

ABSTRAK

Isolasi Bakteri Amilolitik Termofilik Dari Sumber Air Panas Pacet Mojokerto Dan Pengujian Aktivitas Enzim Amilase

Mega Puspita Sari (10620056)

Jurusan Biologi Fakultas Sains Dan Teknologi UIN Maliki Malang

asjaru@yahoo.co.id

Bakteri termofilik merupakan jenis bakteri yang mampu hidup pada suhu yang tinggi karena memiliki membran sel yang stabil, dan protein yang tahan terhadap denaturasi. Bakteri termofilik dapat menghasilkan enzim dengan sifat tahan terhadap suhu tinggi yang disebut enzim termostabil. Salah satu jenis enzim ini yaitu enzim amilase yang banyak dimanfaatkan oleh manusia dalam bidang industri. Enzim ini memiliki waktu simpan yang lebih lama dan aktivitas yang lebih tinggi pada suhu tinggi. Enzim amilase dapat diperoleh dari beberapa organism, salah satunya dari bakteri. Tujuan penelitian ini untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri amilolitik termofilik serta mengetahui aktivitas enzim amilasena dari sumber air Panas Pacet Mojokerto. Penelitian ini terdiri dari tiga tahap, tahap pertama uji kualitatif dengan mengisolasi bakteri amilolitik dan menetes dengan iodine pada isolat yang ditumbuhkan pada media yang mengandung pati, tahap kedua mengidentifikasi isolat terpilih dengan uji mikrobact 12 A/E, dan tahap terakhir uji kuantitatif dengan mengukur aktivitas enzim yang didapatkan dari analisa kadar glukosa menggunakan metode 3,5-dinitrosalisilat (DNS). Kemampuan isolat bakteri dalam menghidrolisis pati ditunjukkan dengan adanya zona bening disekitar koloni setelah ditetesi dengan iodin. Tiga isolat terpilih dengan hasil zona bening terbesar yaitu isolat A5 dengan diameter zona bening 15 mm, isolat A1 sebesar 13 mm dan isolat A3 sebesar 10 mm. Hasil identifikasi dengan mikrobact 12A/E menunjukkan bahwa isolat A1 dan A5 merupakan jenis spesies *Enterobacter agglomerans* dan isolat A3 merupakan jenis spesies *Escherichia coli*. Hasil uji aktivitas enzim amilase pada isolat yang memiliki nilai tertinggi aktivitasnya pada isolat A5 sebesar 1,664 U/mL, kemudian isolat A3 sebesar 0,855 U/mL dan paling kecil isolat A1 sebesar 0,419 U/mL.

Kata Kunci : bakteri termofilik, enzim amilase, zona bening, aktivitas enzim

PENDAHULUAN

Enzim adalah suatu kelompok protein yang menjalankan dan mengatur perubahan-perubahan kimia dalam sistem biologi (Sumardjo, 2006). Kegunaan utama enzim bagi organisme adalah sebagai katalis hayati yang mempunyai kemampuan untuk mempercepat berlangsungnya reaksi kimiawi tanpa enzim itu sendiri terkonsumsi atau berubah setelah reaksi selesai (Pelczar, 2010).

Enzim memegang peran penting dalam kehidupan manusia salah satunya adalah enzim amilase. Enzim amilase banyak dimanfaatkan dalam bidang industri tekstil, industri makanan, deterjen dan industri kertas (Palmer, 1985). Bidang industri yang memanfaatkan enzim umumnya beroperasi pada suhu tinggi misalnya pada industri tekstil, enzim α -amilase digunakan untuk membantu dalam proses penghilangan pati yang digunakan sebagai perekat untuk melindungi benang saat di tenun agar lentur. Proses ini memerlukan suhu tinggi sekitar 70°C - 80°C , sehingga digunakan enzim yang bersifat termostabil yang tahan terhadap suhu tinggi karena suhu yang tinggi dapat meningkatkan laju reaksi kimia termasuk reaksi enzimatik serta dapat mengurangi kontaminasi (Setiasih, 2006).

Bakteri termofilik yang dapat menghasilkan enzim termostabil dapat di isolasi dari berbagai tempat seperti sumber-sumber geotermal, pemandian mata air panas di darat maupun mata

air panas dilaut dalam dan juga dari proses pembuatan kompos (Brock, 1978). Indonesia Indonesia sebagai negara tropis mempunyai banyak daerah dengan aktivitas geotermal, seperti daerah pegunungan berapi dan sumber air panas. Salah satunya yaitu pada sumber air panas Pacet Mojokerto yang belum pernah dilakukan penelitian tentang bakteri termofilik penghasil enzim amilase, sehingga perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui keragaman mikroorganisme yang dapat menghasilkan enzim amilolitik termofilik serta uji aktivitas enzim amilasena.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif kualitatif. Data yang diperoleh disajikan secara deskriptif meliputi karakteristik makroskopis, mikroskopis dan identifikasi secara biokimia, identifikasi spesies dengan mikrobact dan aktivitas enzim amilase dari jenis bakteri amilolitik terpilih yang berhasil diisolasi dari sumber air panas Pacet Mojokerto.

Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan adalah Mikroskop, hot plate stirrer, mikropipet, inkubator, cawan petri, Erlenmeyer, tabung reaksi, timbangan analitik, gelas ukur, *beaker glass*, *autoklaf*, *laminar air flow*, blue tip, gunting, bunsen, ose, lemari es, termos, dan termometer.

Bahan Penelitian

Sampel air yang digunakan untuk isolasi bakteri amilolitik adalah

air dari sumber air panas Pacet Mojokerto yang bersuhu 45°C-50°C. Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media selektif amilolitik (pati 10 g, yeast ekstrak 2 g, bacto pepton 5 g, MgSO₄·7H₂O 0,5 g, NaCl 0,5 g, CaCl₂·2H₂O 0,15 g, agar 20 g dalam 1000 ml aquades), iodin, reagen pewarnaan gram, reagen 3,5-dinitrosalisilat (DNS), K-Na-Tartrat 40%, aquades, spirtus, alumunium foil, kertas label, plastik tahan panas dan tissue secukupnya.

Isolasi Bakteri Amilolitik Termofilik

Sampel air panas sebanyak 10 ml dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi 90 ml media selektif amilolitik cair (pengenceran 10⁻¹) kemudian di inkubasi dalam inkubator pada suhu 50°C selama 24 jam, selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat sampai 10⁻¹⁰ dengan mengambil 1 ml dari pengenceran sebelumnya lalu diencerkan dengan 9 ml aquadest steril. Pengenceran 10⁻¹ sampai 10⁻¹⁰ diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam cawan petri untuk ditanam secara *pour plate* menggunakan media selektif, kemudian diinkubasi pada suhu 50°C selama 24 jam.

Pengamatan Makroskopik

Karakteristik koloni bakteri hasil isolasi pada media selektif amilolitik yaitu berdasarkan (Dwijoseputro, 2005) : bentuk koloni, permukaan, tepi koloni dan warna koloni.

Uji Bakteri Amilolitik Secara Kualitatif

Semua isolat murni yang diperoleh diuji kemampuannya untuk menghasilkan enzim amilase. Untuk

memastikannya dilakukan uji iodine dengan cara meneteskan iodine diatas permukaan agar yang berisi isolate, bila terdapat zona bening pada media mengindikasikan enzim amilase diproduksi oleh isolat. Kemudian zona bening di ukur menggunakan penggaris (Cappucino,1983).

Uji bakteri amilolitik secara kualitatif adalah perbandingan antara diameter zona bening dengan diameter koloni (Sudiana dkk, 2002).

$$\text{Zona Bening} = \text{Diameter Total} \\ - \text{Diameter Koloni}$$

Pengamatan Mikroskopik Dengan Pewarnaan Gram

Bakteri amilolitik diambil sedikit dengan jarum ose secara aseptis dan disuspensikan dengan aquades yang ada di atas gelas objek. Preparat difiksasi diatas api bunsen sampai kering. Preparat ditetesi dengan larutan kristal ungu, didiamkan selama 1 menit dan dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan larutan iodin dan didiamkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan larutan alkohol 96% sampai warna ungu hilang. Preparat ditetesi dengan larutan safranin dan didiamkan selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan minyak imersi, preparat diamati dengan mikroskop, uji gram positif jika berwarna ungu dan negatif jika berwarna merah (Hadioetomo, 1985).

Identifikasi dengan Menggunakan Mikrobact

Pengidentifikasian isolat bakteri hingga tingkat spesies dibantu

dengan *microbact*. Prinsip kerja dari *Microbact* yaitu dengan mereaksikan suspensi isolat ke dalam sumur-sumur yang telah berisi sumber karbon dan senyawa-senyawa biokimia lain yang berjumlah 12 jenis (Oxoid, 2004).

Ekstrak Enzim Dari Kultur Cair Bakteri

Sebanyak 2 ose biakan isolat terpilih yang berumur 24 jam dimasukkan ke dalam 50 mL media selektif cair steril untuk perangsang pembentukan amilase. Media yang mengandung kultur bakteri diinkubasi pada suhu 50 °C selama 72 jam pada *shakerinkubator* dengan kecepatan 150rpm (Ajayi, 2007). Setelah diinkubasi selama 72 jam, kultur bakteri di sentrifuge dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C, supernatan yang diperoleh adalah ekstrak kasar enzim (Asadullah, 2014).

Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Disiapkan 6 tabung, masing-masing diisi dengan larutan glukosa dengan konsentrasi 0, 200, 400, 600, 800 dan 1000 ppm. Setelah itu diambil 1 mL dari masing-masing konsentrasi dan dimasukkan kedalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan ke dalam tabung reaksi 1 mL reagen DNS dan dihomogenkan. Ditutup mulut tabung dengan alumunium foil dan dipanaskan dalam air mendidih selama 5-15 menit sampai larutan berwarna merah-coklat. Kemudian ditambahkan 1 mL larutan K-Na-Tartrat 40 %. Tabung reaksi didinginkan dan ditambahkan dengan aquades hingga volumenya menjadi 10 mL dan dihomogenkan. Selanjutnya diukur absorbansinya dengan

spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

Uji Aktivitas Enzim Amilase

Sebanyak 0,5 ml ekstrak kasar enzim hasil sentrifugasi dicampur dengan 0,5 ml substrat (pati terlarut 1 % dalam buffer fosfat 0,2 M pH 7) lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 50° C. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 mL asam 3,5 dinitrosalisilat (DNS) kemudian dikocok kuat-kuat dan ditutup mulut tabung dengan alumunium foil dan dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit (Shaw *et al.*, 1955). Kemudian ditambahkan 1 mL larutan K-Na-Tartrat 40 %. Tabung reaksi didinginkan dan ditambahkan dengan aquades hingga volumenya menjadi 10 mL dan dihomogenkan. Selanjutnya diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

Aktivitas amilase ditentukan dengan mengkonversi nilai absorbansi yang diperoleh dari konsentrasi glukosa standart, kemudian dihitung dengan menggunakan rumus (Kombong, 2004):

$$AE = \frac{C}{BM \text{ glukosa} \times t} \times \frac{H}{E}$$

Dimana:

AE =Aktifitas enzim(Unit/mL)

C = Konsentrasi glukosa

BM = Berat Molekul Glukosa = 180 g/mol

T = Waktu Inkubasi (menit)

H = Volume total enzim-substrat (mL)

E = Volume enzim (mL)

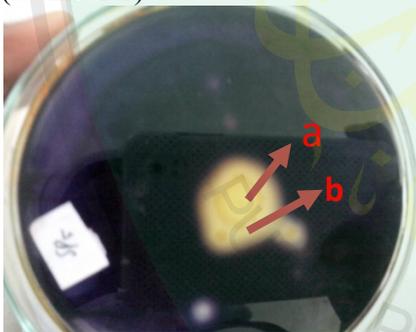
HASIL DAN PEMBAHASAN

ISOLASI BAKTERI

Hasil isolasi yang telah dilakukan pada air panas Pacet Mojokerto didapatkan 6 isolat bakteri yang mampu hidup pada media selektif amilolitik agar dan memiliki karakteristik yang berbeda-beda.

Uji Kualitatif Bakteri Amilolitik

Isolasi bakteri termofilik pada media selektif amilolitik menunjukkan terdapatnya tiga isolat yang dapat memperlihatkan zona bening ketika diuji kualitatif dengan ditetesi larutan iodine, isolat yang memiliki aktifitas amilolitik tersebut yaitu isolat A1, A3 dan A5. Zona bening yang terbentuk masing- masing isolat berbeda-beda (Gambar 1)



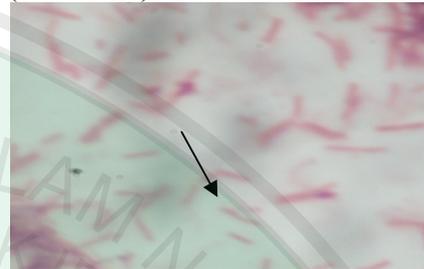
Gambar 1. Zona bening isolat A5 Ket : a. koloni, b. zona bening

Tabel 1. Hasil Pengukuran Diameter Zona Bening Pada Berbagai Isolat

Kode isolat	Diameter zona bening (mm)
A1	13
A2	-
A3	10
A4	-
A5	15
A6	-

Pewarnaan Gram

Pengujian gram menunjukkan gram negative pada semua isolat bakteri amilolitik hasil isolasi dari sumber air panas Pacet Mojokerto (Gambar 2)



Gambar 2. Pewarnaan gram isolat bakteri

Identifikasi Isolat Bakteri Amilolitik dengan Mikrobact 12A/E

Berdasarkan hasil pengamatan morfologi ketiga isolat memiliki ciri dan lebar zona bening yang berbeda-beda, sehingga dilakukan identifikasi sampai tingkat spesies untuk mengetahui keragaman bakteri amilolitik. Identifikasi bakteri gram negatif dilakukan dengan menggunakan *Mikrobact 12 A/E*.

Berdasarkan hasil uji maka dapat diketahui bahwa isolat A1 dan A5 ternyata isolat tersebut teridentifikasi sebagai bakteri jenis *Enterobacter agglomerans* dan isolat A3 teridentifikasi sebagai bakteri jenis *Escherichia coli*.

Identifikasi bakteri *Enterobacter agglomerans*

E. agglomerans merupakan golongan bakteri gram negatif berbentuk batang yang memiliki panjang 1,2- 3 μm dan lebar 0,6-1,0 μm , bakteri ini bersifat anaerob fakultatif (Holt, 1994).

Berdasarkan hasil uji biokimia bakteri *E. agglomerans* positif pada uji

katalase, tidak memiliki spora dan negatif pada uji oksidase. Pada uji fermentasi karbohidrat menunjukkan hasil positif untuk xylose dan VP, sedangkan untuk fermentasi karbohidrat yang lain hasilnya negatif. Kemudian pada uji indol hasilnya negatif. Menurut Holt (1994), pada fermentasi D-glukosa dan karbohidrat yang lain mampu menghasilkan asam dan gas, namun pada hasil uji mikrobact glukosa negatif. Golongan bakteri ini memiliki uji indol negatif, uji *Voges Proskauer* (VP) positif, lysine negatif, dan ornithine positif, pada uji mikrobact ornithine negatif. Bakteri ini tidak memproduksi lipase dan H_2S_2 *deoksiribonuklease*. Bakteri jenis *E. agglomerans* dapat ditemukan pada tanaman serta tanah, air, limbah, saluran usus manusia dan hewan. Natsir (2014) berhasil mengidentifikasi bakteri *E. agglomerans* penghasil enzim amilase yang berasal dari sumber air panas Panggo Sulawesi Selatan.

Identifikasi bakteri *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang dan bersifat anaerob fakultatif. *E. coli* membentuk koloni yang bundar, cembung dan halus dengan tepi yang nyata (Smith, 1988).

Berdasarkan hasil uji biokimia bakteri *E. coli* ini positif pada uji katalase dan negative pada uji oksidase, sehingga mengindikasikan sel tidak dapat menghasilkan enzim oksidase. Hasil uji fermentasi karbohidrat, bakteri *E. coli* terbukti mampu memfermentasikan xylose. Kemudian pada uji indol hasilnya positif. Menurut Holt (1994) pada

fermentasi D-Glukosa dan karbohidrat bakteri ini mampu menghasilkan asam dan gas, namun pada hasil uji mikrobact glukosa negatif. Golongan bakteri ini mempunyai oksidase negatif, katalase positif, Voges-Proskauer negatif, dan biasanya hasil uji sitrat negatif. Pengujian negatif pada H_2S , urea hidrolisis dan lipase. Shyam (2013) berhasil mengisolasi bakteri yang dapat menghasilkan enzim amilase yang teridentifikasi sebagai *E. coli* dari sampel tanah.

Uji Aktivitas Enzim Amilase Dari Bakteri Amilolitik

Aktifitas enzim didefinisikan sebagai kecepatan pengukuran substrat atau kecepatan pembentukan produk pada kondisi optimum. Satu unit aktifitas enzim amilase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dihasilkan dari satu mikromol pati menghasilkan satu mikromol gula reduksi (glukosa) setiap menit (Lehninger, 1993). Aktifitas amilase dapat diukur dengan menggunakan metode asam 3,5 dinitrosalisilat (DNS).

Besar kecilnya aktivitas enzim amilase ini akan mempengaruhi kadar gula pereduksi (glukosa) yang dihasilkan.

Tabel 2. Hasil Uji Aktifitas Ekstrak Kasar Amilase Dari Tiap Isolat

Isolat	Aktifitas enzim (Unit/mL)
<i>E. agglomerans</i> (A1)	0,419
<i>E. Coli</i> (A3)	0,855
<i>E. agglomerans</i> (A5)	1,664

Berdasarkan data pada tabel 4.6, isolat yang memiliki aktifitas enzim tertinggi adalah isolat A5 dengan aktifitas enzim sebesar 1,664 Unit/ml, sedangkan aktifitas enzim terendah pada isolat A1 yaitu sebesar 0,419 Unit/mL. Resmi (2011), berhasil mengukur aktifitas enzim amilase pada bakteri termofilik pada sumber air panas Cangar sebesar 2,175 Unit/mL. Sedangkan Cristina (2008) berhasil mengukur aktifitas enzim amilase pada sumber air panas dengan suhu 50°C, aktifitas enzimnya sebesar 0,105 Unit/mL.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian isolasi bakteri amilolitik termofilik dari sumber air panas Pacet Mojokerto ditemukan 3 isolat yang dapat menghasilkan enzim amilase dengan terbentuk zona bening dan morfologi yang bervariasi, yaitu isolat A1 & A5 yang teridentifikasi sebagai *Enterobacter agglomerans* dan isolat A3 sebagai *Eschericia coli*.

Aktifitas enzim oleh bakteri amilolitik yaitu pada *Enterobacter agglomerans* A5 sebesar 1,664 Unit/ml, *Eschericia coli* sebesar 0,855 Unit/ml dan *Enterobacter agglomerans* A1 sebesar 0,419 Unit/ml.

DAFTAR PUSTAKA

Ajayi, Adedayo. 2007. Heat activation and stability of amylases from *Bacillus* species. *African*

Journal of Biotechnology Vol. 6 (10). Academic Journals

Brock TD & Brock KM. 1978. *Basic microbiology with application*. 2nd edition. Prentice Hall, Inc, New Jersey. p.583.

Cappucino JG. 1983. *Microbiology: A Laboratory Manual*. Addison Publishing Company

Christina, Dessy. 2008. Isolasi Bakteri Dan Uji Aktivitas Amilase Termofil Kasar Dari Sumber Air Panas Penen Sibirubiru Sumatera Utara. *Tesis*. Universitas Sumatera Utara

Holt, G., Kreig, N.R., Sneath, P.H.A., Stanley, J.T. dan Williams, S.T. 1994. *Bergey's Manual Determinative Bacteriology*. Baltimore: Williamn and Wilkins Baltimore

Lehninger, A.L. 1993. *Dasar-dasar biokimia*. Jakarta : Erlangga

Natsir, nurul. 2014. Eksplorasi Dan Karakterisasi Bakteri Termofil Penghasil Enzim Amilase Dari Sumber Air Panas Panggo, Sulawesi Selatan. Seminar Nasional Biokimia Uin Syarif Hidayatullah Jakarta

Oxoid, 2004. Microbact Identification Kits. <http://www.oxid.com/fs/t/Val.kane@oxid.com.pdf>. Tanggal akses 05 April 2014

- Palmer T. 1985. *Understanding Enzyme*. Ellishorwood Publisher.
- Archives of Applied Science Research, 2013, 5 (1):15-24
- Pelczar MJ, Chan ECS. 2010. *Dasar-Dasar Mikrobiologi. Jilid 1*. Hadioetomo RS, Imas T, Tjitrosomo SS, Angka SL, Penerjemah; Jakarta: UI Pr. Terjemahan dari: Elements Of Microbiology.
- Sumardjo, Damin. 2006. *Pengantar Kimia: Buku Panduan Kuliah Mahasiswa Kedokteran Dan Program S1 Fakultas Bioeksak*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC
- Resmi, Syarifah. 2011. Isolasi dan identifikasi bakteri termofilik penghasil amilase termostabil dari sumber air panas Cagar-batu. *Skripsi*
- Setiasih, Budiasih, Trismila dan Dewi. 2006. Karakterisasi enzim α -amilase ekstraseluler dari isolate bakteri termofilik SW2. *Jurnal Kimia Indonesia*. Vol. 1(1) 22-27
- Shyam, Sunder. 2013. Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil.