

IDENTIFIKASI BAKTERI POTENSIAL PENGHASIL ENZIM AMILASE, SELULASE, XILANASE DAN LIPASE PADA FASE TERMOFILIK KOMPOS MANUR SAPI

Fenti Fatmawati^{1,4*}, Fida Madayanti Warganegara² Dan Made Puspari³
^{1,2,3}Kelompok Keahlian Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Institut Teknologi Bandung, email: fentisabian@gmail.com.
⁴Program Studi Farmasi, Sekolah Tinggi Farmasi Bandung (STFB)

Abstrak

Kebutuhan akan enzim di Indonesia cukup besar namun pasokannya masih dipenuhi oleh impor. Keaneka ragaman hayati di Indonesia yang begitu melimpah dapat menjadi alternatif dalam mencari sumber- sumber enzim potensial yang banyak digunakan dalam industri. Amilase, selulase, xilanase dan lipase merupakan enzim yang memiliki nilai ekonomi tinggi. Kompos dari kotoran sapi adalah kompos yang menggunakan limbah kotoran sapi sebagai bahan campurannya. Proses pengomposan dapat terbagi menjadi beberapa tahap yaitu fase mesofilik awal, fase termofilik, mesofilik akhir dan fase pematangan. Perbedaan fase tersebut berdasarkan atas perbedaan suhu yang menyebabkan perubahan komunitas bakteri di dalamnya. Pada fase termofilik terjadi peningkatan suhu yang signifikan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi bakteri potensial yang dapat menghasilkan enzim amilase, selulase, xilanase dan lipase pada fase termofilik kompos manur sapi. Pada penelitian ini dilakukan isolasi mikroba pada fase termofilik lalu dilakukan skrining enzim. Kemudian dilakukan identifikasi secara genetik dengan metode penentuan urutan nukleotida gen 16S rRNA untuk mengetahui spesies bakteri tersebut. Dari hasil skrining dipilih koloni bakteri F3A pada fase termofilik dimana bakteri tersebut dapat menghasilkan enzim amilase, selulase, xilanase dan lipase. Koloni bakteri tersebut memiliki ukuran sebesar 20.000 pb. DNA kromosom hasil isolasi ini selanjutnya digunakan sebagai templat dalam proses PCR untuk mendapatkan gen secara utuh. Hasil PCR menunjukkan bahwa proses amplifikasi telah berhasil dilakukan yang ditunjukkan diperolehnya ukuran fragmen DNA yang berukuran 1500 pb. Setelah diamplifikasi lalu dilakukan sequencing. Berdasarkan urutan homologi dengan analisis BLAST dan analisis filogenetik dengan menggunakan program MEGA 5 diketahui bahwa bakteri F3A memiliki kemiripan 93% dengan *Ureibacillus thermosphaericus*.

Kata kunci: Enzim, kompos, termofilik, *Ureibacillus thermosphaericus*.

1. LATAR BELAKANG

Selama ini belum ada upaya yang maksimal dalam penanganan limbah dari usaha peternakan. Limbah peternakan dapat berupa sisa buangan dari kegiatan pemeliharaan ternak, rumah potong ternak dan pengolahan produk ternak. Hanya sedikit yang telah dimanfaatkan untuk pembuatan kompos dan biogas. Limbah ternak sapi perah dapat berupa limbah padat dan limbah cair. Limbah padat seperti manur kotoran ternak dan sisa pakan. Limbah cair misalnya air pencucian kandang dan air kencing sapi.

Salah satu metode pengolahan limbah ternak ini adalah dengan pengomposan. Proses pengomposan yaitu proses penguraian yang merubah material organik menjadi material yang lebih stabil yang mengandung humus. Proses pengomposan memiliki 4 fase utama yaitu fase mesofilik awal, fase termofilik, fase mesofilik akhir dan fase pendinginan atau pematangan. Pada saat fase mesofilik awal, temperatur kompos relatif mirip dengan lingkungannya. Selanjutnya temperatur kompos akan meningkat dengan tajam hingga mencapai kondisi termofilik. Pada tahap termofilik,

mikroorganismen menjadi sangat aktif mendegradasi bahan-bahan organik sehingga menghasilkan panas. Akumulasi kalor ini dapat menyebabkan kenaikan temperatur dari bahan kompos. Temperatur yang tinggi mempercepat degradasi protein, lemak dan karbohidrat kompleks seperti selulosan hemiselulosa. Aktivitas dan diversitas mikroba menurun pada saat temperatur mencapai 55-60°C. Patogen dihancurkan oleh panas metabolik yang dihasilkan oleh fase termofilik yang menurunkan sejumlah besar polutan organik berbahaya (Singh dkk, 2012). Setelah fase ini terlampaui, temperatur menurun secara perlahan hingga akhirnya kompos matang di fase pendinginan dan pematangan. Perubahan yang terjadi selama proses perubahan fase-fase tersebut adalah terjadinya pola perubahan temperatur yang signifikan yang mempengaruhi baik secara langsung maupun tidak langsung terhadap aktivitas mikroorganismen. Mikroorganismen yang terlibat dalam proses degradasi bahan kompos umumnya menghasilkan enzim.

Dengan adanya aktivitas enzim-enzim tersebut pada proses pengomposan manur sapi akan memberikan kelebihan tersendiri. Kompos dari manur sapi ini selain dapat digunakan dalam bercocok tanam juga dapat dijadikan alternatif baru dalam mencari sumber-sumber enzim potensial yang banyak digunakan dalam industri seperti enzim amilase, selulase, xilanase dan lipase. Adapun kebutuhan akan enzim di Indonesia cukup besar

namun pasokannya masih dipenuhi oleh impor. Enzim amilase digunakan dalam industri tekstil, industri kertas dan industri makanan. Enzim selulase banyak diaplikasikan pada industri tekstil, pada deterjen sebagai agen untuk meningkatkan kecerahan dan kelembutan kain, untuk meningkatkan kualitas gizi dan pencernaan pakan ternak, pembuatan bioetanol. Enzim xilanase dapat dijadikan pengganti klorin pada industri kertas dan untuk meningkatkan mutu pakan ternak non ruminansia. Lipase banyak diaplikasikan pada industri makanan, kertas, tekstil, kulit, pengolahan limbah, produksi bahan kimia dan, sintesis surfaktan, obat-obatan, kosmetik.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi bakteri potensial yang dapat menghasilkan enzim amilase, selulase, xilanase dan lipase pada fase termofilik kompos manur sapi.

2. METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia, Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Bandung. Peralatan yang digunakan meliputi gelas kimia, gelas ukur, labu Erlenmeyer, cawan petri, tabung reaksi, tabung Eppendorf, pipet mikro, tip pipet mikro berbagai ukuran, autoclave, waterbath incubator, hot plate stirrer, neraca analitik, pH meter, microcentrifuge (BOECO M24A), alat PCR (c-100 Thermal Cycler BIORAD),

Spektrofotometer, alat elektroforesis, lampu UV.

Cara kerja

a. Isolasi Bakteri

Pada penelitian ini digunakan sampel dari hasil pengomposan manur sapi yang dicampur dengan jerami padi pada perbandingan 3:1. Sampel kompos diambil mewakili termofilik yaitu suhu 55 °C. Pada fasa termofilik diambil dengan 3 posisi pengambilan yaitu bagian atas, tengah dan bawah. Sampel lalu dilarutkan dengan aquades dengan perbandingan 1:10. Sebanyak 0.1 mL larutan stok dari larutan sampel diinokulasikan ke dalam 10 mL media LB cair. Isolat diinkubasi pada suhu yang sesuai dengan suhu 55°C selama 16 jam dengan menggunakan shaker dengan kecepatan 150 rpm. Dilakukan pengenceran terhadap kultur dengan menggunakan NaCl fisiologis 0,9%. Setelah itu kultur ditumbuhkan dalam media LB dengan cara *spread*. Kultur selanjutnya diinkubasi pada suhu 55 °C selama 16 jam.

b. Skrining Amilase

Koloni tunggal yang telah didapatkan, ditumbuhkan pada media selektif dan diinkubasi selama 16 jam pada suhu 55 °C. Skrining amilase dilakukan dengan metode Foulds (2010).

c. Skrining Selulase

Koloni tunggal yang sama juga ditumbuhkan pada media CMC dan selanjutnya diinkubasi pada suhu 55 °C selama 16 jam.

d. Skrining Xilanase

Koloni tunggal yang sama juga ditumbuhkan pada media selektif yang mengandung xilan. Xilan diekstraksi dari tongkol jagung dengan cara delignifikasi menggunakan pelarut natrium hipoklorit (NaOCl) 1%. Setelah itu tongkol jagung dioven selama 48 jam dengan suhu 50°C. Lalu dilakukan perendaman dengan larutan NaOH 15% . Xilan kemudian diendapkan dengan HCl. Skrining enzim xilanase dilakukan dengan menggunakan metode Samanta (2011).

f. Skrining Lipase

Skrining lipase dilakukan dengan dengan metode Leonov (2010).

g. Isolasi DNA Kromosom

Sebanyak 3 µl kultur bakteri disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 5 menit. Pada pellet yang tersisa ditambahkan 300 µl buffer ekstraksi dan lisozim 5 mg. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Sel dilisis dengan buffer lisis (40 µl SDS 10%, 80 µl EDTA 0.5 M, 398 µl proteinase K, 72 µl ddH₂O). Lalu diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Setelah itu didiamkan di suhu ruang lalu diinkubasi di es. Ditambahkan 30 ml CH₃COOK 5M dan 5,75 ml asamasetat glasial lalu diinkubasi dalam es batu selama 5 menit. Sentrifugasi dengan kecepatan 12.000xg pada suhu 4°C selama 20 menit. Supernatan diendapkan dengan isopropanol. Lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam. Sentrifugasi kembali selama 15 menit. Pellet lalu dicampur dengan Etanol 70%. Sentrifugasi kembali selama 5 menit.

Pellet kemudian dikering udarakan selama semalam.

h. Amplifikasi DNA Kromosom

Proses amplifikasi DNA kromosom dilakukan menggunakan PCR dengan metode Tessaionika (2012).

i. Elektroforesis Gel Agarosa

Hasil amplifikasi DNA dapat dilihat melalui elektroforesis gel agarosa tersebut dibawah sinar UV (360 nm).

j. Sequencing 16S rRNA

Penentuan urutan nukleotida dilakukan di MACROGEN Korea Selatan dengan metode dye-end terminator. Untuk satu kali penentuan dibutuhkan templat DNA sebanyak 100 µl dan primer BactF, UniB1, ComF, ComR yang masing-masing sebanyak 10 pmol.

k. Analisis Homologi

Urutan nukleotida gen 16S rRNA yang diperoleh selanjutnya dianalisis dengan program BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi) untuk mengidentifikasi pengelompokan bakteri. Program BLAST membandingkan urutan nukleotida yang dihasilkan dan mencari kecocokan dengan urutan nukleotida yang ada pada GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

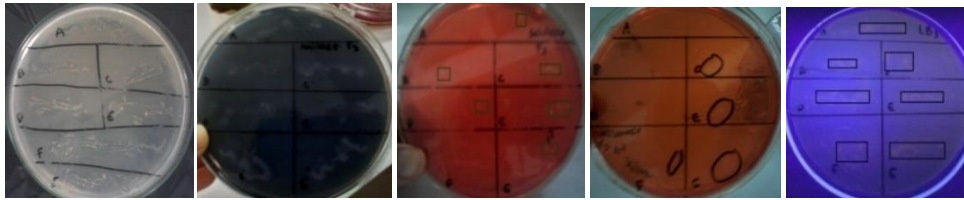
3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri

Dari hasil isolasi didapatkan koloni tunggal dengan pengenceran. Pengenceran dilakukan agar pertumbuhan bakteri pada sampel tidak terlalu padat sehingga dapat dilakukan perhitungan. NaCl fisiologis digunakan sebagai pengencer agar suspensi sampel tetap steril dan menghindari adanya kontaminan pada sampel. Jumlah koloni yang tumbuh pada termofilik sebanyak $1,2 \times 10^3$ CFU/ml. Koloni yang tumbuh diamati morfologinya. Koloni dengan morfologi berbeda ditumbuhkan kembali di media LB padat yang baru kemudian dibuat koleksinya. Adapun perbedaan morfologinya tersebut yaitu terletak perbedaan bentuk koloni dan juga ukuran. Koloni dengan morfologi yang berbeda diperoleh sebanyak 7 koloni.

Skrining Enzim

Koloni bakteri penghasil enzim yang terdapat pada fasa termofilik diperoleh dengan menumbuhkan koloni tunggal terpilih dalam media skrining yang spesifik. Koloni bakteri yang memiliki aktivitas amilase, selulase dan xilanase akan menghasilkan zona bening disekitar koloni. Sedangkan koloni bakteri yang memiliki aktivitas lipase akan menghasilkan pendar bila dilihat di bawah sinar UV seperti yang terlihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 1. Skrining enzim dari koloni tunggal terpilih di fasa termofilik

Catatan : dari kiri ke kanan. Kontrol positif, skrining amilase, skrining selulase, skrining xilanase, skrining lipase

Pada fasa termofilik terdapat 7 koloni yang dilakukan skrining dengan metode media selektif. Dari ke 7 koloni ini masing-masing dinamakan F3A, F3B,

F3C, F3D, F3E, F3F, F3G. Dari hasil skrining dapat dilihat secara visual aktivitas enzim dari masing-masing koloni seperti terlihat pada tabel 2 dibawah ini.

Tabel 2. Aktivitas enzim dari koloni fasa termofilik

Koloni	Aktivitas amilase	Aktivitas selulase	Aktivitas xilanase	Aktivitas lipase
F3A	+++	++	++	++
F3B	+++	++	-	++
F3C	+++	++	-	++
F3D	+++	+	-	++
F3E	+++	++	+	++
F3F	+++	-	+	++
F3G	+++	+	++	++

Catatan: +++ : tingkat aktivitas enzim tinggi ; ++ : tingkat aktivitas enzim sedang ; + : tingkat aktivitas enzim rendah ;

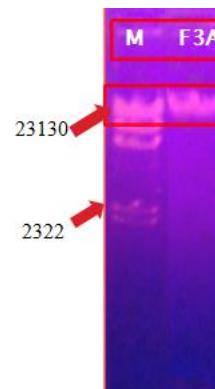
- : tidak adanya aktivitas enzim

Dari tabel diatas jika setiap tanda (+) dianggap mewakili aktivitas enzim maka koloni F3A memiliki aktivitas enzim amilase, selulase, xilanase dan lipase dilihat dari hasil skrining. Koloni ini dianggap potensial karena dapat menghasilkan keempat enzim potensial. Oleh karena itu, koloni F3A ini selanjutnya diidentifikasi untuk mengetahui spesies bakteri dilihat dari urutan gen 16Snya. Urutan nukleotida di kedua ujung gen bersifat lestari sehinggahampir seluruh gen dapat diamplifikasi.

Isolasi DNA Kromosom

Bakteri potensial tersebut kemudian diisolasi DNA kromosomnya untuk

dilakukan identifikasi lebih lanjut. DNA hasil isolasi lalu dielektroforesis menggunakan gel agarosa. Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa DNA tersebut memiliki ukuran diatas 20.000 pb (Gambar 2).



Gambar 2. Hasil elektroforesis DNA kromosom

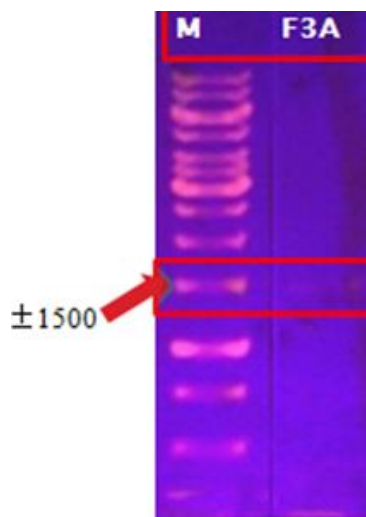
Catatan : M : marker ; F3A : bakteri pada fasa termofilik

Amplifikasi DNA Kromosom

Amplifikasi DNA kromosom dilakukan menggunakan teknik PCR lalu hasilnya dielektroforesis dengan gel agarosa. DNA kromosom hasil isolasi digunakan sebagai template dalam proses PCR. PCR 16S rRNA dilakukan dengan tujuan mengamplifikasi gen 16S rRNA secara utuh. Amplifikasi gen 16SrRNA dilakukan dengan menggunakan primer universal (primer Bact F dan primer UniR).

Elektroforesis Gel Agarosa

Keberhasilan amplifikasi gen 16S rRNA dapat dilihat dari besarnya ukuran DNA yang didapatkan. Dari hasil penelitian ini didapatkan ukuran DNA setelah amplifikasi adalah ± 1500 pb (Gambar 3). Ini menunjukkan bahwa proses amplifikasi telah berhasil dilakukan. Hal ini dikarenakan gen yang diamplifikasi merupakan gen 16S yang memiliki ukuran sekitar 1500 pb.



Gambar 3. Hasil elektroforesis amplifikasi PCR
Catatan: M : marker ; F3A : bakteri pada fasa termofilik.

Sequencing 16S rRNA

Untuk mendapatkan urutan nukleotida hasil PCR perlu dilakukan sequencing dengan menggunakan beberapa primer. Primer yang digunakan adalah sepasang primer luar dan sepasang primer dalam. Primer luar yang digunakan adalah Bact F untuk *forward* dan Uni B untuk *reverse*. Sedangkan primer dalam yang digunakan adalah primer comF untuk *forward* dan comR untuk *reverse*. Diharapkan dari primer tersebut dapat terbaca secara baik urutan nukleotida dari bakteri target. Proses sequencing dilakukan di Macrogen Korea Selatan dengan menggunakan metode *dye end* terminator. Berdasarkan hasil sequencing gen 16S rRNA didapatkan data urutan nukleotida dari primer yang digunakan. Masing-masing primer memberikan data urutan nukleotida berupa elektroforegram puncak-puncak basa. Puncak-puncak tersebut dipilih dari puncak yang tinggi dan tidak menumpuk. Dari beberapa elektroforegram hasil sequencing didapatkan puncak-puncak pendek. Adanya puncak-puncak yang pendek kemungkinan disebabkan oleh hasil amplifikasi DNA yang tipis.

Analisis Homologi

Urutan nukleotida yang diperoleh kemudian dianalisis dengan menggunakan program BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/). Program BLAST membandingkan urutan nukleotida yang dihasilkan dengan urutan nukleotida yang ada di GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank).



Gambar 4. Pohon Filogenetik Bakteri F3A

Berdasarkan analisis homologi yang didapat dari BLAST dapat diketahui persentase kemiripan bakteri target. Hasil BLAST menunjukkan bahwa bakteri memiliki homologi dengan beberapa bakteri lain. Analisis filogenetik dilakukan dengan menggunakan program Mega 5. Berdasarkan hasil analisis pohon filogenetik (Gambar 4) diketahui bahwa

bakteri F3A memiliki homologi terdekat dengan *Ureibacillus thermosphaericus* dengan kemiripan 93%.

4. KESIMPULAN

Bakteri F3A adalah bakteri potensial yang dapat menghasilkan enzim amilase, selulase, xilanase dan lipase pada fase termofilik kompos manur sapi. Namun

Bakteri F3A hanya memiliki kemiripan dengan bakteri *Ureibacillus thermosphaericus* sebesar 93%. Hal ini berarti bahwa urutan nukleotida keduanya tidak cukup mirip dan masih terdapat perbedaan sehingga memungkinkan bahwa bakteri F3A ini bukan merupakan bakteri *Ureibacillus thermosphaericus*.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada pembimbing yang telah membantu dalam penyelesaian penelitian ini.

6. DAFTAR PUSTAKA

Fooladi, J. dan Sajjadian, A. (2010) : Screening the Thermophilic and Hyperthermophilic Bacterial Population of Three Iranian Hot Springs to Detect the Thermostable α -amylase Producing Strain. Iranian Journal of Microbiology 46-50.

Leonov, S. (2010) : Screening for Novel Cold Active Lipases from wild

Type Bacteria Isolates. Innovative Romanian Food Biotechnology vol 6.

Samantha, A., Kolte,A., Senani,S. dan Sridhar (2011) : A Simple and Efficient Diffusion Technique For Assay of Endo β -1,4-Xylanase Activity, Brazilian Journal of Microbiology 42: 1349-1353.

Singh, J., Kalamdhad,A.S. (2012) : Reduction of Heavy Metal during Composting- A Review. International Journal of Environmental Protection.

Tesalonika, A.C. (2012) : Isolasi dan uji aktivitas lipase dan xilanase pada fasa-fasa pembuatan kompos, Skripsi, Program Studi Sarjana Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Bandung.