

## Karakterisasi Bakteri Amilo-Termofilik Obligat dari Sumber Air Panas Semurup, Sungai Penuh

### Characterization of Amilo-Thermophilic Obligat Bacteria from Semurup Hot Spring

Jumawita\*<sup>1)</sup>, Anthoni Agustien<sup>1)</sup> dan Djong Hon Tjong<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Andalas, Limau Manis Padang 25163

<sup>2)</sup> Laboratorium Genetika & Sitologi Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Andalas, Limau Manis Padang-25163

\*Koresponden: jumawita@gmail.com

#### Abstract

The study about “characterization of amilo-thermophilic obligat bacteria from Semurup Hot Spring” has been conducted from November 2013 to March 2014 in Laboratory of Microbiology, Biology Department, Faculty of Mathematic and Natural Science, Andalas University, Padang. The purpose of this study was to find out and analyze isolate amilo-thermophilic obligat bacteria. The result of this study showed that isolate SII-7 from Semurup Hot Spring survived at 70 °C, that produced amylase with unique macroscopic characters: random, cream and smooth surface. The isolate SII-7 was bacille, Gram positive, has endospore as a product, motility and catalase positive.

Keyword: Characterization, thermophilic obligat, bacteria, amylase.

#### Pendahuluan

Mikroorganisme termofilik dapat dibedakan menjadi tiga kelompok yaitu termofilik fakultatif, termofilik obligat dan termofilik ekstrem. Termofilik fakultatif memiliki suhu maksimum antara 50-65 °C contoh kelompok ini adalah beberapa strain *Bacillus stearotherophilus*. Termofilik obligat memiliki suhu maksimum 65-70 °C contoh kelompok ini adalah beberapa strain *Bacillus coagulans*. Termofilik ekstrem memiliki suhu maksimum lebih dari 70 °C dengan suhu optimum lebih besar dari 65 °C contohnya *Bacillus caldolyticus* dan *Thermus thermophilus* (Friedman, 1992).

Ketahanannya terhadap suhu menyebabkan enzim termostabil memiliki nilai komersial yang sangat tinggi (Gerday *et al.*, 2000 *cit.* Agustien, 2010). Saat ini, beberapa bidang industri terutama pangan dan kesehatan, serta bidang penelitian mulai banyak tergantung dengan kebutuhan terhadap enzim-enzim termostabil (Mulyani dan Agustina, 2004).

Sumber air panas merupakan salah satu lingkungan tempat kehidupan bagi beberapa organisme yang tahan terhadap suhu tinggi, seperti bakteri, fungi, ataupun alga yang bersifat termofilik. Salah satunya adalah sumber air panas Semurup yang terdapat di Kabupaten Kerinci. Berdasarkan hasil survey yang telah dilakukan di lokasi sumber air panas Semurup ditemukan beberapa sumur atau kolam yang menjadi sumber air panas dengan suhu 50 °C hingga 85 °C dan pH kolam tertinggi adalah 9. Sumber air panas semurup memiliki pH air yang bersifat basa, terbilang lebih tinggi untuk keanekaragaman jenis bakteri.

Identifikasi bakteri dapat dilakukan menggunakan analisis fenotipik dengan mempelajari sifat fisiologis atau biokimia serta karakterisasinya (Hadioetomo, 1993). Oleh sebab itu dilakukan penelitian mengenai karakterisasi bakteri termofilik obligat penghasil amilase yang bertujuan memperoleh isolat, dan mengamati karakterisasi bakteri amilo-termofilik obligat yang terdapat di Sumber air Panas Semurup.

## Metodologi Penelitian

### *Pengisolasian Bakteri*

Pengisolasian bakteri dilakukan pada sumber air panas Semurup, Sungai Penuh di kolam yang mempunyai suhu 50 °C sampai 85 °C. Sampel air panas diambil sebanyak 100 ml air yang dimasukkan pada botol kaca, berdasarkan metode *purposive sampling*. Inokulasi bakteri dari masing-masing sampel ke medium *Nutrient agar* dilakukan secara *Poure plate*, kemudian cawan petri di inkubasi pada suhu 70 °C selama 24 jam.

### *Penapisan dan Pemurnian Bakteri Amilolitik*

Pemurnian bakteri dilakukan dengan menggoreskan bakteri pada medium NA, diinkubasikan pada suhu 70 °C selama 24 jam. Setelah inkubasi, diambil bentuk koloni yang berbeda. Dipindahkan pada medium NA lain, inkubasi selama 24 jam pada suhu 70 °C. Koloni tunggal diinokulasikan pada biakan miring NA dan diinkubasikan pada suhu 70 °C selama 24 jam, kemudian disimpan sebagai stok bakteri (Atlas, 1997). Isolat pemurnian bakteri digunakan untuk penapisan bakteri termofilik penghasil amilase.

Penapisan amilase dilakukan dengan metode menurut Margareta 2003 *cit* Hastuti 2012 yang telah di modifikasi dengan menumbuhkan isolat bakteri pada media seleksi dengan penambahan 1% pati, dilakukan inkubasi pada suhu 70 °C selama 24 jam. Penambahan lugol pada cawan petri yang membentuk zona bening disekitar koloni bakteri menunjukkan bakteri bersifat amilolitik. Diukur diameter zona bening serta koloni yang terbentuk.

### *Pengamatan Morfologi dan Fisiologi*

Pengamatan makroskopis dengan melihat bentuk bakteri, bentuk pinggir koloni, ukuran koloni, sudut elevasi dan warna. Ciri mikroskopis bakteri diamati dengan mikroskop pada pembesaran 10x100, serta dilakukan pewarnaan Gram dan uji endospora (Fardiaz, 1993). Pengamatan Fisiologis bakteri dengan cara: Bakteri diinokulasi dengan medium NA semisolid (agar ±0,7%). Diinkubasi pada suhu

optimum. Jika bakteri menyebar, berarti bersifat motil, jika tidak menyebar berarti tidak motil. Serta uji katalase dilakukan dengan membuat preparat ulasan isolat bakteri pada kaca objek yang telah difiksasi, kemudian ditetesi dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hidrogen peroksida) di permukaan kaca objek dan diamati gelembung udara yang terbentuk (Lay, 1994).

## Hasil dan Pembahasan

### *Isolasi Bakteri Termofilik Obligat*

Bakteri termofilik obligat yang diisolasi dari Sumber Air Panas Semurup diperoleh 12 isolat bakteri termofilik yang tumbuh pada suhu 70 °C. Kolam I (suhu 81 °C, pH 8) didapatkan empat isolat, kolam II (suhu 82 °C, pH 8) didapatkan tiga isolat dan kolam III (suhu 66 °C, pH 9) didapatkan lima isolat bakteri termofilik obligat, dapat dilihat pada Tabel 1. Adanya bakteri tersebut di sumber air panas Semurup, kemungkinan disebabkan karena pH air bersifat basa yang berindikasi kaya mineral.

Tabel 1. Isolat bakteri termofilik obligat dari sumber air panas Semurup yang ditumbuhkan pada medium NA, suhu 70° C

No	Kolam	Isolat yang didapatkan
1	I (Suhu 81° C, pH : 8)	4
2	II (Suhu 82° C, pH : 8)	3
3	III (Suhu 66° C, pH : 9)	5
Total		12

Keterangan : pH = data sekunder didapatkan dari penelitian Hastuti (2012)

### *Penapisan Bakteri Termofilik Obligat Penghasil Amilase*

Penapisan bakteri termofilik obligat diperoleh tiga isolat yang menghasilkan amilase, dengan kode isolat SI-4, SII-5, dan SII-7. Isolat SII-7 memiliki indeks amilolitik paling tinggi yaitu 1,09 sedangkan isolat SI-4 dengan indeks amilolitik terendah yaitu 0,71, diperlihatkan pada Tabel 2.

Terbentuknya zona bening pada uji amilolitik disebabkan bakteri

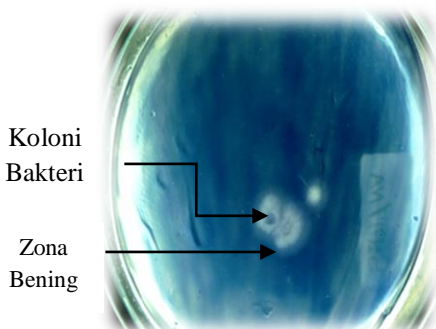
menghidrolisis amilase kemudian mensekresikannya kedalam medium. Enzim menghidrolisis amilase menjadi oligosakarida, maltosa dan glukosa yang menghasilkan zona bening setelah diberikan zat warna lugol (Gambar 1). Menurut Raharjo, *et al* (2008) zona bening terjadi

karena enzim amilase yang disekresikan oleh sel bakteri menghidrolisis molekul pati yang ada disekitarnya, sehingga kompleks amilum-iod dengan warna biru kehitaman (disebabkan oleh penambahan iodin kedalam media) berkurang atau bahkan hilang.

Tabel 2. Indeks amilolitik bakteri termofilik obligat dari Sumber Air Panas Semurup

No	Kolam	Kode Isolat	Diameter Koloni	Diameter Zona Bening	Indeks Amilolitik
1.	I	SI-1	-	-	-
		SI-2	-	-	-
		SI-3	-	-	-
		SI-4	0,7	1,2	0,71
2.	II	SII-5	1,2	2,2	0,83
		SII-6	-	-	-
		SII-7	0,69	1,44	1,09
3.	III	SIII-8	-	-	-
		SIII-9	-	-	-
		SIII-10	-	-	-
		SIII-11	-	-	-
		SIII-12	-	-	-

Keterangan : (-) : tidak tumbuh  
SI : Semurup kolam I  
SII : Semurup kolam II  
SIII : Semurup kolam III



Gambar 1. Zona bening bakteri amilo-termofilik obligat isolat SII-7

#### Karakterisasi Morfologi dan Uji Biokimia

Karakterisasi morfologi dilakukan pada isolat bakteri termofilik obligat yang menghasilkan enzim amilase, dengan mengamati bentuk makroskopis, mikroskopis dan uji biokimia sel bakteri.

Karakterisasi makroskopis koloni bakteri isolat SI-4 dan SII-5 memiliki bentuk koloni, bentuk pinggir dan elevasi yang sama yaitu bulat dan timbul, isolat SII-7 memiliki bentuk koloni bundar dengan pinggir menyebar atau berombak dengan elevasi timbul. Permukaan koloni

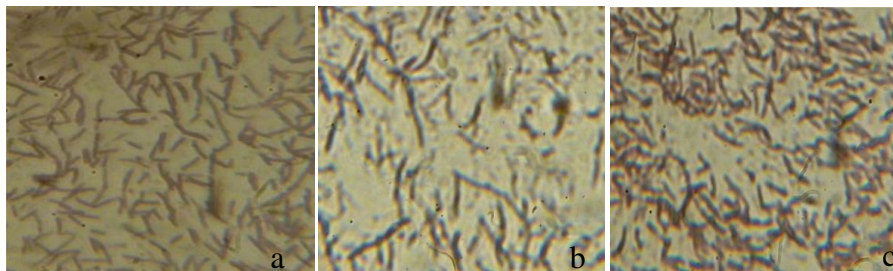
semua isolat sama yaitu licin, sedangkan warna koloni berbeda, SI-4 memiliki warna bening, SII-5 krem dan SII-7 putih. Uji pewarnaan Gram isolat SI-4 bersifat Gram negatif, isolat SII-5 dan SII-7 sama yaitu Gram positif, endospora isolat SI-4 negatif dan SII-5 serta SII-7 positif. Uji motilitas bersifat motil dan positif katalase untuk ketiga isolat bakteri. Menurut Ochman, *et al* (2005) karakteristik fenotip bakteri tidak bersifat statis, sehingga mungkin saja bakteri yang sama dapat memperlihatkan karakteristik morfologis yang berbeda.

Pewarnaan Gram menunjukkan bahwa isolat SI-4 bersifat Gram negatif, SII-5 dan SII-7 bersifat Gram positif ditandai dengan warna ungu pada dinding sel bakteri dan berbentuk batang (Gambar 2). Bakteri Gram positif memiliki dinding sel dengan konsentrasi lipid yang rendah, sehingga akan terlarut oleh alkohol 96% dan membentuk pori-pori yang kecil (Cappuccino dan Sherman, 1986). Pori-pori tersebut akan tertutup kembali oleh efek dehidrasi alkohol, sehingga pewarna utama (kristal violet) akan sulit dihilangkan. Hal

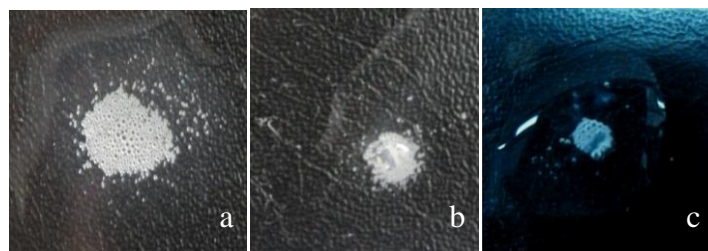
ini menyebabkan sel bakteri bersifat Gram positif. Pengujian endospora dilakukan pada dua isolat bakteri yang memiliki Gram positif. Endospora bakteri terdapat diujung koloni.

Hasil uji katalase isolat bakteri SI-4, SII-5 dan SII-7 pada Gambar 3 memperlihatkan ketiga bakteri positif katalase. Karena diperoleh gelembung udara yang menghasilkan oksigen dari

permukaan isolat ketika ditetesi larutan  $H_2O_2$ . Mikroorganisme yang mampu menghasilkan katalase atau peroksidase mampu menguraikan  $H_2O_2$  menjadi air dan oksigen (Cappuccino dan Sherman, 1986). Hidrogen peroksida terbentuk ketika metabolisme aerob sehingga mikroorganisme yang tumbuh dalam lingkungan aerob harus menguraikan bahan tersebut (Lay, 1994).



Gambar 2. Bentuk sel bakteri setelah dilakukan pewarnaan Gram (a) isolat SI-4 (b) isolat SII-5 dan (c) isolat SII-7 dengan perbesaran 10x100



Gambar 3. Gelembung udara pada uji katalase bakteri isolat (a) SI-4 (b) SII-5 (c) SII-7

Berdasarkan semua karakterisasi yang telah dilakukan dapat diprediksi bakteri amilo-termofilik obligat masuk ke dalam Genus *Bacillus*. Menurut (Pelczar dan Chan, 1988) genus *Bacillus* berbentuk basil, Gram positif, endospora positif dan positif katalase. Genus tersebut mampu bertahan hidup dalam bentuk sel vegetatifnya sampai suhu  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sedangkan pada suhu yang lebih tinggi dari  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  bakteri ini membentuk endospora.

Karakterisasi bakteri yang didapatkan tidak jauh berbeda dengan Agustien (2010) yang melakukan identifikasi bakteri termofilik suhu inkubasi  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  dari sumber air panas di Sumatera Barat dengan kode isolat A-03 melakukan pengamatan morfologi sel dan uji biokimiawi sederhana mencirikan genus *Bacillus*. Kemudian melakukan identifikasi lanjut menggunakan metode 16S rRNA dengan kode isolat A-03

didapatkan 1400 pasang basa (bp), persentase kemiripan 98% dengan *Bacillus agri* atau *Brevibacillus agri*.

### Kesimpulan

1. Diperoleh tiga isolat bakteri yang merupakan amilo-termofilik obligat, dengan indeks amilolitik tertinggi yaitu isolat SII-7.
2. Karakterisasi yang didapatkan ketiga bakteri ini bersifat termofilik obligat dengan suhu pertumbuhan optimum  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , memiliki bentuk makroskopis yang berbeda, mikroskopis berbentuk basil, uji katalase dan uji motilitas positif. Isolat SI-4 bersifat Gram negatif sedangkan isolat SII-5 dan SII-7 bersifat Gram positif dan menghasilkan endospora.

### Ucapan Terimakasih

Terima kasih disampaikan kepada Dr. Nasril Nasil, Dr. Mairawita dan Dr. Phil. Nat. Nurmiati yang telah memberikan bimbingan dan saran selama penelitian.

### Daftar Pustaka

- Agustien, A., J. Nurhayati, L.Z. Udin dan P. Aditiawati. 2010. *Isolasi dan identifikasi Bacillus spp. Proteolitik dan keratinolitik dari sumber air panas Sumatra Barat*. Makalah pada seminar XX dan Kongres Biologi, Malang.
- Atlas, R. M. 1997. *Principles of Microbiology*, 2<sup>nd</sup> Ed., WBC Mc Grow-Hill Book, New York.
- Benerjee, U. C., R. K. Sani., W. Azmi and R. Soni. 1999. Thermostable alkaline proteases from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Prosess Biochemistry* **35**: 213-219
- Cappuccino, J. G. and Sherman, N. 1986. *Microbiology: A Laboratory Manual*. New York: Benjamin Cummings Publishing Company, Inc.
- Fardiaz, S. 1993. *Analisis Mikrobiologi Pangan*. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Friedman, M. S. 1992. *Thermophilic Microorganism. Encyclopedia of Microbiology*, Vol. 4, Academic Press, Inc. New York **4**: 217-219.
- Hastuti, W. 2012. *Penapisan dan Karakterisasi Bakteri Amilo-Termofilik Sumber Air Panas Semurup, Kerinci, Jambi*. Sarjana Biologi FMIPA. Universitas Andalas. Padang.
- Lay, B. W. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. PT. Grafindo Persada. Jakarta
- Leveque, E., S. Janecek, B. Haye, and A. Belarbi. 2000. *Thermophilic Archaeal Amyolytic Enzymes; Enzyme and Microbial Technology* **26**: 3–14
- Mulyani, N. S dan L. N. A. Agustina. 2004. *Isolasi dan karakterisasi Enzim Proteolitik dari Isolate Bakteri Termofilik Sumber Air Panas Gonoharjo dan Plantungan, Kendal Jawa Tengah*. Universitas Diponegoro. Semarang
- Pelczar, M. J and R. D. Reid. 1958. *Microbiology*. Mc Graw Hill Book Company, Inc. New York **564**: pp.