sci.* 92 : 513-518.
- Pfennig, N. 1974. *Rhodopseudomonas globiformis* sp. A new species of *Rhodospirillaceae*. *Arch. Microbiol.* 100 : 197-206.
- Reinheimer, G. 1991. *Aquatic Microbiology*. 4 th Ed. John Wiley and Sons, Chichester and New York
- Secades P., & J.A Guijarro. 1999. Purification and Characterization of an Extracellular Protease from the Fish Pathogen *Yersinia ruckeri* and Effect of Culture Condition on Production. *App.Envir. Microbiol.* 65 (9): 3969-3975
- Sujatmiko, W. 2000. *Inventarisasi Jenis Spons Disekitar Perairan Pulau Lombok dan Garam di Pulau Sumbawa Nusa Tenggara Barat*, Kerjasama: Yayasan Rinjani Bahari, Badan Perencanaan dan Penerapan Teknologi, Badan Perencanaan dan Pembangunan Propinsi Nusa Tenggara Barat.
- Sunarko, B., Adityarini, USF. Tambunan & N. Sulistinah. 2000. Isolasi, seleksi dan karakterisasi mikroba pendegradasi asetonitril. *Berita Biologi* 5(2) : 177-185.
- Sunarko, B., TU. Harwati, AT. Utari, D. Setianingrum & L. Nurhayani. 2007. Penapisan mikroba potensial untuk biokatalis produksi senyawa obat antiinflamasi nonsteroid (AINS). *Laporan Teknik Kegiatan Pusat Penelitian Bioteknologi DIPA* tahun 2006.
- Suryati, E., A Parenrengi, & Rosmiati. 2000. Penapisan Serta Analisis Kandungan Bioaktif Spons *Clathria* sp. yang efektif sebagai Antibiofouling pada teritif (*Balanus amphitrit*). *J. Penel. Perik. Indo.* 5 (3)
- Van Soest, RMW. 1994. Desmospons Distribution Pattern, In: Eds. Van Soest, R.W.M Van Kompen . T.M.G . Braekman, J.C. *Spons in Time and Space*. A.A Balkema, Rotterdam
- Yamamoto, K., Y. Ueno, K. Otsubo, K. Kawakami & K. Komatsu. 1990. Production of S- (+)-Ibuprofen from a nitrile compound by *Acinetobacter* sp. Strain AK226. *J. App.Envir. Miro.* 56 : 3125-3129.

Memasukkan: Desember 2009

Diterima: Mei 2010