

KONSTANTA PELURUHAN CAHAYA DAN QUANTUM YIELD DARI BIOLUMINISENSI *PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM*

Ratnawulan

Staf Pengajar Jurusan Fisika FMIPA Universitas Negeri Padang

E-mail : ratna_unp@yahoo.com

ABSTRACT

The light disintegration constant and quantum yield of luminescent responses of Photobacterium phosphoreum were conducted. The light emission physical characteristic of this bioluminescence are exceptionally interesting for further assessment since it become a remarkable sample from nature photonic. Result of light emission physical characteristic has obtained that the light disintegration constant is 0.007/sec and quantum yield is 0.3 at pH of 7 and temperature of 25°C.

Keyword : *Light disintegration constant, quantum yield, Photobacterium phosphoreum*

PENDAHULUAN

Fenomena bioluminisensi pada organisme hidup telah menjadi objek perhatian semenjak zaman dahulu kala. Ketika Christopher Columbus menyeberangi laut Atlantik, ia sering melihat cahaya luminesensi misterius di sekitar kapalnya. Saat itu, dijelaskan bahwa luminesensi yang ditemukan di laut dihubungkan dengan monster atau misteri lain yang belum diketahui (Harvey, 1920 dikutip dari Floyd, 1997).

Usaha serius pertama ilmuwan untuk menyelidiki asal muasal luminesensi pada organisme dimulai pada pertengahan tahun 1600 Masehi. Saat itu Boyle menguji pengaruh oksigen pada luminesensi yang teramati pada daging yang sudah mati. (Harvey, 1952 dikutip dari Kruse dan Boyle, 2000). Pada tahun 1830, ilmuwan Jerman, G.A. Michaelis, menemukan bahwa luminesensi dari daging yang sudah mati disebabkan oleh sesuatu yang hidup (Harvey, 1920 dikutip dari Biron, 2003). Penemuan G.A. Michaelis ini merupakan titik awal para peneliti untuk mengobservasi luminesensi pada makhluk hidup. Saat ini, bioluminisensi telah diobservasi

pada ribuan spesies meliputi kunyup-kunyup, jamur, binatang laut dan bakteri.

Salah satu spesies yang menarik perhatian adalah bakteri luminesensi. Bakteri luminesensi mayoritas ditemukan di alam dalam bentuk simbiosis dengan makhluk hidup yang lain seperti ikan, cumi dan ada juga yang mampu hidup bebas di alam (Meyer-Rochow, 2001). Dalam peristiwa simbiosis, bakteri menggunakan inang sebagai habitat untuk penumbuhan dan memperoleh makanan, dan pada waktu yang sama inang menggunakan cahaya yang dihasilkan bakteri untuk komunikasi, pertahanan, dan mencari mangsa (Hasting, 1998). Dalam hal komunikasi, cahaya dipancarkan agar dikenali spesies atau identitasnya oleh individu lain. Cahaya juga digunakan sebagai alat pertahanan bagi inang karena berfungsi memindahkan perhatian dari pemangsa dengan cara mengelabui pemangsa di malam terang bulan. Cahaya juga digunakan untuk mencari mangsa karena cahaya dapat digunakan sebagai penerangan untuk menangkap mangsa.

Holt dkk. (1994) mengungkapkan bahwa bakteri luminesensi dapat dikelompokkan atas tiga genus: pertama *Photobac*

terium, kedua *Vibrio*, dan ketiga *Photorhabdus*. Genus yang ada pada lingkungan laut dikelompokkan sebagai *Photobacterium* dan *Vibrio*. Genus *Photobacterium* kebanyakan bersimbiosa pada organ cahaya dari binatang laut sedangkan genus *Vibrio* selain ada dalam keadaan bersimbiosa juga ditemukan dalam keadaan hidup bebas di dalam laut. Sedangkan genus *Photorhabdus* hidup bebas di lingkungan darat.

Salah satu fenomena alam dari kekayaan laut Indonesia adalah ditemukan bakteri bioluminisensi yang bersimbiosa dengan cumi-cumi jenis *Laligo duvaucelli* (Pringgenies (2003)). Bakteri ini paling terang dari bakteri luminisensi yang ada (Maden dan Lidesten 2001).

Pringgenies (2003) menemukan kehadiran bakteri *Photobacterium phosphoreum* pada cumi-cumi jenis *Loligo duvauceli* di laut Indonesia. Populasi cumi-cumi ini dominan di laut Indonesia dan termasuk dalam cumi-cumi ekonomis penting. Bakteri *Photobacterium phosphoreum* terdapat pada sepasang organ cahaya yang menempel pada bagian dorso-lateral kantung tinta. Posisi organ cahaya di bagian dorsal kantung tinta cumi mudah diketahui karena berwarna kontras yaitu putih dengan panjang 2 s.d 5 mm. Didalam organ cahaya terdapat kantung organ cahaya yang berisi penuh dengan koloni bakteri. Sel bakteri tampak berbentuk batang atau silinder dan tidak mempunyai rambut getar atau flagella. Ukuran bakteri adalah 0,9 μm x 3,2 μm . Permukaan sel bakteri mengandung suatu lapisan kapsula dan didalam sel terdapat satu atau lebih butiran phb (polihidroksiburat) serta DNA. Keberadaan kapsula pada bakteri *Photobacterium phosphoreum* ini merupakan karakteristik khas yang dimiliki oleh strain tropis yang berbeda dari jenis *Photobacterium phosphoreum* yang pernah dilaporkan.

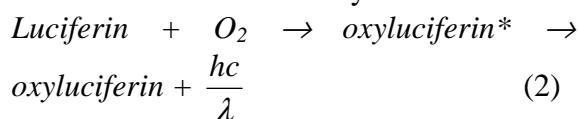
Bioluminisensi adalah proses pemancaran cahaya oleh organisme hidup yang menyertai reaksi oksidasi dari substrat

(luciferin) akibat dikatalis oleh enzim yang dinamakan luciferase. Walaupun reaksi bioluminisensi berbeda dari satu spesies ke spesies lainnya, tetapi memiliki kesamaan dalam hal tertentu yaitu melibatkan reaksi reduksi-oksidasi yang menyebabkan sebuah substrat memberikan elektron ke substrat yang lain. Substrat yang menerima elektron dikatakan tereduksi dan yang melepaskan elektron dikatakan teroksidasi. Secara fisika, perpindahan elektron dari sebuah substrat ke substrat lain menyebabkan terjadinya peningkatan energi pada substrat yang mendapat tambahan elektron tersebut sehingga menghasilkan keadaan eksitasi yang tidak stabil dan meluruh kembali ke keadaan dasar sambil memancarkan cahaya tampak. Panjang gelombang cahaya tampak λ yang dihasilkan dapat dihitung berdasarkan persamaan berikut

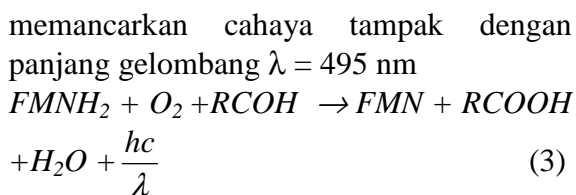
$$\Delta E = E_{\text{eksitasi}} - E_{\text{dasar}} = \frac{hc}{\lambda} \quad (1)$$

dimana E_{eksitasi} adalah energi dalam keadaan eksitasi, E_{dasar} adalah energi dalam keadaan dasar, h adalah tetapan Planck ($6,626 \times 10^{-34}$ J.s) dan c adalah kecepatan cahaya (3×10^8 m/s dalam ruang vakum).

Fraga (2000), mengusulkan proses reaksi bioluminisensi yang dikatalis oleh luciferase dimana luciferin teroksidasi oleh O_2 sehingga membentuk oxyluciferin dalam keadaan eksitasi, kemudian oxyluciferin meluruh ke keadaan dasar sambil memancarkan cahaya



Untuk bakteri *Photobacterium phosphoreum*, Wei dkk, (2001) mengusulkan proses pemancaran cahaya melibatkan enzim (E) yang disebut luciferase. Luciferase mengkatalis tiga substrat yaitu flavin mononukleotida tereduksi (FMNH_2), molekul oksigen (O_2) dan aldehyde rantai panjang (RCOH). Reaksi tersebut membebaskan flavin (FMN), asam fatty rantai panjang (RCOOH), molekul air (H_2O) sambil



Proses reaksi FMNH₂, O₂ dan RCOH yang dikatalis luciferase dari bakteri lain telah diungkapkan oleh peneliti-peneliti terdahulu. Abu-Soud dkk, (1993) dan Francisco dkk, (1996) menyatakan bahwa langkah pertama dalam proses reaksi bioluminisensi melibatkan pengikatan molekul tunggal FMNH₂ untuk setiap molekul luciferase, menghasilkan pembentukan intermediat E.FMNH₂. Intermediat ini bereaksi dengan oksigen O₂ menghasilkan pembentukan intermediat hidroperoksida luciferase mengikat flavin yang stabil (E.FMNOOH). Selanjutnya aldehid bereaksi dengan E.FMNOOH untuk membentuk intermediat aldehid-oksigen-flavin yang disebut dengan intermediat peroksihemiacetal (E.FMN OOA). Pemancaran cahaya yang dihasilkan diakibatkan transfer elektron dari dihidroflavin ke ikatan peroksida lemah dalam E.FMNOOA, menghasilkan pemutusan ikatan O-O. Intensitas pemancaran cahaya tergantung pada jumlah dari E.FMNOOA dan efisiensi relatif berhubungan dengan jumlah E.FMNOOA yang berubah keadaan eksitasi.

Keadaan eksitasi dipandang sebagai *annihilation* antara dua pusat-pusat ion-radikal yang terjadi pada sisi aktif enzim luciferase (Halldorson dan Duran, 2003). Perubahan intensitas cahaya persatuan waktu dari bakterial bioluminisensi berbeda-beda tergantung dari jenis spesies. Perubahan intensitas persatuan waktu dinyatakan dengan kecepatan peluruhan cahaya. Dari konstanta peluruhan cahaya kemudian dapat diketahui jumlah foton yang dipancarkan bakteri bioluminisensi persatuan detik atau disingkat quantum yield. Artikel ini melaporkan nilai konstanta peluruhan dan quantum yield dari bakteri bioluminisensi *Photobacterium phosphoreum*.

METODE PENELITIAN

Sampel penelitian ini adalah bakteri bioluminisensi *Photobacterium phosphoreum*. Bakteri ini mudah ditumbuhkan dalam laboratorium dengan cara mengeluarkan kantong tinta dari cumi kemudian organ cahaya dilepas dari kantong tinta dan dipisahkan dari lensanya. Lensa kemudian dibelah dan digerus supaya bakteri dapat dibiakkan pada media "agar miring".

Isolasi senyawa aktif bakteri *Photobacterium phosphoreum* dimulai dari isolasi bakteri dari cumi spesifik Indonesia jenis *Loligo duvacelli* (Pringgenis, 2003). Selanjutnya bakteri ini dikultur pada medium padat yang terdiri dari 3g yeast extract bacto, 5g peptone-bacto, 15g agar bacto, 30g Natrium klorida (NaCl), 3ml glycerol, 1 liter air suling dan NaOH secukupnya untuk mengatur pH menjadi 7,0. Kultur dilanjutkan pada 5 liter medium cair yang terdiri dari 1 liter air suling, 30g NaCl, 14g Na₂HPO₄·7H₂O, 2g KH₂PO₄, 0,5g (NH₄)₂HPO₄, 0,2g MgSO₄·7H₂O, 3ml glycerol, 5g triptone bacto, 5g ekstrak ragi bacto dan NaOH secukupnya untuk mengatur pH menjadi 7,0.

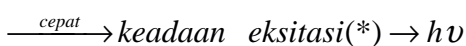
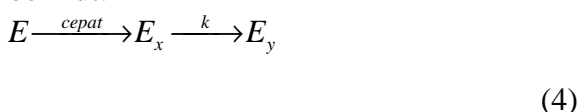
Untuk pertumbuhan bakteri, sebanyak satu ose bakteri *Photobacterium phosphoreum* ditanam dalam media padat dan diinkubasi pada temperatur 25°C selama 26 jam hingga terbentuk koloni. Koloni tersebut dicuplik dan diinkubasi ke dalam 100 ml media cair selama 26 jam dengan kecepatan putar 200 rpm pada temperatur 25°C. Sebanyak 4,5 ml kultur hasil inkubasi pada media pertama dipindahkan ke dalam 450 ml media cair kedua dan diinkubasi dengan kecepatan putar 200 rpm pada temperatur 25°C selama 26 jam. Selama inkubasi dilakukan juga sampling untuk mengukur pertumbuhan dan kerapatan sel setiap dua jam selama 26 jam. Pengukuran dilakukan dengan metode spektrofotometer UV-VIS Shimadzu UV-120-02 pada panjang gelombang 660 nm. Teknik pengukuran absorpsi dengan spektrofotometer UV-VIS adalah menempatkan sampel pada salah satu kuvet dan air

suling pada kuvet yang lain (referensi). Sebelum alat ini digunakan terlebih dahulu spektrofotometer UV-VIS dikalibrasi dengan cara mengisi kedua kuvet dengan air suling. Pada kondisi ini yang terbaca pada alat menunjukkan absorpsi nol.

Alat lain yang digunakan adalah spektrofotometer fluoresensi model F-2000. Alat ini berfungsi mengukur intensitas dan panjang gelombang cahaya yang dipancarkan oleh bakteri

Untuk mendapatkan nilai konstanta peluruhan dan quantum yield, diperlukan data intensitas cahaya dari bakteri *Photobacterium phosphoreum*. Penentuan intensitas pemancaran cahaya (emisi) dimulai dari pengukuran panjang gelombang pemancaran cahaya dari reaksi luciferase setelah mengikat substrat-substrat (FMNH₂, O₂ dan RCOH) dengan menggunakan spektrofotometer fluoro seni. Komposisi sampel adalah 0,5 ml LBPP ditambahkan ke 1,0 ml FMN (50 µM) yang berada dalam 0,05 M fosfat pH 7,0 yang dijaga anaerob dengan menggunakan gas N₂. Selanjutnya ditambahkan 20 µl larutan Na₂S₂O₄ segar (150 mg Na₂S₂O₄ dalam 10 ml air suling yang bebas O₂). Pengukuran diset pada temperatur 25⁰C.

Hubungan intensitas cahayadengan konstanta peluruhan dapat dapat diturunkan dari reaksi pemancaran cahaya dari bakteri *Photobacterium phosphoreum* sebagai berikut:



dimana E_x dan E_y adalah enzim Luciferse dalam keadaan intermediat sebelum menghasilkan keadaan eksitasi. Jika reaksi adalah order pertama maka intensitas cahaya I diukur dalam quanta/s dapat dinyatakan sebagai berikut:

$$I = - \frac{d(E_x)}{dt} = k(E_x) \quad (5)$$

dan

$$\frac{dI}{dt} = -kI \quad (6)$$

Oleh karena itu

$$I = I_0 e^{-kt} \quad (7)$$

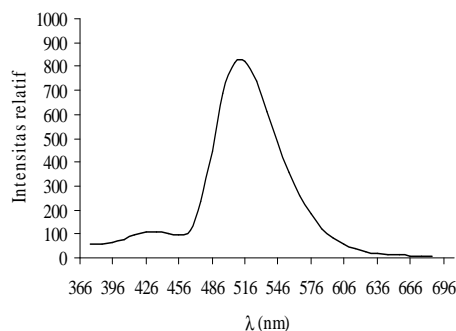
atau dapat juga dinyatakan dengan

$$\log I = - \frac{k}{2,303} t + \log I_0 \quad (8)$$

dimana I₀ adalah intensitas cahaya awal maksimal, k adalah konstanta peluruhan cahaya dan t adalah waktu peluruhan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengukuran spektrum pemancaran cahaya dari bakteri *Photobacterium phosphoreum* diperlihatkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Spektrum Pemancaran Cahaya Dari Bakteri *Photobacterium phosphoreum*.

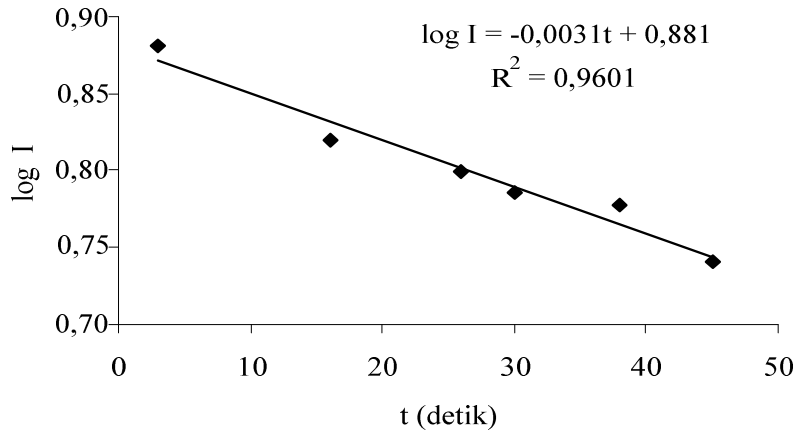
Gambar 1 memperlihatkan bahwa spektrum pemancaran cahaya maksimum dari bakteri telah mengikat substrat-substrat terjadi pada panjang gelombang 516 nm. Panjang gelombang yang dipancarkan pada daerah ini berhubungan dengan warna cahaya yang kebiru-biruan. Warna cahaya ini sesuai dengan hasil kultur bakteri yang ditumbuhkan pada medium cair.

Cahaya yang dipancarkan dari reaksi bakteri dapat digolongkan sebagai reaksi langsung karena tidak ada molekul di luar sistem yang terlibat dalam pemancaran cahaya. Dengan kata lain reaksi hanya

melibatkan substrat sebagai reaktan untuk membentuk molekul dalam keadaan tereksitasi. Molekul dalam keadaan tereksitasi menempati keadaan tereksitasi singlet yang selanjutnya kembali ke keadaan dasar sambil memancarkan cahaya dengan panjang gelombang 516 nm atau

dengan energi 2,4 eV yang setara dengan 54 kkal/mol.

Hubungan antara intensitas cahaya dari reaksi bioluminisensi bakteri sebagai fungsi waktu peluruhan dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hubungan Antara log I Terhadap Waktu Peluruhan t

Berdasarkan Gambar 2 dapat ditentukan persamaan garis lurus pada grafik yaitu $\log I = -0,0031t + 0,881$. Dari pers. 7 kemudian dapat disimpulkan bahwa konstanta peluruhan cahaya adalah 0,007/s. Konstanta peluruhan cahaya yang disebut juga dengan koefisien laju atau laju reaksi jenis menyatakan perubahan intensitas cahaya persatuan waktu jika konsentrasi semua substrat sama dengan satu.

Selanjutnya jumlah quanta total yang dipancarkan (N) dapat dihitung berdasarkan persamaan berikut

$$N = cq = \int_{t=0}^{\infty} Idt \quad (9)$$

dimana q adalah *quantum yield* dari LBPP dan c adalah jumlah molekul dari intermediat yang terbentuk dalam reaksi. Substitusikan pers. 6 ke dalam pers. 9 sehingga didapatkan:

$$cq = I_0 / k \quad (10)$$

Karena nilai c dalam eksperimen tidak diketahui maka nilai c diasumsikan konstan. Selanjutnya cq dinyatakan dalam bentuk *quantum yield* relatif. *Quantum yield* dalam sebuah reaksi bioluminisensi didefinisikan sebagai jumlah quanta yang dipancarkan per molekul substrat atau

jumlah foton yang dipancarkan per molekul reaksi.

Perhitungan nilai *quantum yield* menggunakan konstanta peluruhan (k) diperoleh berdasarkan Gambar 1 dimana $k = 0,007/s$. Pada penelitian ini digunakan Luciferase dengan tingkat fraksionasi (25-85%) dan aktivitas spesifik $0,167 \times 10^{14}$ quanta/s.mg. *Quantum yield* yang dihasilkan adalah 24×10^{14} quanta/mg. Karena berat molekul dari Luciferase adalah 79000 D sedangkan 1 mg terdiri dari $7,6 \times 10^{15}$ molekul luciferase maka diperoleh *quantum yield* adalah 0,3.

Hasil-hasil eksperimen tentang karakteristik fisis pemancaran cahaya dari reaksi bioluminisensi bakteri *Photobacterium phosphoreum* dan dari bakteri luminesensi lain dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Perbandingan Karakteristik Fisis Pemancaran Cahaya Bakteri *Photobacterium phosphoreum* dengan Bakteri-bakteri Luminesensi Lainnya

Luciferase	$\lambda_{\text{eksitasi}}$ (nm)	λ_{emisi} (nm)	q
<i>Photobacterium</i>	350	516	0,3

<i>phosphoreum</i> (penulis)			
<i>Photobacterium phosphoreum</i> (Kasai dkk. 1987)	363	495	0,1
<i>Vibrio harveyi</i> (Fisher dkk. 1996)	370	490	0,2 7
<i>Vibrio harveyi</i> (Nicoli dkk. 1974)	-	490	0,0 1
<i>Photobacterium fisheri</i> (Tanner dkk. 1996)	-	536	0,3
<i>Photobactrium leiognathi</i> (Moore dkk. 1995)	-	490	0,1

Dari Tabel 1 dapat dikemukakan bahwa karakteristik fisis pemancaran cahaya dari reaksi LBPP yang diisolasi dari cumi laut Indonesia memiliki perbedaan dengan karakteristik fisis cahaya dari bakteri lain. Perbedaan tersebut terletak pada panjang gelombang eksitasi, panjang gelombang emisi, dan kuantum yield.

Perbedaan karakteristik fisis pемancaran cahaya disamping disebabkan oleh luciferase spesifik yang dimiliki setiap bakteri juga disebabkan oleh kondisi optimum pemancaran cahaya pada setiap bakteri seperti pH dan temperatur.

Disamping itu penggunaan substrat analog FMNH₂ dan dodecyl decanal sebagai aldehid juga berpengaruh terhadap karakteristik fisis pemancaran cahaya bakte. Substrat yang dipakai dalam penelitian ini tidak persis sama seperti yang digunakan oleh bakteri *Pphosphoreum* dalam proses pemancaran cahaya di alam. Penggunaan substrat analog ini diduga mempengaruhi panjang gelombang cahaya yang dipancarkan dalam keadaan *in vitro*. Francisco dkk. (1996) mengungkapkan bahwa penggunaan substrat yang diambil dari luar sistem bakteri (substrat analog)

menyebabkan pergeseran panjang gelombang cahaya yang dipancarkan

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dikemukakan sebelumnya dapat disimpulkan bahwa:

1. Konstanta peluruhan cahaya dari reaksi bioluminisensi bakteri *Photobacterium phosphoreum* adalah 0,007/detik.
2. Nilai *quantum yield* yang dihasilkan oleh bioluminisensi bakteri adalah 0,3. Artinya jumlah kuantum foton yang dipancarkan bakteri adalah 24×10^{14} quanta/mg.

DAFTAR PUSTAKA

- Abu-Soud, H.M., Clark, A.C., Francisco, W.A., Baldwin, T.O., dan Raushel, F.M. (1993). **Kinetic Destabilization of the Hydroperoxy Flavin Intermediate by Site-directed Modification of the Reactive Thiol in Bacterial Luciferase**, *The Journal of Biological Chemistry*, 264(11): 7699-7706
- Biron, K. (2003). **Fireflies, Dead Fish and a Glowing Bunny: a Primer on Bioluminescence**, *J.Bio.Teach.*, 1, 19 - 25.
- Floyd, E R. (1997). **Bermuda Triangle Continues to Mystify**. *The Augusta Chronicle Online* <http://www.augustachronicle.com/stories/030297>.
- Fraga, N. (2000). **The Function dan Mechanism of Bioluminescence in The Dinoflagellate Gonyaulax**, *J. bioluminescence*, 1-5
- Francisco, W.A., Abu-Soud, H.M., Topgi, R., Baldwin, T.O., Raushel, F.M. (1996). **Interaction of Bacterial Luciferase with 8-Substituted Flavin Mononucleotide Derivatives**, *The Journal of Biological Chemistry*, 271(1): 104-11
- Fisher, A.J., Thompson, T.B., Thoden, J.D., Baldwin, T.O., dan Rayment, I. (1996). **The 1,5 A Resolution Crystal Structure of Bacterial**

- Luciferase in Low Salt Conditions**, *J. Biol. Chem.*, **271**, 21956 – 219678.
- Hasting, J.W. (1998). **Bioluminescence**, In: **Cell Physiology**, 2nd Edition, Academic Press, New York, 984-1000
- Halldorson, V.N., dan Duran, N.L. (2003). **Bioluminescent bacterial: Lux Genes As Environmental Biosensors**, *Brazilian Journal of Microbiology*, 34: 91-96
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., dan Williams, S.T. (1994). **Bergey's Manual of Determinative bacteriology**, 9th Edition, Williams & Wilkins, USA.
- Kasai, S., Matsui, K., and Nakamura, T. (1987). **Purification and Some Properties of FP₃₉₀ from Photobacterium. phosphoreum, Flavin and Flavoprotein** (Edmonton, D.E and McCormic), Walter de Gruyter, Berlin and New York, 647-650.
- Kruse, M, dan Boyle, R. (2000). <http://library.thinkquest.org/COO5358/index2.htm?tqskip1=1&tqtime=0429>.
- Madden, D., dan Lidsten, B.M. (2001). **Bacterial illumination; Culturing luminous bacteria**, *Bioscience Explained*, Vol.1(1),
- Meyer-Rochow, V.B. (2001). **Light of My Life-Messages in The Dark**. *Biologist (London)* **48**, 163 – 165.
- Moore, S.A., dan James, M.N. (1995). **Structural Refinement of The Non-Fluorescent Flavoprotein from Photobacterium leiognathi at 1,60 A Resolution**, *J. Mol. Biol*, **249**, 195 - 214.
- Nicoli, M.Z, Meighen, E.A, Hasting, J.W. (1974). **Bacterial Luciferase, Chemistry of The Reactive Sulfhydryl**, *J. Biol. Chem*, **249**, 2385-2392.
- Tanner, J.J, Lei, B., Tu, S.C., dan Krause, K.L (1996). **Flavin Reductase P: Structure of Dimeric Enzyme That Reduces Flavin**, *Biochemistry*, **35**, 13531 – 13539.
- Pringgenies, D. (2003). **Kehadiran bakteri pada organ cahaya cumi-cumi *Loligo duvauceli***, Disertasi, PPs-ITB
- Wei, C.J., Lei, B., dan Tu. (2001). **Characterization of the binding of Photobacterium phosphoreum P-flavin by Vibrio harveyi luciferases**, *Archives of Biochemistry dan Biophysics*, 396(2):199-206.