

Artikel Asli/Original Article

**Pengenalpastian Mikroflora Bakteria Gram Positif dan Negatif yang Dipencil
daripada Kolam Air Panas Bentong, Pahang**
(Identification of Gram Positive and Negative Bacteria Microflora Isolated from
Hot Water Spring in Bentong, Pahang)

AHMAD ZORIN SAHALAN, ABDUL HAMID ABDUL AZIZ, MOHAMED KAMEL ABD GHANI & HING HIANG LIAN

ABSTRAK

Suatu kajian pemencilan dan pengenalpastian mikroflora bakteria daripada kolam air panas telah dilakukan di kolam air panas Bentong, Pahang. Kebanyakan bakteria yang dipencil dari kolam air panas adalah dari Bacillus sp. kerana ia mempunyai ciri adaptasi yang membolehkannya hidup di kawasan ekstrem suhu tinggi dengan pembentukan endospora. Objektif kajian adalah untuk mengenal pasti spesies bakteria selain dari spesies Bacillus sp. yang mampu mandiri dalam kolam air panas ini. Tiga buah kolam air panas dikenal pasti sebagai A, B dan C. Julat suhu berada antara 36°C-52°C dan nilai pH antara 7.88-8.65. Kajian ini telah berjaya memencilkan dua isolat bakteria kokus Gram positif bersama tiga spesies Gram negatif. Spesies Gram positif tersebut adalah dari spesies Streptococcus sp. dan Staphylococcus sp., manakala Gram negatif pula dikenal pasti sebagai Pseudomonas sp., Klebsiella sp. dan Proteus sp.. Sebagai kesimpulan, bakteria tak berspora yang bukan Bacillus sp. mampu mandiri dalam kolam air panas.

Kata kunci: Kolam air panas; pengenalpastian; kokus gram positif; gram negatif; Bentong

ABSTRACT

A study on the isolation and identification of bacterial flora from hot spring was carried out from Bentong hot spring water, Pahang. In general, many of the bacteria identified from the hot spring were from Bacillus sp. due to its ability to adapt to high temperature mainly by forming endospore. The objective of this study was to identify bacteria other than Bacillus sp. that were able to survive this hot spring. Three hot spring pools were identified as A, B and C. The temperatures were ranging from 36°C to 52°C and their pH values were between 7.88-8.65. The result shows that two species of Gram positive cocci and three species of Gram negatives were isolated. The two Gram positives were Streptococcus sp. and Staphylococcus sp. The three species of Gram negative rods were identified as Pseudomonas sp., Klebsiella sp. and Proteus sp. In conclusion, non-sporulating species of bacteria other than Bacillus sp. have adapted to survive in hot springs.

Keywords: Hot spring water; identification; gram positive cocci; gram negative; Bentong

PENDAHULUAN

Kolam air panas atau "Hot Spring" adalah kawasan yang mana terdapatnya takungan air yang suhunya tinggi sehingga mampu mencapai suhu tinggi sekitar 110°C. Kolam air panas ini terhasil akibat resapan air yang keluar dari tanah di mana airnya dipanaskan oleh geothermal haba yang berpunca daripada haba bumi atau larva bawah tanah (Pentecost et al. 2003). Di Malaysia, kolam air panas sering dikunjungi oleh orang ramai dan air kolam dipercayai dapat menyembuhkan pelbagai penyakit kulit seperti kurap dan panau. Walaupun suhu di kolam ini tinggi hinggalah mampu membunuh pelbagai hidupan 45-80°C, namun kawasan ekstrem ini mampu menampung hidupan beberapa jenis mikroorganisma seperti bakteria termofilik.

Mikroorganisma tahan haba seperti bakteria termofilik boleh mandiri pada suhu antara atau melebihi 80°C

(Farkas et al. 2011). Termofilik boleh dibahagikan kepada termotoleran, termofilik dan termofilik ekstrim. Termotoleran mempunyai pertumbuhan yang optimum pada suhu mesofilik iaitu sekitar 30-40°C tetapi mempunyai suhu pertumbuhan maksimum melebihi 50°C. Termofilik pula mempunyai suhu pertumbuhan optimum antara 50-70°C manakala termofilik ekstrem pula mempunyai suhu pertumbuhan optimum melebihi 70°C. Sesetengah bakteria termofilik, khususnya bakteria basilus Gram positif (Mahdavi et al. 2011) akan menghasilkan endospora yang sangat rintang haba. Moriello et al. (2003) mendapati satu strain bakteria termofilik yang dipencilkan dari pasir pantai di Itali menghasilkan polisakarida eksoselular dalam jumlah yang agak banyak. Polisakarida ini mampu untuk menjadikan bakteria tahan terhadap suhu panas.

Oleh kerana kebanyakan kolam air panas sentiasa dimonopoli oleh bakteria dari kumpulan gram positif

Bacillus sp., kehadiran bakteria selain ini tidak diketahui dengan begitu baik (Chaudhuri et al. 2017) Oleh yang demikian, objektif kajian ini adalah untuk mengumpul data kepelbagaian bakteria yang wujud di kolam air panas ini. Lokasi kolam air panas Bentong, Pahang telah dipilih sebagai lokasi kajian kerana memandangkan ianya merupakan kolam yang belum terjejas oleh aktiviti pelancongan dan ini meningkatkan peluang kepelbagaian biodiversitinya. Sifat fizikal air seperti suhu dan pH juga dicatat.

KAEDAH

MEDIA KULTUR

Media kultur yang digunakan untuk pertumbuhan bakteria adalah agar soya trypticase (TSA-Merck) dan agar darah (Mahdavi et al. 2011).

PENGAMBILAN SAMPEL

Kolam air panas di Bentong Pahang ini mempunyai tiga kolam, yang dikenal pasti sebagai kolam A, B dan C. Kedalaman kolam yang ada adalah sangat cetek iaitu sedalam 1-2 kaki sahaja dan sampel air (500 ml) diambil terus dari kolam air panas tersebut.

UJIAN PENGENALPASTIAN BAKTERIA

Semua ujian pengenalanpastian bakteria menggunakan ujian piawai mikrobiologi (Pentacost et al. 2003) Media biokimia seperti sitrat Simmons (Merck) untuk ujian sitrat, media agar separa pepejal (Merck) untuk ujian motiliti, media kaldu triptofan (Merck) untuk ujian Indol, media kaldu urea (OXOID) untuk ujian urease, media kaldu MRVP (Merck) untuk ujian Voges-Proskauer, media kaldu TSA (Merck) dengan 7% natrium klorida untuk ujian pertumbuhan dan air pepton (Merck) untuk ujian fermentasi karbohidrat

(glukosa, arabinosa, sukrosa, laktosa dan mannitol) digunakan bagi tujuan pengenalanpastian bakteria.

Selain daripada media, beberapa bahan kimia yang terlibat dalam pengenalanpastian mikroorganisma juga digunakan. Ujian ini termasuklah ujian fermentasi karbohidrat, ujian pertumbuhan dalam 7% natrium klorida (NaCl), katalase, sitrat, oksidase, indol, motiliti, urease dan Voges-Proskauer digunakan.

HASIL

CIRI FIZIKAL KOLAM AIR PANAS BENTONG, PAHANG

Ketiga-tiga kolam dicatat sebagai kolam A, B dan C yang mana suhunya serta pH adalah seperti di dalam Jadual 1. Suhu kolam A mempunyai suhu yang tertinggi iaitu antara 47-52°C, diikuti oleh kolam B dan kemudian C. Manakala pHnya untuk ketiga-tiga kolam mini adalah antara 7.88 sehingga 8.65, iaitu lebih kepada bersifat alkali.

JADUAL 1. Ciri fizikal kolam air panas Bentong, Pahang

Kolam	Suhu/°C	pH
A	47 – 52	8.22 – 8.65
B	37 – 52	8.15 – 8.50
C	36 – 37	7.88 – 8.61

*Aliran air memasuki kolam A dahulu dan kemudian kolam B dan akhirnya C

KOLONI BAKTERIA YANG DIPENCIL DARI KOLAM

Ciri-ciri koloni serta bentuk fizikal bakteria yang dipencilkan telah dikenal pasti. Terdapat dua kumpulan bakteria yang ada didalam kolam air panas ini, iaitu gram positif dan negatif. Jadual 2 menunjukkan ciri bakteria dan bentuk koloninya.

JADUAL 2. Ciri-ciri bakteria yang berjaya dipencilkan daripada kolam air panas Bentong, Pahang

Sampel	Gram	Ciri Koloni (Pada TSA)	Ciri Mikroskop	% Jumlah Koloni /ml
1.	Gram positif	Koloni adalah kecil, berwarna putih krim	kokus berantai dan tidak berbentuk bulat dan berspora	12.5
2.	Gram Positif	Koloni kecil, bulat warna putih dan kelihatan lembap	kokus berkelompok dan tidak sedikit cembung berspora	6.25
3.	Gram Negatif	Koloni kecil, berwarna putih dan sedikit cembung	basilus, tidak berspora	18.3
4.	Gram Negatif	Koloni pin poin dan berwarna putih jernih	basilus, tidak berspora	16.3
5.	Gram Negatif	Koloni pin poin, berwarna putih krim, permukaan agak kasar	basilus, tidak berspora	17.7

Pencirian koloni bakteria berdasarkan kepada piawai cerapan koloni bakteria (Mac Fadden 2000)

HASIL UJIAN PENGENALPASTIAN BAKTERIA

Di dalam Jadual 3(a), didapati dua kumpulan bakteria daripada Gram positif iaitu *Streptococcus* sp. daripada sampel 1 dan juga *Staphylococcus* sp. daripada sampel 2 (Mac Fadden 2000). Ujian selanjutnya terhadap (Mac

Fadden 2000) sampel 3, 4 dan 5 menunjukkan ianya bakteria daripada kumpulan gram negatif. Bacteria ini telah dikenal pasti dan hasil ujian biokimia menunjukkan yang ianya merupakan bakteria *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp. dan *Proteus* sp.

JADUAL 3. Ujian biokimia penenalpastian bakteria untuk sampel 1-5. Ujian untuk (a) Gram positif dan (b) Gram negatif. Ujian Biokimia untuk bakteria Gram positif dan (b) Ujian biokimia untuk bakteria gram negatif

(a)			
Sampel	1	2	
Gram	Positif	Positif	
Koagulasi tube	-	+	
Katalase	-	+	
Hemolysis	Gamma	Beta (separa)	
Bacitracin	-	-	
Optochin	-	-	
Oksidase	-	-	
Nama bakteria	<i>Streptococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>	

(b)			
Sampel	3	4	5
Gram	Negatif	Negatif	Negatif
Oksidase	+	-	-
TSI: Butt – Acid/Alkali	K	A	A
Slant – Acid/Alkali	K	g	g
Gas: +ve/-ve	K	A	K
H ₂ S	-	-	-
Urease	-	+	+
Motiliti	+	-	+
Indol	-	-	-
Metil merah	-	-	-
Voges-Proskauer	-	+	-
Sitrat	+	+	+
Glukose	-	+	-
Laktose	-	+	-
Sukrose	-	+	-
Mannitol	-	+	-
Nama Bakteria	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Proteus</i> sp.

Petunjuk + (ada tindakbalas) - (tiada tindakbalas) TSI: A – Acid; K – Alkali; g = gas+

PERBINCANGAN

Kolam air panas Bentong terletak di kawasan pedalaman selatan negeri Pahang dan terletak jauh dari kawasan penempatan juga merupakan takongan air. Kolam ini mengandungi tiga kolam rekreasi yang bercantum antara satu sama lain dan dipisahkan oleh tembok simen. Suhu yang tertinggi dicatat daripada kolam A di mana julat suhunya mencapai 47 hingga 52°C (Jadual 1). pH untuk keseluruhan kolam A, B dan C juga agak beralkali (Chan et al. 2015). Kesan ini adalah akibat daripada kehadiran mineral semulajadi yang terlarut didalam air panas tersebut. Biasanya mineral yang terlibat adalah kalsium karbonat

yang berasal daripada kelarutan batu kapur dalam tanah yang memberikan pH beralkali kepada air panas ini (LaMoreux et al. 2001).

Air panas yang telah diambil daripada kolam kemudiannya ditebarkan ke atas media agar TSA dan agar darah. Media agar TSA yang digunakan ialah media yang diperkaya yang sesuai dan umum digunakan untuk pemencilan bakteria persekitaran (Ibfelet et al. 2014) Koloni bakteria yang dipencil daripada air panas ini telah dikenal pasti dan dibezakan apabila dikulturkan di atas agar darah. Koloni yang terbentuk diatas agar kemudiannya dikenal pasti melalui ujian serta agar biokimia (Mac Fadden 2000).

Hasil daripada ujian pengenalpastian menunjukkan dua spesies bakteria kokus Gram positif telah dikenal pasti. Daripada Jadual 2, sampel 1 menunjukkan bakteria dikenal pasti dari genus *Streptococcus* sp. dan sampel 2 adalah bakteria *Staphylococcus* sp. Selain daripada itu, terdapat tiga bakteria Gram negatif yang telah dikenal pasti. Hasil daripada ujian biokimia mendapati ketiga-tiga spesies bakteria ini adalah *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp. dan juga *Proteus* sp. Bacteria ini merupakan bakteria yang dikenali sebagai kumpulan proteobakter (Rajesh et al. 2015). Daripada analisis jumlah keberatusan yang hadir seperti di dalam Jadual 2, didapati bakteria Gram negatif ini merupakan kumpulan jumlah yang melebihi 15-18% populasi dalam kolam air panas. Apa yang menariknya adalah bakteria Gram positif dan negatif yang di pencilkan dari kolam air panas Bentong ini tidak memerlukan penghasilan endospora untuk melindunginya daripada suhu panas sebaliknya menggunakan kaedah lain seperti kehadiran kapsul polisakarida untuk ia beradaptasi di kolam ini (Oren 2010). Pembentukan berlendir daripada bakteria Gram negatif ini juga menunjukkan bahawa ianya membentuk satu lapisan biofilem pada permukaan batuan di kolam air panas ini. Biofilem ini membantu bakteria bertahan terhadap suhu panas persekitaran dalam kolam air (Beam et al. 2016).

KESIMPULAN

Hasil kajian ini mendapati bahawa kolam air panas Bentong, Pahang mempunyai kepelbagaian spesies bakteria selain *Bacillus* seperti bakteria gram positif iaitu *Streptococcus* sp. dan juga *Staphylococcus* sp. serta Gram negatif seperti *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp. dan juga *Proteus* sp. Keunikan kesemua bakteria ini adalah kesemuanya tidak berspora dan mampu memandiri pada suhu yang tinggi.

PENGHARGAAN

Penghargaan kepada kakitangan makmal Pn. Mariahyati Abu Bakar dan En. Faisal Arifin di Program Sains Bioperubatan, Pusat Pengajian Sains Diagnostik dan Kesihatan Gunaan, Fakulti Sains Kesihatan.

RUJUKAN

- Averhoff, B. & Müller, V. 2010. Exploring research frontiers in microbiology: recent advances in halophilic and thermophilic extremophile. *Res. Microbiol.* 161(6): 506-514.
- Beam, J.P., Bernstein, H. C., Jay, Z. J., Kozubal, M. A., Jennings, R. D., Tringe, S. G. & Inskeep, W. P. 2016. Assembly and succession of iron oxide microbial mat communities in acidic geothermal springs. *Front. Microbiol.* 15: 7-25.
- Chaudhuri, B., Chowdhury, T. & Chattopadhyay, B. 2017. Comparative analysis of microbial diversity in two hot springs of Bakreshwar, West Bengal, India. *Genom Data* 12: 122-129.

- Chan, C.S., Chan, K.G., Tay, Y.L., Chua, Y.H. & Goh, K.M. 2015. Diversity of thermophiles in a Malaysian hot spring determined using 16S rRNA and shotgun metagenome sequencing. *Front. Microbiol.* 6(177): 1-15.
- Farkas, J., Chung, D., DeBarry, M., Adams, M.W. & Westpheling, J. 2011. Defining components of the chromosomal origin of replication of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* needed for construction of a stable replicating shuttle vector. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(18): 6343-6349.
- Ibftel, T., Foged, C. & Andersen, L. P. 2014. Validation of dipslides as a tool for environmental sampling in a real-life hospital setting. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33(5): 809-813.
- LaMoreaux, P.E. & Tanner, J.T. 2001. *Springs and Bottled Water of the World: Ancient History, Source, Occurrence, Quality and Use*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
- McFadden, J.F. 2000. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria* (3rd ed.). USA: Lippincott Williams and Wilkins.
- Mahdavi, A., Sajedi, R.H., Asghari, S.M., Taghdir, M. & Rassa, M. 2011. An analysis of temperature adaptation in cold active, mesophilic and thermophilic *Bacillus α-amylases*. *Int. J. Biol. Macromol.* 49(5): 1038-1045.
- Moriello, S.V., Lama, L., Poli, A., Gugliandolo, C., Maugeri, T.L., Gambacorta, A. & Nicolaus, B. 2003. Production of exopolysaccharides from a thermophilic microorganism isolated from a marine hot spring in Flegrean areas. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30(2): 95-101.
- Oren, A. 2010. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environ. Technol.* 31(8-9): 825-834.
- Pentecost, A.B., Jones, R.W. & Renaut. 2003. What is a hot spring?. *Can. J. Earth Sci.* 40(11): 1443-1446.
- Rajesh Kumar Sahoo, Enketeswara Subudhi & Mohit Kumar. 2015. Investigation of bacterial diversity of hot springs of Odisha, India. *Genomics Data* 6: 188-190.

Ahmad Zorin Sahalan
 Abdul Hamid Abdul Aziz
 Mohamed Kamel Abd Ghani
 Hing Hiang Lian
 Program Sains Bioperubatan
 Pusat Pengajian Sains Diagnostik & Kesihatan Gunaan
 Fakulti Sains Kesihatan
 Universiti Kebangsaan Malaysia
 Jalan Raja Muda Abd Aziz, 50300 Kuala Lumpur
 Malaysia

Pengarang untuk dihubungi: Ahmad Zorin Sahalan
 E-mel: ahmadzorinsahalan@ukm.edu.my

Tel: +603-9289 7175.
 Faks: +603-2691 4304

Diterima: Februari 2017
 Diterima untuk diterbitkan: Januari 2018