

SCREENING BAKTERI TERMOFILIK PENGHASIL ENZIM AMILASE DARI SUMBER AIR PANAS SINGGAHAN TUBAN, JAWA TIMUR

SCREENING THERMOPHILIC BACTERIA OF AMYLASE ENZYME FROM SINGGAHAN HOT SPRINGS TUBAN, JAWA TIMUR

Yuliana Eva Novitasari* dan Nuniek Herdyastuti

Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences

State University of Surabaya

Jl. Ketintang Surabaya (60231), Telp. 031-8298761

*Corresponding author, email: yuliana.eva@yahoo.co.id

Abstrak. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh bakteri termofilik yang menghasilkan amilase dari sumber air panas singgahan di Tuban berdasarkan clear zone dan menentukan spesies bakteri yang mempunyai indeks amilolitik tertinggi. Diperoleh 103 isolat dan 51 isolat menunjukkan aktivitas amilase dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni pada media padat yang mengandung 1% pati. Indeks amilolitik tertinggi ditunjukkan oleh isolat ST-32 sebesar 3,8 mm. Berdasarkan uji morfologi dan fisiologi isolat ST-32 menunjukkan spesies *Thermoactinomyces saachari*.

Kata kunci: bakteri termofilik, amilase, pati, zona bening

Abstract. This research aims to obtain thermophilic bacteria produced amylase from Singgahan hot spring in Tuban based on clear zone and determine species of bacteria that have highest amylolytic index. It was obtained 103 isolates and 51 isolates showed amylase activity with formation clear zone around the colony in medium containing 1 % starch. The highest amylolytic index was showed by ST-32 isolate is 3.8 mm. Based on morphology and physiology ST-32 isolates shown species *Thermoactinomyces saachari*.

Keywords: thermophilic bacteria, amylase, starch, clear zone

PENDAHULUAN

Sejalan dengan perkembangan industri serta kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi, penggunaan enzim telah mengalami peningkatan. Setiap tahun enzim di dunia meningkat sekitar 7.6 % karena negara industri maju sudah banyak yang menggunakan enzim untuk menunjang bioteknologi. Keunggulan enzim dapat meminimalkan resiko atau dampak proses industri bagi kehidupan manusia dan lingkungan [1].

Amilase merupakan salah satu enzim yang sering digunakan dalam bidang industri. Amilase adalah enzim yang mempunyai kemampuan menghidrolisis pati. Amilase dapat menghidrolisis molekul pati untuk menghasilkan produk bervariasi seperti maltosa, dekstrin dan terutama molekul glukosa sebagai unit terkecil [2]. Enzim amilase di dapat dari berbagai sumber yaitu hewan, tumbuhan dan mikroorganisme. Mikroorganisme merupakan sumber enzim yang sangat

menguntungkan karena pertumbuhannya lebih cepat dari pada hewan dan tumbuhan.

Saat ini amilase yang berasal dari mikroorganisme termofilik banyak digunakan dalam industri terutama yang menggunakan suhu tinggi dalam prosesnya. Industri bioetanol merupakan salah satu contoh yang menggunakan enzim amilase termostabil. Pada produksi etanol, pati digunakan sebagai substrat yang sering digunakan karena harganya murah dan mudah tersedia. Proses hidrolisis pati melalui tiga tahap yaitu likuifikasi dan sakarifikasi. Pada tahap likuifikasi pati menggunakan enzim α -amilase termostabil yang berlangsung pada suhu sekitar 90°C, α -amilase pada enzim ini dapat menghidrolisis ikatan α -1,4-glukosida secara spesifik menghasilkan dekstrin. Proses selanjutnya, sakarifikasi membutuhkan glukamilase untuk memecah pati yang menghasilkan glukosa [3] Glukosa yang dihasilkan digunakan sebagai bahan

pembuatan bioetanol melibatkan proses fermentasi. Proses fermentasi dilakukan dengan menambahkan ragi atau bakteri untuk mengkonversi glukosa menjadi bioetanol [4]

Bakteri termofilik merupakan kelompok mikroorganisme yang tumbuh optimal pada suhu lebih dari 45 °C dan kisaran umum pertumbuhan antara 45 °C sampai 80 °C [5]. Bakteri termofilik mampu bertahan dan berkembang dalam kondisi suhu tinggi karena protein bakteri termofilik lebih stabil dan tahan panas dibandingkan dengan mesofil karena protein yang terdapat pada sel bakteri termofilik memiliki ikatan hidrofobik dan ikatan ionik yang sangat kuat. Komposisi membran sel pada bakteri termofilik tersusun oleh asam lemak jenuh sehingga dapat bersifat stabil pada suhu tinggi [6].

Bakteri amilolitik termofilik dapat diisolasi dari berbagai tempat seperti daerah kawah, sumber air panas, gunung berapi dan daerah yang bersuhu tinggi lainnya. Berdasarkan penelitian sebelumnya beberapa orang telah berhasil mengisolasi dan mengidentifikasi beberapa jenis bakteri amilolitik dari sumber air panas, seperti yang dilakukan dari sumber air panas Meshkinshahr yaitu *Bacillus spp* dengan suhu 82 °C [7]. Isolasi dilakukan Saline Hot spring di Jepang dengan suhu 55°C dan dianalisis menggunakan rDNA 16s adalah *Bacillus alveayuensis* dan *Bacillus aeolius* [8].

Mengingat bahwa bakteri termofil penghasil enzim amilase ini sangat berpotensi dalam bidang industri dan manfaatnya yang luas, sehingga perlu dilakukan eksplorasi mengenai bakteri termofilik penghasil enzim amilase yang diisolasi dari sumber air panas Singgahan Tuban.

METODE PENELITIAN

Alat

Peralatan yang digunakan adalah alat glass yang umum digunakan, inkubator, *shaker* (Mettler), *autoclave*, *laminar flow*, timbangan mikro, sentrifuse dingin (5810 R), spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu, 1800), stirrer dan *water bath*.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tripton (Difco), *yeast extract*

(Difco), NaCl (Merck), pati (Merck), agar (Criterion), CaCl₂.2H₂O (Merck), MgSO₄.7H₂O (Merck), K₂HPO₄ (Merck), NaH₂PO₄ (Merck), Na₂HPO₄.7H₂O (Merck), D- glukosa anhidrat (Merck), asam 3,5 dinitrosalisilat (SIGMA), NaOH (Merck) dan Natrium Kalium Tartarat (Merck).

PROSEDUR PENELITIAN

Isolasi Bakteri Termofilik

Sampel air yang diambil secara acak dari sumber air panas Singgahan Tuban masing-masing dikulturkan dalam media LB (*Luria Bertany*) cair yang terdiri atas tripton, *yeast extract* dan NaCl, selanjutnya di *shaker* selama ± 18 jam pada suhu 50°C.

100 µL diambil dari LB cair yang telah keruh dituang pada LB padat dengan metode *spread plate* dan diinkubasi pada suhu 53°C selama ± 18 jam didapat biakan campuran.

Screening Bakteri Termofilik Penghasil Amilase

Masing-masing koloni tunggal diinokulasikan ke dalam media padat yang mengandung 1% pati dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 53°C. Clear zone tampak disekitar koloni setelah ditetesi iodine menunjukkan bahwa bakteri menghasilkan amilase.

Penentuan Aktivitas Enzim Amilase

Aktivitas enzim ditentukan berdasarkan jumlah gula reduksi yang dilepaskan dan diukur secara kolorimetri dengan Metode Miller [9]. Sebanyak 1 ml ekstrak amilase kasar hasil sentrifus dimasukkan dalam tabung uji, lalu ditambahkan 1 ml larutan pati 1% (b/v) yang sudah dilarutkan dalam 0.02 M bufer fosfat pH 7, diinkubasi pada suhu 50 °C selama 20 menit. Selanjutnya ditambahkan 2 ml reagen DNS dan dipanaskan pada suhu 100 °C selama 15 menit dan didinginkan segera dalam es selama 5 menit untuk menginaktivasi enzim tersebut. Lalu ditentukan serapan cahaya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 471 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri Termofilik

Pada Penelitian ini, sampel yang digunakan berasal dari sumber air panas Singgahan di Tuban. Sampel air diambil secara acak dan dikulturkan dalam media cair selama 18 jam. Hasil pengkayaan pada media cair kemudian ditumbuhkan pada media padat dan diinkubasi 18 jam pada suhu 53°C. Diperoleh 103 isolat yang diberi kode ST-1 sampai ST-103.

Screening Bakteri Termofilik Penghasil Amilase

103 isolat yang diperoleh ditumbuhkan pada media padat yang mengandung 1% patidan diinkubasi selama 24 jam. Diperoleh 51 isolat yang menunjukkan clear zone setelah ditetesi iodine (Gambar 1). Clear zone terbentuk akibat enzim amilase dapat menghidrolisis pati dalam media padat oleh menjadi senyawa yang sederhana yaitu [10].



Gambar 1. Isolat yang enunjukkan clear zone pada media padat *screening*

Sifat enzim tersebut merupakan enzim ekstraseluler yang bersifat menginduksi substrat, dimana disintesis didalam sel kemudian di bawa melintasi membran sel untuk bekerja di lingkungan luar sel [11].

Besarnya *clear zone* yang dihasilkan tergantung pada jumlah monomer glukosa yang dihasilkan dari proses hidrolisis pati. Semakin besar jumlah monomer glukosa yang dihasilkan semakin besar *clear zone* yang terbentuk disekitar koloni.

Dari 51 isolat yang menunjukkan clearzone terdapat 3 isolat yang memiliki indeks amilolitik sama (ST-32, ST-47 dan ST-63) yaitu 6 mm. Dan dilakukan *screening* ulang, dan isolat ST-32 memiliki indeks amilolitik tertinggi sebesar 3.8 mm.

Uji Aktivitas Amilase dari Isolat Termofilik Terpilih

Tiga isolat yang mempunyai indeks amilolitik tertinggi selanjutnya ditentukan secara kuantitatif berdasarkan aktivitas amilase ditunjukkan pada Tabel 1.

Bakteri amilolitik mampu menghidrolisis substrat pati secara sempurna menjadi glukosa. Jalur degradasi amilase yang pertama diawali dengan hidrolisis ikatan α -1,4 glikosida. Ikatan α -1,4 glikosida diputus oleh enzim α -amilase pada amilosa. Selanjutnya pemutusan ikatan α -1,4 glikosida dan α -1,6 glikosida pada amilopektin menggunakan enzim glukamilase sehingga dihasilkan glukosa [12].

Tabel 1. Kadar glukosa dan aktivitas bakteri amilolitik termofilik

Isolat	Kadar Glukosa (ppm)	Aktivitas (U/ml)
ST-32	216.375	1.2404
ST-47	182.458	1.0136
ST-63	193.297	1.0739

Berdasarkan Tabel 1 aktivitas tertinggi amilase ditunjukkan oleh isolat ST-32 yaitu 1.2404 U/ml. Hal ini didukung oleh hasil indeks amilolitik tertinggi terdapat pada isolat ST-32.

Uji Morfologi dan Fisiologi Isolat ST-32

Uji morfologi menunjukkan bahwa isolat ST-32 memiliki bentuk *irregular*, elevasi cembung, berwarna cream transparan dan permukaannya halus. Hasil pewarnaan gram menunjukkan bentuk streptobasil dan gram positif.

Uji Fisiologi dilakukan dengan uji *microbact* 12A dan 12B dengan 22 jenis uji ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji *microbact* 12A dan 12 B isolat ST-32

Jenis Uji	Hasil uji
Lisin	+
Ornithin	-
H ₂ S	-
Glukosa	-
Manitol	-
Xylosa	+
ONPG	+
Indol	-
Urease	-
VP	-
Sitrat	-
TDA	-
Gelatin	+
Malonat	-
Inositol	-
Sorbitol	-
Rhamnosa	-
Sukrosa	-
Laktosa	-
Arabinosa	+
Adonitol,	-
Rafinosa,	-
Salisin	-
Arginin	-

Karakteristik morfologi dan biokimia menunjukkan isolat ST-32 merupakan spesies *Thermoactinomyces saachari*.

PENUTUP

Simpulan

Bakteri dari sumber air panas Singgahan Tuban diperoleh 103 isolat dan 51 isolat menunjukkan aktivitas amilase dengan terbentuknya *clear zone*. Isolat ST-32 memiliki indeks amilolitik tertinggi sebesar 3,8 mm, dan berdasarkan uji morfologi dan fisiologi menunjukan spesies *Thermoactinomyces saachari*.

Saran

Perlu dikaji lebih lanjut untuk penentuan kondisi optimum yang mempengaruhi aktivitas amilase dan identifikasi bakteri menggunakan analisis secara genetis 16S rRNA.

UCAPAN TERIMAKASIH

Sebagian penelitian ini telah dibimbing dan didanai oleh Dr. Aline Puspita Kusumadjaja, M.Si.

DAFTAR PUSTAKA

1. Octarya, Zona. 2010. Skrining Dan Identifikasi Bakteri Termofilik Penghasil Selulase Dan Amilase Dari Sumber Air Panas Bukit Kili Ketek Solok Dengan Analisis 16s rRNA Serta Karakterisasi Molekuler Enzim Ekstraselulernya. *Tesis*. Jakarta ; Universitas Andalas
2. Putra, Surya Rosa., Sarah., Putro, Herdayanto Sulistiyo. 2009. Isolasi α -amilase termostabil dari bakteri termofilik *Bacillus stearothermophilus*. *Prosiding Skripsi*. Surabaya : Institut Teknologi Sepuluh November
3. Lestari, Puji., Darwis, A.A., Syamsu, K., Richana, Nur., Damarjdaki, D.S., 2001. Analisis Gula Reduksi Hasil Hidrolisis Enzimatik Pati Ubi Kayu oleh α -Amilase Termostabil dan *Bacillus tearothermophilus* T1112. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*. ISSN 0853-358 : 23-26
4. De Souza, Paula Monteiro., and Oliveira Magalhaes, Perola de. 2010. Application of microbial α -amylase in industry. *Braz J Microbiol*. 41 (4): 850-861
5. Kathleen. (2008). *Foundation in Microbiology*. New York; Prentice Hall
6. Endah Pratita, Maria Yuli., Putra, Surya Rosa. 2012. Isolasi dan identifikasi bakteri termofilik dari sumber mata air panas singgahan di Songgoriti setelah dua hari inkubasi. *Jurnal Teknik Pomits*. Vol 1 (1): 1-5
7. Fooladi, J., and Sajjadian A, 2010. Screening the termophilic and hyperthermophilic bacterial population of three Irian hot-springs to detect the thermostable α -amylase producing strain. *Irian Journal of microbiology*. 2(1) 49-53
8. Kawasaki, Y., Madoka, A., Yoriyasu, M., et al., 2011. Characterization of Moderately Thermophilic Bacteria Isolated from Saline Hot Spring in Japan. *Journal Microbiology Indonesia*. 5(2) : 56-60

9. Miller, G. L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31: 426–428
10. Winarno FG, 1986. *Enzim Pangan*. Gramedia. Jakarta. 57-59
11. Black, Jacquelyn G. 2012. *Microbiology : Principles and Explorations eighth editions*. Texas : John Willey.
12. Heryanto, Tri Ekawati. 2012. Penentuan Aktivitas Kasar Termofil *Bacillus Subtilis* isolat Gunung Darajat Garut Jawa Barat. *Skripsi*. Bandung : Universitas Pendidikan Indonesia

