

Isolasi dan Identifikasi Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Selulase dari Sumber Air Panas Sila

Laury M. Ch. Huwae^{1*} dan Pingkan Aditiawati²

¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pattimura, Ambon

²Bioteknologi, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung, Bandung

*e-mail korespondensi: lauryhuwae@gmail.com

INFORMASI ARTIKEL

Diterima : 03 Mei 2020
Disetujui : 05 Juni 2020
Terbit Online : 08 Juni 2020

ABSTRACT

*Cellulose is included in the main polysaccharide group that is widely available in nature. Cellulose is a straight-chain glucose polymer that is bound by β -1,4 glucoside bonds. Cellulase is an enzyme complex consisting of several enzymes that work in stages or together in breaking down cellulose into glucose, by hydrolyzing the β -1,4 glucoside bond in cellulose. Cellulase enzymes have been used in various industries. Industrial applications require enzymes that are stable at high temperatures. Various types of thermostable enzymes can be isolated from thermophilic bacteria, cellulase enzymes are no exception. This study aims to isolate and identify thermophilic bacteria that produce cellulase enzymes from Sila hot springs. The results of isolation and screening of cellulase-producing bacteria from hot water samples obtained by 7 isolates that have the ability to degrade cellulose can produce clear zones on LB-CMC agar selective medium, but CR2 isolates showed the largest zone of 1.5 cm. CR2 isolates were Gram-positive bacteria and were identified as having close relations with *Bacillus aryabhatai* strain B8W22 using the 16S rRNA method.*

Keywords:

Cellulose
Cellulase enzyme
Thermostable enzyme
Thermophilic bacteria

Copyright © 2020 Universitas Cenderawasih

PENDAHULUAN

Selulosa termasuk dalam golongan polisakarida utama yang banyak terdapat di alam. Senyawa organik ini merupakan unit-unit glukosa glukosa rantai lurus yang dihubungkan dengan ikatan β -1,4 glukosida (Shuangqi et al., 2011). Ikatan β -1,4 glukosida pada serat selulosa dapat didegradasi menjadi glukosa melalui cara enzimatis, yakni dengan bantuan enzim selulase.

Selulase (EC 3.2.1.4) merupakan suatu kompleks enzim yang terdiri atas beberapa enzim yang berkerja bertahap atau bersama-sama dalam menguraikan selulosa menjadi glukosa, dengan menghidrolisis ikatan β -1,4 glukosida pada selulosa (Nenci, 2012). Enzim selulase terdiri dari tiga kelompok, yaitu endo-1,4- β -D-glukanase, ekso-1,4- β -D-glukanase, dan β -D-glukosidase. Ketiga enzim tersebut bekerjasama menghidrolisis selulosa yang tidak dapat larut menjadi glukosa.

Enzim selulase telah digunakan dalam berbagai industri. Selulase dimanfaatkan dalam proses memperhalus bubuk kertas pada industri kertas, menjaga warna kain agar tetap cemerlang pada industri tekstil, meningkatkan kualitas pada industri pangan, sebagai dekomposer bahan-bahan organik, meningkatkan nutrisi pakan ternak. Selain itu, enzim selulase juga berperan penting dalam biokonversi selulosa menjadi berbagai komoditas senyawa kimia dan dapat mengurangi dampak

negatif dari polusi limbah terhadap lingkungan (Hartanti, 2010).

Aplikasi dalam bidang industri membutuhkan enzim yang stabil pada suhu tinggi. Pada industri, reaksi dengan suhu tinggi sangat diminati karena dapat meminimalkan resiko kontaminasi, meningkatkan laju transfer massa, dan dapat menggeser kesetimbangan ke arah pembentukan produk. Oleh karena itu, aplikasi enzim didalam industri bioteknologi semakin menuntut enzim yang bersifat tahan terhadap lingkungan ekstrim. Karena faktor utama yang dapat merusak enzim adalah suhu, maka diperlukan suatu enzim yang bersifat termostabil (Nanda et al., 2017). Sumber air panas merupakan salah satu habitat mikroorganisme termofilik yang dapat menghasilkan enzim termostabil. Berbagai jenis enzim termostabil dapat diisolasi dari bakteri termofilik, salah satunya yaitu enzim selulase. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri termofilik penghasil enzim selulase dari sumber air panas Sila.

BAHAN DAN METODE

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain cawan petri, erlenmeyer, spatula, jarum ose, pinset, bunsen, semprotan alkohol, lampu spiritus, korek api, *falcon tube*, pembolong media, kaliper, termometer, pH-meter, *hot plate* dan

magnetic stirrer, neraca analitik, mikropipet, *autoclave*, oven, inkubator, mikroskop, dan *laminary air flow*.

Adapun bahan-bahan yang digunakan yakni sampel air panas, aquades, alkohol 70%, kapas, *tissue*, *cling wrap*, tusuk gigi steril, aluminium foil, kertas label, tryptone, yeast extract, agar, CMC (*Carboxymethyl cellulose*), NaCl, reagen Congo Red, crystal violet, iodine, dan safranin.

Prosedur Kerja

Sampel yang digunakan berasal dari sumber air panas Sila di Desa Oma, Kepulauan Haruku, Kabupaten Maluku Tengah. Sebelum dilakukan pengambilan sampel, terlebih dahulu dilakukan pengukuran suhu dan pH air. Sebanyak 50 μL sampel air panas disebarkan di atas media *plate* agar yang mengandung 0,5 g *yeast extract*, 1 g *tryptone*, 0,5 g NaCl, 1 g CMC (*Carboxymethyl cellulose*), 1,5 g bacto agar kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Media agar yang ditumbuhi bakteri kemudian diwarnai dengan larutan Congo Red 0,1% selama 15 menit, selanjutnya larutan pewarna dibuang. Media dibilas dengan larutan NaCl 1 M selama 15 menit. Koloni yang positif memiliki aktivitas selulase akan menghasilkan zona bening (*clear zone*) pada media agar. Koloni-koloni positif kemudian dipindahkan pada media agar baru untuk proses isolasi hingga mendapatkan isolat murni. Setelah itu, dilakukan karakterisasi kultur isolat terpilih. Pengamatan morfologi sel dan pewarnaan Gram menggunakan kristal violet dan safranin serta uji kepastian dengan KOH 3%. Identifikasi secara molekuler menggunakan metode 16S rRNA. Hasil sekuensing yang diperoleh kemudian dilakukan analisis bioinformatik serta konstruksi pohon filogenetik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Air panas Sila memiliki suhu 66 °C dengan kisaran pH 6,87. Menurut penduduk setempat, suhu yang relatif tinggi ini dapat merebus telur hingga setengah matang dalam jangka waktu perendaman 20 menit. Sumber air panas Sila masih berada di sekitar daerah pesisir dengan jarak ± 1 km dari tepi pantai, hal ini ditunjukkan dengan vegetasi pantai yang mendominasi daerah ini. Pohon waru (*Hibiscus tiliaceus*), bakau, kelapa merupakan vegetasi pantai yang ditemukan mendominasi lokasi ini. Selain itu, ditemukan pula pohon sagu dan lumut yang tumbuh di sekitar sumber air panas (Gambar 1).

Sumber air panas Sila dikelilingi dengan pepohonan. Banyak dedaunan busuk, bunga, serbuk sari, biji yang gugur, dan bangkai serangga yang ditemukan pada permukaan sumber air panas tersebut. Selulosa merupakan komponen utama penyusun dinding sel tumbuhan dan termasuk

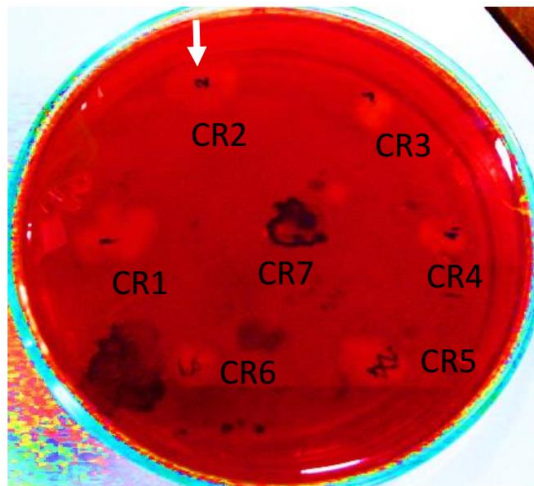


Gambar 1. Sumber air panas Sila

polimer yang ditemukan paling banyak di alam. Keberadaan selulosa pada sumber air panas menyebabkan mikroorganisme termofilik dapat memanfaatkan limbah tersebut sebagai sumber karbon untuk pertumbuhannya. Faktor ini memberikan peluang yang besar bagi mikroorganisme termofilik menghasilkan enzim hidrolitik ekstraseluler seperti selulase dalam sumber air panas tersebut.

Berdasarkan tahapan isolasi yang dilakukan terhadap sampel sumber air panas Sila, diperoleh 7 koloni bakteri yang tumbuh pada media LB-CMC agar. Hasil pengujian aktivitas selulolitik terhadap koloni-koloni bakteri tersebut menunjukkan 1 koloni dengan diameter zona bening terbesar yakni 1,5 cm (Gambar 2). Terbentuknya zona bening mengindikasikan terputusnya ikatan β -1,4-glikosidik yang menghubungkan monomer D-glukosa pada CMC. Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa isolat sumber air panas Sila memiliki potensi menghasilkan selulase untuk menghidrolisis ikatan β -1,4-glikosidik pada CMC. Proses hidrolisis selulosa oleh bakteri dilakukan dengan bantuan enzim ekstraseluler endo- β -1,4-glukanase, ekso- β -1,4-glukanase dan β -glukosidase. Enzim endo- β -1,4-glukanase bekerja aktif memecah secara acak selulosa dengan sifat kekristalan rendah dan menghasilkan molekul selulosa sederhana. Enzim ekso- β -1,4-glukanase aktif pada bentuk kristal selulosa dan memecah bagian selulosa yang tidak tereduksi menjadi unit selobiosa. Kemudian enzim β -1,4-glukosidase berperan memecah selobiosa menjadi glukosa (Mussatto dan Teixeira, 2010).

Media CMC yang terhidrolisis oleh enzim selulase jika digenangi oleh pewarna *congo red* tidak akan terwarnai. Interaksi ini berlangsung secara non-kovalen. *Congo red* dijadikan indikator degradasi β -D-glukan dalam media agar (Hartanti, 2010). *Congo red* berinteraksi kuat dengan ikatan β -1,4-glikosidik dalam CMC. Metode ini dipilih karena proses seleksi dapat berlangsung cepat, mudah, dan sensitif.

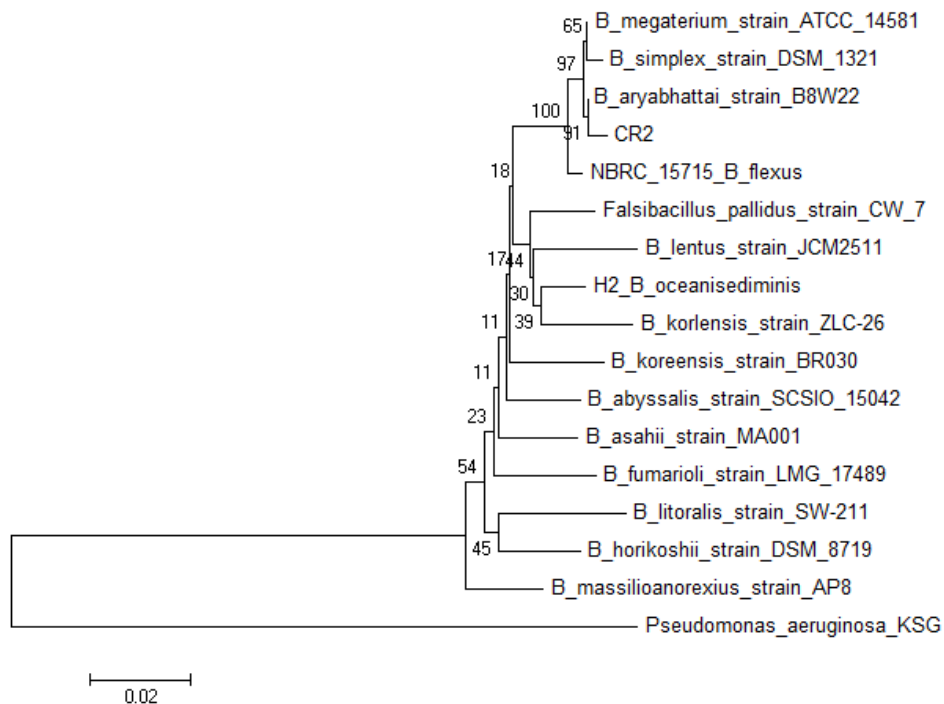


Gambar 2. Skrining kemampuan selulolitik terhadap ketujuh koloni (CR1-CR7) pada media CMC menggunakan congo red 0,1% dan NaCl 1M. Tanda panah: zona bening yang dihasilkan

Hasil pengamatan morfologi terhadap isolat CR2 menunjukkan bentuk koloni sirkular, tepian koloni mulus, cembung, tidak lengket dan berwarna krem. Isolat CR2 termasuk Gram positif dengan bentuk sel oval. Hal ini dipastikan melalui pewarnaan Gram dan uji KOH 3%. Hasil negatif pengujian KOH 3% mengindikasikan suatu isolat bakteri tergolong bakteri Gram positif, ditandai dengan tidak terbentuknya lendir saat isolat

bakteri direaksikan dengan KOH 3% (Standards Unit, 2019). Hasil yang sama ditunjukkan oleh isolat CR2, dimana tidak terbentuk lendir ketika apusan bakteri direaksikan dengan KOH 3%. Tidak terbentuknya lendir pada bakteri gram positif karena dinding sel bakteri Gram positif lebih resisten terhadap KOH sehingga dinding sel tidak pecah. Kuatnya dinding sel ini yang membuat DNA tetap berada di dalam sel. Dinding sel bakteri Gram positif lebih sederhana, dengan jumlah peptidoglikan yang relatif banyak.

Hasil identifikasi terhadap gen 16S rRNA isolat CR2 menggunakan primer 785F dan 907R menunjukkan kesamaan dengan *Bacillus aryabhatai* strain B8W22 sebesar 100%. Konfirmasi kedua dilakukan dengan *multiple sequence alignment* dari sekuen 16S semua spesies *Bacillus* yang ditemukan di NCBI menggunakan program ClustalX 2.1. Konfirmasi ketiga dilakukan dengan konstruksi pohon filogenetik menggunakan program Mega 6 dengan metode *Neighbor Joining* dan nilai bootstrap 1000 terhadap hasil *multiple sequence alignment*. Hasil konstruksi pohon filogenetik menunjukkan isolat CR2 berada pada cabang yang sama dengan *Bacillus aryabhatai* strain B8W22 dengan bootstrap 91% (Gambar 3). Genus *Bacillus* umumnya memproduksi berbagai enzim ekstraseluler termasuk selulase (Alnahdi, 2012).



Gambar 3. Pohon filogenetik berdasarkan analisis gen 16S rRNA dari isolat bakteri CR2 menggunakan metode *Neighbor Joining* dengan nilai *bootstrap* 1000

KESIMPULAN

Telah berhasil diisolasi bakteri penghasil selulase dari sampel air panas, diperoleh 7 isolat namun 1 isolat, yakni CR2 memiliki aktivitas selulolitik yang lebih besar sebesar 1,5 cm dan hubungan kekerabatan yang dekat dengan *Bacillus aryabhatai* strain B8W22.

DAFTAR PUSTAKA

- Alnahdi, H.S. 2012. Isolation and screening of extracellular proteases produced by new isolated *Bacillus* sp. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(9), 071–074.
- Hartanti. 2010. Termofilik dari Kawah Air Panas. Skripsi. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Mussatto, S.I., and Teixeira, J.A. 2010. Lignocellulose as Raw Material in Fermentation Processes. *In: Villas, A.M. (ed.), Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Formatex Research Center, pp. 897–907.
- Nanda, P.T., Siregar, S.A., Kurniawan, R., Hairudin, Meriyanti, dan Yatno. 2017. Isolasi, Karakterisasi dan Uji Potensi Bakteri Penghasil Enzim Termotabil Air Panas Kerinci. *Chempublish Journal*, 2(1), 26–31.
- Nenci. 2012. Isolasi dan Karakterisasi Selulase dari *Trichoderma viride* Strain T051 dengan Substrat Jerami. Skripsi. Universitas Indonesia, Depok.
- Shuangqi, T., Zhenyu W., Ziluan F., Lili Z., and Jichang, W. 2011. Determination methods of cellulase activity. *African Journal of Biotechnology*, 10(37), 7122–7125.
- Standards Unit. 2019. UK Standards for Microbiology Investigations. *Bacteriology-Test Procedures*, TP 30, Issue no. 4, 1–13.