

Penapisan dan Karakterisasi Bakteri Amilo-Termofilik dari Sumber Air Panas Semurup, Kerinci, Jambi

Screening and characterization of amylo-thermophylic bacteria from Semurup hot springs, Kerinci, Jambi

Wira Hastuti, Anthoni Agustien^{*)} dan Nurmiati

Laboratorium Riset Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas, Kampus UNAND Limau Manis Padang - 25163

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

Abstract

The screening and characterization of amylo-thermophylic bacteria that produced amylase from Semurup hot spring in Kerinci, Jambi was conducted from May to July 2012. The aim of this study was to find out the isolate of amylo-thermophylic bacteria and to analyze amylase activities. This study used experimental methods. This study found 31 isolates of amylo-thermophylic bacteria with the amylytic index more than 2. The isolate SII- 1.7 has the highest enzyme activity. The form of colony was circular margin, smooth shiny surface and pigmentation cream. The bacterium was gram negative, bacilli cell, positive catalase, non-motile, and has proteolytic and amylytic activities.

Keywords: amylytic, bacterium, characterization, hot spring, thermophylic

Pendahuluan

Penggunaan teknologi enzim men-duduki posisi penting dan berkembang kian pesat dalam bidang industri. Negara industri maju sudah banyak yang menggunakan enzim untuk menunjang bioteknologinya, baik untuk sarana maupun analisis (Falch, 1991). Amilase merupakan salah satu jenis enzim yang sering digunakan (Richana *et al.*, 1999). Amilase dapat dihasilkan dari bakteri maupun cendawan, namun amilase yang dihasilkan dari cendawan cenderung tidak tahan terhadap suhu tinggi (Pepler & Reed, 1987 *cit* Margaretha, 2003). Untuk mendapatkan α -amilase yang memiliki sifat termostabil dapat diperoleh dari mikroorganisme termofilik (Leveque *et al.*, 2000). Keuntungan utama dari penggunaan mikroorganisme termofilik adalah untuk memperoleh enzim α -amilase dengan protein yang tahan panas (Uhling, 1998).

Sumber air panas merupakan salah satu lingkungan tempat kehidupan bagi beberapa organisme yang tahan terhadap suhu air yang panas tersebut, seperti

bakteri, fungi, ataupun alga yang bersifat termofilik. Sebaran sumber air panas hampir merata diseluruh dunia, namun ada wilayah tertentu tempat sumber air panas itu terkonsentrasi (Madigan, Martinko and Parker, 2000).

Di kabupaten Kerinci, Jambi terdapat beberapa sumber mata air panas, salah satunya adalah sumber mata air panas Semurup yang dapat dilakukan isolasi bakteri termofilik terutama bakteri penghasil enzim amilase yang memiliki aktifitas pada suhu tinggi. Dari survei yang telah dilakukan di lokasi sumber air panas Semurup, terdapat beberapa kolam air panas dengan suhu 50°C hingga 92°C dengan pH kolam tertinggi adalah pH 8,87. Sumber air panas semurup yang memiliki pH basa, terbilang potensial untuk mendapatkan bakteri yang lebih beragam dibanding sumber air panas lainnya. Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk memperoleh isolat bakteri termofilik amilolitik dari sumber air panas Semurup dan untuk mengetahui aktifitas enzim dari isolat bakteri amilolitik termofilik dan

karakter bakteri amilolitik termofilik di sumber air panas Semurup.

Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metoda eksperimental dengan beberapa tahapan yaitu isolasi bakteri dari 5 kolam sumber air panas Semurup, Kerinci, Jambi dan selanjutnya dilakukan penapisan bakteri yang bersifat amilolitik. Kemudian dilakukan karakterisasi secara parsial terhadap isolat yang memiliki indeks amilolitik paling tinggi.

Isolasi bakteri termofilik. Sampel dipipetkan ke dalam medium NA cair selanjutnya diinkubasi pada suhu 50 °C selama 24 sampai dengan 48 jam. Koloni bakteri yang tumbuh diinokulasikan kembali dengan metode kuadran, selanjutnya diinkubasi pada suhu 50°C selama 24 sampai dengan 48 jam hingga terlihat koloni – koloni tunggal yang tumbuh (Atlas, 1997).

Penapisan bakteri amilolitik termofilik metode Kaur et al., (2003). Penapisan amilase dengan menumbuhkan isolat bakteri pada media agar dengan penambahan 1% pati. Di inkubasi dilakukan pada suhu 50 °C selama 24 jam. Selanjutnya lugol's iodine di tuang pada cawan petri, zona bening yang terbentuk disekitar koloni bakteri menunjukkan bakteri bersifat amilolitik. Zona bening serta koloni yang terbentuk kemudian diukur dengan menggunakan kaliper.

Produksi dan isolasi enzim. Penghasilan dan isolasi enzim dilakukan dengan pembuatan medium basal dengan penambahan 3g K₂HPO₄, 3g KH₂PO₄, 5g MgSO₄/ MgCl₂, pati 1%, dan aquadest dicukupkan hingga 1000 ml. 1 ose inokulum diinokulasi kedalam 25 ml medium basal, di agitasi selama 24 jam dengan kecepatan 150 rpm, pada suhu 50°C. Setelah 24 jam disentrifus dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit, supernatant yang terbentuk kemudian

diisolasi untuk kemudian diuji aktivitasnya (Agustien, 2010)

Uji aktivitas amylase. Uji aktivitas enzim amilase dilakukan terhadap 10 isolat dengan indeks amilolitik paling tinggi, ditentukan berdasarkan metode Darwis dan Sukara (1990) dengan cara membuat larutan pati 1 % yang diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit, lalu dimasukkan larutan kasar enzim sebanyak 0,1 ml dan diinkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit. Selanjutnya ditambahkan pereaksi Somogy-Nelson dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 15 menit. Selanjutnya didinginkan segera dalam es, kemudian ditambahkan pereaksi arsenomolibdat sebanyak 1 ml dan 6,9 ml air suling lalu divortex. Setelah itu ditentukan serapan cahaya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Untuk blanko caranya sama dengan perlakuan sampel, hanya pada blanko ekstrak kasar enzim dinonaktifkan dengan cara penambahan TCA, Selanjutnya absorbansi dikonversi ke dalam kurva standar glukosa (Darwis dan Sukara, 1990).

Karakterisasi bakteri amilolitik termofilik, meliputi pengamatan terhadap makroskopis dan mikroskopis isolat bakteri amilolitik termofilik yang memiliki indeks amilolitik tertinggi dengan mengamati bentuk koloni, tepian koloni, elevasi dan permukaan koloni, pewarnaan Gram, bentuk sel, motilitas sel, uji katalase, uji motilitas, proteolitik, lipolitik, selulolitik dan dilanjutkan uji substrat spesifik.

Hasil dan Pembahasan

Berdasarkan isolasi bakteri termofilik yang telah dilakukan dari sumber air panas Semurup didapatkan 44 isolat bakteri termofilik sumber air panas Semurup, dimana 19 isolat bakteri didapatkan pada lokasi SI, 10 isolat pada lokasi SII, 10 isolat pada lokasi SIII, dan 5 isolat pada lokasi SIV. Selanjutnya dilakukan penapisan yang menghasilkan 31 isolat bakteri amilolitik termofilik yang masing – masing terdiri dari 9 isolat dari lokasi SI, 9 isolat dari lokasi SII, 6 isolat dari lokasi

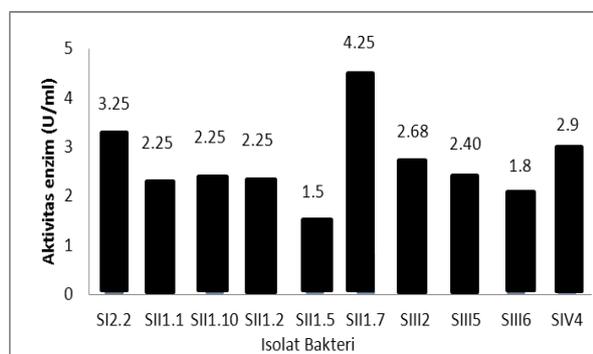
SIII dan 5 isolat dari lokasi SIV. Data perolehan indeks amilolitik dapat dilihat pada Tabel 1. Data pada Tabel 1 menunjukkan bahwa dari penapisan bakteri amilo-termofilik didapatkan 31 isolat bakteri amilolitik dengan indeks amilolitik lebih dari 2 dengan rentang indeks amilolitik berkisar antara 2.1-8.45.

Tabel 1. Rata – rata perolehan indeks amilolitik pada masing – masing kolam sumber air panas Semurup.

No.	Lokasi	Suhu	Kode Isolat	Indeks Amilolitik
1	SI	81°C	SI-1.2	3.44
2			SI-1.4	3.82
3			SI-1.8	4.74
4		70°C	SI-2.1	3.72
5			SI-2.2	8.45
6			SI-2.3	3.07
7			SI-2.4	3.15
8			SI-2.5	2.10
9			SI-K3	3.34
10			SI-K4	3.07
11			SI-K5	3.70
12	SII	92°C	SII-1.1	6.97
13			SII-1.10	5.33
14			SII-1.2	5.95
15			SII-1.3	3.89
16			SII-1.4	2.65
17			SII-1.5	5.51
18			SII-1.6	3.47
19			SII-1.7	8.42
20			SII-1.8	4.78
21			SIII	87°C
22	SIII-2	7.56		
23	SIII-3	3.13		
24	SIII-5	5.16		
25	SIII-6	5.00		
26	SIII-7	2.97		
27	SIV	65°C		
28			SIV-2	3.83
29			SIV-3	4.00
30			SIV-4	8.22
31			SIV-5	3.97

Berdasarkan suhu masing – masing kolam, didapatkan bahwa bakteri termofilik amilolitik mampu hidup pada rentang suhu 65°C sampai dengan 92°C. Dari 19 isolat bakteri termofilik pada kolam SI dengan suhu 81°C dan 70°C diperoleh 11 isolat bakteri amilolitik, pada kolam SII dengan suhu 92°C dari 10 isolat bakteri termofilik menghasilkan 9 isolat bakteri amilolitik, pada kolam SIII dengan suhu 87°C dari 10 isolat bakteri termofilik didapatkan 6 isolat amilolitik dan pada kolam SIV dengan suhu 65°C 5 isolat yang didapatkan semuanya memiliki kemampuan amilolitik.

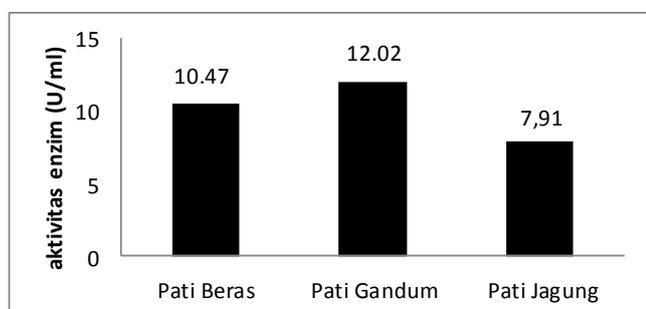
Pada Gambar 1 terlihat bahwa nilai aktivitas enzim tertinggi adalah pada isolat SII-1.7 dengan nilai aktivitas enzim 4.25 U/ml diikuti dengan isolat SI-1.2 dengan nilai aktivitas enzim 3.25 U/ml. Sementara itu nilai aktivitas enzim terendah terlihat pada isolat SII-1.5 dengan nilai aktivitas 1.50 U/ml, 3 kali lebih rendah dibanding aktivitas isolat SII-1.7. Isolat SII-1.7 merupakan isolat dengan Indeks Amilolitik kedua paling tinggi diantara 10 isolat yang diuji aktivitasnya.



Gambar 1. Histogram aktivitas enzim amilase pada 10 isolat teratas.

Hasil yang didapatkan memperlihatkan bahwa isolat dengan indeks amilolitik tertinggi tidak menjadi isolat dengan aktivitas enzim tertinggi, dimana isolat SI-2.2 berada di urutan kedua setelah SII-1.7 untuk pengujian aktivitas enzim. Hal ini disebabkan oleh perbedaan kepadatan medium yang digunakan pada perlakuan pengujian potensi amilolitik dan pengujian aktivitas enzim. Pada pengujian aktivitas enzim digunakan medium pati tanpa agar yang diikuti dengan perlakuan

agitasi 250 rpm selama 24 jam, sementara pada perlakuan uji potensi amilolitik dilakukan dengan menggunakan medium pati agar yang berupa padatan tanpa perlakuan agitasi. Hal ini sesuai dengan pernyataan Sumantha *et al.*, 2006 yang menyatakan bahwa optimasi mikroorganisme dapat dilakukan dengan melakukan rekayasa pada komposisi medium, pH medium, umur dan jumlah medium. Optimasi lingkungan juga diperlukan, seperti parameter fermentasi seperti agitasi, pH, suhu dan Aerasi untuk menjaga keseimbangan komponen medium (Kumar dan Takaghi, 1999 *cit.* Agustien, 2010).

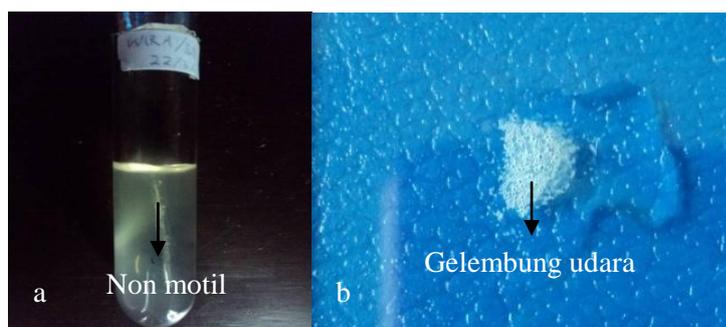


Gambar 2. Nilai Uji aktivitas enzim pada berbagai substrat bakteri SII-1.7.

Pengujian spesifitas substrat pati dilakukan dengan menggunakan 3 substrat pati berbeda yaitu pati beras, gandum dan pati jagung. Hasil yang diperoleh dari pengujian ini dapat dilihat pada perbandingan histogram pada Gambar 2. Aktivitas enzim secara berurutan dari tertinggi ke rendah terjadi pada substrat pati gandum dengan nilai aktivitas 12,02 U/ml, pati beras dengan nilai aktivitas 10,4 U/ml dan yang terendah adalah pada pati jagung sebesar 7,91 U/ml. Perbedaan aktivitas enzim ini dikarenakan oleh perbedaan komposisi pati masing – masing substrat. Umumnya pati mengandung 15 sampai dengan 30% amilosa, 70 sampai dengan 85% amilopektin dan 5 sampai dengan 10% material antara seperti protein dan lemak (Greenwood and Munro, 1979). Hidrolisis secara enzimatis berhubungan dengan kecenderungan terhadap kandungan amilosa, diduga karena amilase lebih mudah memutus ikatan hydrogen dari

amilosa. Kandungan amilosa tertinggi ditemukan pada butiran yang paling kecil permukaannya daripada yang mempunyai permukaan yang luas (Cluskey, *et al.*, 1980).

Karakterisasi dilakukan terhadap bakteri SII-1.7 sebagai isolat dengan aktivitas enzim amilase tertinggi. Isolat amilolitik SII-1.7 ini memiliki bentuk koloni yang bulat, dengan tepian (Margin) yang rata. Permukaan koloni bakteri licin dengan elevasi cembung dan pigmentasi berwarna krem, uji motilitas non motil dan uji katalase positif (Gambar 3 a dan b). Sedangkan pengamatan mikroskopis memperlihatkan bahwa bakteri dari isolat SII-1.7 memiliki bentuk sel batang dengan Gram negatif, sehingga tidak perlu dilakukan pengamatan terhadap endospora (Gambar 4 dan Tabel 2).



Gambar 3. Uji motilitas (a) dan katalase (b) bakteri SII-1.7



Gambar 4. Bentuk mikroskopis sel bakteri SII-1.7 setelah dilakukan pewarnaan Gram.

Uji hidrolisis menunjukkan bahwa isolat bakteri SII-1.7 positif memiliki kemampuan proteolitik yang terlihat dari terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri uji hidrolisis kasein. Sedangkan pengujian dengan medium hidrolisis lipid

dan medium hidrolisis CMC tidak memperlihatkan zona bening. Hal ini menunjukkan bahwa isolat bakteri SII-1.7 dapat berperan dalam mendegradasi pati dan kasein, namun tidak dapat berperan dalam mendegradasi lipid dan selulosa (Gambar 5 dan Tabel 3).

Tabel 2. Pengamatan karakterisasi makroskopis dan mikroskopis bakteri SII-1.7

No.	Karakteristik		
1.	Morfologi	bentuk koloni	Bulat
		tepi koloni	Rata
		elevasi koloni	Cembung
		permukaan koloni	Licin
		pigmentasi koloni	Krim
2.	Mikroskopis	Gram	(-)
		Bentuk Sel	Basil
		Motilitas	non motil
		Katalase	(+)
		Endospora	(-)
3.	Uji Hidrolisis	Pati	(+)
		Lipid	(-)
		Selulosa	(-)
		Uji Katalase	(+)

Tabel 3. Hasil uji hidrolisis pada isolat SII-1.7 dari sumber air panas semurup.

No	Uji hidrolisis	Hasil
1.	Proteolitik	+
2.	Lipolitik	-
3.	Selulolitik	-

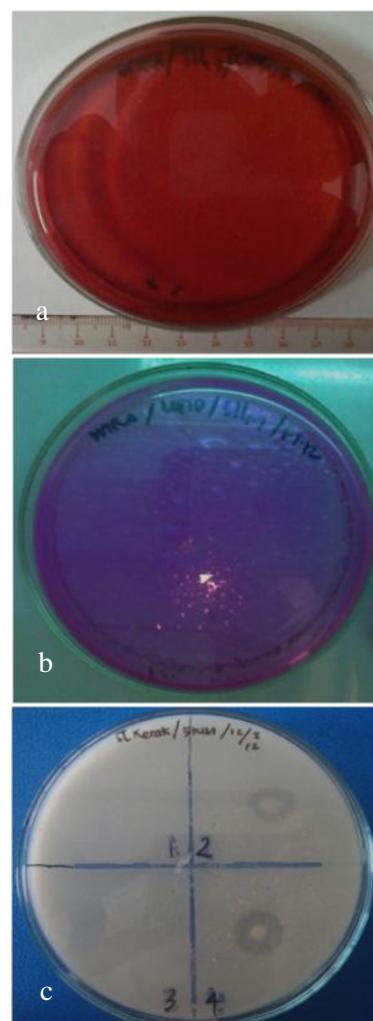
Ket : (+) = uji positif (menghasilkan enzim), (-) = uji negatif (Tidak menghasilkan enzim)

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Diperoleh 31 isolat amilo-termofilik dengan Indeks Amilolitik (IA) tertinggi pada isolat SI-2.2 dengan IA 8,46.

2. Diperoleh isolat SII 1-7 dengan nilai aktivitas tertinggi yaitu sebesar 4,25 U/ml yang memiliki kemampuan proteolitik disamping kemampuan amilolitik.



Gambar 4. Uji enzimatik pada masing – masing medium spesifik. Uji selulolitik negatif pada isolat SII-1.7 dimana tidak terbentuk zona bening setelah pemberian congo red (a), Uji lipolitik negatif pada isolat SII-1.7 tidak terbentuk butiran hijau dibawah lampu UV (b), Uji proteolitik pada isolat SII-1.7 positif dengan adanya zona bening disekeliling koloni bakteri pada medium kasein (c).

Ucapan Terimakasih

Terima kasih diucapkan kepada Dr. Nasril Nasir, Dr. Fuji Astuti Febria dan Dr. Dewi Imelda Roesma atas masukan dan saran yang diberikan dalam penulisan artikel ini. Terimakasih kepada kepala Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas yang telah memberikan fasilitas untuk penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Agustien, A. 2010. *Protease Bakteri Termofilik*. UNPAD PRESS. Bandung.
- Atlas, R.M. 1997. *Handbook of Microbiological Media*, 2nd edition. CRC Press. London.
- Cappucino, J.G and N. Sherman. 1983. *Microbiology: A Laboratory Manual*. Addison Wesley Publishing Company. New York.
- Cluskey, J.E., C.A. Knutson dan G.E. Inglett, 1980, Fractionation and characterization of dent corn and amylomaize starch granules. *Journal Starch*. 32 (4): 105.
- Darwis, A.A. dan Sukara, E. 1990. Isolasi, purifikasi dan karakterisasi enzim. Departemen P & K. Dirjen Pendidikan Tinggi. PAU Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Falch, E. A. 1991. Industrial enzymes-developments in production and application. *Journal Biotechnology Advances*. 9 : 643-658.
- Greenwood, C.T. and D.N. Munro. 1979. *Carbohydrates*. Applied Science Publ. Ltd., London.
- Kaur, A. M. Kaur, L. Manohar and A. Zabeer. 2012. Isolation, characterization and identification of bacterial strain producing amylase. *Journal Microbiology Technology*. 2 (4):573-579
- Leveque, E., S. Janecek, B. Haye, and A. Belarbi. 2000. Thermofilik Archaeal Amilolitik Enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*. 26: 3 – 14
- Madigan, M.T, J.M. Martinko and J. Parker. 2000. *Brock Biology of Microorganism*. Prentice Hall. New Jersey.
- Margaretha, M. 2003. Penapisan Dan Karakterisasi Sejumlah Isolate Bakteri Termofilik Amilolitik .[Skripsi]. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Richana, N, G.M. Yusuf, P. Lestari dan D.S. Damardjati, 1999. Perilaku Kultivasi Isolat Bakteri Termofil Penghasil α – amylase. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia* . 4 (2): 35 – 39
- Sumantha,A., C. Laroche and A. Pandey. 2006. Microbiology and industrial of food grade proteases : A perspective. *Food Technology Biotechnology*, 44 (2):211-220
- Uhling, H. 1998. *Industrial Enzymes and Their Applications*. Academic press. New York.