

Isolasi Komunitas Bakteri Termofilik Selulolitik dari Kompos Serta Identifikasi Fenotipik dan Genotipik dengan Metode Sscp

Khamdan Ali Al Bashori, Nies S. Mulyani, Agustina L.N. Aminin

Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang

Corresponding author: agustina_lna@undip.ac.id

ABSTRAK

Bioetanol sebagai sumber energi alternatif baru dapat dihasilkan dari degradasi selulosa secara enzimatik. Proses enzimatik degradasi selulosa menggunakan enzim termostabil yang dihasilkan oleh bakteri termofilik selulolitik. Kompos diketahui merupakan habitat alami bakteri termofilik selulolitik. Eksplorasi sumber bakteri baru penghasil enzim selulase termostabil untuk mengoptimalkan potensi kompos. Isolasi bakteri termofilik selulolitik dari kompos dan identifikasi fenotipik dan genotipik untuk mengetahui profil dan perkiraan jumlah bakteri dari komunitas bakteri telah dilakukan. Hasil penelitian diperoleh isolat komunitas bakteri termofilik selulolitik kompos yang mampu tumbuh pada media CMC. Identifikasi fenotipik menghasilkan lima kenampakan koloni bakteri serta tiga bentuk morfologi bakteri. Data SSCP menunjukkan tiga profil komunitas bakteri dan ada sekitar sembilan spesies yang tumbuh baik pada media CMC. Korelasi kedua identifikasi membuktikan bahwa adanya komunitas bakteri termofilik penghasil enzim selulase pada kompos termofilik.

Kata kunci: bakteri selulolitik, kompos termofilik, SSCP

PENDAHULUAN

Meningkatnya kebutuhan energi seiring perkembangan teknologi memicu pencarian sumber energi baru yang dapat diperbarui dan ramah lingkungan. Penggunaan selulosa dengan mengubahnya menjadi bahan baku pembuatan bioetanol sebagai sumber energi baru dinilai cukup menjanjikan. Proses konversi selulosa menjadi bioetanol yang begitu panjang menjadi alasan pencarian teknik konversi yang lebih efektif. Salah satu caranya adalah biokonversi enzimatik menggunakan enzim selulase termostabil (Kovacs, 2009). Enzim selulolitik termostabil mempunyai kemampuan optimum pada suhu tinggi, sehingga proses biokonversi selulosa menjadi lebih cepat (Zambare dkk., 2011). Salah satu mikroorganisme penghasil enzim selulase termostabil adalah bakteri termofilik selulolitik dari habitat sumber mata air panas (Aminin dkk., 2008) dan kompos (Baharuddin dkk., 2010).

Menurut Iyengar dan Bhawe, (2005) proses pengomposan melibatkan mikroorganisme mesofilik dan termofilik. Mikroorganisme dalam kompos menggabungkan oksigen dan karbon untuk menghasilkan karbondioksida dan energi,

sebagian energi digunakan untuk pertumbuhan, sisanya dilepaskan sebagai panas (Jenkins, 2005). Energi panas yang dihasilkan merupakan parameter adanya aktivitas mikroorganisme selulolitik dalam kompos. Beberapa mikroorganisme telah ditemukan di dalam kompos seperti *Bacillus brevis*, *B. subtilis*, *Thermus sp.*, *Aspergillus fumigatus*, *Sporotrichum thermophile*, (Jenkins, 2005). Proses degradasi selulosa oleh mikroorganisme selulolitik tidak lepas dari peran kompleks enzim selulase yang dihasilkan bakteri.

Enzim selulase merupakan sistem enzim yang kompleks yang digunakan untuk memecah selulosa menjadi glukosa atau senyawa oligosakarida lainnya (Pham dkk., 2010). Enzim selulase termostabil dari bakteri termofilik banyak digunakan dalam industri karena kestabilannya pada suhu tinggi. Tingginya kebutuhan akan enzim selulase termostabil memberikan tuntutan pencarian sumber-sumber alternatif bakteri termofilik selulolitik.

Karakterisasi komunitas bakteri termofilik selulolitik kompos diperlukan untuk mengetahui profil komunitas serta perkiraan jumlah bakteri penghasil enzim selulase yang tumbuh pada media CMC. Langkah kerjanya dengan

mengisolasi komunitas bakteri termofilik selulolitik dari kompos serta identifikasi secara fenotipik dan genotipik. Identifikasi fenotipik meliputi pengamatan kenampakan koloni bakteri dan pengamatan bentuk sel bakteri, sedangkan identifikasi genotipik menggunakan metode SSCP (*Single Strand Conformation and Polymorphism*) untuk mengetahui profil komunitas dan perkiraan jumlah spesies yang mampu terisolasi (Aminin dkk., 2008).

Penelitian ini diharapkan mampu memberikan gambaran akan keragaman jumlah spesies bakteri termofilik selulolitik dalam kompos sebagai dasar untuk pengembangan proses degradasi enzimatik selulosa yang lebih efisien.

METODE PENELITIAN

1. Alat dan Bahan

1.1 Alat: Alat-alat yang dipakai dalam penelitian ini adalah neraca analitik, cawan petri, *spreader*, labu erlenmeyer, termometer, petri disk, *magnetic stirrer*, *autoclave*, inkubator, gelas beker, gelas ukur, pipet tetes, pengaduk, tabung rol film, plastik kaca, aluminium foil, mikrotube, mikropipet, mikrotip, mikrosentrifus, labu ukur, bunsen, penjepit, lemari pendingin, peralatan elektroforesis gel agarose, peralatan elektroforesis gel poliakrilamide, UV transluminator, mesin PCR (GeneAmp per system), mikroskop, spektro UV (Beckman UD-65 Spectrophotometer).

1.2 Bahan: Kompos termofilik, *yeast extract*, *beef extract*, pepton, KH_2PO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 , FeCl_2 , Na_2HPO_4 , CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*), pasir laut steril, SDS, kloroform, isoamil alkohol, isopropanol, proteinase-K, ddH_2O steril, *taq* polimerase, primer Com1-F, primer Com2-R, buffer PCR (Master Mix Blue), alkohol 70 %, H_2O , NaCl , etanol, bufer ekstraksi DNA, akrilamide, N,N-methylen bisakrilamide, ammonium persulfat, TEMED, aquabidest, EDTA, es batu, tris base, asam borat, asam acetat glacial, xilene cyanol, formamide, bromphenol blue, NaOH , agarose, AgNO_3 , formaldehyde, natrium karbonat, natrium tiosulfat, bacto agar, Na_2CO_3 anhidrat, K-Na tartrat, NaHCO_3 , NaSO_4 anhidrat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, H_2SO_4 pekat, ammonium molibdat, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan *methylen blue*, Nelson A, Nelson B, Arsenomolibdat.

2. Cara Kerja

2.1 Preparasi

Sampel kompos yang digunakan adalah kompos yang berasal dari kompos pertanian yang telah mencapai suhu 55°C . Media cair yang digunakan adalah media CMC, setiap 200 mL media berisi *yeast extract* 0,4 g, *beef extract* 0,8 g, pepton 1 g, KH_2PO_4 0,2 g, MgSO_4 0,04 g, CaCl_2 0,6 g, FeCl_2 0,056 g, Na_2HPO_4 0,2 g, CMC 1 g. Untuk media padat, setiap 100 mL media mengandung *yeast extract* 0,2 g, *beef extract* 0,4 g, pepton 0,51 g, KH_2PO_4 0,1 g, MgSO_4 0,02 g, CaCl_2 0,3 g, FeCl_2 0,028 g, Na_2HPO_4 0,1 g, CMC 0,5 g dan bacto agar 2,5 g (Baharuddin dkk., 2010).

2.2 Kultivasi Bakteri Termofilik Selulolitik

Sampel kompos sebanyak 10 g disuspensi ke dalam 90 mL aquadest steril dan disaring menggunakan kain. Sebagian filtrat disaring kembali dengan membran berpori $0,2 \mu\text{m}$. Bakteri termofilik diisolasi dari kompos dengan media CMC cair dan CMC padat. Kultivasi media padat menggunakan media CMC padat menggunakan 3 petri disk. Tiga petri disk diisi 30 mL media CMC padat, kemudian suspensi kompos hasil filtrasi dikultivasi dengan cara disebar menggunakan *spreader* dan diinkubasi pada suhu 55°C selama 5 hari.

Pada media CMC cair, 50 mL media pada erlenmeyer yang telah ditambah 0,25 mL filtrat suspensi kompos diinkubasi selama 5 hari pada suhu 55°C disertai kontrol. Media cair yang telah ditumbuhi bakteri digunakan sebagai sampel uji penentuan aktivitas enzim selulase.

2.3 Uji Aktivitas Enzim Selulase

Sebagai parameter uji aktifitas enzim selulase, pada penelitian ini menggunakan penentuan kadar glukosa yang dihasilkan dari degradasi CMC oleh kompleks enzim selulosa dari bakteri termofilik selulolitik kompos. Sampel yang digunakan adalah media cair CMC diambil 5 sampel setiap 24 jam sekali. Lima sampel yang diuji diambil dari media pertumbuhan bakteri dengan selang waktu 24 jam untuk tiap sampel. Mulai dari hari ke-0, 1, 2, 3, hingga hari ke-4. Sampel media pertumbuhan bakteri diambil sebanyak 1 mL kemudian ditambah 1 mL reagen Nelson (Nelson A dan Nelson B) selanjutnya dipanaskan dalam air mendidih selama 20 menit. Didinginkan hingga suhu 25°C kemudian

ditambahkan reagen arsenomolibdat sebanyak 1 mL selanjutnya digojog. Larutan ditambahkan aquades hingga volume 10 ml dan dilakukan penggojogan hingga homogen. Absorbansi masing-masing larutan diukur dengan UV-Vis pada panjang gelombang 520 nm. Panjang gelombang tersebut diperoleh dari pengukuran panjang gelombang maksimal menggunakan larutan glukosa standart dengan konsentrasi 1 mg/L. Penentuan kurva standart dilakukan sesuai dengan perlakuan pengukuran pada sampel dengan variasi konsentrasi larutan glukosa 1 mg/L, 0,8 mg/L, 0,6 mg/L, 0,4 mg/L, dan 0,2 mg/L.

2.4 Identifikasi Fenotipik

Identifikasi fenotipik digunakan untuk melihat kenampakan koloni bakteri pada media padat dan kenampakan bentuk sel secara mikroskopis. Kenampakan koloni bakteri dibedakan dengan kenampakan warna, bentuk, permukaan dan pinggiran. Secara mikroskopis, bentuk sel bakteri akan terlihat dengan pewarnaan sederhana. Pewarnaan sederhana menggunakan *methylene blue* yang diteteskan pada preparat sampel bakteri. Bentuk sel bakteri akan terlihat pada perbesaran 1000 kali.

2.5 Identifikasi Genotipik

Ekstraksi DNA Kromosom Bakteri

Ekstraksi DNA bakteri menggunakan metode Zhou yang telah dimodifikasi (Aminin dkk., 2008). Ekstraksi DNA kromosom bakteri berasal dari isolat asli kompos hasil filtrasi dengan membran mikropori dan bakteri hasil pengkulturan dalam media CMC cair. Komunitas asli bakteri kompos diisolasi dengan menyaring suspensi kompos dalam aquades steril menggunakan membran 0,02 μm pori untuk mendapatkan pelet sel isolat asli bakteri kompos, sedangkan isolat bakteri hasil kultivasi diperoleh dengan sentrifugasi media yang telah ditumbuhi bakteri dengan kecepatan 2500 rpm selama 30 menit. Kedua pelet sel dicampur dengan 300 μL bufer ekstraksi DNA, 10 μL proteinase K dan 0,2 g pasir laut steril kemudian digojog selama 10 menit dan ditambahkan 30 μL 20 % SDS. Inkubasi pada suhu 60 °C selama satu jam dan disentrifugasi pada 5.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh ditambah campuran kloroform-isoamil alkohol (24:1, v/v)

dan disentrifugasi hingga diperoleh supernatan. Supernatan ditambahkan satu volume isopropanol dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 10 menit sehingga diperoleh pelet kasar lalu dicuci dengan alkohol dingin 70 % kemudian dilarutkan kembali dengan TE sampai volume akhir 20 μL . Hasil ekstraksi DNA kromosom kemudian dianalisa menggunakan elektroforesis agarosa dan kemurnian DNA kromosom diukur dengan spektro UV.

Amplifikasi DNA Kromosom Hasil Isolasi dengan PCR

Amplifikasi DNA kromosom hasil isolasi dari pelet sel bakteri menggunakan PCR GeneAmp. Satu mikroliter sampel DNA dalam mikrotube ditambahkan larutan mega mix blue 12,5 μL , ddH₂O 9,5 μL , Com1-F 1 μL , Com2-R 1 μL , dan DNA template sebanyak 1 μL , kemudian dimasukkan ke dalam set PCR dan diamplifikasi untuk primer Com1F dan Com2R dengan inisiasi 95 °C selama 5 menit, mengalami 30 siklus, tiap siklus mengalami tahap denaturasi pada suhu 95 °C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 50 °C selama 1 menit dan *extension* pada suhu 72 °C selama 1 menit serta *final extension* setelah siklus ke-30 pada suhu 72 °C selama 10 menit. Amplikon yang diperoleh dianalisis menggunakan elektroforesis agarosa.

Single Strand Conformation and Polymorphism (SSCP)

Sebagai sampel elektroforesis poliakrilamida. hasil PCR sebanyak 5 μL ditambah larutan loading (95 % formamide, 0,25 % xylene cyanol, 0,25 % bromofenol biru) kemudian dipanaskan pada 100 °C selama 5 menit dan segera didinginkan dalam es. Gel poliakrilamida dipre-run selama 30 menit pada tegangan 200 V dan suhu 4 °C sebelum dimasuki sampel. Sampel diisikan ke dalam sumuran gel poliakrilamida 10 % dan dielektroforesis pada gel poliakrilamide 10 % tanpa denaturasi pada tegangan 200 Volt selama 3 jam pada suhu 4 °C.

Gel poliakrilamide hasil elektroforesis diwarnai menggunakan pewarnaan perak. Gel direndam 10 % asam asetat selama 24 jam lalu gel dicuci dengan aquadest 3 x 5 menit. Kemudian gel direndam dalam 100 mL larutan perak nitrat yang mengandung 0,1 % AgNO₃ dan 150 μL formaldehyde 37 % selama 45 menit, lalu

gel dicuci dengan aquadest dan segera direndam dengan larutan *developing* (10 mL larutan terdiri dari 10 % NaCO₃, 150 µL formaldehyde dan 20 µL Na-tiosulfat (10 mg/mL)) selama beberapa menit hingga muncul pita-pita gelap pada gel. Perendaman dihentikan setelah warna *background* gel berubah menjadi hampir gelap dan segera dicuci dengan asam asetat 10 %.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Penyiapan Sampel Kompos

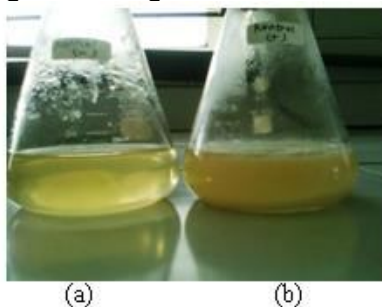
Kompos yang digunakan adalah kompos dari limbah pertanian. Pengukuran dilakukan selama per 24 jam sekali. Sampel kompos diambil setelah suhu kompos mencapai optimal. Hasil pengukuran suhu tercatat suhu optimal kompos 55 °C.

2. Pembuatan Media Pertumbuhan Bakteri

Semua bahan-bahan pembuat media dilarutkan pada aquadest 200 mL. Untuk media padat ditambahkan bacto agar untuk memadatkan media. Pasteurisasi kedua media untuk membunuh kontaminan.

3. Kultivasi Bakteri Termofilik Selulolitik

Media yang digunakan adalah media pertumbuhan dengan penambahan substrat CMC (*carboxymetil cellulose*). Kultivasi pada media ini menggunakan kultur bakteri dari suspensi kompos pada aquadest steril. Inkubasi pada suhu 55 °C pada inkubator goyang. Hasilnya, pada hari kedua media yang ditambah kultur suspensi kompos dalam aquadest steril mejadi lebih keruh dibanding kontrol negatif.

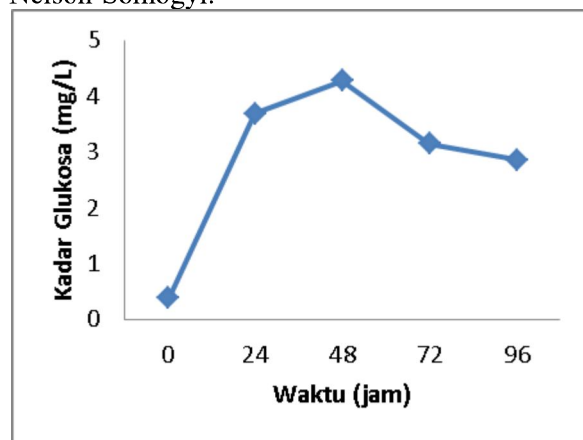


Gambar 1. Kultur bakteri pada media cair, (a) kontrol negative, (b) kontrol positif.

Kekeruhan berubah setelah hari ke-2. Kekeruhan media menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri termofilik selulolitik pada media CMC cair.

4. Uji Aktivitas Enzim Selulase

Pengujian aktivitas enzim ini ditujukan untuk membuktikan bahwa bakteri termofilik selulolitik mampu mendegradasi selulosa menghasilkan glukosa dengan bantuan kompleks enzim selulase termostabil yang dihasilkannya. Substrat CMC didegradasi oleh enzim selulase menjadi bahan makanan dari bakteri selulolitik. Kompleks enzim inilah yang mampu memecah ikatan pada selulosa menjadi glukosa. Glukosa yang dihasilkan diukur dengan metode gula pereduksi Nelson-Somogyi.



Gambar 2. Kurva pengukuran kadar glukosa hasil degradasi selulosa

Pengukuran dari jam ke-0 hingga ke-48 menunjukkan peningkatan kadar glukosa secara signifikan karena pada range waktu tersebut proses degradasi selulosa mencapai kinerja maksimal. Proses ini tidak selamanya menghasilkan kenaikan kadar glukosa, yang ditunjukkan dengan penurunan kadar glukosa yang dihasilkan pada jam ke-72. Penurunan ini disebabkan oleh menurunnya substrat selulosa sebagai makanan bakteri, sebagai gantinya glukosa hasil degradasi digunakan sebagai bahan makanan bakteri pengganti selulosa untuk bertahan hidup. Gambar 2 menunjukkan adanya peningkatan kadar glukosa dari jam ke-0 hingga jam ke-48 dan mengalami penurunan pada jam ke-72 dan ke-96. Kadar glukosa tertinggi diperoleh pada jam ke-48 sebesar 0,427 mg/L. Grafik ini memberikan gambaran bahwa di dalam kompleks enzim terdapat selulosa yang mampu mendegradasi CMC. Secara teoritis, semakin bertambahnya waktu inkubasi produk hasil penguraian enzim akan semakin tinggi. Namun dalam grafik tampak adanya penurunan setelah

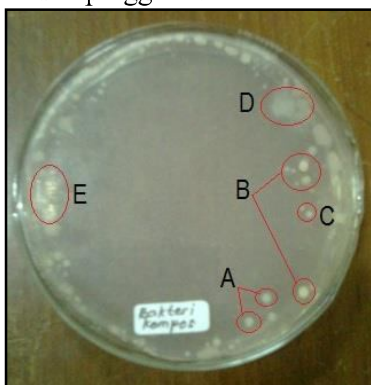
jam ke 48. Selulase adalah jenis enzim yang bisa diinhibisi balik oleh produknya sendiri. Jika terjadi inhibisi balik, umumnya grafik akan menunjukkan pola stationer saat terjadi inhibisi balik, namun pada gambar 2 justru terjadi penurunan. Hal tersebut terjadi kemungkinan disebabkan oleh terikatnya sebagian produk yang sudah jenuh ke seluruh sisi aktif enzim yang menyebabkan seolah-olah jumlah produk berkurang.

Pengamatan secara mikroskopis pada bakteri menunjukkan beberapa bentuk sel bakteri. Pewarnaan sederhana dengan satu macam zat warna (metylen blue) bertujuan untuk melihat bentuk sel bakteri. Pewarnaan sederhana ini merupakan pewarna yang paling umum digunakan. Pewarnaan Sederhana merupakan satu cara yang cepat untuk melihat bentuk bakteri secara umum.

5. Identifikasi Fenotipik

5.1. Kenampakan Koloni Bakteri

Penelitian ini menggunakan identifikasi fenotipik bakteri termofilik selulolitik kompos sebagai tahap awal dari identifikasi suatu komunitas bakteri. Data morfologi bakteri termofilik selulolitik diperoleh dari pengamatan koloni kultur pada media padat. Pengamatan ini dilakukan untuk memperoleh jumlah koloni dan menemukan perbedaan-perbedaan warna, bentuk, permukaan dan pinggiran.



Gambar 3. Koloni bakteri selulolitik kompos

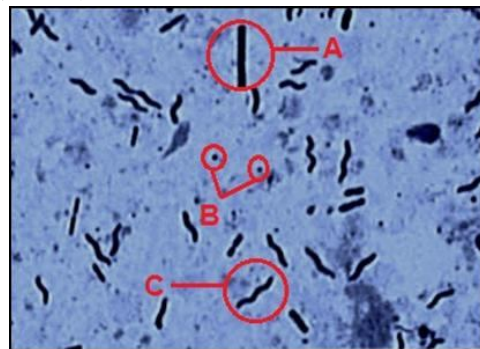
Perbedaan kenampakan koloni mengindikasikan adanya perbedaan spesies yang tumbuh pada koloni tersebut. Pada satu koloni dimungkinkan terdapat dua spesies bakteri atau lebih (Madigan, 1997).

Tabel 1. Morfologi koloni bakteri

Koloni	Warna	Bentuk	Permukaan	Pinggiran
A	putih	bulat	datar	halus
B	putih kekuningan	bulat	timbul	halus
C	putih	bulat	timbul	halus
D	kecoklatan	menyebar	datar	tidak teratur
E	kuning	menyebar	timbul	bergelombang

Koloni-koloni bakteri termofilik yang tampak adalah koloni A, B, C, D, dan E yang mempunyai warna, bentuk, permukaan, dan pinggiran yang berbeda yang ditunjukkan oleh tabel IV.1. Koloni dengan bentuk dan warna yang berbeda terbentuk dari mikroorganisme yang berbeda-beda (Madigan, 1997). Dapat disimpulkan bahwa dalam suatu koloni bakteri mampu ditumbuhi oleh lebih dari satu jenis bakteri.

Pengamatan secara mikroskopis pada bakteri menunjukkan beberapa bentuk sel bakteri. Pewarnaan sederhana dengan satu macam zat warna (*metylen blue*) bertujuan untuk melihat bentuk sel bakteri. Pewarnaan sederhana ini merupakan pewarna yang paling umum digunakan.



Gambar 4. Bentuk sel bakteri selulolitik kompos

Koloni bakteri terlihat pada mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Sampel berasal dari bakteri hasil kultivasi pada media padat. Gambar di atas menunjukkan kultur bakteri didominasi bentuk basil, kokus dan spirilia.

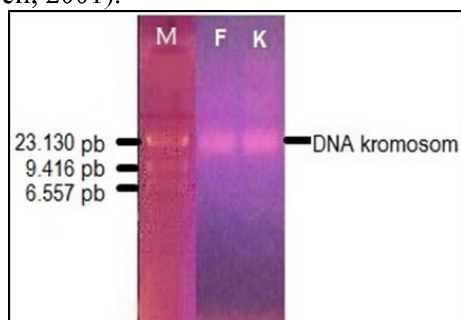
6. Identifikasi Genotipik

6.1. Ekstraksi DNA Kromosom Bakteri

Untai DNA diperoleh dengan ekstraksi dengan menggunakan metode Zhou yang telah dimodifikasi (Aminin dkk., 2008). Ekstraksi DNA dilakukan pada sel mikroorganisme hasil

filtrasi dan sel komunitas bakteri hasil kultivasi. Isolasi dan pemurnian DNA kromosom bertujuan untuk memisahkan DNA kromosom dari sel dan komponen-komponen lain di dalam sel tersebut. Sel isolat asli dari bakteri termofilik selulolitik kompos dilakukan dengan mensuspensi aquadest steril dan selanjutnya disaring dengan membran mikro pori dengan ukuran 0,2 μm . Suspensi sel kompos diperoleh dari penyaringan dengan menggunakan corong khusus dengan membran yang memiliki ukuran pori 0,02 μm (Aminin dkk., 2008). Menurut Pelczar dan Chan, (2005) ukuran bakteri berkisar antara 0,75 – 1,15 μm .

Analisa hasil isolasi DNA kromosom dilakukan dengan metode elektroforesis menggunakan gel agarose. Elektroforesis DNA merupakan teknik untuk memisahkan sampel DNA berdasarkan atas ukuran (berat molekul) dan struktur fisik molekulnya. Gel yang biasa digunakan adalah gel agarosa dan gel poliakrilamida (Sambrook and Russell, 2001).



Gambar 5. Elektroforegram elektroforesis DNA kromosom hasil isolasi. M: marker DNA kromosom, F: DNA kromosom dari suspensi sel bakteri pada filter, K: DNA kromosom bakteri hasil kultivasi pada media CMC cair

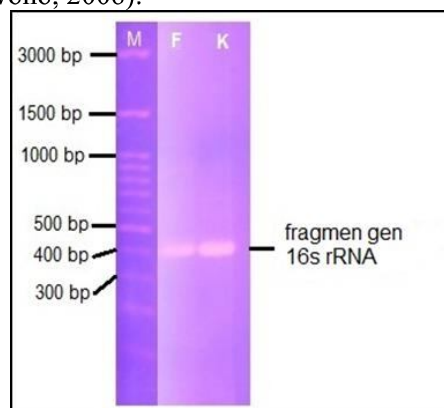
Kolom M menunjukkan marker DNA kromosom (λ HindIII), kolom F menunjukkan DNA kromosom dari bakteri isolat asli kompos, kolom K menunjukkan DNA kromosom dari bakteri hasil kultivasi pada media CMC. Semua pita DNA muncul dalam ukuran yang sama, sekitar 23 kb yang membuktikan bahwa pita-pita ini merupakan DNA kromosom dari bakteri (Aminin dkk., 2008).

6.2. Analisis Menggunakan SSCP

Penelitian ini menggunakan metode *Single Strand Conformation and Polymorphism* (SSCP). Menurut Gupta dkk. (1999) SSCP merupakan pemisahan asam nukleat rantai tunggal hasil

amplifikasi PCR dengan elektroforesis melalui gel poliakrilamid dan berdasarkan pada perbedaan berat molekul pasangan basa. Prinsip dari metode ini adalah perbedaan konformasi dari DNA untai tunggal pada panjang rantai DNA untai tunggal yang sama. Perubahan konformasi ini dapat dideteksi dengan perubahan laju migrasi DNA untai tunggal pada *nondenaturing polyacrylamid gel*.

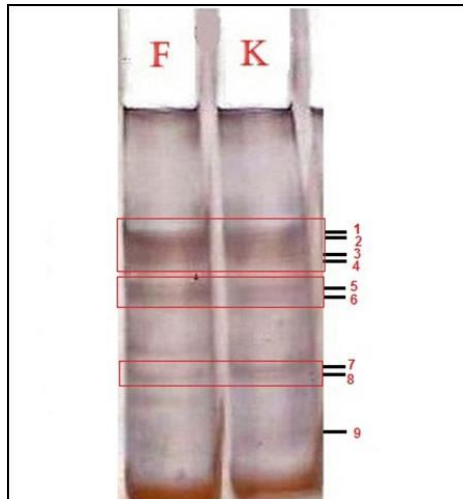
Hasil isolasi DNA digandakan dengan bantuan enzim-enzim dan primer, proses penggandaan ini dikenal sebagai proses amplifikasi. Proses tersebut dilakukan pada kondisi suhu dan siklus penggandaan tertentu, yang dapat diatur pada mesin PCR (thermocycle). Proses ini disebut dengan reaksi rantai polimerase (polymerase chain reaction, PCR) karena merupakan siklus penggandaan yang berulang sehingga kegiatan ini seolah-olah merupakan suatu proses reaksi berantai. *Polymerase Chain Reaction* merupakan teknik perbanyakan DNA secara in vitro (Yuwono, 2006).



Gambar 6. Elektroforegram amplicon fragmen gen 16s rRNA hasil PCR dengan primer Com1F dan Com2R. F: DNA bakteri hasil filtrasi, K: DNA bakteri kultur, M: marker DNA 100 bp

Gambar 6. menunjukkan pita-pita DNA hasil amplifikasi mempunyai panjang basa sebesar 400 bp. Marker yang digunakan adalah marker DNA kromosom sebagai penanda ukuran DNA yang teramplifikasi dengan jarak pemisahan sebesar 100 bp. Hasilnya, DNA kromosom dari isolat asli kompos dan DNA bakteri hasil kultivasi teramplifikasi dengan menggunakan primer Com1F dan Com2R dan terukur pada harga 400 bp. Pemaparan pada *UV transluminator* bertujuan untuk menampakkan pita-pita DNA pada gel elektroforesis. Asam nukleat dapat mengabsorpsi

sinar UV karena adanya basa nitrogen yang bersifat aromatik. Hasil sintesis DNA dalam satu siklus dapat berperan sebagai cetakan (template) pada siklus berikutnya sehingga jumlah DNA target menjadi berlipat dua pada setiap akhir siklus. Dengan kata lain DNA target meningkat secara eksponensial, sehingga setelah 30 siklus akan menghasilkan milyaran ampikon DNA target.



Gambar 7. Hasil identifikasi genotipik komunitas bakteri kompos dengan SSCP. F: sumuran keragaman bakteri dari kompos, K: sumuran keragaman bakteri hasil kultivasi pada media CMC cair

Kolom F menunjukkan sumuran isolat asli bakteri kompos, kolom K merupakan sumuran bakteri hasil kultivasi pada media CMC. Sembilan pita DNA tampak pada kolom K. Kotak merah menunjukkan 3 profil komunitas bakteri termofilik selulolitik yang dominan pada media CMC.

Berdasarkan gambar 7, tiga profil keragaman komunitas bakteri termofilik selulolitik menunjukkan bahwa bakteri pada kompos mampu tumbuh pada media CMC. Komunitas bakteri termofilik selulolitik terdeteksi dengan munculnya 9 pita DNA pada kolom K yang menunjukkan jumlah spesies yang tumbuh pada media CMC. Pita-pita yang tampak pada kolom F namun tidak tampak pada kolom K, menunjukkan adanya spesies bakteri kompos yang tidak tumbuh pada media CMC.

6.3. Hubungan Identifikasi Fenotipik dan Identifikasi Genotipik

Karakterisasi suatu mikroorganisme dari habitat alami untuk keperluan identifikasi spesies diperlukan identifikasi fenotipik dan genotipik. Kedua identifikasi ini berfungsi untuk mengetahui kelimpahan suatu mikroorganisme di dalam suatu habitat. Identifikasi fenotipik berdasarkan pengamatan kasat mata. Pengamatan suatu mikroorganisme secara kasat mata mempunyai kekurangan yaitu timbulnya bias dalam pengamatan. Hal ini akan berakibat tidak akuratnya data yang diperoleh khususnya dalam penentuan jumlah spesies suatu komunitas mikroorganisme dari suatu habitat alami.

Identifikasi pada tingkatan DNA merupakan identifikasi tanpa menimbulkan bias pengamatan karena setiap spesies memiliki urutan DNA yang berbeda-beda. Urutan DNA inilah yang akan digunakan dalam identifikasi genotipik untuk menentukan jumlah spesies ataupun profil suatu komunitas mikroorganisme.

Berdasarkan hasil penelitian ini, data fenotipik menunjukkan adanya 5 koloni bakteri termofilik selulolitik dari kompos yang tumbuh baik pada media CMC. Selain itu juga diperoleh data 3 bentuk morfologi sel yang berbeda yaitu, basil, spirilia dan kokus. Sedangkan untuk identifikasi genotipik menunjukkan adanya 3 profil kelimpahan bakteri termofilik selulolitik kompos yang tumbuh baik pada media CMC serta 9 pita yang tampak pada kolom bakteri kultur pada media. Perbedaan hasil kedua identifikasi ini mengindikasikan adanya bias pengamatan dan secara tidak langsung juga menunjukkan adanya suatu keragaman komunitas bakteri termofilik selulolitik dalam kompos dan mampu diisolasi pada media CMC.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Komunitas bakteri termofilik selulolitik dari kompos telah terisolasi pada media CMC.
2. Identifikasi fenotipik menampakkan 5 tipe koloni bakteri termofilik yang berbeda dan didominasi bakteri berbentuk basil, spirilia dan kokus.
3. Identifikasi genotipik mendeteksi adanya 3 profil komunitas bakteri serta dimungkinkan terdeteksi 9 spesies yang menunjukkan

keragaman spesies bakteri termofilik dari kompos yang tumbuh baik pada media CMC.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Aminin, L.N.A., Purwantisari, S., Mulyani, N.S., 2008, "SSCP Profiles of 16s rRNA Gene of Thermophilic Bacterial Communities Inhabiting The Local Hot Stream", Proceeding Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia (UNS-UNDIP-UNNES), ISBN 978-979-19215-0-3
- [2] Baharuddin, A.S., Razak, M.N.A., Hock, L.S., Ahmad M.N., Aziz, S.A., Rahman, N.A.A and Shah, U.K.M., 2010, "Isolation and Characterization of Thermophilic Cellulase-Producing Bacteria from Empty Fruit Bunches-Palm Oil Mill Effluent Compost", *American Journal of Applied Sciences* 7 (1): 56-62
- [3] Gupta, P.K., Varshney, R.K., Sharma, P.C., dan Ramesh, B., 1999, "Molecular Markers and Their Application in Wheat Breeding", *Plant Breeding*, 118: 369-390
- [4] Iyengar, S.R. dan Bhave P.P., 2005, "In-vessel composting of household wastes", *J. Waste Manage*, 26: 1070-1080. DOI: 10.1016/j.wasman. 2005.06.011 PMID: 16153815
- [5] Jenkins, J., 2005, "*The Humanure Handbook*", edisi ke-3, Chelsea Green Publishing, USA
- [6] Kovacs, K., 2009, "Production of Cellulolytic Enzymes with *Trichoderma atroviride* Mutants for The Biomass-To-Bioethanol Process"; Doctoral Thesis, Budapest University Of Technology And Economics Faculty of Chemical and Bioengineering, Department Of Applied Biotechnology and Food Science
- [7] Madigan, M.T., Martinko, J.M., dan Parker, J., 1997, "*Brock Biology of Microorganisms*", Eighth edition, Prentice Hall International, Inc., New Jersey
- [8] Pham, T.H., Quyen, D.T., Nghiem, N.M., 2010, "Optimization of Endoglucanase by *Aspergillus niger* VTCC-F021", *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(9): 4151-4157
- [9] Pelczar, M.J, dan Chan, E.S.C., 2005, "*Dasar-Dasar Mikrobiologi*", Alih Bahasa: Hadioetomo, R.S., Imas, T., Tjicosomo, S.S., dan Angka, S.L., UI Press, Jakarta
- [10] Sambrook, J., Russell, D.W., 2001, "*Molecular Cloning : A laboratory Manual*", 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- [11] Yowono, T., 2007, "*Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*", Andi Publisher, Yogyakarta
- [12] Zambare, V., Zambare, A., Muthukumarappan, K., Christoper, L.P., 2011, "Biochemical Characterization of Thermophilic Lignocelluloses Degrading Enzymes and Their Potential for Biomass Bioprocessing", *International Journal of Energy and Environment*, Volume 2, Issue 1, pp.99-112