

# **SELEKSI BAKTERI TERMOFILIK PASCA ERUPSI MERAPI SEBAGAI PENGHASIL ENZIM AMILASE DAN PROTEASE**

Oleh:

Anna Rakhmawati\*, Evy Yulianti\*, Eli Rohaeti\*\*

\*Jurusan Pendidikan Biologi FMIPA UNY

\*\* Jurusan Pendidikan Kimia FMIPA UNY

## **ABSTRAK**

Erupsi Gunung Merapi tahun 2010 membawa dampak positif dan negatif bagi kehidupan manusia. Salah satu dampak positif adalah ditemukannya bakteri termofilik yang mampu hidup pada suhu tinggi. Tujuan penelitian ini yaitu melakukan seleksi bakteri termofilik pasca erupsi Merapi yang mampu menghasilkan enzim amilase dan protease serta menentukan indeks amilolitik dan proteolitik tertinggi. Bakteri termofilik yang diseleksi sebanyak 348 isolat yang telah diisolasi dari Kali Gendol Atas pasca erupsi Merapi. Produksi enzim amilase dapat diketahui dengan adanya zona jernih di sekitar koloni bakteri pada media Starch Agar (SA) setelah ditetesi iodin. Produksi enzim protease diketahui dengan adanya zona jernih di sekitar koloni bakteri pada media Skim Milk Agar. Kemudian dilakukan perhitungan indeks amilolitik dan proteolitiknya. Inkubasi dilakukan dengan suhu 55 °C selama 24 jam. Hasil penelitian menunjukkan 57 isolat bakteri menghasilkan enzim amilase dan protease, 15 isolat hanya menghasilkan enzim amilase, dan 35 isolat hanya menghasilkan enzim protease. Isolat D79 mempunyai indeks amilolitik tertinggi yaitu 5,00 sedangkan isolat D104a mempunyai indeks proteolitik tertinggi yaitu 3,49.

**Kata kunci:** seleksi; bakteri termofilik; pasca erupsi Merapi; amilase; protease

## **PENDAHULUAN**

### **Latar belakang**

Gunung Merapi yang terletak di wilayah perbatasan Provinsi Jawa Tengah dan Provinsi Daerah Istimewa Yogyakarta merupakan salah satu gunung teraktif di dunia. Letusan pada tahun 2010 memberi dampak positif dan negatif. Suriadikarta dkk (2011) menyatakan dampak negatif erupsi Merapi yaitu terjadinya kerusakan lahan dan hilangnya sumber daya alam. Selain itu juga terjadi penurunan keragaman dan populasi mikroba tanah terutama pada tanah lapisan atas, sedangkan pada tanah bagian bawah tidak terlalu berpengaruh. Salah satu dampak positif erupsi Merapi yaitu ditemukannya bakteri yang dapat hidup di

suhu tinggi. Anna R dan Evy Y (2012) telah melakukan penelitian mengenai eksplorasi bakteri termofilik pasca erupsi Merapi sebagai penghasil enzim ekstraseluler, serta Evy Y dan Anna R (2013) melakukan isolasi dan uji aktivitas enzim amilase termostabil dari bakteri termofilik pasca erupsi Merapi. Sedangkan Drajat P, Anna R, & Evy Y (2012) melakukan seleksi bakteri termofilik pasca erupsi Merapi sebagai penghasil enzim lipase.

Bakteri termofilik dapat dibedakan menjadi 3 kategori berdasarkan temperatur optimum pertumbuhannya, yaitu (1) *Moderate thermophiles* dengan temperatur pertumbuhan optimum berkisar antara 35-70 °C; (2) *Extreme thermophiles*, temperatur pertumbuhan optimum berkisar 55-85 °C; dan (3) *Hyperthermophiles*, temperatur pertumbuhan optimum berkisar 75-113 °C (Baker *et al.*, 2001).

Salah satu karakter paling menarik dari bakteri termofilik adalah kemampuannya dalam memproduksi enzim yang mampu mengkatalis reaksi pada suhu lebih tinggi dibandingkan organisme mesofilik (Demirjian *et al.*, 2001). Properti stabilitas suhu yang lebih tinggi dan toleransi terhadap bahan kimiawi penyebab denaturasi seperti pelarut organik (Aguilar *et al.*, 1998; Kristjansson, 1989). Kenaikan temperatur dalam proses bioteknologi mempengaruhi ketersediaan dan solubilitas senyawa organik seperti poliaromatik, hidrokarbon alifatik, dan substansi polimer. Kenaikan temperatur juga berhubungan dengan penurunan viskositas dan kenaikan koefisien difusi senyawa organik. Hal ini berakibat kecepatan reaksi akan lebih tinggi (Niehaus *et al.*, 1999). Enzim termofil memiliki tingkat kontaminasi yang rendah, kecepatan reaksi lebih baik, dan stabil pada temperatur tinggi (Edward, 1990). Proses-proses biologis ketika dioperasikan dengan suhu diatas 60 °C akan mengurangi resiko kontaminan oleh organisme lain (Adams and Kelly, 1998). Mikrobia termofil mampu menghasilkan enzim termofil sehingga reaksi enzimatik dapat berjalan lebih cepat, mempercepat difusi, daya larut bahan semakin besar, memperkecil viskositas dan tegangan permukaan media (Hartiko, 1992). Kebanyakan mikrobia mengalami penurunan efektivitas kerja setelah fermentasinya menghasilkan panas, tapi hal ini tidak terjadi pada mikrobia termofil (Edward, 1990).

Konsep tentang termostabilitas yang dimiliki oleh enzim yang berasal dari mikroorganisme termofil ini dilandaskan pada dua konsep yaitu pertama struktur molekular pada selnya yang memang tersusun oleh molekul protein yang termostabil, kedua termostabilitas itu berkaitan dengan adanya asosiasi senyawa protein enzim dengan molekul lainnya seperti lipid, polisakarida maupun protein lainnya yang menyebabkan terbentuknya suatu senyawa yang memiliki mekanisme yang memungkinkannya tetap stabil saat menghadapi kondisi yang dapat menginaktivasi. Hampir 70% sektor industri yang menggunakan enzim dalam prosesnya memanfaatkan enzim yang berasal dari mikroorganisme termofil. Industri detergen misalnya menggunakan protease yang bersifat tahan suasana alkalis, industri amilum menggunakan enzim amilase, amiloglukosidase dan glukoisomerase yang berasal dari mikroorganisme termofil. Amilase termostabil digunakan dalam skala yang cukup luas pada proses industri. Enzim amilase yang digunakan tersebut berkisar pada  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase, glukoamilase, pullulanase dan jenis lainnya (Illanes, 1999). Faktor-faktor yang dianggap berhubungan dengan termostabilitas enzim-enzim dari mikroorganisme termofilik bervariasi pada berbagai spesies termofil, namun beberapa hal umum yang ditemukan antara lain terjadinya peningkatan ikatan hidrogen dan *salt bridge* pada protein dari enzim termofil. Selain itu ditemukan juga adanya perbedaan jenis dan komposisi asam amino penyusun protein enzim termofil bila dibandingkan dengan protein enzim yang mesofilik. Pada enzim termofilik terjadi penurunan jumlah sistein dan serin secara nyata, sedangkan jumlah arginin dan tirosin meningkat secara nyata. Asam amino prolin juga lebih sedikit ditemukan pada struktur  $\alpha$ -heliks pada protein termofilik (Kumar *et al.*, 2000).

Hasil penelitian Anna R & Evy Y (2012) menunjukkan ada beberapa isolat bakteri termofilik pasca erupsi Merapi 2010 yang berpotensi sebagai penghasil enzim ekstraseluler termostabil pada suhu inkubasi 70 °C. Sedangkan pada penelitian ini akan dilakukan seleksi bakteri termofilik sebagai penghasil enzim amilase dan protease pada suhu inkubasi 55 °C.

### **Rumusan masalah**

1. Adakah isolat bakteri termofilik pasca erupsi Merapi yang mampu menghasilkan enzim amilase dan protease pada suhu inkubasi 55 °C selama 24 jam?
2. Isolat bakteri termofilik pasca erupsi Merapi manakah yang memiliki indeks amilolitik dan proteolitik tertinggi pada suhu inkubasi 55 °C selama 24 jam?

### **Tujuan dan manfaat**

Penelitian ini bertujuan:

1. Mengetahui keberadaan isolat bakteri termofilik pasca erupsi Merapi yang mampu menghasilkan enzim amilase dan protease pada suhu inkubasi 55 °C.
2. Mengetahui isolat bakteri termofilik pasca erupsi Merapi yang memiliki indeks amilolitik dan proteolitik tertinggi pada suhu inkubasi 55 °C.

Penelitian ini bermanfaat untuk memberikan informasi dalam bidang iptek mengenai enzim amilase dan protease termostabil yang dihasilkan oleh bakteri termofilik pasca erupsi Merapi.

### **METODE PENELITIAN**

Penelitian meliputi dua tahap yaitu tahap pertama seleksi aktivitas enzim amilase dan tahap kedua yaitu seleksi aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh 348 isolat bakteri termofilik pasca erupsi Merapi. Kemudian menghitung indeks amilolitik dan proteolitiknya.

#### **Seleksi aktivitas enzim amilase**

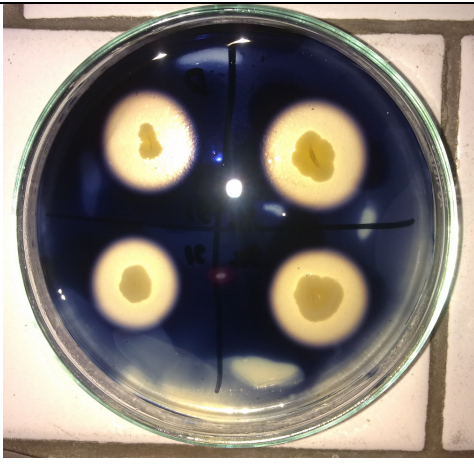
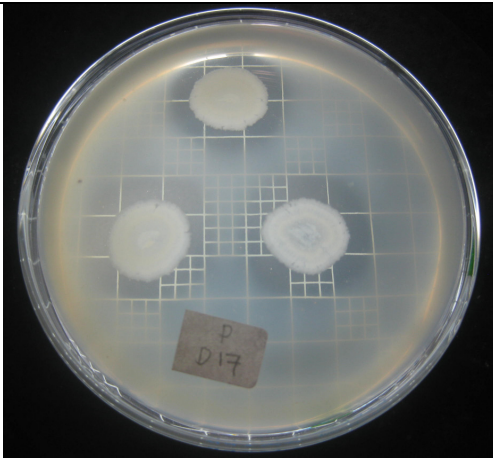
Isolat murni bakteri diinokulasi pada media Starch Agar (komposisi per liter: Nutrien broth 8 g; starch 5 g; agar 15 g). Diinkubasi selama 24 jam pada 55 °C, ditambahkan larutan iodine (I<sub>2</sub> = 1 g, KI = 2 g/ 300 ml) ke dalam plate, zona jernih dengan latar belakang biru di sekitar koloni menunjukkan adanya aktivitas amilase (Bragger *et al.*, 1989). Aktivitasnya kemudian diukur dengan indeks amilolitik = diameter zona jernih/diameter koloni (Ward, 1985).

### Seleksi aktivitas protease

Isolat murni bakteri ditumbuhkan pada medium untuk seleksi enzim protease (komposisi per liter: Nutrien broth 8 g; skim milk 10 g, agar 15 g). Diinkubasi selama 24 jam pada 55 °C, adanya zona jernih di sekitar koloni menunjukkan adanya aktivitas protease (Priest *et. al.* 1988). Aktivitasnya kemudian diukur secara semi kuantitatif dengan indeks proteolitik = diameter zona jernih/diameter koloni (Elidar & Nunuk, 2002).

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Aktivitas enzim amilase dan protease ditandai dengan adanya zona jernih di sekitar koloni setelah diinkubasi 24 jam pada suhu 55 °C. Zona jernih ini menunjukkan adanya produksi enzim ekstraseluler yang dikeluarkan oleh bakteri. Gambar 1 menunjukkan zona jernih di sekitar koloni bakteri pada media Starch Agar (SA). Zona jernih tampak setelah media ditetesi dengan iod. Sedangkan Gambar 2 menampakkan zona jernih di sekitar koloni bakteri pada media Skim Milk Agar.

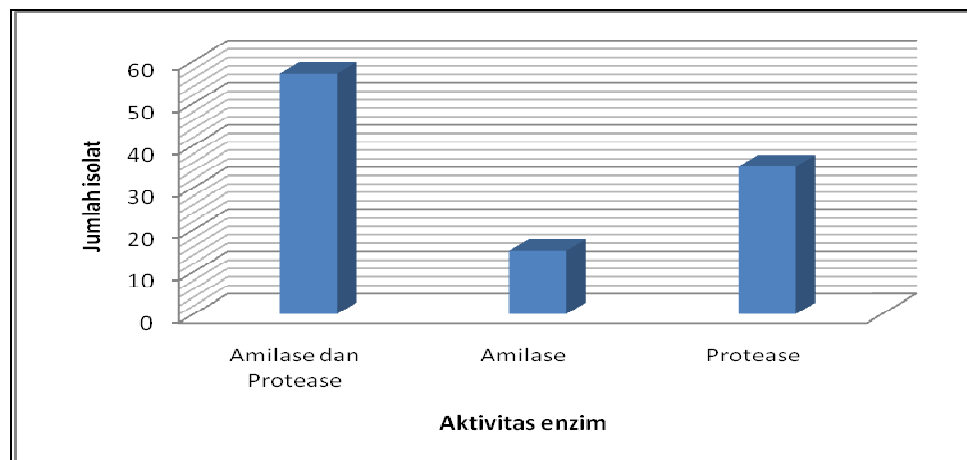
	
Gambar 1. Zona jernih di sekitar koloni pada medium Starch Agar	Gambar 2. Zona jernih di sekitar koloni pada medium Skim Milk Agar

Isolat bakteri mampu menghasilkan enzim ekstrasel ketika ditumbuhkan pada media uji starch agar dan skim milk. Hal ini dikarenakan enzim amilase dan protease merupakan *inducible enzim* yang akan diproduksi ketika terdapat amilum (starch) dan protein (casein dalam skim milk) dalam substrat.

Zona jernih di sekitar koloni bakteri pada medium Starch Agar (SA) menunjukkan aktivitas enzim amilase. Pewarnaan iodin merupakan salah satu metode untuk mendeteksi aktivitas  $\alpha$ -amilase dan berfungsi sebagai reagen pendeteksi adanya amilase (Sarah, Surya, R.P., dan Herdayanto, S.P., 2009). Amilase adalah kelompok enzim yang memiliki kemampuan untuk memutuskan ikatan glikosida yang terdapat pada molekul amilum. Hasil hidrolisis atau pemecahan molekul amilum ini adalah molekul-molekul yang lebih kecil seperti maltosa, dekstrin dan terutama molekul glukosa sebagai unit terkecil Reddy *et al.*, (2003) dalam Evy Y & Anna R (2013).

Pati (*starch*) adalah karbohidrat kompleks yang mengandung dua macam polimer, yaitu amilosa dan amilopektin, dalam komposisi yang berbeda-beda. Amilosa merupakan polisakarida, yaitu polimer yang tersusun dari glukosa sebagai monomernya. Setiap monomer terhubung dengan ikatan  $-(1,4)$  glikosidik. Amilosa adalah polimer yang tidak bercabang. Amilopektin merupakan polisakarida yang tersusun dari monomer  $\alpha$ -glukosa. Amilopektin merupakan molekul raksasa dan mudah ditemukan karena menjadi satu dari dua senyawa penyusun pati, bersama-sama dengan amilosa. Secara struktural amilopektin terbentuk dari rantai glukosa yang terikat dengan ikatan  $-(1,6)$  glikosidik, hal ini sama dengan yang terdapat pada amilosa. Namun demikian, pada amilopektin terbentuk cabang-cabang (sekitar tiap 20 mata rantai glukosa) dengan ikatan  $-(1,4)$  glikosidik.

Zona jernih di sekitar koloni bakteri pada media Skim Milk Agar menunjukkan bakteri ini telah mendegradasi skim milk (mengandung laktosa dan kasein) menjadi senyawa peptida dan asam amino yang sifatnya terlarut dalam media (Rosliana, 2009).



Gambar 3. Jumlah isolat bakteri yang mampu menghasilkan enzim amilase dan protease

Gambar 3 menunjukkan 57 isolat mampu memproduksi enzim amilase dan protease, 15 isolat hanya mampu memproduksi enzim amilase, dan 35 isolat hanya mampu memproduksi enzim protease. Hal ini menunjukkan keragaman isolat bakteri. Jumlah total isolat bakteri termofil yang menunjukkan aktivitas enzim ekstraseluler positif baik untuk amilase dan protease cukup banyak yaitu 107 dari 348 isolat yang diuji (30,75%). Hal ini disebabkan suhu inkubasi mempengaruhi produksi dan aktivitas enzim termostabil yang dikeluarkan oleh bakteri. Sedangkan Girinda (1993) dalam Merryandini dkk (2009) menyatakan ketika suhu bertambah sampai suhu optimum, kecepatan reaksi enzim naik karena energi kinetik bertambah. Bertambahnya energi kinetik akan mempercepat gerak vibrasi, translasi, dan rotasi baik enzim maupun substrat. Hal ini akan memperbesar peluang enzim dan substrat bereaksi. Ketika suhu lebih tinggi dari suhu optimum, protein berubah konformasi sehingga gugus reaktif terhambat. Perubahan konformasi ini dapat menyebabkan enzim terdenaturasi. Substrat juga dapat berubah konformasinya pada suhu yang tidak sesuai, sehingga substrat tidak dapat masuk ke dalam sisi aktif enzim.

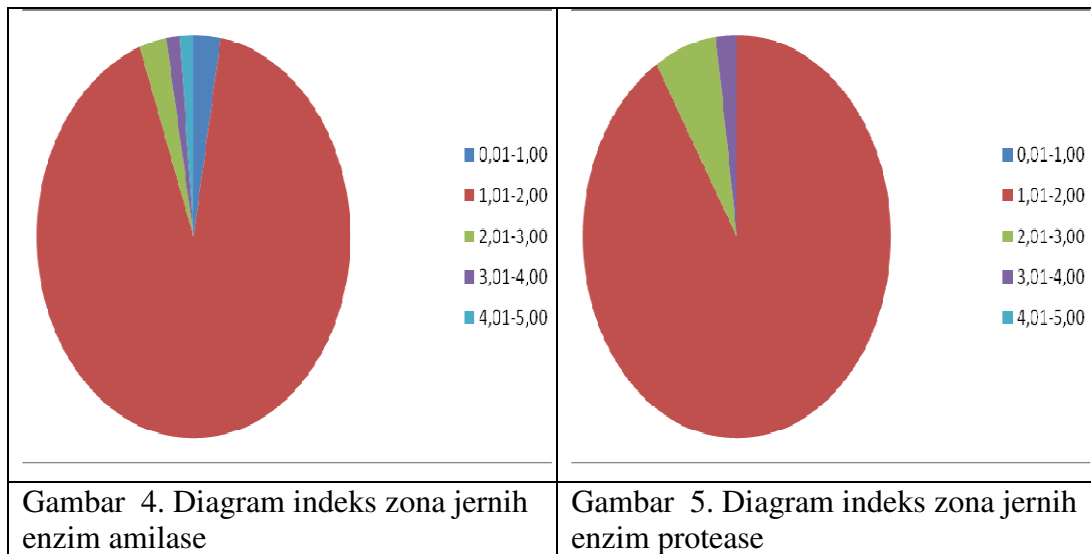
Tabel 1 menunjukkan jumlah isolat yang bersifat proteolitik lebih banyak dibandingkan amilolitik. Hal ini dimungkinkan karena habitat awal pengambilan sampel dari pasir dan air Kali Gendol Atas banyak mengandung protein. Protein dapat berasal dari sisa-sisa organisme yang telah mati. Selain itu juga dipengaruhi

suhu dan waktu inkubasi pada penelitian yaitu 55 °C dan waktu 24 jam lebih optimum untuk produksi enzim protease dibandingkan enzim amilase. Atlas (1997) menyatakan selama ini protease yang stabil di suhu tinggi banyak dihasilkan oleh bakteri termofilik. Julia E, Anja M, dan Lily N (2004) aktivitas optimum enzim protease dicapai pada suhu 55 °C. Sedangkan Hamad *et al* (2005) mengemukakan suhu optimum untuk biosintesis enzim amilase adalah 40 °C. Hasil penelitian Asgher *et al.* (2007) menunjukkan produksi enzim amilase termostabil mencapai puncaknya setelah inkubasi 48 jam.

Tabel 1. Indeks amilolitik dan proteolitik isolat bakteri

Indeks zona jernih	Jumlah isolat	
	Amilolitik	Proteolitik
0,01 – 1,00	2	0
1,01 – 2,00	66	84
2,01 – 3,00	2	6
3,01 – 4,00	0	2
4,01 – 5,00	2	0
Total jumlah isolat	72	92

Enzim ekstraseluler yang dihasilkan bakteri selanjutnya diukur secara semi kuantitatif dengan menghitung indeks amilolitik dan proteolitik masing-masing isolat. Tabel 1 menunjukkan indeks amilolitik dan proteolitik isolat bakteri bervariasi dari 0,01 sampai 5,00. Hal ini menunjukkan keragaman kemampuan menghasilkan enzim amilase dan protease. Semakin tinggi nilai indeks yang diperoleh maka produksi enzim ekstraseluler semakin besar. Isolat D79 mempunyai indeks amilolitik tertinggi yaitu 5,00 sedangkan isolat D104a mempunyai indeks proteolitik tertinggi yaitu 3,49.



Gambar 4 dan 5 menunjukkan mayoritas isolat bakteri memiliki indeks amilolitik dan proteolitik berkisar 1,01 sampai 2,00. Hal ini menggambarkan bahwa kemampuan mayoritas isolat bakteri menghasilkan enzim amilase dan protease belum cukup tinggi.

### Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Isolat bakteri termofilik pasca erupsi Merapi yang mampu menghasilkan enzim amilase dan protease sebanyak 57 isolat, hanya menghasilkan enzim amilase sebanyak 15 isolat, dan hanya menghasilkan enzim protease sebanyak 35 isolat pada suhu inkubasi 55 °C selama 24 jam.
2. Bakteri termofilik pasca erupsi Merapi isolat D79 memiliki indeks amilolitik tertinggi sedangkan isolat D104a memiliki indeks proteolitik tertinggi pada suhu inkubasi 55 °C selama 24 jam.

### Saran

1. Perlu dilakukan karakterisasi dan identifikasi isolat bakteri termofilik amilolitik dan proteolitik sampai tingkat spesies.
2. Perlu dilakukan isolasi dan karakterisasi enzim amilase dan protease yang dihasilkan isolat bakteri termofilik terpilih.

3. Perlu variasi suhu, pH, substrat, dan waktu inkubasi untuk mengetahui aktivitas enzim amilase dan protease paling optimal.
4. Penelitian lebih lanjut mengenai produk-produk bernilai ekonomis yang dapat dihasilkan dari proses degradasi amilum dan protein oleh bakteri termofilik.
5. Strain-strain *indigenous* Indonesia yang telah diperoleh tidak dimusnahkan tetapi disimpan dalam suatu kultur koleksi sehingga dapat dipelajari potensinya lebih lanjut.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adams, M.W.W. and Kelly, R.M. 1998. Finding and Using Hyperthermophilic Enzymes,. *TIBTECH* **16**: 329-332.
- Aguilar, A., Ingemansson, T., Magnien, E. 1998. Extremophile Microorganisms as Cell Factories : Support From The European Union, . *Extremophiles* **2**, 367-373.
- Anna Rakhmawati dan Evy Yulianti. 2012. Eksplorasi bakteri termofilik pasca erupsi Merapi sebagai penghasil enzim ekstraseluler. *Jurnal Saintek* Vol 17 no 1.
- Asgher, M., M Javaid Asad, S.U. Rahman, and R.L. Legge. 2007. A Thermostable  $\alpha$  amilase from moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering*. 79: 950-955
- Atlas, R.M. 1997. *Principle of Microbiology*, 2nd ed. WC Brown Publisher. USA
- Baker, G., Gaffar, S., Cowan, D. A., Suharto A. R. 2001. Bacterial Community Analysis of Indonesian Hotsprings,. *FEMS Microbiology Letters* **200**, 103-109.
- Bragger, J.M., Daniel, R.M., Coolbear, T., Morgan, H.W. 1989. Very stable enzymes from extremely thermophilic archaeobacteria and eubacteria,. *Applied Microbiology and Biotechnology* **31**,556-561.
- Demirjian, D., Moris Varas, F., Cassidy, C.S. 2001. Enzymes from Extremophiles, *Current Opinion in Chemical Biology* **5**, 144-151.
- Drajat, P., Anna R., dan Evy Y. 2012. Isolasi dan Uji Aktivitas Enzim Lipase Termostabil dari Bakteri Termofilik Pasca Erupsi Merapi.

- Edwards, C. 1990. *Thermophiles in Microbiology of Extreme Environment*. Ed 5. Clive Edwardas. Mc Graw Hill Publ. Comp. New York: 23
- Elidar, N dan Nunuk W. 2002. Isolasi, Seleksi, dan Optimasi Produksi Protease dari beberapa Isolat Bakteri. *Berita Biologi* 6 (3)
- Evy Yulianti dan Anna Rakhmawati. 2013. Isolasi dan Uji Aktivitas Enzim Amilase Termotabil Dari Bakteri Termofilik Pasca Erupsi Merapi. Prosiding semnas PBI.
- Hamad A., K. Rana., H. Zainab, and Ikram-ul-Haq. 2005. Production of alpha Amilase by Thermophilic Starain of *Bacillus licheniformis*. *Journal of Food Technology* 3 (1): 64-67
- Hartiko, H. 1992. *Biologi Mikroorganisme Termofil*. Pusat Antar Universitas-Biotek. Universitas Gadjah Mada, 25-30.
- Ibrahim A.S.S and Al Dewany. 2007. Isolation and Identification of New Cellulases Producing Thermophilic Bacteria from an Egyptian Hot Spring and Some Properties of the Crude Enzyme. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1(4): 473-478
- Illanes A. 1999. *Stability of biocatalysts*. Electronic Journal of Biotechnology. 2: 1-9
- Julia, E., A. Meryandini, dan Lily N., 2004. Karakterisasi Protease Ekstraseluler *Clostridium bifermentans* R14-1-b. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*. 9 (1): 9-12
- Kristjansson, J.K. 1989 .Thermophilic Organisms as Sources of Thermostable Enzymes,.*TIBTECH* 7: 349-353.
- Kumar S & Nussinov R. 2001. *How do thermophilic protein deal with heat ? A review*. Cell. Moll. Life Sci. 58: 1216– 233
- Meryandini, A, Wahyu W, Besty M., Titi C.S.,Nisa R, dan Hasrul S. 2009. Isolasi Bakteri Selulolitik dan Karakterisasi Enzimnya. *Makara, Sains*. VOL. 13, NO. 1: 33-38
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M., Antranikian, G. 1999. Extremophiles as a Source of Novel Enzymes For Industrial Application,. *Applied Microbial Biotechnology* 51: 711-729.
- Priest, G. F., Goodfellow, M., Todd, C.. 1988. A Numerical Classification of the genus *Bacillus*, .*Journal Of General Microbiology* 134, 1847-1882.

Roslina, P. 2011. Isolasi Bakteri Dan Uji Aktivitas Protease Termofilik Dari Sumber Air Panas Sipoholon Tapanuli Utara Sumatera Utara. <http://www.researchgate.net>. Tanggal 28 Februari 2011.

Sarah, Surya .R.P., Herdayanto S.P., 2009. Isolasi  $\alpha$ -amilase termotabil dari bakteri termofilik *Bacillus stearothermophilus*. FMIPA.ITS

Suriadikarta, D.A., Abdullah Abbas Id., Sutono, Dedi Erfandi, Edi Santoso, dan A. Kasno. 2011. Identifikasi Sifat Kimia Abu Vulkan, Tanah dan Air di Lokasi Dampak Letusan Gunung Merapi. Balai Penelitian Tanah, Bogor

