

Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Termo-Proteolitik Sumber Air Panas Sungai Medang, Sungai Penuh, Jambi

Isolation and characterization of thermoproteolytic bacteria from hot springs at Sungai Medang, Sungai Penuh, Jambi

Dina Wahyuna, Anthoni Agustien^{*)} dan Periadnadi

Laboratorium Riset Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Kampus UNAND Limau Manis, Padang, 25163

^{*)}Koresponden: aagustien@gmail.com

Abstract

A study on isolation and characterization of thermoproteolytic bacteria from hot springs at Sungai Medang, Sungai Penuh, Jambi was conducted from March to June 2012 using a descriptive method. Seventy thermophilic bacteria were isolated from the hot springs. A Total of 39 thermoproteolytic bacteria were identified. The highest enzymatic activity (13.59 U/ml) was shown by isolate MI_{2,3} from a location at which the temperature was 60°C. The isolate MI_{2,3} was characterized as an aerobic thermoalkaliphilic (optimum temperature of 50°C, optimum pH of 9.0) bacterium with the ability to produce amylase but neither lipase nor cellulase.

Keywords : alkaliphilic, bacterium, enzymatic activity, proteolytic, thermophilic.

Pendahuluan

Bakteri termofilik merupakan mikroba yang potensial memproduksi enzim protease yang stabil terhadap panas dan dari sifat ini sangat diperlukan dalam industri pangan dan non pangan serta aplikasi bioteknologi karena mengurangi kemungkinan kontaminan dan ekonomis. Adanya mikroorganisme yang unggul merupakan salah satu faktor penting dalam usaha produksi enzim. Oleh karena itu, penggalan mikroorganisme indigenous penghasil protease perlu dilakukan di Indonesia (Akhdia, 2003).

Mikroorganisme ini sendiri tidak hanya bersifat toleran terhadap suhu lingkungannya yang bersifat ekstrim tetapi juga mampu untuk bertahan hidup dan berkembangbiak pada kondisi suhu yang ekstrim tersebut (Brock, 1986). Mikroorganisme termofilik menjadi pilihan yang baik sebagai sumber enzim termostabil. Aplikasi enzim didalam bioteknologi semakin menuntut enzim yang

bersifat tahan lingkungan. Karena faktor utama yang paling merusak enzim adalah suhu, maka usaha pertama yang akan dilakukan adalah mencari mikroba penghasil enzim-enzim termofilik dari berbagai sumber alam (Suhartono, 2000).

Protease merupakan enzim penting dan memiliki nilai ekonomi yang tinggi karena aplikasinya yang sangat luas. Industri pengguna protease diantaranya ialah industri deterjen, kulit, tekstil, makanan, hidrolisat protein, pengolahan susu, farmasi, bir, dan limbah (Moon dan Parulekar 1993). Nilai perdagangan enzim dunia mencapai 3–4 miliar dolar per tahun, 4–5 juta dolar di antaranya dari pasar Indonesia yang keseluruhannya diimpor dari negara-negara produsen enzim (Rajasa 2003). Indonesia memiliki pasar yang luas dan sumber daya alam yang mendukung dengan keanekaragaman jenis bakteri penghasil protease, sehingga diharapkan impor protease dapat digantikan produksi protease dalam negeri.

Sumber air panas Sungai Medang merupakan salah satu sumber air panas yang berada di Kota Sungai Penuh, Provinsi Jambi. Berlokasi di Wisata Air Panas Sungai Medang, Kecamatan Air Hangat Timur, Kota Sungai Penuh. Sumber air panas tersebut memiliki suhu antara 50⁰C sampai 78⁰C, dengan interval pH 8,45 sampai 8,71 dan disekelilingnya didapati beberapa vegetasi seperti lumut, rumput-rumputan dan serasah-serasah. Artikel ini membahas tentang isolasi dan karakterisasi bakteri proteolitik termofilik dari sumber air panas Sungai Medang.

Metode Penelitian

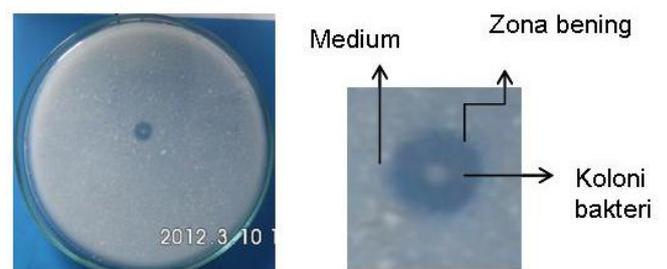
Penelitian ini menggunakan metode deskriptif dengan beberapa tahap isolasi bakteri termofilik dari sumber air panas Sungai Medang dan selanjutnya dilakukan penapisan bakteri yang bersifat proteolitik. Penapisan bakteri termofilik ini dilakukan menurut modifikasi dan metode Banerjee *et.,al* (1999). Biakan miring bakteri termofilik ini diinokulasikan dengan menggunakan tusuk gigi steril pada medium susu skim. Kemudian diinkubasi pada suhu 50⁰C selama 24 – 48 jam. Koloni bakteri dan zona bening yang terbentuk disekitar koloni bakteri diukur diameternya dan selanjutnya ditentukan Indeks Proteolitik (IP). Kemudian dilakukan uji aktivitas enzim dengan metode Bergmeyer dan Ward (1984) *cit.* Pakpahan (2009) yang dimodifikasi. Substrat yang digunakan adalah Kasein Hammarsten 1 % sebagai induser dilarutkan kedalam buffer posfat (50 mM, pH 8). 1 ml substrat kemudian direaksikan dengan 1 ml enzim selama 10 menit pada suhu 50⁰C. reaksi dihentikan dengan penambahan 1 ml asam tricloroasetat (TCA) 10 % inkubasi selama 10 menit pada suhu 50⁰C. Kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit. Pada 1 ml supernatan ditambahkan Na₂CO₃ 0,5 M dan pereaksi Folin Ciocalteau's (1:2), campuran diinkubasi 20 menit pada suhu 50⁰C. absorbansi dibaca pada panjang gelombang 578 nm. Aktivitas protease ditentukan dengan cara menginterpolasikan nilai

absorbansi dengan persamaan regresi dari kurva standar tirosin yang didapatkan. Blanko dibuat dengan cara yang sama, namun enzim di inaktifkan dahulu dengan direaksikan dengan 1 ml TCA. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang membebaskan 1 μmol tirosin permenit pada suhu dan pH optimum. (Sugiyono *et al.*, 2003). Dan setelah itu dilakukan Karakterisasi bakteri termofilik terhadap isolat bakteri yang memiliki IP yang paling tinggi meliputi pengamatan makroskopis, pewarnaan gram, pewarnaan spora, suhu pertumbuhan, pH pertumbuhan, motilitas dan uji enzimatik (amilase, lipase dan selulase).

Hasil dan Pembahasan

Isolat Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Protease

Hasil isolasi menunjukkan diperolehnya 70 koloni bakteri termofilik. Setelah dilakukan uji proteolitik diperoleh 39 isolat bakteri penghasil protease yang memiliki IP antara 0,13 sampai 7,89 mm (Tabel 1) . Hal ini ditandai dengan adanya zona bening disekitar koloni yang tumbuh pada medium skim agar. Bentuk koloni bakteri dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Bentuk koloni bakteri MII_{2,1} yang membentuk zona bening dan mempunyai indeks proteolitik tertinggi

Kisaran nilai indeks proteolitik yang dihasilkan 39 isolat yang potensial penghasil protease berkisar antara 0,13 sampai 7,89. Isolat yang memiliki nilai indeks proteolitik yang tertinggi terdapat

pada isolat MII_{2.1} yaitu 7,89 yang di dapatkan pada lokasi II pada titik ke 2 dengan suhu 77°C dan pada pH 8,71.

Tabel 1. Indeks proteolitik isolat bakteri sumber air panas Sungai Medang

No.	K	T (°C)	Kode Isolat	Hasil		IP
				DK	DZN	
1.	I	78	MI _{2.3}	0,6	3,3	4,5
2.			MI _{2.4}	9,3	14,6	0,57
3.			MI _{2.9}	7,2	16,5	1,22
4.			MI _{2.10}	7	19,7	1,81
5.	II	52	MII _{1.2}	6,4	8,3	0,297
6.			MII _{1.10}	4,8	11,6	1,417
7.			MII _{1.11}	8,75	10,45	0,194
8.			MII _{1.13}	2,2	6,0	1,727
9.			MII _{1.18}	0,8	4,6	4,75
10.		MII _{1.16}	3,65	10,4	1,85	
11.		77	MII _{2.1}	1,8	16,6	7,89
12.			MII _{2.2}	15,1	17,74	0,175
13.		70	MII _{3.16}	21,1	24,35	0,154
14.			MII _{3.21}	2,4	12,6	4,25
15.	MII _{3.23}		9,6	14,05	0,464	
16.	III	50	MIII _{1.1}	1,4	5,8	3,143
17.			MIII _{1.2}	4	8,8	1,2
18.			MIII _{1.3}	3,9	7,9	1,026
19.			MIII _{1.4}	4,4	11,4	1,591
20.			MIII _{1.5}	3,9	7,5	0,923
21.			MIII _{1.6}	5,7	14,3	1,509
22.			MIII _{1.7}	5,5	9,2	0,673
23.			MIII _{1.8}	7,1	13,7	0,93
24.	IV	70	MIV _{1.7}	5,2	7,7	0,455
25.			MIV _{1.8}	8,7	10,85	0,247
26.			MIV _{1.9}	6,0	12,1	1,017
27.	V	74	MV _{1.1}	8,15	9,7	0,190
28.			MV _{1.5}	0,9	4,7	4,22
29.			MV _{1.6}	1,4	4,1	1,929
30.			MV _{1.7}	4,5	7,3	0,622
31.			MV _{1.8}	9,42	17,45	0,852
32.		MV _{1.10}	5,4	6,1	0,13	
33.		74	MV _{2.2}	2,7	5,3	0,963
34.			MV _{2.3}	15,1	18	0,192
35.			MV _{2.4}	2,02	10,13	4,015
36.			MV _{2.6}	6	11	0,83
37.	MV _{2.7}		4,4	6,1	0,387	
38.	MV _{2.8}	8,6	12,35	0,436		
39.	MV _{2.10}	2,7	5,6	1,074		

Ket : K – kolom, T – suhu, DK – diameter koloni, DZN – diameter zona bening, IP – indeks proteolitik,

Isolat yang mempunyai indeks proteolitik terendah terdapat pada isolat MV_{1.10} yaitu sebesar 0,13 yang lokasinya terletak pada kolom V di titik 1 dengan

suhu 74°C dengan pH 8,55 (tabel 1). Pada Tabel 1 dapat juga dilihat bahwa 7 isolat memiliki indeks proteolitik lebih dari 2 yaitu 7,89 pada isolat MII_{2.1}, 4,75 pada isolat MII_{1.18}, 4,5 pada isolat MI_{2.3}, 4,25 pada isolat MII_{3.21}, 4,22 pada isolat MV_{1.5}, 4,015 pada isolat MV_{2.4} dan 3,143 pada isolat MIII_{1.1}.

Uji aktivitas enzim protease pada suhu 50°C dengan pH 8

Pengujian aktivitas enzim dilakukan terhadap 10 isolat yang memiliki indeks proteolitik teratas seperti yang disajikan pada Tabel 2. Isolat yang memiliki indeks proteolitik tinggi diuji aktivitasnya pada suhu 50°C dengan pH 8. Suhu 50°C merupakan suhu optimum bagi bakteri termofilik dan bakteri ini merupakan bakteri yang mampu hidup pada pH basa, maka dilakukan pengujian aktivitas enzim pada pH 8.

Tabel 2. Hasil uji aktivitas enzim protease setelah diregresikan dengan standar tirosin

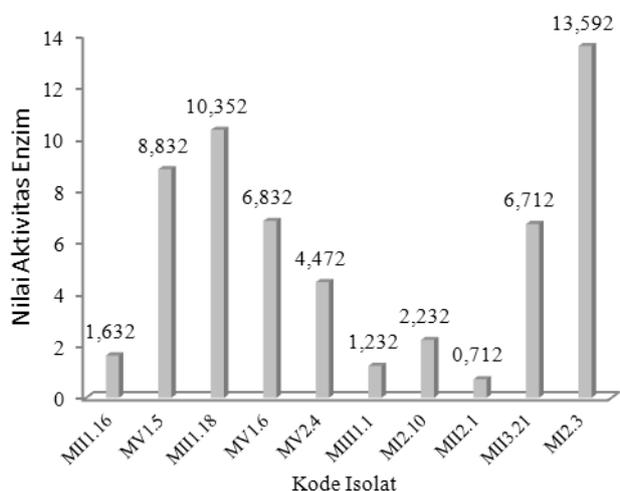
No.	KI	IP	AE (U/ml)
1.	MII _{2.1}	7,89	0,712
2.	MII _{1.18}	4,75	10,352
3.	MI _{2.3}	4,50	13,592
4.	MII _{3.21}	4,25	6,712
5.	MV _{1.5}	4,22	8,832
6.	MV _{2.4}	4,02	4,472
7.	MIII _{1.1}	3,14	1,232
8.	MV _{1.6}	1,93	6,832
9.	MII _{1.16}	1,85	1,632
10.	MI _{2.10}	1,81	2,232

Ket : KI – kode isolat, IP – indeks proteolitik, AE – aktifitas enzim

Tabel 2 menunjukkan bahwa isolat yang memiliki aktivitas enzim yang tertinggi adalah pada isolat MI_{2.3} yaitu 13,592 U/ml dan yang paling rendah adalah pada isolat MII_{2.1} yaitu 0,712 U/ml. Histogram uji aktivitas enzim protease dapat dilihat pada Gambar 3.

Menurut Agustien (2010) bahwa aktivitas spesifik enzim yang berbeda dari isolat *Bacillus* spp. kemungkinan disebabkan jumlah enzim dan asam amino protein enzim yang dihasilkan masing-

masing isolat *Bacillus* spp. berbeda satu sama lainnya. Menurut Lehninger (1998), bahwa aktivitas suatu enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu pH, konsentrasi substrat dan enzim, suhu dan adanya aktivator atau inhibitor.



Gambar 3. Histogram Aktivitas Enzim Protease (U/ml)

Karakterisasi Parsial Isolat $MI_{2.3}$

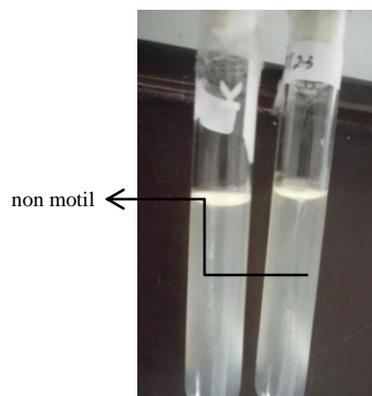
Karakterisasi parsial dilakukan terhadap isolat yang memiliki aktivitas enzim tertinggi yakni isolat $MI_{2.3}$. Karakterisasi tersebut mencakup pengamatan bentuk mikroskopis dan makroskopis, pewarnaan Gram, suhu pertumbuhan optimum, pH pertumbuhan optimum dan uji enzimatik.

Bentuk mikroskopis dan makroskopis isolat $MI_{2.3}$

Pengamatan mikroskopis dan makroskopis isolat bakteri $MI_{2.3}$ pada medium susu skim koloni berbentuk circular, pinggir koloni berbentuk tidak beraturan, berwarna putih, elevasinya datar, permukaan koloni halus mengkilat. Selnya berbentuk batang dan merupakan Gram positif, ukuran koloninya 0,6 mm, bersifat non motil dan katalase positif. Isolat $MI_{2.3}$ bersifat non motil dapat dilihat pada gambar 4.

Bakteri ini juga dilakukan pengujian konsentrasi penambahan NaCl dengan nilai OD tertinggi didapatkan pada konsentrasi

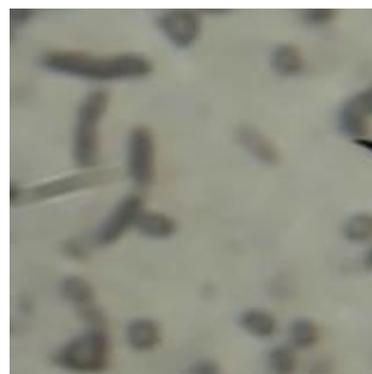
penambahan NaCl 7% sebesar 0,006U/ml. Pada konsentrasi 5% didapatkan sebesar 0,005U/ml dan pada konsentrasi 3% didapatkan sebesar 0,003U/ml. Isolat bakteri ini termasuk bakteri halofilik karena mampu hidup pada salinitas yang tinggi.



Gambar 4. Uji motilitas isolat $MI_{2.3}$ (non motil)

Pewarnaan gram terhadap isolat bakteri $MI_{2.3}$

Pewarnaan Gram dilakukan juga terhadap isolat $MI_{2.3}$ yang dapat dilihat pada Gambar 5. Isolat bakteri $MI_{2.3}$ merupakan bakteri yang mempunyai selnya berbentuk batang (bacil) dan bersifat Gram positif.

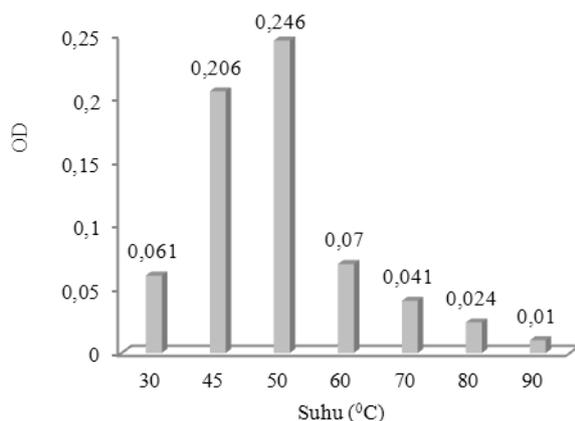


Gambar 5. Bentuk sel bakteri isolat $MI_{2.3}$

Suhu optimum pertumbuhan isolat bakteri $MI_{2.3}$

Dari uji penentuan faktor abiotik didapatkan bahwa isolat $MI_{2.3}$ mampu tumbuh optimum pada suhu 50°C. Isolat $MI_{2.3}$ mampu hidup pada kisaran suhu 30°C

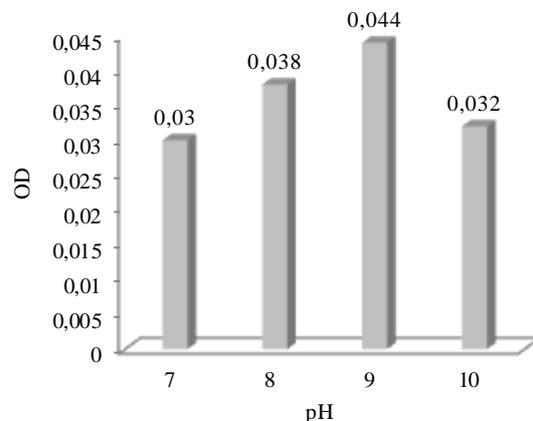
sampai 90⁰C (Gambar 6). Suhu optimum isolat ini dicapai pada suhu 50⁰C dengan aktivitas sebesar 0,246 U/ml sedangkan suhu maksimumnya pada suhu 90⁰C. Bakteri termofilik biasanya suhu optimumnya pada suhu 50⁰C. Aktivitas enzim mulai menurun dibawah suhu 50⁰C, mungkin karena sebagian besar protein telah mengalami kerusakan atau denaturasi. Pada suhu 30⁰C memiliki aktivitas sebesar 0,061 U/ml. Pada suhu 90⁰C menunjukkan bahwa enzim masih mempunyai aktivitas sebesar 0,010 U/ml. Dapat disimpulkan bahwa bakteri ini merupakan bakteri termotoleran karena masih bisa hidup pada suhu rendah dan suhu tinggi, dimana suhu tersebut tidak sama dengan suhu habitatnya. Data pertumbuhan isolat MI_{2.3} ini dapat dilihat pada grafik yang dapat dilihat pada gambar 6.



Gambar 6. Grafik suhu pertumbuhan isolat MI_{2.3}

pH pertumbuhan optimum isolat bakteri MI_{2.3}

Isolat MI_{2.3} dilakukan juga terhadap beberapa nilai pH yaitu 7,8,9,10. Isolat MI_{2.3} ini mampu tumbuh optimum pada pH 9 dengan perlakuan pada suhu 50⁰C. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 7. Pada gambar dapat dilihat bahwa isolat MI_{2.3} mampu hidup pada pH 7 sampai 10 dengan pertumbuhan optimum isolat MI_{2.3} ini pada pH 9 dengan OD sebesar 0,044 dan nilai OD terendah sebesar 0,030 pada pH 7. Hal ini sesuai dengan pertumbuhannya pada habitat aslinya yang memiliki pH tinggi.



Gambar 7. Grafik pH pertumbuhan isolat MI_{2.3}

Uji enzimatik terhadap isolat MI_{2.3}

Pengujian enzimatik dilakukan terhadap isolat bakteri MI_{2.3} dalam kemampuan penghasil enzim amilase, selulase, dan lipase. Isolat bakteri MI_{2.3} selain mempunyai kemampuan menghasilkan enzim protease juga mempunyai kemampuan menghasilkan amilase. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Uji enzimatik pada isolat MI_{2.3}

No.	Uji Enzimatik	Hasil
1.	Amilase	+
2.	Lipase	-
3.	Selulase	-
4.	Katalase	+

Ket : (+) uji positif (menghasilkan enzim) (-) uji negatif (tidak menghasilkan enzim)



Gambar 8. a. uji amilase positif pada Isolat MI_{2.3} ditandai adanya zona bening pada medium setelah ditetesi lugol b. Uji lipase negatif pada isolat bakteri MI_{2.3} c. Uji katalase positif pada isolat MI_{2.3} yang

ditandai dengan terbentuknya gelembung udara pada isolat bakteri MI_{2,3}.

Kesimpulan

Diperoleh bakteri termofilik yang menghasilkan protease sebanyak 39 isolat yang ditemukan pada sumber air panas Sungai Medang. Isolat bakteri yang memiliki indeks proteolitik tertinggi adalah MII_{2,1} yaitu 7,89 mm. Dan nilai uji aktivitas enzim protease tertinggi terdapat pada isolat MI_{2,3} yaitu sebesar 13,592 U/ml. Karakter dari isolat bakteri MI_{2,3} bersifat gram positif, sel berbentuk batang, bersifat non motil. Suhu pertumbuhan optimum 50°C dan pH optimum 9,0. Isolat MI_{2,3} ini positif pada uji amilase dan katalase namun negatif pada uji selulase dan lipase.

Ucapan Terimakasih

Terima kasih kepada Dr. Nurmiati, Dr. Nasril Nasir dan Afrizal S., M.S. atas masukan dan saran yang diberikan selama penulisan artikel ini.

Daftar Pustaka

- Akhdiya, A. 2003. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termotabil. *Balai Penelitian Bioteknologi & Sumberdaya Genetik Pertanian*. Bogor.
- Agustien, A. 2010. *Isolasi, Optimasi & Amobilisasi Brevibacillus agri A-03 dari Sumber Air Panas Sumatera Barat Penghasil Protease Alkali & Keratinase Termotabil Serta Aplikasinya*. [Disertasi]. Univ. Padjadjaran. Bandung.
- Banerjee., U. C., R. K. Sani, W. Azmi and R. Soni. 1999. Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus cereus*. *Microbiology Research* 159: 135-140.
- Brock, T. D. 1986. Introduction : *An Overview of The Thermophiles*, in : *Thermophiles : General, Molecular and Applied Microbiology* Ed. T. D. Brock, John Whilley and Sons. New York.
- Desriningsih. 2011. *Efek Suhu Inkubasi & pH Medium dalam Produksi Amilase dari Isolat Bakteri TPT 30 Termo-Alkalifilik*. [Skripsi]. Universitas Andalas. Padang.
- Lehninger, A. L. 1998. *Biochemistry*. Academic Press. New York.
- Kumar, S., and R. Nussinov. 2001. How do Thermophilic Proteins Deal with Heat? A Review. *Cell. Mol. Life Sci.* 58 : 1216- 1233.
- Moon, S. H., and S. J. Parulekar. 1993. Some Observation on Protease Producing in Continuous Suspension Cultures of *Bacillus firmus*. *Biotechnol. Bioeng.* 41(1) : 43-54.
- Pakpahan, R. 2009. *Isolasi Bakteri & Uji Aktivitas Protease Termofilik dari Sumber Air Panas Sipoholon Tapanuli Utara, Sumatera Utara*. [Tesis]. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Rajasa, H. 2003. *Technology & Business Opportunity for Industrial Enzyme in Harmony with Environment*. 3rd Conference on Industrial Enzyme & Biotechnology. BPPT. Jakarta, 6-7 Oktober 2003.
- Sugiyono., R. A. J. Lintang dan R. A. Sabe. 2008. Karakterisasi Protease Bakteri Termofil Mata Air Laut Panas Poso Sulawesi Tengah. *Penelitian Perikanan*, 11(2): 156-162.
- Suhartono, M. T. 2000. *Exploration Of Indonesian thermophiles Producing Thermostable Chitinolytic Enzymes*. Research Center for Biotechnology. Bogor Agric. University. Bogor.