

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI TERMO-LIPOLITIK DENGAN PENDEKATAN BIOLOGI MOLEKULER BERBASIS GEN 16S rRNA

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF THERMO-LIPOLYTIC BACTERIA USING MOLECULAR BIOLOGY APPROACH BASED ON 16S rRNA GENE

Muharni^{1*)}, Heni Yohandini²⁾ dan Meita Anggraini¹⁾

Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Sriwijaya, Inderalaya 30662, Indonesia¹
muharni_bio@unsri.ac.id

Jurusan Kimia, FMIPA Universitas Sriwijaya, Inderalaya 30662, Indonesia²

ABSTRACT

Thermo-lipolytic bacteria has an important role in the development of biotechnology at the moment, because it can be applied to food and non-food industries. In this study, we attempted to isolate and select thermophilic bacteria, which have a lipolytic activity, and to identify each strain. Selection of lipolytic bacteria was carried out using ZoBell solid medium containing 1% olive oil and identification of the isolates based on the 16S rRNA gene sequences. Six thermophilic bacteria have been isolated and four of them have lipolytic activity with the highest lipolytic index of 2.65. The 16S rRNA gene sequences of the thermo-lipolytic bacteria had 99% similarity with Anoxybacillus pushchinoensis (for AA1 and AA3 strains), Anoxybacillus sp. (for AB2 strain) and Bacillus licheniformis (for LB1 strain).

Keywords : Identification, thermo-lipolytic bacteria, 16S rRNA gene

ABSTRAK

Bakteri termo-lipolitik merupakan bakteri pendegradasi lipid yang mampu beraktivitas pada suhu tinggi. Bakteri tersebut memiliki peran penting dalam perkembangan bioteknologi pada saat ini, karena dapat diaplikasikan pada berbagai industri baik industri pangan maupun non pangan. Salah satu upaya yang dilakukan pada penelitian ini adalah mencari dan menyeleksi isolat-isolat bakteri termofilik yang memiliki aktivitas lipolitik, serta mengetahui jenis dari masing-masing isolat tersebut. Seleksi dilakukan pada medium ZoBell padat yang mengandung olive oil 1% dengan menggunakan metode pour plate dan identifikasi isolat melalui analisis sekuen gen 16S-rRNA menggunakan DNA sequencer. Hasil isolasi memperoleh 6 isolat bakteri termofilik, dan hanya 4 isolat yang memiliki aktivitas lipolitik dengan indeks lipolitik tertinggi 2,65. Analisis similaritas berdasarkan sekuen gen 16S-rRNA menunjukkan bahwa dari isolat bakteri termo-lipolitik pada penelitian ini memiliki kemiripan dengan Anoxybacillus pushchinoensis 99% (untuk isolat AA1 dan AA3), Anoxybacillus sp. 99% (untuk isolat AB2) dan Bacillus licheniformis 99% (untuk isolat LB1).

Kata kunci : Identifikasi, bakteri termo-lipolitik, gen 16S rRNA

1. PENDAHULUAN

Bakteri termo-lipolitik memiliki kemampuan dalam memproduksi enzim lipase termostabil. Enzim lipase memiliki cakupan aplikasi yang sangat luas dan telah banyak dikenal dalam bidang bioteknologi seperti pada industri deterjen, farmasi dan makanan,

sintesis biopolimer, produksi biodiesel, dan pengolahan limbah cair yang mengandung lemak [1]. Disamping itu enzim ini sangat potensial dalam mengatasi masalah teknis pada industri seperti masalah suhu yang tinggi dan waktu.

Meskipun lipase dapat diperoleh dari tumbuhan dan hewan, lipase mikroba memiliki keunggulan seperti produksi yang tinggi, biaya produksi rendah, aktivitas katalitik beragam, stabilitas dalam pelarut organik dan spesifitas yang luas [2]. Bakteri yang dilaporkan memiliki aktivitas lipolitik adalah seperti, *Acinetobacter radioresistens* [3] *Bacillus* sp. [4], *Lactobacillus plantarum* [5], *Pasteurella multocida* [6], *Serratia marcescens* [7] dan *Pseudomonas fluorescens* [8].

Produksi enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya adalah mikroorganisme unggul. Oleh sebab itu, pencarian dan pengembangan mikroorganisme baru indigenous penghasil lipase termostabil perlu dilakukan di Sumatera Selatan. Mengingat Sumatera Selatan memiliki beberapa sumber air panas, diantaranya adalah sumber air panas Semendo Muara Enim dengan suhu 60 – 85 °C dan pH 4 – 8,5 yang berpotensi untuk mendapatkan bakteri termo-lipolitik unggul. Sumber air panas merupakan tempat yang sangat potensial untuk mendapatkan berbagai jenis bakteri termo-lipolitik yang bernilai ekonomi. Mikroorganisme yang potensial untuk dikembangkan sebagai penghasil enzim akan mudah diperoleh dari keragaman hayati yang tinggi [9].

Identifikasi bakteri secara fenotipe belum cukup memberikan informasi yang jelas dalam membedakan strain *intraspecies* dan *interspecies*. Hal ini disebabkan sering terjadi kesalahan dalam membedakan spesies bakteri karena adanya karakter yang tidak bersifat statis dan dapat berubah seiring dengan perubahan lingkungan [10]. Disamping itu identifikasi bakteri berdasarkan fenotipe memiliki reproduibilitas yang rendah karena tergantung pada kondisi kultur di laboratorium yang berbeda, hal inilah yang mendorong dilakukannya identifikasi secara genotipe berdasarkan gen penyandi 16S rRNA.

Analisis gen penyandi 16S rRNA dapat sebagai penanda molekuler karena bersifat ubikuitus dengan fungsi yang identik pada semua bakteri. Gen 16S rRNA memiliki beberapa daerah dengan urutan basa yang konservatif dan juga daerah yang urutan basanya yang sangat variatif. Perbandingan urutan basa yang konservatif berguna untuk mengkonstruksi pohon filogenetik universal, sedangkan urutan basa yang variatif dapat digunakan untuk melacak keragaman dan menempatkan strain-strain dalam satu spesies [11]. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan isolat lokal bakteri termo-lipolitik dari sumber air panas Semendo Muara Enim Sumatera Selatan, serta karakterisasi isolat dengan pendekatan Biologi Molekuler berbasis gen 16S rRNA untuk mengetahui jenis masing-masing isolat tersebut.

2. METODE PENELITIAN

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahap seperti, (i) Pengambilan sampel dan isolasi bakteri termofilik, (ii) Seleksi bakteri termo-lipolitik, (iii) Pengamatan morfologi isolat, (iv) Isolasi DNA dan Amplifikasi fragmen gen 16S rRNA, (v) Penentuan urutan DNA dan analisis filogenetik.

2.1 Pengambilan sampel dan isolasi bakteri termofilik

Sampel diambil dari air/lumpur yang berasal dari sumber air panas lalu dimasukkan ke dalam botol sampel yang sudah berisi media NB yang dipekatkan 10x. Isolasi dilakukan secara *pour plate* dengan menggunakan medium NA. Setelah media membeku diinkubasi selama 48 - 72 jam pada suhu 55 °C. Koloni bakteri yang tumbuh dan mempunyai karakter morfologi berbeda ditetapkan sebagai isolat terpilih untuk dilanjutkan dengan pengujian aktivitas lipolitik.

2.2 Seleksi bakteri termo-lipolitik

Isolat-isolat yang diperoleh ditumbuhkan pada media ZoBell padat yang mengandung 1% *olive oil* dan Tween 80 dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 55 °C. Adanya aktivitas lipolitik ditandai dengan terbentuknya endapan yang berwarna putih keruh di sekitar *paper disk* [12]. Isolat yang menunjukkan aktivitas lipolitik selanjutnya ditentukan indeks lipolitiknya.

2.3 Pengamatan morfologi isolat

Isolat bakteri termo-lipolitik yang sudah didapatkan dilakukan pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis meliputi, bentuk dan warna koloni, dan mikroskopis berupa bentuk sel melalui pewarnaan Gram.

2.4 Amplifikasi Fragmen Gen 16S rRNA.

Isolat bakteri yang terpilih ditumbuhkan pada media LB dan dipanen pada saat fase logaritma. Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan kit DNA purifikasi (Promega). Proses amplifikasi menggunakan *Go Taq green mastermix* (Promega). Primer yang digunakan adalah Bact27_F 5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3' dan Uni1492_R 5'-GGT TAC CTT ACG ACT T-3'. Sebanyak 50 µL campuran reaksi PCR (*Go Taq green mastermix*, Primer, *nuclease free water*, dan DNA templat) digunakan untuk amplifikasi DNA kromosom. Proses PCR dilakukan pada kondisi denaturasi pada 95 °C, *annealing* pada suhu 55 °C, dan pemanjangan primer pada 72°C. Pemanjangan primer terakhir dilakukan pada 72°C.

2.5 Penentuan Urutan DNA.

Penentuan urutan DNA (sekuensing) dilakukan melalui jasa komersial *Macrogen Inc. Korea*. Proses penentuannya adalah menggunakan metode Dye Terminator (3'-*dye labelled dideoxynucleotide triphosphate*) yang meliputi beberapa tahap yaitu: penyiapan

template, pemurnian produk PCR, elektroforesis dengan *scanning fluorescence*, dan reaksi sekuensing.

2.6 Analisis filogenetik

Data yang diperoleh dianalisis dengan bantuan program komputer, antara lain: analisis adanya chimera pada urutan DNA sampel, penyuntingan urutan DNA, penjajaran urutan DNA sampel dengan urutan DNA yang ada di *GenBank*, pengambilan urutan DNA dari *GenBank*, penjajaran urutan DNA menggunakan program Clustal W versi 1.83, dan konstruksi pohon filogenetik menggunakan program Phylip 3.62.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

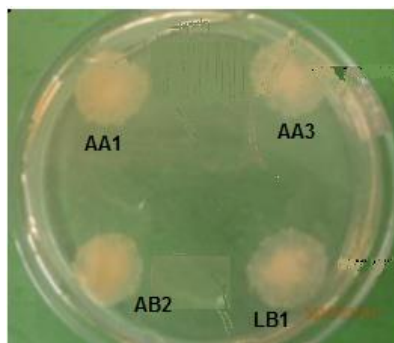
3.1 Isolasi dan Seleksi Bakteri Termo-lipolitik

Hasil isolasi bakteri termofilik dari sumber air panas Semendo Muara Enim Sumatera Selatan diperoleh sebanyak 6 isolat. Seleksi bakteri termo-lipolitik dari 6 isolat yang didapatkan hanya 4 isolat yang menunjukkan adanya aktivitas lipolitik dengan indeks lipolitik tertinggi didapatkan pada isolat AA3 sebesar 2,65 (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil seleksi isolat bakteri termo-lipolitik

Kode Isolat	Nama Isolat	Similaritas (%)	Indeks Lipolitik
AA1	<i>Anoxybacillus pushchinoensis</i>	99	2,37 ± 0,03
AA3	<i>Anoxybacillus pushchinoensis</i>	99	2,65 ± 0,09
AB2	<i>Anoxybacillus</i> sp.	99	1,46 ± 0,10
LB1	<i>Bacillus licheniformis</i>	98	2,40 ± 0,46

Bakteri termo-lipolitik diseleksi pada media ZoBell yang mengandung 1 % *olive oil*. Adanya aktivitas lipolitik ditandai dengan terbentuknya endapan asam lemak yang berwarna putih keruh *paper disk* (Gambar 1). Zona keruh yang terbentuk karena adanya degradasi dari substrat (*olive oil*) yang terdapat pada media menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana. Setyati dan Subagiyo (2012) menyatakan, bahwa terbentuknya endapan asam lemak yang berwarna putih keruh menunjukkan bahwa isolat bakteri tersebut mempunyai kemampuan menghasilkan lipase [12]. Enzim lipase menghidrolisis trigliserida dalam *olive oil* menjadi gliserol dan asam lemak. Lipase yang bereaksi secara spesifik memutus rantai asam lemak trigliserol pada posisi sn-1 dan sn-3.



Gambar 1. Aktivitas lipolitik isolat bakteri termofilik

Indeks lipolitik dari masing-masing isolat bakteri termo-lipolitik berbeda-beda, yang paling tinggi didapatkan pada isolat AA3 yaitu 2,65, sedangkan yang paling rendah adalah pada isolate AB2 yaitu 1,46. Perbedaan indeks lipolitik dari masing-masing isolat disebabkan perbedaan kemampuan isolat dalam mendegradasi lipid.

3.2 Pengamatan Morfologi Isolat Bakteri Termo-lipolitik

Pengamatan morfologi isolat bakteri termo-lipolitik meliputi, morfologi koloni berupa bentuk dan warna koloni, sedangkan morfologi sel berupa pewarnaan Gram dan endospora seperti yang terdapat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil pengamatan morfologi koloni dan sel isolat bakteri termo-lipolitik

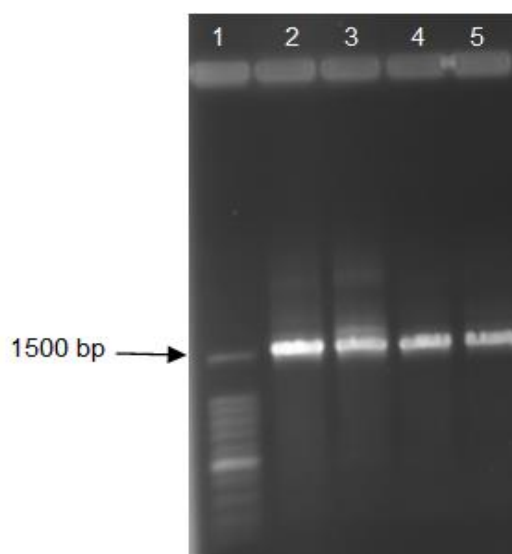
Karakter Isolat	Isolat AA1	Isolat AA3	Isolat AB2	Isolat LB1
Morfologi koloni	Sirkuler, putih	Irreguler, putih	Irregular, krem	Sirkuler, krem
Morfologi Sel	Batang pendek, Gram positif, menghasilkan endospora	Batang pendek, Gram positif, menghasilkan endospora	Batang pendek, Gram positif, menghasilkan endospora	Batang pendek, Gram positif, menghasilkan endospora

Hasil pengamatan menunjukkan morfologi koloni dari isolat termo-lipolitik bentuk bulat dan tidak beraturan, berwarna putih dan krem. Morfologi sel semua isolat berbentuk batang pendek, Gram positif dan menghasilkan endospora. Berdasarkan hasil pengamatan morfologi sel menunjukkan bahwa semua isolat-isolat tersebut dapat digolongkan ke dalam kelompok *Bacillus*. Kelompok bakteri ini sering dijumpai diberbagai lokasi bahkan di tempat yang bersuhu ekstrim. Kebanyakan anggota kelompok *Bacillus* dapat membentuk endospora yang dibentuk sebagai respon terhadap kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan, oleh karena itu anggota kelompok *Bacillus* memiliki toleransi yang tinggi terhadap kondisi lingkungan yang berubah-ubah [13]. Selanjutnya

Madigan *et al.* (2012) menyatakan, pada umumnya kelompok *Bacillus* merupakan bakteri yang berbentuk batang, menghasilkan enzim ekstraseluler yang dapat menghidrolisis protein dan polisakarida kompleks, membentuk endospora, aerob atau anaerob fakultatif.

3.3 Amplifikasi Fragmen Gen 16S rRNA dari Bakteri Termo-lipolitik

Hasil amplifikasi gen 16S rRNA dari isolat bakteri termo-lipolitik yang diuji dengan elektroforesis disajikan pada Gambar 2.



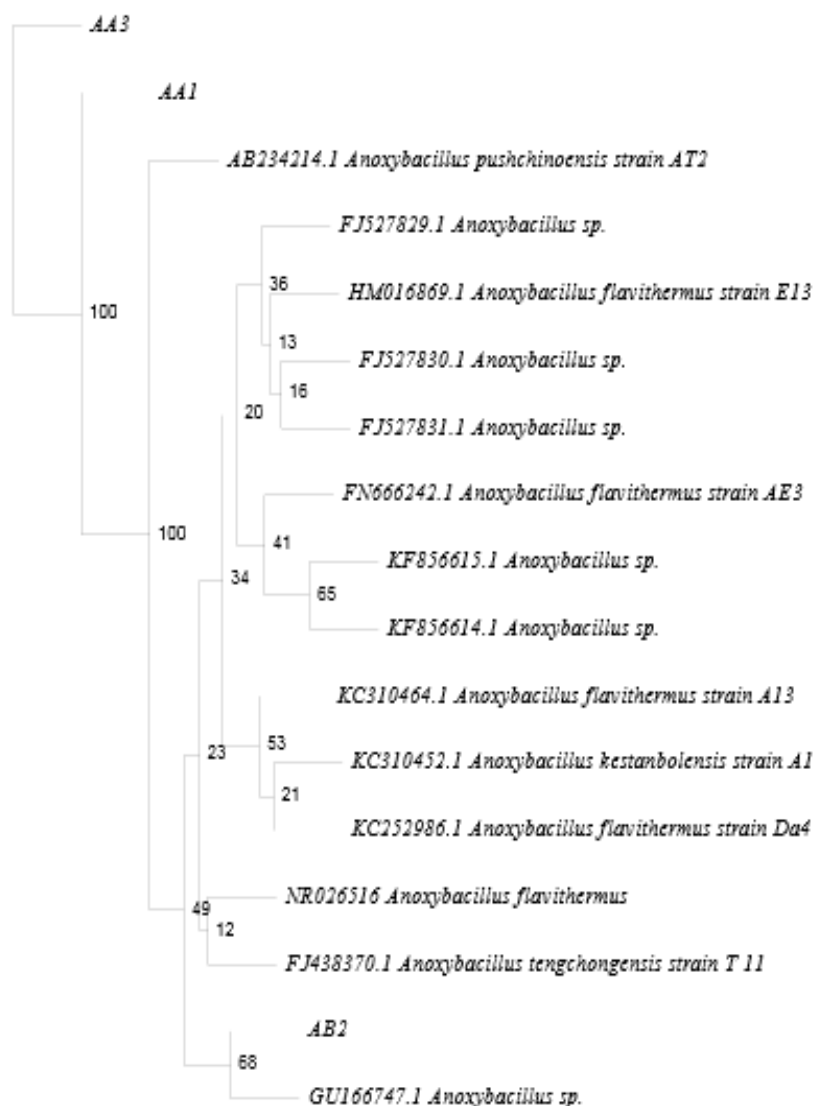
Gambar 2. Elektroferogram hasil amplifikasi gen 16S rRNA pada bakteri termo-lipolitik yang diuji. (1) DNA marker, (2) DNA AA1, (3) DNA AA3, (4) DNA AB2, (5) DNA LB1.

Amplifikasi gen 16S rRNA menunjukkan pita DNA dengan ukuran ± 1500 bp dengan ketebalan yang relatif sama dan jumlah pita DNA yang dihasilkan adalah satu. Hal ini menunjukkan bahwa primer yang digunakan untuk mengamplifikasi DNA sudah spesifik dengan untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA yang berukuran ± 1465 bp. Penggunaan primer bakteri yang spesifik yaitu 27F dan 1492R dapat memperoleh ampikon fragmen gen 16S rRNA dengan ukuran ± 1465 bp. Primer 27F dan 1492R merupakan dua primer yang biasa digunakan untuk identifikasi gen 16S rRNA bakteri [15].

3.4 Analisis Filogenetik.

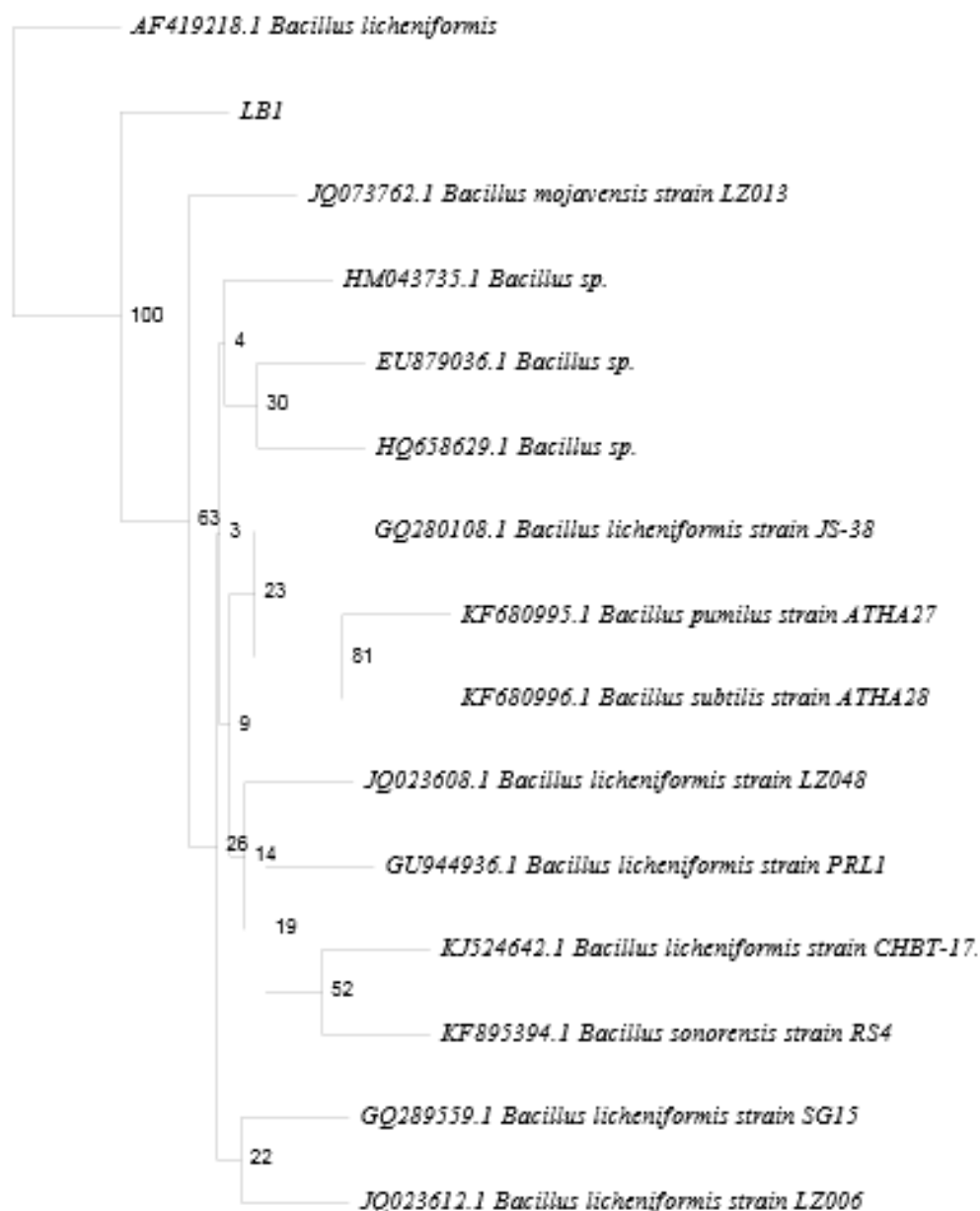
Analisis gen 16S rRNA didasarkan pada urutan nukleotida dari gen 16S rRNA dan dibandingkan dengan data gen 16S rRNA yang tersedia di Genbank. Hasil analisis menunjukkan bahwa sekuen gen 16S rRNA dari isolat AA1 dan AA3 memiliki kemiripan 99% dengan *Anoxybacillus pushchinoensis* sedangkan isolat AB2 memiliki kemiripan 99% dengan *Anoxybacillus* sp. (buat Tabel X. Matriks kemiripan). Pada Gambar 3 dapat dilihat isolat AA1 dan AA3 berada pada kelompok yang sama dengan *Anoxybacillus pushchinoensis* dan isolat AB2 berada pada kelompok yang sama dengan *Anoxybacillus* sp. Ketiga jenis bakteri ini berbentuk batang pendek, Gram positif dan menghasilkan

endospora (Table 2). *Anoxybacillus* memiliki toleransi yang luas terhadap kondisi lingkungan, sehingga sangat potensial untuk dikembangkan dalam industri bioteknologi karena kemampuannya dalam menghasilkan enzim termostabil [16].



Gambar 3. Filogenetik berdasarkan urutan nukleotida dari gen 16S rRNA isolat AA1, AA3, dan AB2.

Anoxybacillus bersifat aerob atau anaerob fakultatif, neutrofilik, termofilik obligat, pembentuk endospora, Gram positif, dan berbentuk batang. Pikuta *et al.* (2000) menyatakan Genus *Anoxybacillus* bersifat sebagai anaerob obligat. Pikuta *et al.* (2003) melaporkan bahwa *Anoxybacillus pushchinoensis* mengalami perubahan dari anaerob obligat menjadi anaerob aerotoleran dan Genus *Anoxybacillus* dari anaerob obligat menjadi anaerob fakultatif atau anaerob aerotoleran [17]



Gambar 4. Filogenetik berdasarkan urutan nukleotida dari gen 16S rRNA isolat LB1.

Isolat LB1 memiliki kemiripan 98% dengan *Bacillus licheniformis* (Gambar 4). *Bacillus licheniformis* berbentuk batang, Gram positif dan membentuk endospora (Tabel 2). Bakteri ini banyak digunakan untuk keperluan industri seperti produksi enzim dan antibiotik, memiliki kemampuan enzimatik yang beragam dan suhu optimal untuk sekresi enzim adalah 37°C [18]. Suhu pertumbuhan optimalnya adalah 50°C, tetapi dapat juga bertahan pada suhu yang lebih tinggi.

Bacillus spp. memiliki kemampuan enzimatik yang beragam, dan beberapa diantaranya mampu melakukan biodegradasi terhadap banyak senyawa rekalsitran dan xenobiotik. Disamping itu *Bacillus* bersifat aerob atau fakultatif anaerob, memiliki kisaran

suhu pertumbuhan yang luas, pembentuk spora, kosmopolit, tahan terhadap senyawa-senyawa antiseptik, sehingga sangat potensial untuk dikembangkan dalam industri bioteknologi [19].

4. KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

- Telah berhasil diisolasi enam isolat bakteri dari sumber air panas Semendo Muara Enim, namun hanya 4 isolat bakteri termofilik yang memiliki aktivitas lipolitik dengan indek lipolitik tertinggi pada isolat AA3, yaitu sebesar 2,65.
- Isolat bakteri AA1 dan AA3 memiliki kemiripan dengan *Anoxybacillus pushchinoensis*, AB2 dengan *Anoxybacillus sp* dan LB1 dengan *Bacillus licheniformis*. Tingkat kemiripan keempat isolat tersebut dengan masing-masing spesie sebesar 99%.

5. DAFTAR PUSTAKA

- [1]. Aravindan R, Anbumathi P and Viruthagiri T. Lipase applications in food industry. *Indian Journal of Biotechnology*. 2007 Apr;6:141-158.
- [2]. Shu ZY, Jiang H, Lin RF, Jiang YM, Lin L, Huang JZ: Technical methods to improve yield, activity and stability in the development of microbial lipases. *J Mol Catal B: Enzym* 2010;62:1-8.
- [3]. Liu IL, Tsai SW. Improvements in lipase production and recovery form *Acinetobacter radioresistens* in presence of polypropylene powders filled with carbon sources. *Appl Biochem Biotechnol*. 2003;104:129–140.
- [4]. Sharma R, Soni SK, Vohra RM, Gupta LK, Gupta JK. Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus sp.* . *Process Biochem*. 2002;37:1075–1084.
- [5]. Lopes Mde F, Leitao AL, Regalla M, Marques JJ, Carrondo MJ, Crespo MT. Characterization of a highly thermostable extracellular lipase from *Lactobacillus plantarum*. *Int J Food Microbiol*. 2002;76:107–115.
- [6]. Pratt J, Cooley JD, Purdy CW, Straus DC. Lipase activity from strains of *Pasteurella multocida*. *Curr Microbiol*. 2000;40:306–309.
- [7]. Abdou AM. Purification and partial characterization of psychrotrophic *Serratia marcescens* lipase. *J Dairy Sci*. 2003;86:127–132.
- [8]. Arpigny JL, Jaeger KE. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J*. 1999;343:177–183.

- [9]. Akhdiya A. Isolasi bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termotabil. *Jurnal Buletin Plasma Nutfah*.2003; 9(2):38–43.
- [10]. Nuronyah T, Rosa S. Identifikasi Spesies Isolat Bakteri S1 dengan Metode Analisis Sekuen Fragmen Gen 16S-rDNA. *Jurnal Teknik Pomits*. 2012;1(1):1–6.
- [11]. Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. Review and Re-analysis of Domain-specific 16S Primers. *J. Microbiol. Methods*. 2003;55:541–555.
- [12]. Setyati WA, Subagiyo. Isolasi dan Seleksi Bakteri Penghasil Enzim Ekstraseluler (Proteolitik, Amilolitik, Lipolitik dan Selulolitik) yang Berasal dari Sedimen Kawasan Mangrove. *Jurnal Ilmu Kelautan*. 2012;17(3):164-168.
- [13]. Slepecky RA, Hemphill HE, 2006. The Genus *Bacillus*- Nonmedical. *Jurnal Prokaryotes*. 2006;4: 530-562.
- [14]. Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA, Clark DP. *Biology of Microorganisms*. Tokyo: Benjamin Cummings;2012.
- [15]. Frank JA, Reich CI, Sharma S, Weisbaum JS, Wilson BA, Olsen GJ. Critical Evaluation of Two Primers Commonly Used for Amplification of 16S rRNA Genes. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*.2008;74(8):2461-2470.
- [16]. Inan K, Canakci S, Belduz AO. Isolation and Characterization of Xylanolytic New Strains of *Anoxybacillus* from some Hot Springs in Turkey. *Turk J Biol*. 2010:529-542.
- [17]. Pikuta E, Cleland D, Tang J. Aerobic Growth of *Anoxybacillus pushchinoensis* K1 : Emended Descriptions of *A. pushchinoensis* and The Genus *Anoxybacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003;53:1561-1562.
- [18]. De Clerck E, De Vos P. Genotypic diversity among *Bacillus licheniformis* strain from Various Sources. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;231(1):91-98.
- [19]. Atlas RDM, Bartha R. *Microbial Ecology, Fundamentals and Applications*. Sanjuan. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc. 1993.