

Studi Filogeni dan Uji Potensi Enzim Ekstraseluler (amilase, β -galaktosidase, protease, katalase) Isolat *Alicyclobacillus sp.* Gedong Songo

Mahreta suhartanti^a, Purbowatiningrum Ria Sarjono^{a*}, Agustina L. N. Aminin^a

^a Biochemistry Laboratory, Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang 50275

* Corresponding author: purbowatining@live.undip.ac.id

Article Info

Keywords:
thermophilic
bacteria,
Alicyclobacillus sp.,
Extracellular enzyme

Kata kunci:
Bakteri termofilik,
Alicyclobacillus sp.,
enzim ekstraseluler

Abstract

Previous research on Gedong Songo hot springs has isolated 5 isolates of *Alicyclobacillus sp.* which were ATSae10, ANBae10, AYTae7, AYTae31 and AYTae33 with growth conditions of 55°C and pH 4. The purpose of this study was to obtain the phylogeny tree and obtain information about extracellular enzyme potential of three isolates *Alicyclobacillus sp.* including amylase, β -galactosidase, proteases and catalase. The construction of phylogeny trees was performed using Phylip 3.68 ed program with parsimony method. Extracellular enzyme potential test of *Alicyclobacillus sp.* was conducted qualitatively. Amylase activity test used starch as substrate, β -galactosidase activity test used ONPG as substrate and on protease test used gelatin as substrate. The catalase test was carried out qualitatively by observing the presence of O₂ bubbles generated by the catalase activity. The results showed that all three isolates of *Alicyclobacillus sp.* (AYTae7, AYTae31 and AYTae33) were in one kinship group and have the closest kinship level to *Alicyclobacillus sp.* KI, *Alicyclobacillus sp.* T127, *Alicyclobacillus acidocaldarius* strains DSM 454 and uncultured bacterium clone351. The three isolates of *Alicyclobacillus sp.* has thermostable enzyme extracellular amylase and β -galactosidase.

Abstrak

Penelitian terdahulu pada sumber air panas Gedong Songo, telah diisolasi 5 isolat *Alicyclobacillus sp.* yaitu: ATSae10, ANBae10, AYTae7, AYTae31 dan AYTae33 dengan kondisi pertumbuhan 55°C dan pH 4. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mendapatkan pohon filogeni dan mendapatkan informasi mengenai potensi enzim ekstraseluler ketiga isolat *Alicyclobacillus sp.* yang meliputi amilase, β -galaktosidase, protease dan katalase. Konstruksi pohon filogeni dilakukan menggunakan program Phylip 3.68 ed dengan metode parsimony. Uji potensi enzim ekstraseluler isolat *Alicyclobacillus sp.* dilakukan secara kualitatif. Uji aktifitas amilase menggunakan amilum sebagai substrat, uji aktifitas β -galaktosidase menggunakan ONPG sebagai substrat dan pada uji protease menggunakan gelatin sebagai substrat. Uji katalase dilakukan secara kualitatif dengan melihat adanya gelembung O₂ yang dihasilkan oleh aktifitas katalase. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ketiga isolat *Alicyclobacillus sp.* (AYTae7, AYTae31 dan AYTae33) berada dalam satu kelompok kekerabatan dan mempunyai tingkat kekerabatan terdekat dengan *Alicyclobacillus sp.* KI, *Alicyclobacillus sp.* T127, *Alicyclobacillus acidocaldarius* strain DSM 454 dan Uncultured bacterium clone351. Ketiga isolat *Alicyclobacillus sp.* memiliki enzim termostabil ekstraseluler amilase dan β -galaktosidase.

1. Pendahuluan

Mikroorganisme termofilik merupakan mikroorganisme yang tahan terhadap suhu tinggi dengan suhu optimum pertumbuhan mencapai lebih dari 60°C [1]. Mikroorganisme termofilik dapat diisolasi dari sumber air panas seperti *Bacillus thermocatenulatus* dengan suhu optimum antara 40–70°C [2], *Alicyclobacillus* dan *Geobacillus* dengan suhu optimum 55°C [3].

Telah diketahui bahwa lebih dari 99% bakteri di alam belum dikultivasi [4]. Keragaman bakteri yang belum dikultivasi menunjukkan kelompok gen yang sangat luas untuk eksploitasi bioteknologi dan merupakan sebuah kesempatan yang sangat besar bagi ilmu mikrobiologi untuk mempelajari hubungan filogenetik dan arti ekologi.

Enzim termostabil adalah enzim yang stabil dan aktif pada suhu yang lebih tinggi dari pada suhu optimum untuk pertumbuhan mikroorganisme yaitu 40°C [5]. Enzim termostabil yang telah digunakan antara lain α -amilase yang dapat menghidrolisis pati (amilum), protease yang biasa digunakan dalam deterjen [6] dan β -galaktosidase yang berfungsi untuk mengurangi kadar laktosa dalam susu serta katalase yang berfungsi menguraikan hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi molekul oksigen (O_2) dan air (H_2O). Enzim-enzim termostabil saat ini sedang mendapat perhatian besar, karena enzim-enzim ini sangat cocok untuk proses-proses industri yang memerlukan suhu tinggi. Penggunaan enzim termostabil pada beberapa aplikasi sangat efektif dan menguntungkan misalnya pada proses-proses yang menggunakan suhu tinggi, peningkatan kecepatan reaksi, dan mengurangi kontaminasi mikroba-mikroba mesofilik. Kemajuan dalam bidang bioteknologi memungkinkan semakin meluasnya penggunaan enzim termostabil dalam berbagai produk komersil dan industri di Indonesia [7]. Namun, kebutuhan terhadap enzim termostabil hampir 100% masih bergantung pada produk impor [8].

Berdasarkan penelitian [9] pada sumber air panas Gedong Songo telah diisolasi 5 isolat *Alicyclobacillus sp.* yaitu *Alicyclobacillus sp.* AYTae-7, *Alicyclobacillus sp.* AYTae-31, *Alicyclobacillus sp.* AYTae-33, *Alicyclobacillus sp.* ATSae-10 dan *Alicyclobacillus sp.* ANBae-10. Kelima isolat tersebut telah ditentukan urutan nukleotidanya dari gen 16S rRNA dan telah dimasukkan dalam *database Genebank*, namun belum diketahui konstruksi pohon filogeni dan potensi ekstraseluler enzimnya.

Penelitian ini merupakan kelanjutan identifikasi bakteri termofilik sumber air panas Gedong Songo [9]. Pada penelitian ini dilakukan studi filogeni bakteri isolat *Alicyclobacillus sp.* AYTae7, AYTae31 dan AYTae33 Gedong Songo. Dilakukan pula uji potensi ekstraseluler enzim meliputi amilase, β -galaktosidase, protease dan katalase.

2. Metode

Bahan dan Cara Kerja

Bahan. isolat bakteri termofilik *Alicyclobacillus sp.* AYTae7, 31 dan 33; media DSMZ 261 pH 4; media agar; larutan H_2O_2 0,5N; HCl 2N; NaOH 2N; etanol 70%; gelatin; laktosa; pati amilum dan akuades.

Alat. inkubator (Memmert model 300), pH meter, alat pendingin, botol semprot, alat-alat kultur sel, Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), autoklaf (Clinical Autoclave Prestige Medical series 2100), mikroskop, erlenmeyer, gelas beker, tabung reaksi, labu ukur, botol vial, corong kaca, mikropipet, pipet tetes, kertas saring dan pengaduk.

Konstruksi Pohon Filogeni

Konstruksi pohon filogeni menggunakan urutan nukleotida gen 16S rRNA isolat *Alicyclobacillus sp.* yang didapat dari *database Genebank*. Urutan nukleotida tersebut kemudian dianalisis dan dibandingkan dengan data dalam *Genebank* menggunakan program BLAST N pada *website National centre of Biotechnology Information (NCBI)*, sehingga diperoleh 100 spesies bakteri yang memiliki tingkat kekerabatan yang dekat (Lampiran C). Dilakukan edit data urutan nukleotida gen 16S rRNA terhadap ke seratus bakteri tersebut dengan cara mengambil *subject* dan menghapus *query* pada data penjajaran nukleotida untuk masing-masing spesies bakteri dan *meng-copy* pada notepad. Selanjutnya dilakukan penjajaran urutan nukleotida gen 16S rRNA dari isolat *Alicyclobacillus sp.* dan bakteri lainnya dengan program Clustal W sehingga dihasilkan 4 data *output* dengan format '.aln', '.msf', '.dnd' dan '.phy'. *Output* dengan format '.phy' digunakan untuk tahap selanjutnya. Konstruksi pohon filogeni terhadap isolat *Alicyclobacillus sp.* dilakukan dengan program Phylip (*Phylogeny Inference Package*) 3.68 ed. Pada paket program phylip, dipilih program seqboot, DNAPars dan consense. Hasil penjajaran Clustal W dengan program '.phy' dijadikan data *input* pada program seqboot, output dari program seqboot menjadi input pada program DNAPars dan *output* dari DNAPars menjadi *input* pada program consense. *Output* dari program consense berupa data *newick* dimasukkan pada phylo dendron secara *online*, sehingga didapatkan pohon filogeni.

Peremajaan Bakteri

DSMZ 261 pH 4 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) tersusun dari komposisi (per liter) sebagai berikut: 4,5 gram $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$; 1,5 gram $KH_2PO_4 \cdot 2H_2O$; 1,0 gram NH_4Cl ; 0,01 gram $MnSO_4 \cdot H_2O$; 0,2 gram $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,01 gram $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 5,0 mg $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ dan 3,0 mL *trace element solution* SL-6 (0,1 gram $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,03 gram $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 0,3 gram H_3BO_3 ; 0,2 gram $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,01 gram $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,02 gram $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ dan 0,03 gram $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$). Media DSMZ 261 tersebut dibuat dengan pH 4. Media cair ini disterilisasi dengan menggunakan autoklaf selama 20 menit. Media cair ini digunakan untuk peremajaan isolat bakteri. Isolat Bakteri murni diambil dengan menggunakan jarum ose

kemudian diinokulasikan kedalam 100mL media DSMZ 261 dan diinkubasi pada suhu 55°C selama 24 jam.

Uji Pewarnaan gram

Pewarnaan gram dilakukan dengan menambahkan pewarna gram secara bertahap. Kaca preparat yang digunakan dibersihkan dengan alkohol kemudian dipanaskan di dekat nyala api. Selanjutnya isolat bakteri diambil dengan menggunakan mikropipet dan diratakan pada kaca preparat, kemudian dipanaskan di dekat api sambil digoyang-goyangkan hingga isolat kering. Pada saat pemanasan diusahakan agar api tidak terkena langsung, setelah itu isolat bakteri ditetesi dengan kristal ungu, didiamkan selama 1 menit, dicuci dengan akuades dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Hasil pewarnaan kristal ungu ditetesi iodine, didiamkan selama 1 menit, dicuci dengan akuades dan dikeringkan. Hasil pewarnaan iodine ditetesi dengan *decolorize agent* (etanol absolut), didiamkan selama 30 detik, dicuci dengan akuades dan dikeringkan. Langkah terakhir, hasil yang diperoleh dari pewarnaan dengan *decolorize agent* ditetesi dengan safranin kemudian dicuci dengan akuades. Setelah itu dikeringkan dan hasilnya diamati dengan mikroskop.

Uji Aktivitas Enzim Amilase Secara Kualitatif

Uji amilase dilakukan dengan membuat media DSMZ 261 (pH 4) padat yang mengandung pati kanji. Sebanyak 30 mL media dituang ke dalam cawan Petri dan didiamkan hingga memadat, kemudian isolat bakteri ditetaskan pada media, lalu diinkubasi pada suhu 55°C selama 48 jam. Kemudian cawan digenangi dengan larutan lugol (1 g kristal iodine, 2 g KI, 300 mL akuabides) dan didiamkan sekitar 1 menit agar iodine bereaksi. Adanya daerah tak berwarna di sekitar koloni menunjukkan aktivitas enzim amilase.

Uji Aktivitas Enzim β -Galaktosidase Secara Kualitatif

Isolat bakteri murni di ambil dengan menggunakan mikro pipet kemudian diinokulasikan kedalam media cair DSMZ 261 (pH 4) yang mengandung 1% laktosa dan diinkubasi pada suhu 55°C selama 24 jam, kemudian inokulum ditambah dengan larutan ONPG dan diinkubasi selama 3-5 jam. Adanya β -Galaktosidase ditandai dengan perubahan warna yaitu menjadi berwarna kuning.

Uji Aktivitas Enzim Protease Secara Kualitatif

Uji protease dilakukan dengan menghidrolisis gelatin. Bakteri yang diuji diinokulasikan ke dalam media DSMZ 261 (pH 4) yang ditambah dengan gelatin kemudian diinkubasi pada 55°C selama 24 jam hingga media sedikit keruh, setelah itu media disimpan di dalam lemari es selama 15 menit. Apabila media tetap cair menunjukkan adanya hidrolisis gelatin oleh bakteri sedangkan bila media me memadat maka tidak terjadi hidrolisis gelatin oleh bakteri.

Uji Aktivitas Enzim Katalase Secara Kualitatif

Isolat bakteri yang telah diremajakan diambil dengan menggunakan mikro pipet kemudian diinokulasikan ke dalam media DSMZ 261 (pH 4) untuk

mendapatkan stater. Media tersebut diinkubasi pada 55°C hingga keruh. Media yang telah keruh ditetaskan pada kaca preparat kemudian ditetesi H₂O₂. Aktivitas katalase pada mikroba dapat diketahui dengan terbentuknya gelembung-gelembung gas O₂.

3. Hasil dan Pembahasan

Studi Filogeni

Hubungan kekerabatan isolat *Alicyclobacillus sp.* dengan bakteri lain dilakukan dengan perbandingan urutan nukleotida *data base Gen Bank* menggunakan program Blast-N. Berdasarkan hasil perbandingan Blast-N dari data *Gene Bank* dengan urutan DNA gen 16S rRNA, terdapat 100 spesies bakteri yang memiliki kemiripan 91-98% dengan ketiga isolat *Alicyclobacillus sp.* 100 spesies bakteri tersebut terdiri dari 84 spesies *Alicyclobacillus*, 8 spesies *Bacillus* dan 8 spesies *uncultured bacterium*.

Studi filogeni dilakukan untuk mengetahui tingkat kekerabatan dari ketiga isolat *Alicyclobacillus sp.*, yaitu AYTae-7, AYTae-31 dan AYTae-33 khas Gedong Songo. Analisis filogenetik ini didasarkan pada sekuen parsial gen 16S rRNA yang merupakan penanda molekuler dengan fungsi yang identik pada seluruh organisme. Molekul 16S rRNA mempunyai beberapa daerah yang memiliki urutan basa yang relatif konservatif dan beberapa daerah urutan basanya variatif. Perbandingan urutan basa yang konservatif berguna untuk mengkonstruksi pohon filogenetik universal karena mengalami perubahan relatif lambat dan mencerminkan kronologi evolusi bumi. Sebaliknya, urutan basa yang bersifat variatif dapat digunakan untuk melacak keragaman dan menempatkan galur-galur dalam satu spesies [10].

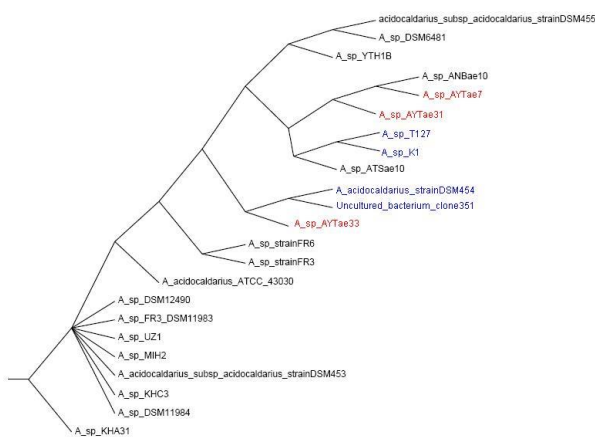
Penjajaran urutan nukleotida gen 16S rRNA dari ketiga isolat *Alicyclobacillus sp.* dilakukan dengan program Clustal W. Data hasil penjajaran diketahui bahwa pada penjajaran urutan nukleotida gen 16S rRNA dari ketiga *Alicyclobacillus sp.* terdapat delesi dan substitusi. Delesi terjadi pada awal dan akhir dari data penjajaran gen 16S rRNA, delesi terbanyak ditemukan pada awal penjajaran. Delesi merupakan pengurangan satu atau lebih pasangan nukleotida pada suatu gen. Substitusi adalah perubahan urutan nukleotida pada suatu gen. Substitusi terjadi pada awal dan tengah dari data penjajaran gen 16S rRNA, substitusi terbanyak ditemukan pada awal penjajaran. Delesi dan substitusi spesifik tersebut menunjukkan bahwa ketiga *Alicyclobacillus sp.* mempunyai perbedaan antar ketiga spesies bakteri tersebut, yang menunjukkan bahwa bakteri Gedong Songo adalah khas. Dari data tersebut bisa dilihat bahwa *Alicyclobacillus sp.* AYTae-7 mirip dengan *Alicyclobacillus sp.* AYTae-31.

Konstruksi pohon filogeni dilakukan dengan program Phylip (*Phylogeny Inference Package*) 3,68 ed dengan metode *parsimony*, dan dihasilkan pohon filogeni yang menunjukkan kekerabatan dari ketiga isolat *Alicyclobacillus sp.* dengan 97 spesies bakteri lainnya. Pohon filogeni dari 100 bakteri diambil 20

bakteri terdekat untuk dibuat pohon filogeni lagi seperti pada gambar 1.

Berdasarkan gambar 1 dapat diketahui bahwa ketiga isolat *Alicyclobacillus sp.* Gedong Songo berada dalam satu kelompok kekerabatan yang dekat. Kedekatan kekerabatan tersebut menunjukkan kemiripan sifat pada ketiga isolat *Alicyclobacillus sp.*, dibuktikan dengan adanya kemiripan data potensi enzim ekstraseluler dari ketiga isolat *Alicyclobacillus sp.* yang telah didapatkan pada penelitian ini.

Spesies lain yang memiliki tingkat kekerabatan yang dekat dengan ketiga isolat *Alicyclobacillus sp.* adalah *Alicyclobacillus sp._K1* dan *A-sp-T127* yang ditemukan oleh Stoot (NCBI. Accession Number AM749794, AM749785 2009), *Alicyclobacillus acidocaldarius_DSM454* yang ditemukan oleh Goto,K., Mochido,K.M., Asahara,M., Suzuki,M dan Yokota,A (NCBI. Accession Number AB059665, 2009).



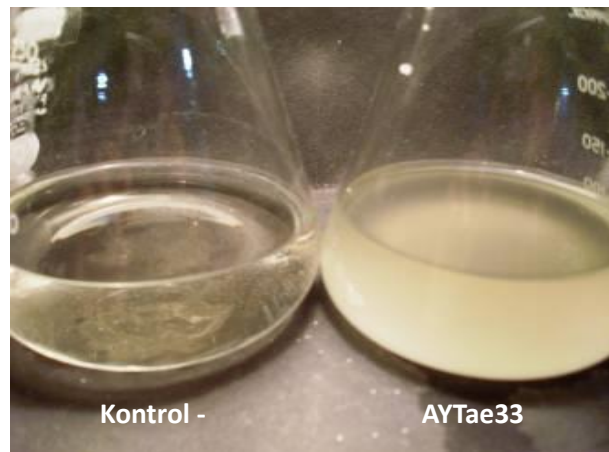
Gambar 1. Pohon filogeni 20 bakteri terdekat dengan warna merah=AYTae7, 31, 33 dan warna biru merupakan bakteri terdekat

Berdasarkan potensi spesies bakteri yang mempunyai kekerabatan yang dekat dengan *Alicyclobacillus sp.* Gedong Songo, maka potensi lain dari *Alicyclobacillus sp.* dapat ditelusuri. Bakteri yang mempunyai hubungan kekerabatan yang dekat, diperkirakan sifat-sifat dari mikroorganisme tersebut relatif sama, sehingga kemungkinan memiliki potensi yang sama pula. Selain itu dapat pula diketahui mikroorganisme alternatif untuk masing-masing isolat dalam pemanfaatannya. Pada penelitian ini akan dieksplorasi lebih lanjut potensi enzim ekstraseluler terhadap amilase, β -galaktosidase, katalase dan protease.

Peremajaan Isolat Bakteri *Alicyclobacillus*

Hasil peremajaan bakteri ditunjukkan pada gambar 2. Pada gambar 2 dapat dilihat bahwa isolat bakteri telah tumbuh. Hal ini ditandai dengan keruhnya media yang telah ditambahkan bakteri setelah diinkubasi, sedangkan kontrol negatif tetap bening sebelum maupun sesudah inkubasi. Tahap peremajaan isolat *Alicyclobacillus sp.* bertujuan untuk mendapatkan isolat

bakteri *Alicyclobacillus sp.* yang lebih muda dan produktif sehingga aktivitas yang dilakukan lebih optimal.



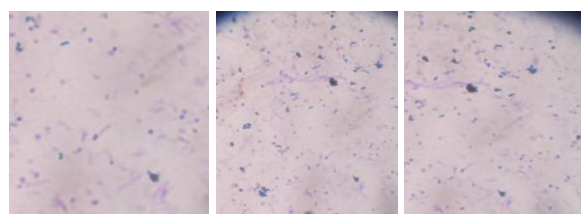
Gambar 2. Hasil peremajaan bakteri AYTae-33

Tiga isolat *Alicyclobacillus sp.* Gedong Songo meliputi *Alicyclobacillus AYTae-7*, *Alicyclobacillus AYTae-31*, dan *Alicyclobacillus AYTae-33* diambil dengan mikro pipet dan diinokulasikan ke dalam media cair DSMZ 261 dengan pH 4, yaitu pH optimum *Alicyclobacillus sp.* [11]. Media cair akan memberikan ruang gerak yang lebih leluasa pada bakteri untuk mendapatkan nutrisinya. Nutrisi yang ditambahkan pada media DSMZ 261 pada AYTae-7, AYTae-31, AYTae-33 adalah Nutrient Yeast Tripton/YT (yeast ekstrak dan tripton). Nutrisi tersebut digunakan bakteri sebagai sumber karbon, nitrogen dan enzim [11].

Media yang telah ditanami *Alicyclobacillus sp.* diinkubasi pada suhu 55°C, yaitu suhu optimum yang digunakan untuk menginkubasi *Alicyclobacillus sp.* hasil isolasinya [9], setelah diinkubasi selama 48 jam, media yang telah ditanami bakteri berubah menjadi keruh, hal ini membuktikan bahwa kedelapan isolat *Alicyclobacillus sp.* telah tumbuh pada media DSMZ 261 yang baru.

Hasil Pengamatan Morfologi dan Pewarnaan Gram

Bakteri koloni tunggal yang telah diperoleh dari hasil peremajaan, kemudian diamati bentuk morfologi dan sifat gramnya. Pada uji ini *Alicyclobacillus AYTae-7*, *AYTae-31* dan *AYTae-33* berbentuk batang dan merupakan bakteri gram positif karena berwarna ungu.



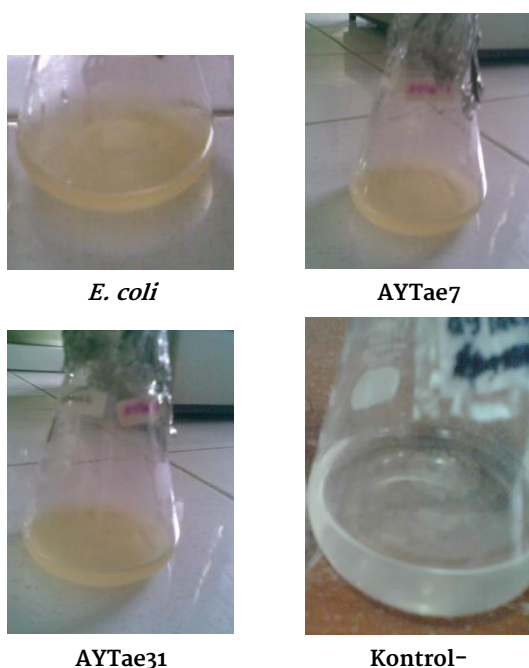
A B C
Gambar 3. Hasil uji morfologi dan pewarnaan gram A: AYTae7, B: AYTae31, C: AYTae33

Pada gambar 3 di atas, dapat terlihat bahwa isolat bakteri yang digunakan merupakan bakteri dengan bentuk batang (basil) dan gram positif. Hal ini ditandai dengan pembentukan warna ungu pada bakteri setelah

penambahan safranin. Pewarnaan awal dengan kristal violet akan mewarnai baik bakteri gram positif maupun negatif. Ion CV^+ berinteraksi dengan muatan negatif komponen sel bakteri dan memberikan warna ungu. Pada saat penambahan iodine terjadi interaksi antara iodine dan kristal violet membentuk kompleks besar kristal violet-iodine. Dekolorisasi dengan campuran alkohol-aseton akan melarutkan lipid dan membran luar sel bakteri gram negatif. Alkohol akan berinteraksi dengan lipid membran sel. Sel gram negatif akan kehilangan membran luarnya dan lapisan peptidoglikan terbuka. Lapisan tipis peptidoglikan pada dinding sel bakteri gram negatif tidak mampu mempertahankan kompleks violet-iodine sehingga akan tampak berwarna merah [12]. Pada bakteri gram positif akan berwarna ungu karena sel bakteri gram positif menjadi terdehidrasi oleh penambahan alkohol, pori-pori akan menutup dan dinding sel akan menciut selama dehidrasi. Kompleks kristal violet-iodine terperangkap di dalam sel oleh multilayer peptidoglikan dinding sel dan tidak terdekolorisasi.

Hasil Uji Aktivitas Enzim β -Galaktosidase Secara Kualitatif

Hasil uji kualitatif enzim β -Galaktosidase ekstraseluler yang telah dilakukan menunjukkan ada perubahan warna dari kuning pucat menjadi kuning terang. Hal ini dapat dilihat pada gambar 4 membuktikan bahwa ketiga isolat *Alicyclobacillus sp.* menghasilkan enzim β -Galaktosidase ekstraseluler.



Gambar 4. Hasil uji enzim β -Galaktosidase ekstraseluler pada *Alicyclobacillus sp.* AYTae7 dan AYTae31

Untuk meyakinkan uji kualitatif yang telah dilakukan, maka digunakan *E.coli* sebagai kontrol positif. Bakteri *E.coli* digunakan sebagai kontrol positif, karena *E.coli* dapat menghasilkan enzim β -Galaktosidase [13-15].

Uji kualitatif enzim β -Galaktosidase ekstraseluler bertujuan untuk mengetahui kemampuan ketiga isolat

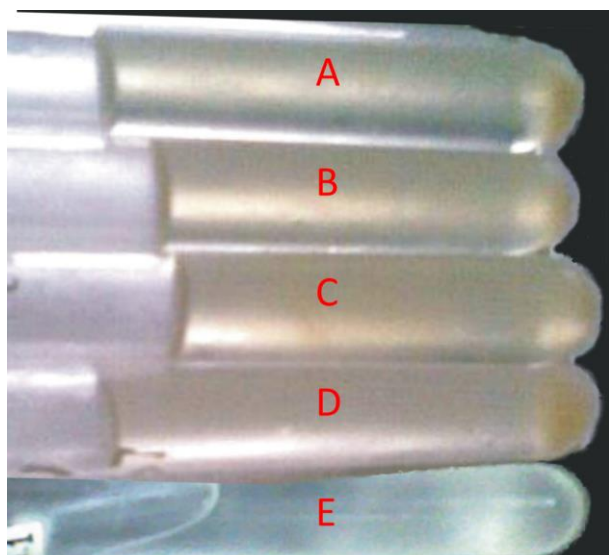
Alicyclobacillus sp. Gedong Songo dalam menghasilkan enzim β -Galaktosidase ekstraseluler. Uji ini dilakukan dengan cara menumbuhkan tiga isolat *Alicyclobacillus sp.* dalam media DSMZ 261 cair yang mengandung 1% laktosa. Laktosa yang ditambahkan tersebut berfungsi sebagai inducer [16]. Keberadaan dari enzim β -Galaktosidase dapat diketahui dengan menggunakan ONPG (*o*-nitrofenol- β -D-Galaktosidase) sebagai substrat. Substrat ONPG ditambahkan pada ketiga media yang telah ditumbuhi isolat *Alicyclobacillus sp.* setelah media sedikit keruh, menandakan bahwa bakteri telah tumbuh [17]. Gambar 4 di atas menunjukkan bahwa ketiga isolat *Alicyclobacillus sp.* menghasilkan enzim β -Galaktosidase. Hal ini ditandai dengan warna ONP yang terbentuk semakin terang. Ini berarti menandakan bahwa terjadi aktivitas enzim β -Galaktosidase yang menghidrolisis ONPG menjadi ONP dan galaktosa pada media *Alicyclobacillus sp.* tersebut, yang menyebabkan perubahan warna pada media menjadi kuning terang.

Hasil Uji Aktivitas Enzim Protease Secara Kualitatif

Hasil uji kualitatif enzim protease ekstraseluler yang telah dilakukan menunjukkan hasil yang negatif. Hal ini ditunjukkan pada gambar 5 dari masing-masing media DSMZ 261-gelatin memadat setelah pendinginan (tabung A, B, C), begitu juga media DSMZ 261-gelatin yang tidak ditumbuhi isolat *Alicyclobacillus sp.* menjadi beku (tabung D). Hal ini berbanding terbalik dengan kontrol positif (tabung E) yang tetap cair ketika didinginkan dalam lemari es.

Uji kualitatif enzim protease ekstraseluler bertujuan untuk mengetahui potensi ketiga isolat *Alicyclobacillus sp.* dalam menghasilkan enzim protease ekstraseluler. Uji ini dilakukan dengan cara menumbuhkan ketiga isolat *Alicyclobacillus sp.* pada media DSMZ 261 cair yang mengandung gelatin. Ketiga isolat *Alicyclobacillus sp.* yang telah diremajakan diinokulasikan ke dalam media DSMZ 261 yang ditambah dengan gelatin kemudian diinkubasi pada $55^{\circ}C$ selama 24 jam. Setelah 24 jam media menjadi sedikit keruh. Hal ini disebabkan isolat *Alicyclobacillus sp.* telah tumbuh pada media tersebut. Setelah itu masing-masing media disimpan di dalam lemari es selama 15 menit [18].

Gelatin merupakan protein yang diperoleh dari hidrolisis kolagen yang secara alami terdapat pada tulang atau kulit binatang. Gelatin meleleh bila dipanaskan, namun akan segera menjadi padat lagi apabila didinginkan. Bila bercampur dengan air, gelatin akan membentuk larutan dengan viskositas tinggi yang juga akan menjadi padat (gel) bila mendingin. Dengan adanya protease, gelatin akan terurai menjadi asam-asam aminonya karena ikatan peptida pada gelatin terputus yang menyebabkan gelatin terdegradasi. Efek dari degradasi gelatin adalah gelatin tidak memadat pada proses pendinginan. Gelatin pada media berfungsi sebagai inducer yang memicu bakteri mengeluarkan enzim protease. Apabila enzim berpotensi protease, maka dengan keberadaan gelatin dalam media pertumbuhan akan menginduksi bakteri untuk mengeluarkan enzim protease [19].



Gambar 5. A= AYTae-7, B=AYTae-31, C=AYTae-33, D=Kontrol negatif, E=Kontrol Positif

Dari gambar 5 dapat diketahui bahwa gelatin pada media DSMZ 261 tidak terhidrolisis menjadi asam amino-asam amino penyusunnya, yaitu asam amino non esensial (glisin dan prolin) [19]. Oleh sebab itu media yang telah ditumbuhi isolat *Alicyclobacillus sp.* membeku setelah pendinginan sebab, ikatan peptida pada gelatin tidak terputus sehingga tidak menyebabkan gelatin terdegradasi. Hal ini membuktikan bahwa tidak terjadi aktivitas protease pada ketiga isolat *Alicyclobacillus sp.* pada media tersebut.

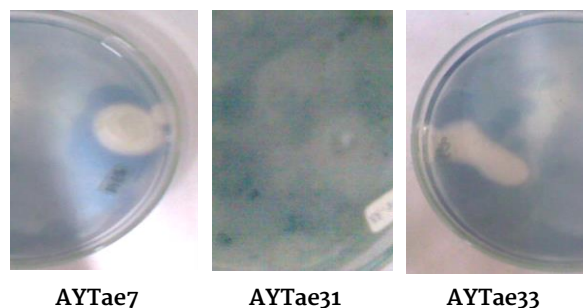
Hasil Uji Aktivitas Enzim Amilase Secara Kualitatif

Hasil penelitian gambar 6 menunjukkan disekeliling ketiga isolat *Alicyclobacillus sp.* terdapat zona bening yang menandakan terdapat enzim amilase. Hal ini menunjukkan bahwa amilum yang terdapat pada media disekitar isolat *Alicyclobacillus sp.* telah terhidrolisis menjadi monosakaridanya, yaitu glukosa [20].

Uji kualitatif enzim amilase ekstraseluler bertujuan untuk mengetahui kemampuan ketiga isolat *Alicyclobacillus sp.* yaitu AYTae-7, AYTae-31 dan AYTae-33 Gedong Songo dalam menghasilkan enzim amilase ekstraseluler. Uji ini dilakukan dengan cara membuat media DSMZ 261 padat yang mengandung 1% pati kanji dan menumbuhkan isolat bakteri *Alicyclobacillus sp.* pada media tersebut. Pati kanji yang ditambahkan pada media padat tersebut berperan sebagai substrat yang dapat diuraikan oleh enzim amilase.

Media DSMZ 261 padat dibuat dengan cara menambahkan bako agar dan pati kanji pada media DSMZ 261 cair, dan diautoklaf untuk mensterilkan media tersebut. Media yang telah steril dituang pada cawan petri sebagai tempat tumbuhnya bakteri. Setelah media memadat, isolat *Alicyclobacillus sp.* yang telah diremajakan ditanam pada media tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 55°C, yaitu suhu optimum pertumbuhan *Alicyclobacillus sp.* [3].

Setelah 48 jam, bagian media padat yang ditanami ketiga isolat *Alicyclobacillus sp.* terlihat keruh. Hal ini menunjukkan bahwa ketiga isolat *Alicyclobacillus sp.* telah tumbuh pada masing-masing media padat yang mengandung 1% pati kanji. Untuk membuktikan apakah ketiga isolat *Alicyclobacillus sp.* menghasilkan enzim amilase ekstraseluler, maka media yang telah ditumbuhi bakteri di tetesi iodin [5].



Gambar 6 Hasil uji enzim amilase ekstraseluler *Alicyclobacillus sp.*

Gambar 6 membuktikan bahwa ketiga isolat *Alicyclobacillus sp.* dapat menghasilkan enzim amilase yang disekresikan ke dalam medium. Zona bening yang terbentuk pada ketiga isolat bakteri ini diakibatkan adanya aktifitas amilolitik enzim α -amilase yang dihasilkan oleh bakteri. Zona bening terjadi karena amilum telah terhidrolisis menjadi glukosa sehingga iodium tidak terjerap pada aliran spiral amilum (amilosa) sedangkan warna biru terjadi karena adanya molekul iodine yang masuk dalam aliran spiral amilum [21].

Hasil Uji Enzim Katalase Secara Kualitatif

Hasil uji kualitatif enzim katalase ekstraseluler yang telah dilakukan menunjukkan hasil yang negatif (gambar 7). Hal ini ditandai dengan tidak adanya gelembung-gelembung gas pada masing-masing isolat *Alicyclobacillus sp.* yang ditetesi H_2O_2 dimana mengindikasikan bahwa *Alicyclobacillus sp.* merupakan bakteri penghasil katalase negatif, yaitu bakteri yang tidak dapat menghasilkan enzim katalase.

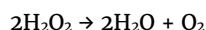


Kontrol Positif dengan *S. aureus* *Alicyclobacillus sp.* AYTae 31
Gambar 7. Hasil uji katalase pada *Alicyclobacillus sp.* AYTae 31

Uji ini dilakukan dengan cara membuat stater dari ketiga isolat *Alicyclobacillus sp.* Gedong Songo yang telah diremajakan. Isolat Bakteri yang telah diremajakan diambil dengan menggunakan mikro pipet, dan diinokulasikan kedalam media DSMZ 261 yang baru untuk mendapatkan stater, dan kemudian diinkubasi

pada suhu 55°C. Setelah 48 jam, media sudah terlihat keruh, yang menandakan bahwa bakteri *Alicyclobacillus* sp. sudah tumbuh pada media DSMZ 261 tersebut. Stater diambil dengan menggunakan mikro pipet kemudian diteteskan pada kaca preparat, dan ditetesi H₂O₂.

Adanya aktivitas katalase dapat diketahui dengan terbentuknya gelembung-gelembung gas O₂. Hidrogen peroksida (H₂O₂) dapat terdekomposisi oleh enzim katalase yang dapat dihasilkan suatu mikroorganisme [22].



Pada mikroorganisme, H₂O₂ dapat didekomposisi oleh katalase dalam mitokondria sel [23]. Katalase tersebut berfungsi untuk melindungi sel dari efek toksik hidrogen peroksida [22]. Kontrol positif yang digunakan adalah bakteri *S.aureus* yang merupakan penghasil enzim katalase. *S.aureus* diteteskan pada kaca preparat dan ditambah setetes H₂O₂. Gelembung-gelembung gas O₂ pada sel *S.aureus* tersebut timbul setelah 5 detik.

Hasil penelitian tidak menunjukkan adanya gelembung-gelembung gas pada masing-masing isolat *Alicyclobacillus* sp. yang ditetesi H₂O₂ dimana mengindikasikan bahwa *Alicyclobacillus* sp. merupakan bakteri bukan penghasil enzim katalase. Ketiga isolat *Alicyclobacillus* sp. merupakan bakteri aerob. Kebanyakan bakteri aerob menghasilkan katalase positif, namun menurut hasil penelitian ketiga isolat *Alicyclobacillus* sp. merupakan penghasil katalase negatif.

Organisme aerob penghasil katalase negatif biasanya mempunyai enzim lain yang dapat diproduksi secara alamiah, sehingga dapat menguraikan bentuk radikal bebas superoksida. Enzim yang berperan dalam hal ini dinamakan Superoksida dismutase (SOD).

Superoksida dismutase adalah enzim yang bertanggung jawab untuk peruraian khususnya superoksida pada organisme aerob yang bersifat katalase negatif, diproduksi secara alamiah oleh organisme yang mengkonsumsi oksigen dan berperan sebagai salah satu mekanisme pertahanan terhadap spesi oksigen reaktif yang diproduksi sebagai efek samping metabolisme dan respirasi [24]

4. Kesimpulan

Pohon filogeni terhadap ketiga isolat *Alicyclobacillus* sp. Gedong Songo (AYTae7, AYTae31, AYTae33) berada dalam satu kelompok kekerabatan dan memiliki tingkat kekerabatan terdekat dengan *Alicyclobacillus*_sp_KI, *Alicyclobacillus*_sp_TI27, *Alicyclobacillus acidocaldarius* DSM454, dan *Uncultured-bacterium-clone531* tetapi spesies terdekat itu belum dilaporkan potensi biomolekulnya. Ketiga isolat *Alicyclobacillus* sp. Gedong Songo (AYTae-7, AYTae-31, AYTae-33) memiliki enzim termostabil ekstraseluler amilase dan β-galaktosidase, namun tidak memiliki enzim termostabil ekstraseluler protease dan katalase.

5. Daftar Pustaka

- [1] Trismilah, Mahyudin A.R, Pemanfaatan Kulit Buah Pisang Nangka Sebagai Substrat Fermentasi Padat Pada Produksi Xilanase, *Jurnal Rekayasa Lingkungan*, 5, 1, (2009) 13-23
- [2] Claudia Schmidt-Dannert, Helena Sztajer, Walter Stöcklein, Ulrich Menge, Rolf D. Schmid, Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1214, 1, (1994) 43-53 [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(94\)90008-6](https://doi.org/10.1016/0005-2760(94)90008-6)
- [3] Agustina L. N. Aminin, Fida Madayanti Warganegara, Pingkan Aditiawati, Akhmaloka, Culture-Independent and culture-dependent approaches on microbial community analysis at Gedongsongo (GS-2) hot spring, *International Journal of Integrative Biology*, 2, 3, (2008) 145-152
- [4] Rudolf I Amann, Wolfgang Ludwig, Karl-Heinz Schleifer, Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiological reviews*, 59, 1, (1995) 143-169
- [5] Jusuf Ginting, Isolasi Bakteri Dan Uji Aktivitas Enzim Amilase Kasar Termofilik Dari Sumber Air Panas Semangat Gunung Kabupaten Karo, Sumatera Utara, Universitas Sumatera Utara, Medan
- [6] Ryan D. Martinus, Graeme P. Garth, Tracie L. Webster, Peter Cartwright, Dean J. Naylor, Peter B. Høj, Nicholas J. Hoogenraad, Selective Induction of Mitochondrial Chaperones in Response to Loss of the Mitochondrial Genome, *European Journal of Biochemistry*, 240, 1, (1996) 98-103 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0098h.x>
- [7] Elidar Naiola, Nunuk Widhyastuti, Semi Purifikasi dan Karakterisasi Enzim Protease *Bacillus* sp, *Berkala Penelitian Hayati*, 13, 1, (2007) 51-56
- [8] Rosliana Pakpahan, Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Protease Termofilik dari Sumber Air Panas Sipoholon Tapanuli Utara Sumatera Utara, (2009)
- [9] Agustina L. N. Aminin, Fida Madayanti Warganegara, Pingkan Aditiawati, Simple enrichment and independent cultures to expand bacterial community analysis from gedongsongo hot spring, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106, 2, (2008) 211-214
- [10] E. Stackebrandt, B. M. Goebel, Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44, 4, (1994) 846-849 <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-44-4-846>
- [11] Agustina L. N. Aminin, F. Madayanti, P. Aditiawati, Akhmaloka, Isolation of Thermophiles From Gedongsongo Hot Spring Using A Simple Enrichment Medium, in: *International Seminar Advance in Biological Science*, 2007.
- [12] Michael T. Madigan, John M. Martinko, Brock Biology of Microorganisms, 11 ed., Pearson Prentice Hall, 2006.
- [13] Hans G. Schlegel, General Microbiology, 7 ed., Cambridge University Press, 1986.

- [14] Agnes Ullmann, Roots: Complementation in β -galactosidase: From protein structure to genetic engineering, *BioEssays*, 14, 3, (1992) 201-205
<http://dx.doi.org/10.1002/bies.950140311>
- [15] Necmettin Yildirim, Michael C. Mackey, Feedback Regulation in the Lactose Operon: A Mathematical Modeling Study and Comparison with Experimental Data, *Biophysical Journal*, 84, 5, 2841-2851
[http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)70013-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(03)70013-7)
- [16] Sophie Drouault, Jamila Anba, Gérard Corthier, *Streptococcus thermophilus* is able to produce a β -galactosidase active during its transit in the digestive tract of germ-free mice, *Applied and environmental microbiology*, 68, 2, (2002) 938-941
<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.2.938-941.2002>
- [17] Joseph Sambrook, David William Russell, Molecular cloning: a laboratory manual, *Coldspring-Harbour Laboratory Press, UK*, (2001)
- [18] Tuti Susilawati, Isolasi dan karakterisasi enzim protease dari isolat bakteri termofilik sumber air panas Gedong Songo Bawen, Skripsi, Jurusan Kimia, Universitas Diponegoro, Semarang
- [19] David M Ward, Diversity, Ecology, and Evolution of Microorganisms Inhabiting Hot Spring Microbial Mats, *Journal of NSF Frontiers of Integrative Biological Research*, (2003)
- [20] Ruth Melliawati, Ricky Setiadi Suherman, Bambang Subardjo, Pengkajian Kapang Endofit dari Taman Nasional Gunung Halimun sebagai Penghasil Glukoamilase, *Berkala Penelitian Hayati*, 12, (2006) 19-25
- [21] John M. DeMan, Principles of Food Chemistry, Springer, 1999.
- [22] L Luhova, A Lebeda, D Hedererová, P Pec, Activities of amine oxidase, peroxidase and catalase in seedlings of *Pisum sativum* L. under different light conditions, *Plant soil and environment*, 49, 4, (2003) 151-157
- [23] Ventsislava Yankova Petrova, Tanya Vassileva Rasheva, Anna V Kujumdzieva, Catalase enzyme in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*, *Electronic Journal of Biotechnology*, 5, 1, (2002) 11-12
- [24] Marini Wijayanti, Produksi, isolasi dan karakterisasi superoksida dismutase dari *Spirulina platensis* yang dibiakkan dalam serum lateks Production, isolation, and characterization of superoxyde dismutase from *Spirulina platensis* cultured on latex serum, *E-Journal Menara Perkebunan*, 77, 1, (2016)