

Isolasi, Seleksi dan Karakterisasi Bakteri Mannolitik yang berasal dari Serasah Tanaman Sawit

Ike Apriani

* E-mail: ike.apriani@gmail.com

ABSTRACT

Mananase enzyme used to hydrolyze manan in producing simple sugars, such as mannose and monooligosakarida which will be utilized in the industry. Mananase enzymes produced by microbes more attractive to industry because it is more economical, higher productivity and amore controlled production conditions. Mannolitic bacteria isolated from soil containing palm litter. Isolation is done by using selective media locus bean gum. The result showed 6 bacterial isolates that have the ability mannolitic. Isolate 6 has the highest mannolitic index of 0.85. Isolates 6 were characterized morphologically, showed that this isolate motile, cocci, and gram-negative. Physiological characterization showed that this isolate utilize peptone as a source of energy that is supported by VP and H₂S test results were positive.

Keywords: Manan; Mananaseenzyme; Locus bean gum; Palmlitter.

PENDAHULUAN

Enzim mananase merupakan salah satu enzim yang dibutuhkan dalam industri pakan, pangan, *pulp* dan kertas, farmasi, serta *pre-treatment* biomassa lignoselulosa dalam produksi biofuel. Lebih tepatnya, industri yang membutuhkan konversi substrat dari limbah agroindustri (Sigres & Sutrisno 2015). Enzim mananase digunakan untuk menghidrolisis manan, yang merupakan polisakarida yang terdapat pada komponen utama hemiselulosa. Sumber manan di alam sangat melimpah, terutama pada kopi, kopra, bungkil sawit maupun umbi jenis *Amorphophalus* (Ooi & Kikuchi, 1995).

Hasil hidrolisis manan akan menghasilkan gula sederhana, berupa manosa dan monooligosakarida yang akan dimanfaatkan dalam industri (Sigres & Sutrisno 2015). Penggunaan enzim untuk proses hidrolisis di bidang industri lebih meningkat karena penerapannya lebih efisien dan ramah lingkungan. Enzim mananase dapat dihasilkan oleh beberapa mikroorganisme seperti fungi, yeast dan bakteri (Dekker & Richards 1979). Produksi mananase dari mikroba lebih menguntungkan, karena lebih ekonomis, produktivitas lebih tinggi dan kondisi produksi lebih terkontrol.

Mikroorganisme yang menghasilkan enzim mananase umumnya terdapat di tanah, kompos atau rumen hewan. Tanah diketahui merupakan sumber isolasi terbaik bagi mikroba-mikroba karena pertumbuhan mikroba secara luas diketahui berada di dalam tanah (Brock 1984). Beberapa bakteri yang diketahui menghasilkan enzim mananase adalah *Bacillus pumilus* DYP 2 (Aurora 2003), *Bacillus subtilis* WY34 (Jiang *et al.* 2006), *Bacillus*

stearothermophilus (Talbot & Sygusch 1990), *Bacillus licheniformis* (Zhang *et al.* 2000) dan *Streptomyces* sp. Galur 451-3 (Ambarawati 2005).

Menurut Yopi *et al.* (2006) manan merupakan sumber biomassa pada limbah perkebunan sawit. Manan merupakan komponen hemiselulosa pada kayu lunak (*soft woods*) pada gymnospermae dan banyak terdapat pada saat pembengkakan biji yang terjadi pada proses germinasi (Marga 1996). Dengan demikian, tanah yang mengandung serasah sawit dimungkinkan mengandung bakteri potensial yang mampu menghidrolisis manan, sehingga perlu dilakukan isolasi bakteri manolitik.

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada Oktober hingga Desember 2010 bertempat di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi FMIPA IPB, Bogor.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan terdiri dari sentrifuse, shaker, waterbath, spektrofotometer, hot plate, pipet volumetrik, pipet mikro, dan peralatan umum Laboratorium Mikrobiologi.

Bahan yang digunakan adalah sampel tanah yang berasal dari area sekitar tanaman sawit di Sumatera Selatan. Media yang digunakan yaitu Locus Bean Gum (LBG) 0.3% dengan penambahan pepton 0.075%, ekstrak khamir 0.05%, KNO₃ 0.2%, MgSO₄.7H₂O 0.05%, NaCl 0.05%, FeSO₄ 0.001%, CaCO₃ 0.3%, dan agar 2%. Reagen untuk uji fisiologis yaitu Reagen Kovac, Metil Red, dan Barit

Metode

Isolasi bakteri penghasil Mananase

Sampel tanah diambil 1 gram dilarutkan dalam 9 ml larutan garam fisiologis 0.85% dan di vortex agar sampel tersuspensi dengan baik. Selanjutnya, dilakukan pengenceran serial dalam garam fisiologis hingga 10^{-5} . Sebanyak 100 μ l suspensi dengan pengenceran 10^{-4} dan 10^{-5} disebar dalam media cawan agar Locus Bean Gum. Selanjutnya bakteri dinkubasi selama 3 hari.

Koloni bakteri yang tumbuh disiram dengan Merah congo 0.1% dan dibilas menggunakan larutan NaCl 5 M. Isolat yang memiliki zona bening terbesar merupakan isolat potensial penghasil mananase. Selanjutnya, isolat tersebut dimurnikan dengan metode kuadran dan diremajakan pada media agar miring *Locust Bean Gum*.

Karakterisasi Morfologi dan Fisiologis

1. Karakterisasi Morfologi

Karakterisasi morfologi dilakukan dengan uji motilitas dan pewarnaan Gram. Uji motilitas dilakukan dengan cara mengamati pergerakan bakteri dibawah mikroskop. Sedangkan pewarnaan gram dilakukan dengan membuat lekapan kering pada kaca objek. Lekapan kering bakteri ditetaskan dengan pewarna ungu kristal dan genangi selama 1 menit, lalu dibilas dengan akuades. Selanjutnya genangi iodin gram selama 2 menit, lalu dibilas kembali. Kemudian dipucatkan dengan meneteskan alkohol 95% keatas lekapan bakteri tersebut hingga sisa pewarna ungu kritical larut. Berikutnya, teteskan dengan pewarna safranin selama 30 detik lalu dibilas. Lekapan yang telah diwarnai tersebut diamati pada mikroskop dengan perbesaran 1000x.

2. Karakterisasi fisiologis

Karakterisasi fisiologis bakteri penghasil mananase dilakukan melalui uji fermentasi karbohidrat, simmon sitrat, H_2S , MR/ VP, urea, dan produksi indol. Sebanyak 1 lup biakan bakteri murni berusia 24 jam dikulturkan pada masing-masing media uji. Untuk menguji kemampuan bakteri menggunakan sitrat dan menghasilkan H_2S , bakteri digoreskan berturut-turut pada media simmon sitrat dan H_2S . Pengamatan hasil uji fisiologis dilakukan setelah diinkubasi selama 24 jam.

a. Fermentasi karbohidrat

Media NB yang ditambah dengan *Brom Tyymol Blue* (BTB) sebagai indikator dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan bakteri sebanyak 1 lup. Tabung durham dimasukkan ke dalam tabung reaksi tersebut, kemudian disterilkan setelah steril diinkubasi masing-masing isolat bakteri kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu $37^\circ C$. Indikator pembentukan asam laktat apabila terjadi perubahan warna medium dari hijau menjadi kuning tanpa

pembentukan gas pada tabung durham. Uji akan bersifat fermentasi asam campuran apabila warna medium berubah dan diikuti pembentukan gas pada tabung durham dan uji akan bersifat fermentasi alkohol apabila terbentuk gas pada tabung durham tanpa diikuti perubahan warna medium.

b. Simmon sitrat

Isolat diinkubasi pada medium *Simmon's Citrate agar* dalam tabung reaksi secara vertikal, kemudian diinkubasi pada suhu $37^\circ C$ selama 24 jam dan diamati perubahan yang terjadi. Uji bernilai positif bila terjadi perubahan warna medium dari hijau menjadi biru yang merupakan indikasi bahwa bakteri mampu menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber energi.

c. H_2S

Inokulasi biakan pada tabung reaksi yang telah berisi media TSIA 7 mL dengan cara menusukkan jarum ose ke dalam media kemudian baru diinkubasi pada bagian *slant* TSIA. Inkubasi pada suhu $37^\circ C$ selama 24 jam. Diamati pertumbuhannya pada bagian *Butt* dan *Slant* (Lay, 1994).

d. MR/ VP

- Uji *Methyl Red*

Isolat bakteri diinkubasi pada medium MR-VP, kemudian diinkubasi pada suhu $37^\circ C$ selama 24 jam, tiap-tiap tabung ditambahkan 3-4 tetes indikator metil merah. Bila warna medium berubah menjadi merah, artinya terbentuk asam.

- Uji *Voges Proskauer*

Biakan ditanam pada medium MR-VP, kemudian diinkubasi pada suhu $37^\circ C$ selama 24 jam, masing-masing tabung ditambahkan 10 tetes barrit A dan barrit B. Tabung dikocok selama 20-30 detik. Uji akan bernila positif jika terbantuk warna merah muda yang merupakan indikasi bahwa bakteri mampu memfermentasikan glukosa dan membentuk asam hingga pH media menjadi 5 atau lebih rendah. Jika selama 20-30 detik medium belum berubah warna, maka hasil pengamatan dilakukan selama 15 menit.

e. Urea

Media ini digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menguraikan urea (oleh enzim urease yang dihasilkan bakteri). Dalam penguraian urea ini akan menghasilkan residu berupa amoniak, sehingga akan mengubah warna indikator neutral red menjadi lebih ungu.

f. Produksi indol.

Media yang digunakan adalah media *Tryptofan Broth*, media ini digunakan untuk mengetahui adanya produksi enzim triptofanase dari bakteri

yang memecah triptofan menjadi asam piruvat dan hasil sampingnya berupa amoniak dan indol, untuk itu media dilengkapi dengan asam amino triptofan. Jika bakteri mampu memecah asam amino triptofan dan menghasilkan indol maka dapat dideteksi dengan meneteskan reagen Kovac's atau reagen Erlich yang mengandung *Para Amino Benzoic Acid* (PABA) melalui dinding tabung, dan akan terjadi ikatan antara indol dengan PABA yang membentuk cincin merah.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan seleksi kemampuan bakteri manolitik

Isolasi mikroorganisme dilakukan dengan cara menumbuhkan sampel di media selektif (*Locus Bean Gum*) yang mengandung manan. Manan merupakan bahan penginduksi atau induser terbaik untuk menghasilkan mananase pada isolat manolitik

yang diujinya (Araujo & Ward, 1990). Kemampuan manolitik isolate dapat dilihat dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni. Dari hasil penelitian, didapatkan 6 isolat yang dapat membentuk zona bening (Tabel 1). Menurut Priest (1984) zona bening terbentuk karena adanya difusi enzim ekstraseluler ke medium agar disekeliling koloni. Zona bening dapat terlihat jelas dengan penambahan *merah congo*. Menurut Sumardi (20017) merah congo akan berikatan dengan polisakarida manan yang memiliki ikatan β -1.4-D-manopiranosil dalam media agar sehingga media akan berwarna merah. Sebaliknya hasil hidrolisis enzim mananase berupa monosakarida (tidak memiliki ikatan β -1.4-D-Manopiranosil) dan oligosakarida (memiliki sedikit ikatan β -1.4-D-Manopiranosil) yang ada disekitar koloni akan berwarna bening setelah pembilasan dengan NaCl 1%.

Tabel 1 Seleksi bakteri manolitik

Isolat	Nilai indeks manolitik (IM)
1	0.22
2	0.09
3	0.42
4	0.67
5	0.014
6	0.85

Indek Manolitik (IM) tertinggi pada isolate 6 sebesar 0.85 dan yang terendah pada isolat 5 sebesar 0.014 (Tabel 1). Isolate dengan zona bening yang tinggi diduga memiliki aktivitas yang tinggi. Menurut Seftiono & Hermawan (2008) zona bening yang dihasilkan berbanding lurus dengan aktivitas enzim yang dihasilkan isolat.

Karakterisasi Morfologi Isolat

Isolat 6 merupakan isolat yang menghasilkan indeks manolitik (IM) yang tinggi sehingga dilakukan uji karakteristik, baik morfologi maupun fisiologi. Pengujian morfologi dilakukan dengan pengujian motilitas dan pewarnaan gram.

Dari hasil pengujian didapatkan bahwa isolat 6 berkarakteristik motil, kokus dan berwarna merah. Hasil pewarnaan gram yang menghasilkan bakteri berwarna merah berarti tergolong bakteri gram negatif. Menurut Pelczar (2008) bakteri gram negatif akan kehilangan ungu kristal ketika dicuci dengan alkohol, dan sewaktu diberi warna tandingan dengan warna merah safranin akan tampak berwarna merah.

Karakterisasi Fisiologi Isolat

Uji fisiologis yang dilakukan yaitu uji fermentasi karbohidrat, simmon sitrat, H₂S, MR/VP, urea, dan produksi indol. Hasil uji fisiologis pada isolat 6 disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2 Karakter bakteri isolat 6 berdasarkan uji fisiologi

Media uji	Hasil uji	Keterangan
1. Fermentasi karbohidrat	-	Merah
2. Urea	-	Merah muda
3. Simmon sitrat	-	Hijau
4. H ₂ S	+	Kuning
5. MR	-	Tetap
6. Indol	-	Tidak ada cincin merah
7. VP	+	Merah

Keterangan:

(+) uji positif

(-) uji negatif

Hasil uji fisiologis menunjukkan bahwa mikroba isolat 6 tidak memanfaatkan sitrat sebagai sumber energi, tidak mendegradasi urea, tidak mendegradasi asam amino triptofan dan tidak memfermentasi karbohidrat dengan hasil uji negatif. Sumber energi bagi pertumbuhan bakteri dapat berasal dari pepton. Terdapat 0.075% pepton yang ditambahkan pada media LBG. Hal ini didukung dengan hasil uji H₂S yang positif. Hasil ini menunjukkan bahwa mikroba dapat menghasilkan hidrogen sulfida dari substrat asam amino bersulfur melalui reduksi (hidrogenasi) enzimatis terhadap sulfur organik menjadi sistein, suatu komponen pepton. Komponen ini dapat didegradasi menjadi asam amino yang akan dikonversi secara enzimatis oleh deaminasi oksidatif menjadi asam ketoamino. Substrat akan dimetabolisme lanjut melalui siklus krebs untuk produksi energi. Reaksi akan melepas ammonia yang terakumulasi dalam media membentuk NH₄OH sehingga lingkungan bersifat basa (Sunatmo, 2009). Didukung dengan uji MR yang menunjukkan hasil negatif berarti tidak ada asam yang dihasilkan dalam reaksi tersebut. Sedangkan uji VP menunjukkan hasil positif, menurut Sunatmo (2009) organisme akan menghasilkan substansi non asam atau produk akhir netral seperti asetilmetilkarbinol dari asam organik sebagai hasil metabolisme glukosa.

KESIMPULAN

Isolasi bakteri dari sampel tanah yang berasal dari area sekitar tanaman sawit menghasilkan 6 isolat yang memiliki kemampuan mananolitik. Isolat 6 memiliki nilai Indeks mananolitik tertinggi sebesar 0.85 cm. Isolat 6 berbentuk kokus, gram negatif dan motil. Hasil uji fisiologis menunjukkan bahwa bakteri ini memanfaatkan pepton sebagai sumber energi yang didukung dengan hasil uji VP dan H₂S yang positif.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Ambarawati D. (2005). *Karakterisasi Mananase Streptomyces sp. Galur 451-3* [skripsi]. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- [2] Araujo P, Ward OP.(1990). Extracellular Mananase and Galactanases from Selected Fungi. *J. Ind. Microbiol*, 6: 171-178.
- [3] Aurora DD. (2003). *Isolasi dan Karakterisasi Enzim Mananase Bacillus pumilus DYP 2* [skripsi]. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- [4] Brock TD. (1984). *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*. Science Tech. Inc.: New York.
- [5] Dekker RFH, Richards GN. (1979). Hemicellulase: their Occurrence, Purification, Properties, and Mode of Action. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 32:277-352.
- [6] Jiang Z *et al.* (2006). High-Level Production, Purification, and Characterization of A Thermostable-mannanase from the Newly Isolated *Bacillus subtilis* WY34. *Carbohydrate Polymers*,30:1-9.
- [7] Marga F, Ghakis C, Morosoli R, Kleupfel D. (1996). Improved production of mananase by *Streptomyces lividans*. *Appl Environ Microbiol*,62(12): 4656-4658.
- [8] Ooi T, D. Kikuchi. (1995). Purification and Some Properties of β -Mananase from *Bacillus* sp. *World J Microbiol Biotechnol*, 11: 310-314
- [9] Pelczar, M.J. and E.C.S. Chan.(1988). *Dasar-dasar Mikrobiologi II*. Universitas Indonesia Press. Jakarta. 192.
- [10] Priest FG.(1984). *Extracellular Enzymes*. Van Nostrand Reinhold, England.
- [11] Seftiono, Hermawan. (2008). Pemurnian dan Karakterisasi Mananase dari *Streptacidiphilus luteoalbus*. Skripsi. Bogor. IPB
- [12] Sigres, D.P & Sutrisno,A. (2015). Enzim mananase dan aplikasi di bidang industri. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 3(3): 899-908.
- [13] Sumardi. (2007). Isolasi dan Karakterisasi Mananase Ekstraseluler dari *Fusarium oxysporum*. *J. Sains MIPA*, 13(1): 43-48
- [14] Sunatmo, T.I. (2009). *Eksperimen Mikrobiologi dalam Laboratorium*. Ardy Regency: Jakarta.
- [15] Talbot G, Sygusch J. (1990). Purification and Characterization of Thermostable β -mannanase and-galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Appl Environ Microbiol*,56:3505-3510.
- [16] Yopi *et al.* (2006). Preparasi Manan dan Mananase Kasar dari Bungkil Kelapa Sawit. *Jurnal Teknologi*, 4: 312-319.
- [17] Zhang J, He Z, Hu K. (2000). Purification and Characterization of β -mannanase from *Bacillus licheniformis* for Industrial use. *Biotechnology Letters*,22:1375-1378.