

Penapisan dan Karakterisasi Bakteri Selulolitik Termofilik Sumber Air Panas Sungai Medang, Kerinci, Jambi

Screening and characterization of cellulolytic thermophylic bacteria from Sungai Medang hot spring, Kerinci, Jambi

Uci Mela Sari, Anthoni Agustien^{*)} dan Nurmiati

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

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

Abstract

A study on screening and characterization of cellulolytic thermophylic bacteria from Sungai Medang hot spring was conducted on May to June 2012 using purposive sampling methods. This study aimed to find a cellulolytic thermophylic bacterium and to analyze its cellulolytic activities. Twenty eight cellulolytic thermophylic bacteria were isolated from Sungai Medang hot springs. The highest enzymatic activity (amylolytic and proteolytic activity) was shown by isolate MII_{2.1} from a location at which the temperature was 78°C. This isolate was characterized as an aerobic bacterium, gram negative and non motile. The form of colony was a circular margin, smooth shiny surface and elevation flat.

Keywords: amylolytic, bacterium, cellulolytic, proteolytic, thermophylic

Pendahuluan

Mikroba mampu hidup dan ditemukan pada kondisi yang ekstrim seperti suhu, salinitas, pH yang relatif tinggi atau rendah dan lingkungan yang berkadar garam tinggi dimana organisme lain tidak dapat hidup. Mikroba yang dapat hidup dan tumbuh pada lingkungan panas dikenal sebagai mikroba termofilik (Madigan, Martinko, and Parker, 2000). Pada lingkungan yang ekstrim tersebut, bakteri termofilik dapat menghasilkan enzim dengan sifat tahan terhadap suhu tinggi yang dikenal sebagai enzim termostabil. Enzim termostabil ini sedang mendapat perhatian besar, karena enzim-enzim ini sangat cocok untuk proses industri yang memerlukan suhu tinggi. 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, minuman, farmasi, kesehatan, tekstil serta bidang penelitian mulai banyak tergantung dengan kebutuhan

terhadap enzim-enzim termostabil (Mulyani dan Agustina, 2004). Salah satu enzim yang banyak digunakan dalam bidang industri adalah enzim selulase. Karena peranannya sebagai biokatalisator dalam bidang industri, maka perkembangan penggunaan enzim sangat pesat. Hal ini terbukti dari laju penjualan enzim yang terus meningkat (Endah *et al.*, 2011).

Organisme dalam kelompok termofil ini mampu hidup di alam pada tempat-tempat seperti sumber air panas atau tumpukan sampah-sampah yang membusuk yang telah menghasilkan panas yang cukup tinggi sebagai akibat metabolismenya (Volk dan Wheeler, 1988). Indonesia kaya akan sumber air panas sebagai media untuk pertumbuhan bakteri termofilik yang dikenal mampu menghasilkan enzim yang bernilai ekonomis (Sundoro, 2006 *cit.* Dewi, 2008).

Salah satu sumber air panas di daerah Jambi adalah sumber air panas Sungai Medang Kerinci. Berdasarkan hasil survei yang telah dilakukan, sumber air panas ini memiliki suhu 50-78°C dengan

pH berkisar 8,45-8,71. Lokasi sumber air panas Sungai Medang yang bersifat basa kaya akan mineral sehingga memungkinkan peluang untuk mendapatkan bakteri yang lebih beragam dibandingkan sumber air panas lainnya sehingga perlu dilakukan penapisan dan karakterisasi bakteri termofilik terutama bakteri penghasil enzim selulase yang memiliki aktivitas selulolitik dan tahan pada suhu tinggi.

Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif dengan beberapa tahapan yaitu isolasi bakteri dari 5 kolam sumber air panas Sungai Medang, Kerinci, Jambi. Selanjutnya dilakukan penapisan bakteri yang bersifat selulolitik dan karakterisasi secara parsial terhadap isolat bakteri yang memiliki indeks selulolitik paling tinggi.

Penapisan bakteri termofilik dan selulolitik

Sampel yang terdapat di dalam botol dikocok sampai homogen, kemudian diteteskan ke dalam cawan petri yang berisi medium NA yang masih cair. Selanjutnya isolat diinkubasi pada suhu tumbuh 50°C selama 24-48 jam. Koloni-koloni yang tumbuh pada medium selanjutnya diinokulasikan kembali ke cawan petri steril yang berisi medium NA dengan metode quadran (Atlas, 1997). Penapisan dilakukan dengan metode yang telah dimodifikasi menurut Rahmanta 2003 *cit* Margaretha (2003).

Produksi enzim selulase

Produksi enzim selulase dilakukan pada medium basal dengan penambahan 3 g K₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 5 g MgSO₄/ MgCl₂, CMC 1% dan dicukupkan dengan aquadest hingga 1000 ml. Satu ose inokulum diinokulasi kedalam 25 ml medium basal, di agitasi selama 24 jam dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 50°C. Setelah 24 jam, biakan disentrifus dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit, supernatan yang terbentuk kemudian diisolasi untuk uji aktivitas selulasenya (Richana *et al.*, 1999).

Uji aktivitas selulase

Uji aktivitas enzim selulase dilakukan terhadap 10 isolat dengan indeks selulolitik teratas yang ditentukan menurut metode Darwis dan Sukara (1990).

Karakterisasi bakteri selulolitik termofilik

Pengamatan yang dilakukan meliputi pengamatan makroskopis dan mikroskopis isolat bakteri selulolitik termofilik dengan indeks selulolitik tertinggi dengan mengamati bentuk koloni, ukuran koloni, tepian koloni, warna koloni (pigment atau tidak), elevasi, permukaan koloni (licin atau kasar), pewarnaan Gram, pewarnaan spora, bentuk sel, motilitas, uji katalase, kemudian dilanjutkan dengan uji enzimatik yaitu proteolitik, amilolitik dan lipolitik.

Hasil Dan Pembahasan

Hasil dari pengisolasian yang telah dilakukan terhadap sampel sumber air panas yang diambil dari 5 kolam didapatkan 70 isolat bakteri. Pengujian selulolitik yang dilakukan menggunakan media agar spesifik *Carboxymethyl cellulose* (CMC) menghasilkan 28 isolat bakteri bernilai positif sebagai penghasil enzim selulase (Tabel 1).

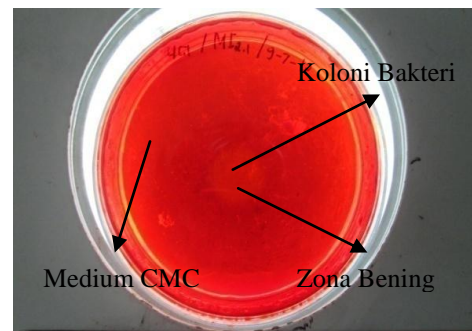
Tabel 1 menunjukkan bahwa dari hasil pengujian selulolitik didapatkan 28 isolat bakteri yaitu 3 isolat pada kolam I (suhu 60-78°C dan pH 8,45-8,53), pada kolam II (suhu 50-77°C dan pH 8,57-8,71) diperoleh 8 isolat, pada kolam III (suhu 50°C dan pH 8,57) diperoleh 8 isolat, pada kolam IV (suhu 70°C dan pH 8,54) diperoleh 7 isolat dan pada kolam V (suhu 74°C dan pH 8,55-8,59) diperoleh 2 isolat dengan rentang indeks selulolitik 0,20-5,40. Isolat MI_{2,2} memiliki indeks selulolitik tertinggi yaitu 5,40 dan isolat MIII_{1,1} memiliki IS terendah yaitu 0,20. Adanya perbedaan indeks selulolitik, hal ini mungkin disebabkan oleh jenis isolat yang berbeda yang memiliki kemampuan menghasilkan selulase yang berbeda pula dalam menghidrolisis substrat CMC. Menurut Goenadi, Saraswati dan Lestari (1993), bahwa kemampuan bakteri dalam mendegradasi selulosa berbeda-beda tergantung pada jenis strain bakteri tersebut.

Tabel 1. Rata-rata Indeks Selulolitik (IS) dari isolat bakteri termofilik sungai Medang penghasil selulase

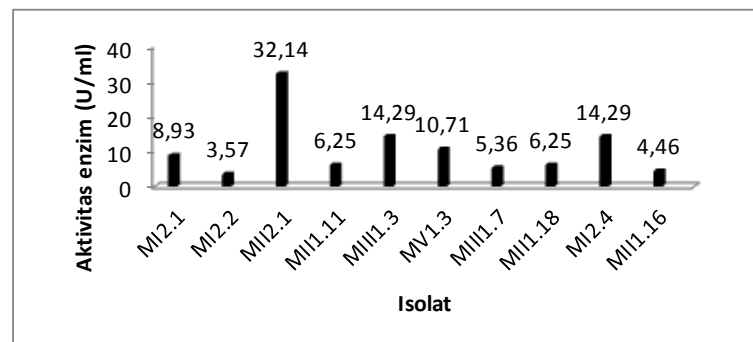
No	Lks.	t (°C)	Kode Isolat	Diameter (mm)		IS
				Koloni	Zona Bening	
1	I	78	MI _{2,1}	3.20	14.5	3.53
2			MI _{2,2}	2.50	16.0	5.40
3			MI _{2,4}	3.35	10.1	2.01
4	II	50	MII _{1,11}	2.10	7.40	2.52
5			MII _{1,13}	4.80	12.2	1.54
6			MII _{1,16}	5.90	18.4	2.12
7	II	77	MII _{1,18}	4.80	15.0	2.13
8			MII _{2,1}	3.00	10.2	2.40
9			MII _{2,2}	1.71	3.85	1.25
10	II	70	MII _{3,3}	1.00	2.02	1.02
11			MII _{3,4}	4.28	5.75	0.34
12			MIII _{1,1}	1.25	1.50	0.20
13	III	50	MIII _{1,2}	1.60	3.10	0.75
14			MIII _{1,3}	2.03	7.31	2.61
15			MIII _{1,4}	3.30	7.80	1.36
16			MIII _{1,5}	3.00	4.80	0.60
17			MIII _{1,6}	3.04	4.85	0.60
18			MIII _{1,7}	2.20	6.10	1.77
19	MIII _{1,8}	2.84	5.64	0.99		
20	IV	70	MIV _{1,1}	2.04	4.84	1.38
21			MIV _{1,2}	2.68	4.47	0.67
22			MIV _{1,5}	3.80	6.40	0.68
23			MIV _{1,6}	4.42	7.85	0.77
24			MIV _{1,7}	2.50	6.50	1.60
25			MIV _{1,8}	2.29	3.08	0.34
26	V	74	MIV _{1,9}	2.80	5.12	0.83
27			MV _{1,3}	4.40	14.5	2.30
28			MV _{1,4}	4.40	10.7	1.43

Pada Tabel 1 juga dapat dilihat adanya 9 isolat yaitu MI_{2,1}, MI_{2,2}, MI_{2,4}, MII_{1,11}, MII_{1,16}, MII_{2,1}, MII_{1,18}, MIII_{1,3} dan MV_{1,3} yang memiliki IS lebih besar atau sama dengan 2. Kesembilan isolat tersebut berindikasi potensial menghasilkan enzim selulase. Menurut Ochoa-Solano dan Olmos-Soto (2006), isolat yang menghasilkan diameter zona bening dua kali diameter koloni merupakan produser enzim yang potensial. Adanya aktivitas selulolitik bakteri secara kualitatif akan dicirikan oleh terbentuknya zona bening (*clear zone*) yang berada disekeliling koloni bakteri yang tumbuh pada media selektif CMC (Gambar 1).

Pada Gambar 2 terlihat bahwa dari pengujian aktivitas selulase didapatkan nilai aktivitas selulolitik isolat dengan kode MII_{2,1} memiliki aktivitas enzim tertinggi yaitu 32,14 U/ml, dilanjutkan dengan isolat MIII_{1,3} dan MI_{2,4} dengan nilai aktivitas yaitu 14,29 U/ml. Isolat yang memiliki aktivitas selulase yang tertinggi bukanlah terdapat pada isolat yang memiliki indeks selulolitik atau zona bening terbesar, dimana pada Gambar 2 ini dapat dilihat bahwa isolat yang memiliki indeks selulolitik tertinggi yaitu MI_{2,2} justru memiliki nilai aktivitas yang paling rendah yaitu 3,57 U/ml.



Gambar 1. Bentuk koloni bakteri MII_{2,1} yang membentuk zona bening.



Gambar 2. Histogram nilai aktivitas selulase 10 isolat yang memiliki indeks selulolitik teratas.

Adanya perbedaan nilai aktivitas selulase kuantitatif dan kualitatif, kemungkinan disebabkan karena perbedaan kondisi suhu alami pertumbuhan bakteri dengan perlakuan di laboratorium. Selain itu, perbedaan ini juga dapat disebabkan karena perbedaan kepadatan medium yang digunakan pada pengujian potensi selulolitik dengan pengujian aktivitas

enzim. Ward (1985) mengindikasikan bahwa tidak selalu terdapat korelasi yang baik antara zona bening di sekitar koloni pada medium padat dengan kemampuan organisme tersebut. Faktor penyebabnya antara lain perbedaan jenis mikroorganisme, kecepatan pertumbuhan setiap isolat pada medium padat dan cair, jumlah inokulum yang diberikan pada kedua medium dan tipe enzim yang dihasilkan.

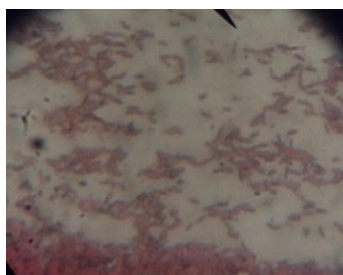
Karakterisasi dilakukan terhadap isolat MII_{2,1} sebagai isolat dengan aktivitas enzim selulase tertinggi (Tabel 3). Isolat MII_{2,1} memiliki ciri-ciri berupa koloni berbentuk bulat, permukaan koloni halus dan licin, pinggiran rata, margins berbentuk *curved*, elevasi flat atau datar, dan koloni berwarna kekuningan, uji motilitas non motil (Gambar 3) dan uji katalase positif (Gambar 4). Sedangkan secara mikroskopis setelah dilakukan pewarnaan gram memperlihatkan bahwa koloni bakteri dari isolat MII_{2,1} memiliki bentuk sel batang dengan Gram negatif yang dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 3. Uji Motilitas Isolat bakteri MII_{2,1}.



Gambar 4. Uji Katalase Isolat bakteri MII_{2,1}



Gambar 5. Bentuk sel isolat MII_{2,1}

Uji enzimatik menunjukkan bahwa isolat bakteri MII_{2,1} positif dalam menghasilkan enzim protease dan amilase serta negatif dalam menghasilkan lipase. Hal ini terbukti dengan terbentuknya zona bening pada medium susu skim setelah diinkubasi selama 24 jam dan juga terbentuknya zona bening pada permukaan isolat pada media pati setelah ditetesi dengan *lugol's iodine*. Sedangkan pada media lipid, isolat bakteri tidak berpendar ketika dilihat pada sinar UV yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut negatif dalam menghasilkan enzim lipase. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 2 dan Gambar 6.

Tabel 2. Uji enzimatik Isolat Bakteri MII_{2,1}

No	Uji Enzimatik	Hasil
1	Proteolitik	+
1	Amilolitik	+
3	Lipolitik	-

Tabel 3. Karakter dan Potensi Isolat Bakteri MII_{2,1}

No	Observasi	Karakterisasi	Hasil
1.	Makroskopis	Bentuk koloni	Bulat
		Pinggiran koloni	Rata
		Elevasi koloni	Datar
		Permukaan koloni	Halus dan licin
		Pigmentasi koloni	Kekuningan
2.	Mikroskopis	Gram	Negatif
		Bentuk sel	Basil
		Pigmentasi sel	Merah
		Endospora	Negatif
3.	Uji Enzimatik	Motilitas	Non-motil
		Proteolitik	Positif
		Amilolitik	Positif
4.	Potensi	Lipolitik	Negatif
		Katalase	Positif
		Indeks selulolitik	2,40
		Aktivitas selulase	32,14

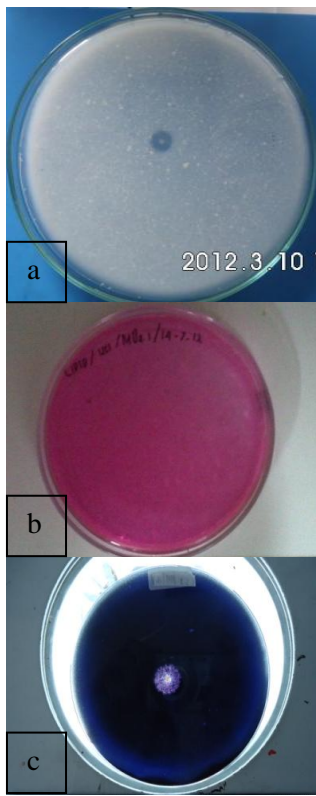
positif, isolat positif menghasilkan enzim amilase dan protease .

Ucapan Terimakasih

Terima kasih diucapkan kepada Dr. phil. nat. Periadnadi, Dr. Chairul dan Dr. Fuji Astuti Febria atas masukan dan sarannya selama penelitian dan penulisan artikel ini.

Daftar Pustaka

- Agustien, A. 2010. *Protease Bakteri Termofilik*. UNPAD PRESS. Bandung.
- Atlas, R.M. 1997. *Microbiology Fundamentals and Application*. Macmillan Publishing Company. New York.
- Darwis, A.A. dan E. Sukara. 1990. *Isolasi, Purifikasi dan Karakterisasi Enzim*. PAU Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Dewi, I.M. 2008. *Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Kitinase Termofilik Kasar dari Sumber Air Panas Tinggi Raja, Simalungun Sumatera Utara*. [Tesis]. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Endah, R., dan Z. Nafisah, 2011. Aktifitas Immobilized β -Amylase dan Free β -Amylase dari *Zoogloea ramigera* ABL 1 dalam Medium Pati Cair dengan Perlakuan Faktor Lingkungan. *Biota* 16(1): 95-106.
- Goenadi, D.H., R. Saraswati dan Y. Lestari. 1993. Kemampuan Melarutkan Fospat dari Berbagai Isolat Bakteri Asal Tanah dan Pupuk Kandang Sapi. *Menara Perkebunan* 61 (2): 44-49.
- Madigan, M.T., Martinko and J. Parker. 2000. *Biolog of Microorganisms*. 9th Ed. Prentice Hall International, inc. New Jersey.
- Margaretha, M. 2003. *Penapisan Dan Karakterisasi Sejumlah Isolat Bakteri Termofilik Amilolitik*. [Skripsi]. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Mulyani, N. S dan L.N.A. Agustina, 2004. *Isolasi dan Karakterisasi Enzim*



Gambar 6. Uji Enzimatis pada isolat MII_{2.1}
(a) Uji proteolitik isolat MII_{2.1} positif dengan adanya zona bening disekeliling koloni pada medium susu skim (b) Uji lipolitik isolat MII_{2.1} negatif dibuktikan dengan tidak terbentuk warna hijau di bawah lampu UV (c) Uji amilolitik isolat MII_{2.1} positif dengan adanya zona bening disekeliling koloni pada medium pati setelah ditetesi lugol

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat diambil kesimpulan :

1. Diperoleh 28 isolat selulolitik termofilik dengan Indeks Selulolitik (IS) tertinggi pada isolat MI_{2.2} dengan nilai IS 5,40.
2. Aktivitas selulolitik tertinggi didapatkan pada isolat MII_{2.1} dengan nilai aktivitas 32,14 U/ml. Karakter koloni bulat, permukaan koloni halus dan licin, pinggiran rata, bentuk sel batang, Gram negatif, aerob, non motil, katalase

- Proteolitik dari Isolat Bakteri Termofilik Sumber Air Panas Gonoharjo dan Plantungan, Kendal Jawa Tengah*. [Laporan Kegiatan]. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Ochoa-Solano, J.L, J. Olmos-Soto, 2006. The Functional property of Bacillus for Shrimp Feeds. *Food Microbiol.* 23 : 519-525.
- Richana, N., G.M. Yusuf, P. Lestari dan D.S. Damardjati, 1999. Prilaku Kultivasi Isolat Bakteri Termofil Penghasil α – amylase. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia.* 4 (2): 35-39.
- Volk, W. A dan M. F. Wheeler. 1988. *Mikrobiologi Dasar Jilid 1*. Erlangga. Jakarta.
- Ward, O.P. 1985. Proteinase. In: Moo Y. M. (Ed.), *Microbial and Enzyme Biotechnology*. Applied Science Publisher. New York. P : 251-290.