

Penghasilan karotenoid oleh bakteria fotosintetik (Carotenoid production by photosynthetic bacteria)

Mohd Effendi Mohamed Nor

Pengenalan

Karotenoid merupakan pigmen tumbuhan yang wujud secara meluas dalam semua tumbuhan peringkat tinggi, alga dan sesetengah mikroorganisma. Dalam mikroorganisma, karotenoid wujud dalam bakteria fotosintetik dan fungi. Karotenoid penting kepada organisma fotosintetik kerana berfungsi sebagai penyerap cahaya yang diperlukan oleh organisma fotosintetik melakukan proses fotosintesis. Karotenoid wujud sebagai molekul yang mengikat bersama kompleks klorofil atau bakteriaklorofil dan kompleks ini mengikat kepada membran fotosintetik. Bilangan karotenoid yang banyak pada membran fotosintetik penting dalam tindak balas fotosintesis. Karotenoid mampu menyerap tenaga cahaya pada panjang gelombang 450 – 570 nm yang tidak mampu diserap klorofil dan seterusnya memindahkan tenaga kepada klorofil. Fungsi lain karotenoid adalah melindungi membran fotosintetik daripada kemusnahan akibat cahaya dan radikal bebas seperti superoksigen.

Karotenoid juga merupakan pigmen yang penting dalam haiwan seperti burung, ikan dan haiwan invertebrata. Karotenoid yang wujud dalam haiwan tersebut merupakan karotenoid tumbuhan yang diambil dalam diet mereka. Karotenoid memainkan peranan penting dalam memberikan warna yang menarik seperti kuning, jingga dan merah pada kebanyakan buah, bunga, akar, serangga, alga, kulat dan sesetengah bakteria.

Kegunaan karotenoid

Karotenoid digunakan secara meluas sebagai pewarna tidak toksik dalam makanan, minuman, kosmetik dan makanan haiwan. Karotenoid seperti beta-karotena, zeaxantin dan astaxantin banyak digunakan untuk menghasilkan bahan-bahan tersebut. Karotenoid juga memainkan peranan penting dalam nutrisi makanan dan haiwan iaitu sebagai sumber vitamin A terutamanya beta-karotena. Terdapat kajian yang mengatakan beta-karotena dan karotenoid yang lain merupakan antioksidan baik yang boleh melindungi daripada kanser seperti kanser hati, kulit, uterus, serviks dan gastrointestinal dan beberapa jenis penyakit seperti jantung, katarak dan arteriosklerosis.

Bakteria fotosintetik

Bakteria fotosintetik merupakan bakteri yang menyerap cahaya matahari untuk menghasilkan bahan organik keperluannya melalui proses fotosintesis. Bakteria fotosintetik melakukan fotosintesis dalam keadaan anaerobik dan bercahaya. Diketahui bahwa bakteria fotosintetik memerlukan keadaan anaerobik dan bercahaya untuk pertumbuhan. Walau bagaimanapun, terdapat beberapa bakteria fotosintetik yang tidak boleh tumbuh dalam keadaan anaerobik dan bercahaya. Bakteria fotosintetik *Erythrobacter longus* didapati menjana tenaga dengan lebih baik di bawah keadaan aerobik dan boleh menghasilkan karotenoid walaupun dalam keadaan gelap. Bakteria fotosintetik hidup di kawasan berair dan marin. Kawasan di mana bakteria fotosintetik boleh dijumpai antaranya adalah di dalam parit, air paya, tasik, kolam air panas, lumpur di tebing sungai dan pantai, kolam kumbahan, kolam enap cemar minyak dan air bertakung.

Kegunaan bakteria fotosintetik

Bakteria fotosintetik berguna dalam merawat air tercemar dan sebarang efluen industri seperti efluen buangan minyak kelapa sawit. Pertumbuhan bakteria fotosintetik dalam air tercemar dan efluen buangan industri dapat menurunkan indeks pencemaran air iaitu *biological oxygen demand* (BOD) dan *chemical oxygen demand* (COD) sekali gus merawat air dan efluen tersebut. Bakteria fotosintetik yang hidup dalam tanah pula membantu mengikat nitrogen atmosfera dan seterusnya dapat meningkatkan kesuburan tanah. Selain itu, bakteria fotosintetik juga menjadi makanan haiwan ternakan seperti ikan talapia. Bakteria fotosintetik diketahui mempunyai karotenoid yang berfungsi sebagai sumber vitamin A. Apabila diekstrak, karotenoid ini boleh dijadikan makanan tambahan yang memberi kesan antioksidan kepada haiwan ternakan.

Mengoptimumkan penghasilan karotenoid oleh bakteria fotosintetik menggunakan sumber nitrogen terpilih

Objektif kajian ini dijalankan adalah untuk mengoptimumkan penghasilan karotenoid oleh bakteria fotosintetik menggunakan sumber nitrogen tertentu. Sumber nitrogen merupakan antara faktor yang membantu meningkatkan penghasilan karotenoid oleh bakteria fotosintetik. Bakteria fotosintetik mengikat nitrogen dari persekitaran untuk menghasilkan bahan-bahan organik keperluannya.

Penyediaan inokulum bakteria fotosintetik

Bakteria fotosintetik yang dipilih dalam kajian ini ialah *Rhodobacter sphaeroides* dan *Rhodobacter capsulatus*. Koloni tunggal bakteria fotosintetik yang dipilih diinokulat ke dalam 30 ml kaldu malat-yis ekstrak (MYE) di dalam botol universal pada pH 7.0 dan dimasukkan ke dalam balang anaerob

bersama gas hidrogen dan karbon dioksida (BBL *Gas Pack*) untuk mewujudkan keadaan anaerobik. Botol kemudiannya disinari dengan lampu tungsten dengan keamatan cahaya 1,000 lux selama empat hari pada suhu bilik. Selepas itu, ampaian bakteria diempar pada 3,000 rpm selama 30 minit dalam keadaan steril. Sel diampaiakan semula dengan air pepton dengan nilai serapan optik sel ditetapkan pada nilai 0.5 pada panjang gelombang 550 nm. Ampaian sel bakteria atau inokulum piawai ini sedia digunakan untuk analisis seterusnya.

Penentuan sumber nitrogen dan kepekatannya

Sebanyak 2.3 ml setiap pencilan daripada inokulum piawai diinokulat ke dalam botol universal yang berisi penuh kaldu malat-yis ekstrak (MYE) iaitu sebanyak 30 ml dengan ditambah sumber nitrogen terpilih dengan kepekatan berbeza iaitu 1, 2 dan 3%. Sumber nitrogen yang digunakan ialah ammonium sulfat, ammonium nitrat, urea dan pepton. Manakala sampel kawalan pula adalah medium yang tidak ditambah sumber nitrogen. Nilai pH semua sampel ditetapkan pada 7.0. Semua botol dieram pada suhu bilik dalam keadaan anaerobik selama tujuh hari di dalam balang anaerobik sambil disinari cahaya lampu tungsten berkeamatan 1,000 lux. Jumlah penghasilan karotenoid oleh setiap pencilan di dalam setiap medium ditentukan selepas tujuh hari. Ampaian bakteria daripada botol universal diempar pada 3,000 rpm selama 30 minit. Supernatan dibuang sepenuhnya sebelum ditambah 0.3 ml air suling dan diempar sekali lagi pada 3,000 rpm selama 30 minit. Pengekstrakan diteruskan dengan menambah 4.7 ml larutan campuran aseton : metanol (7:2 v/v) dan divorteks. Ekstrak disimpan dalam keadaan gelap pada suhu 4 °C selama 30 minit sebelum bacaan serapan optik diambil pada panjang gelombang 480 nm menggunakan spektrofotometer. Jumlah karotenoid yang telah diekstrak ditentukan menggunakan formula seperti yang berikut:

$$\text{Jumlah karotenoid (mg/g)} = \frac{D \cdot v \cdot f \cdot 10 / 2,500}{\text{Berat kering sampel (g)}}$$

D = nilai serapan optik pada jarak gelombang 480 nm

v = jumlah isi padu kultur (ml)

f = faktor pencairan sampel (jika bacaan OD > 0.8)

2,500 = purata pemalar pemupusan bagi karotenoid

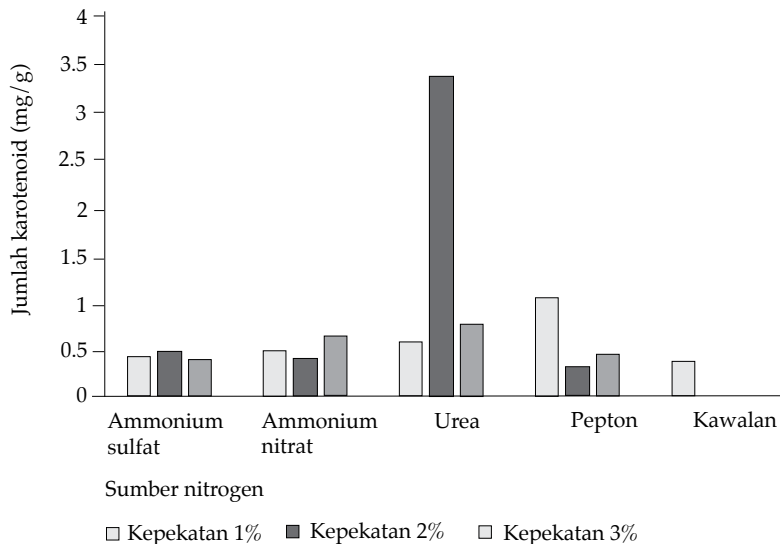
Bagi penentuan berat kering sampel, ampaiakan bakteria di dalam botol universal diempar pada 3,000 rpm selama 30 minit. Supernatan dibuang sepenuhnya sebelum ditambah dengan 0.3 ml air suling dan diempar sekali lagi pada 3,000 rpm selama 30 minit. Pelet yang terhasil dikeringkan di dalam oven pada suhu 70 °C selama 24 jam sebelum berat kering akhir ditimbang.

Penentuan profil penghasilan karotenoid selepas pengoptimuman

Sebanyak 2.3 ml setiap pencilan daripada inokulum piawai diinokulatkan ke dalam botol universal yang berisi penuh kaldu MYE steril iaitu sebanyak 30 ml yang ditambah dengan sumber nitrogen terbaik pada kepekatan terbaik yang telah ditentukan. Nilai pH medium ditetapkan pada 7.0 sebelum dieram pada suhu bilik selama 7 hari dalam keadaan anaerobik dengan disinari keamatan cahaya 1,000 lux. Jumlah penghasilan karotenoid oleh setiap pencilan ditentukan.

Kesan penggunaan sumber nitrogen berbeza pada jumlah kepekatan berbeza terhadap penghasilan karotenoid oleh *R. sphaeroides* dan *R. capsulatus*

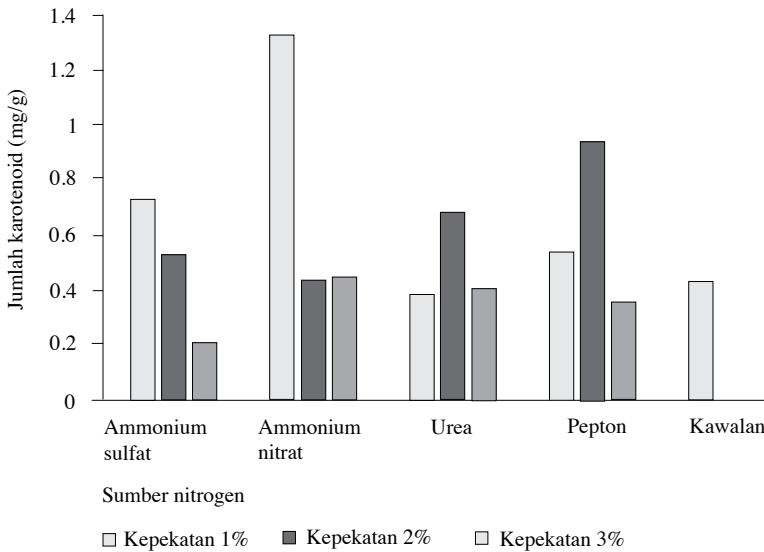
Pada faktor pertumbuhan yang sama, bakteria fotosintetik kajian *R. sphaeroides* dan *R. capsulatus* dengan pH dan disinari dengan keamatan cahaya yang sama, diberikan bekalan sumber nitrogen berlainan dengan kepekatan yang berbeza, telah menghasilkan jumlah karotenoid dengan kadar yang berbeza. *Rajah 1* menunjukkan *R. sphaeroides* tumbuh dan menghasilkan karotenoid dengan jumlah yang paling banyak dalam medium yang ditambah dengan urea 2% dengan jumlah karotenoid sebanyak 3.3488 mg/g, diikuti pepton 1% sebanyak 1.0270 mg/g, urea 3% sebanyak 0.7461 mg/g dan ammonium nitrat 3% sebanyak 0.6353 mg/g. Sumber nitrogen yang lain pada kepekatan yang berbeza didapati tidak mengaruh peningkatan jumlah karotenoid atau hanya mengaruh sedikit



Rajah 1. Jumlah penghasilan karotenoid oleh bakteria fotosintetik Rhodospirillum rubrum dalam medium malat-yis ekstrak dengan sumber nitrogen pada kepekatan berbeza pada pH 7.0 dan keamatan cahaya 1,000 lux selepas 7 hari eraman

sahaja jika dibandingkan dengan jumlah karotenoid dalam medium kawalan iaitu sebanyak 0.3636 mg/g.

Manakala bagi bakteria *R. capsulatus* pula, pencilan yang ditambah dengan ammonium nitrat 1% menghasilkan jumlah karotenoid yang paling tinggi iaitu sebanyak 1.3269 mg/g, diikuti pepton 2% sebanyak 0.9401 mg/g, ammonium sulfat 1% sebanyak 0.7295 mg/g, urea 2% sebanyak 0.6857 mg/g, pepton 1% sebanyak 0.5388 mg/g dan ammonium sulfat 2% sebanyak 0.5310 mg/g. Pencilan dalam medium kawalan menghasilkan jumlah karotenoid sebanyak 0.4308 mg/g. Medium yang lain tidak berlaku peningkatan penghasilan karotenoid (Rajah 2). Ammonium sulfat 1%, 2%, ammonium nitrat 1% dan pepton 2% didapati meningkatkan penghasilan karotenoid oleh *R. capsulatus*, tetapi tidak pada *R. sphaeroides*. Manakala ammonium nitrat 3% dan urea 1% serta 3% mengaruh peningkatan penghasilan karotenoid oleh *R. sphaeroides*, tetapi tidak pada *R. capsulatus*.

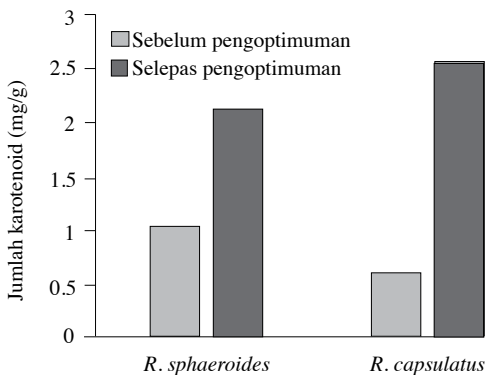


Rajah 2. Jumlah penghasilan karotenoid oleh bakteria fotosintetik *Rhodospirillum capsulatus* dengan sumber nitrogen pada kepekatan berbeza pada pH 7.0 dan keamatan cahaya 1,000 lux selepas 7 hari eraman

Sumber nitrogen yang berbeza mengaruh penghasilan karotenoid dalam kadar yang berbeza oleh bakteria fotosintetik yang berbeza. Dalam kajian yang lain, jumlah penghasilan karotenoid oleh *Mycobacterium phlei* menurun apabila asparagin digantikan dengan ammonium sulfat. Sebaliknya, ammonium sulfat didapati meningkatkan penghasilan karotenoid oleh *Actinomyces antibioticus*. Bakteria fotosintetik mahupun bukan fotosintetik memerlukan sumber nitrogen pada kepekatan tertentu untuk menghasilkan karotenoid atau bahan-bahan organik yang diperlukannya.

Misalnya, bagi bakteri *Actinomyces antibioticus*, penghasilan karotenoid adalah optimum jika medium ditambah dengan ammonium sulfat berkepekatan 0.75%. Kepekatan yang terlalu tinggi atau rendah yang tidak sesuai dengan pertumbuhan sesuatu bakteri mungkin merencat penghasilan karotenoid mahupun bahan organik yang lain.

Profil pertumbuhan berdasarkan penghasilan jumlah karotenoid sebelum dan selepas pengoptimuman bagi bakteri fotosintetik kajian telah ditentukan. Bagi kedua-dua bakteri kajian, jumlah karotenoid selepas pengoptimuman meningkat lebih tinggi daripada sebelum pengoptimuman. Peningkatan penghasilan karotenoid selepas pengoptimuman adalah sebanyak 51.67% bagi *R. sphaeroides* dan 76.70% bagi *R. capsulatus* (Rajah 3). Walaupun kajian ini mengoptimumkan beberapa faktor yang memberi kesan terhadap penghasilan karotenoid, masih terdapat faktor lain yang menjadi perencat atau pengehad penghasilan karotenoid. Antara faktor-faktor penting yang mempengaruhi penghasilan karotenoid oleh bakteri fotosintetik adalah suhu, oksigen dan pengaliran haba dalam medium.



Rajah 3. Jumlah penghasilan karotenoid oleh *Rhodobacter sphaeroides* dan *Rhodobacter capsulatus* sebelum dan selepas pengoptimuman

Karotenoid yang dihasilkan ini sangat berguna kepada industri kesihatan dan makanan. Ciri-ciri antioksidan yang ada pada karotenoid membolehkannya dijadikan suplemen untuk kesihatan dan sebagai bahan tambah dalam makanan atau minuman kesihatan yang dapat memberikan nilai kesihatan kepada manusia dan haiwan ternakan. Manakala bakteri fotosintetik yang tumbuh pula boleh dijadikan stok kultur untuk membersihkan air di dalam sungai, kolam dan tangki.

Kesimpulan

Didapati sumber nitrogen berlainan dengan kepekatan berbeza mengaruh penghasilan jumlah karotenoid yang berbeza oleh bakteri fotosintetik kajian. Keadaan pengoptimuman penghasilan karotenoid oleh bakteri *R. sphaeroides* dalam medium malat-yis ekstrak pada pH 7.0 dan disinari keamatan cahaya 1,000 lux ialah urea pada kepekatan 2%. Manakala

keadaan pengoptimuman penghasilan karotenoid oleh *R. capsulatus* dalam medium malat-yis ekstrak pada pH 7.0 dan disinari keamatan cahaya 1,000 lux ialah ammonium nitrat pada kepekatan 1%. Daripada kajian yang telah dijalankan, didapati bakteria *R. capsulatus* menghasilkan peningkatan jumlah karotenoid yang paling banyak selepas pengoptimuman dengan peningkatan sebanyak 76.71%.

Penghargaan

Kajian ini merupakan disertasi bagi memenuhi sebahagian daripada syarat memperoleh ijazah sarjana muda dengan kepujian dalam bidang mikrobiologi. Penulis mengucapkan ribuan terima kasih kepada semua kakitangan makmal yang membantu dalam aktiviti penyelidikan dan penyediaan bahan kimia dan radas-radas makmal.

Bibliografi

- Dow, C.S. (1982). Experiments with photosynthetic bacteria. Dalam: *Sourcebook of experiment for the teaching of microbiology*, (Primrose, S.B. dan Wardlaw, A.D., ed.), m.s. 408 – 422. New York: Academic Press
- Gest, H. (1993). Photosynthetic and quasi-photosynthetic bacteria. *FEMS Microbiology Letter*. 112: 1 – 6
- Goodwin, T.W. (1980). *The biochemistry of the carotenoids*, m.s. 302 – 306. London: Chapman and Hall
- Johnson, E.A. dan Schroeder, W.A. (1995). Microbial carotenoids. *Advance Biochemistry Eng/Biotech*. 53: 119 – 178
- Kobayashi, M. (1982). The role of phototropic bacteria in nature and their utilization. Dalam: *Advances in Agricultural Microbiology*, (Subba Rao, N.S., ed.) m.s. 643 – 666
- Pfennig, N. (1967). Photosynthetic bacteria. *Annual Review of Microbiology* 21: 285 – 324
- Young, A.J. dan Britton, G. (1993). *Carotenoids in photosynthesis*, m.s. 1 – 3. London: Chapman and Hall

Ringkasan

Karotenoid merupakan pigmen tumbuhan yang wujud dalam semua tumbuhan peringkat tinggi dan alga serta beberapa mikroorganisma seperti bakteria fotosintetik dan fungi. Karotenoid penting kepada organisma fotosintetik kerana berfungsi sebagai penyerap cahaya untuk proses fotosintesis dan melindungi membran fotosintetik daripada cahaya dan radikal bebas serta memberikan warna yang menarik seperti kuning, jingga dan merah pada kebanyakan buah, bunga, akar, alga, kulat dan sesetengah bakteria. Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi penghasilan karotenoid oleh bakteria fotosintetik antaranya ialah pH, sumber karbon dan nitrogen, suhu serta keamatan cahaya. Dalam kajian yang telah dilakukan untuk melihat kesan sumber nitrogen dengan kepekatan berbeza terhadap penghasilan karotenoid oleh bakteria fotosintetik, didapati sumber nitrogen berlainan dengan kepekatan berbeza mengaruh penghasilan jumlah karotenoid yang berbeza. Dalam tubuh manusia dan haiwan, karotenoid menyediakan aktiviti antioksidan yang boleh melindungi tubuh daripada kerosakan akibat radikal bebas dan menjadi sumber utama vitamin A terutamanya beta-karotena. Karotenoid juga melindungi tubuh daripada kanser hati, kulit, uterus, serviks, saluran gastrointestinal dan katarak.

Summary

Carotenoids are plant pigment existed in all plants, algae and some of microorganism like photosynthetic bacteria and fungus. Carotenoids are essential to photosynthetic organisms as its functions are to absorb light for photosynthesis process, to protect photosynthetic membrane from light and free radical; and to give attractive color like yellow, red and purple to fruits, flowers, roots, algae, fungus and some of bacteria. There are a few factors that affected carotenoid production by photosynthetic bacteria which are pH, carbon and nitrogen sources, temperature and light density. In study that was been done to determine effect of different concentration of nitrogen sources on carotenoid production by photosynthetic bacteria showed that different concentration produced different amount of produced carotenoid. In human and animal body, carotenoid provides antioxidant activity that can protect the body from damage caused by free radicals and become main source of vitamin A. Carotenoid also protects body from cancer of liver, skin, uterus, cervix, gastrointestinal and cataract.

Pengarang

Mohd Effendi Mohamed Nor
Pusat Penyelidikan Sains Teknologi Makanan, Ibu Pejabat MARDI,
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor
E-mel: effendi@mardi.gov.my