

**ANALISIS POTENSI DAN KARAKTERISASI MOLEKULER GEN 16S rRNA BAKTERI
SELULOLITIK YANG DIISOLASI DARI MAKROALGA *Eucheuma sp.*
DAN *Sargassum sp.* SEBAGAI PENGHASIL ENZIM SELULASE**

Muhammad Luthfi Ramadhan*, Ibnu Dwi Buwono** dan Yuniar Mulyani**

*) Alumni Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Unpad

**) Staf Dosen Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Unpad

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mencari bakteri selulolitik yang bersimbiosis pada makroalga *Eucheuma sp* dan *Sargassum sp.* Metode penelitian menggunakan analisis deskriptif terhadap parameter uji, identifikasi molekuler gen 16S rRNA dan aktivitas selulolitik. Penelitian ini dilaksanakan melalui tiga tahapan, yaitu kultivasi bakteri, uji aktivitas selulolitik dan analisis molekuler gen 16S rRNA. Hasil penelitian didapatkan 16 isolat murni bakteri dengan 5 diantaranya memiliki aktivitas selulolitik, isolat bakteri dengan kode B.1.2 menghasilkan indeks selulolitik 2,477 mm dan kode C.2 menghasilkan indeks selulolitik 6,102 mm. Dari hasil karakterisasi molekuler gen 16S rRNA diketahui spesies bakteri pada kode isolat B.1.2 adalah *Bacillus subtilis* dan kode isolate C.2 adalah *Bacillus thuringiensis*.

Kata kunci : Bakteri selulolitik, Makroalga, Zona Bening, 16S rRNA

ABSTRACT

**ANALYSIS OF POTENTIAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF 16S rRNA
GENE OF ISOLATION CELLULOLYTIC BACTERIA FROM *Eucheuma sp.* AND
Sargassum sp. MACROALGAL AS A PRODUCER OF CELLULASE ENZYMES**

This research conducted to find a symbiotic cellulolytic bacteria in *Eucheuma sp* and *Sargassum sp.* Methods of research used descriptive analysis of the test parameters, molecular identification of 16S rRNA gene and cellulolytic activity. The research was conducted in three stages, that were cultivation of bacteria, cellulolytic activity assay and molecular analysis of 16S rRNA genes. The results obtained 16 pure bacterial isolates which five of them had a cellulolytic activity, bacterial isolates code B.1.2 produced the cellulolytic index 2.477 mm and code C.2 produced the cellulolytic index 6.102 mm. From molecular characterization of the 16S rRNA gene obtained that bacterial species code B.1.2 isolate was *Bacillus subtilis* and the code C.2 was *Bacillus thuringiensis*.

Key words : Cellulolytic Bacteria, Macroalga, Clear Zone, 16S rRNA

PENDAHULUAN

Perairan Indonesia memiliki sumberdaya makroalga yang besar. Dalam ekspedisi Laut Siboga 1899-1900 oleh Van Bosse ditemukan kurang lebih 555 jenis makroalga di perairan Indonesia (Anggadiredja 2008).

Berdasarkan data Kementerian Kelautan dan Perikanan, Indonesia memiliki luas area untuk kegiatan budidaya rumput laut/ makroalga mencapai 1.110.900 ha, tetapi pengembangan budidaya rumput laut baru memanfaatkan lahan seluas 222.180 ha atau 20% dari luas areal potensial (BPPT 2010).

Dengan kelimpahan yang besar tersebut, pengembangan sumberdaya energi dengan bahan dasar makroalga sangatlah potensial. Hal ini didukung juga oleh hasil analisis laboratorium di Jepang yang menunjukkan komposisi kimia dari makroalga yang menghasilkan agar meliputi kurang lebih air (16-20)%, protein(2,3-5,9)%, lemak (0,3-0,55)%, karbohidrat (67,85-76,15)%, serat (0,8-2,1)% dan abu (3,4-3,6)% (Chapman dalam Salamah 2005). Dari hasil penelitian tersebut menunjukan bahwa kandungan tertinggi dari rumput laut adalah karbohidrat.

Selulosa adalah karbohidrat paling melimpah di alam, namun pemanfaatannya belum optimum. Selulosa terdiri atas monomer glukosa yang dihubungkan dengan ikatan β -1,4-glikosida (Ratnakomala dkk 2009). Dengan menghidrolisis ikatan glikosida dapat diperoleh glukosa yang kemudian dapat digunakan untuk berbagai tujuan, seperti produksi bioetanol.

Dari latar belakang penelitian, masalah yang teridentifikasi adalah bagaimana bakteri selulolitik indigenus yang bersimbiosis pada makroalga dapat menjadi kandidat penghasil enzim selulase. Dan untuk mengetahui 2 jenis bakteri selulolitik yang memiliki aktivitas selulolitik tertinggi, dilakukan karakterisasi molekuler gen 16S rRNA.

Tujuan Penelitian

- Mendapatkan isolat murni bakteri selulolitik dari makroalga *Eucheima* sp dan *Sargassum* sp juga mengetahui sejauh mana menghasilkan potensi

bakteri selulolitik tersebut untuk memproduksi enzim selulase .

- Menganalisis keragaman/ biodiversitas dari bakteri selulolitik hasil isolasi melalui karakterisasi molekuler gen 16S rRNA.

Dengan mendapatkan isolat murni bakteri selulolitik yang bersimbiosis pada makroalga, diharapkan akan lebih mampu menguraikan selulosa pada proses pengolahan selulosa berbasis makroalga seperti dalam proses pembuatan bioetanol.

Selulosa merupakan polisakarida penyusun karbohidrat, dimana polisakarida penyusun karbohidrat meliputi pati, selulosa dan dektrin yang merupakan substrat yang amorph sebagian besar tak larut dalam air dan tak berasa mempunyai perumusan $(C_6H_{10}O_5)_n.H_2O$, dimana n sangat besar. Bila polisakarida dihidrolisis diperoleh gula-gula: C_6 - atau C_5 (Sastrohamidjojo 2005).

Pada kenyataannya, selulosa seringkali berikatan dengan hemiselulosa. Selulosa dan hemiselulosa adalah polisakarida yang dibangun oleh ikatan β -1,4 glikosidik dan sangat melimpah pada limbah berlignoselulosa (Howard dalam Astutik 2012). selulosa dihidrolisis menggunakan enzim selulase. Dalam mendegradasi selulosa, mikroorganisme bekerja dengan mengsekresikan enzim selulase (Ambrianto 2010).

Pada makroalga, limbah yang dihasilkan memiliki kandungan selulosa tinggi berkisar antara 27,38 - 39,45 % (Fithriani dkk 2007). Dari kandungan selulosa yang tinggi tersebut memungkinkan terdapat bakteri selulolitik yang bersimbiosis dengan makroalga.

Dengan menggunakan bakteri selulolitik yang bersimbiosis dengan substrat asalnya, diharapkan akan lebih mampu untuk menguraikan selulosa pada substratnya. Hal tersebut dikarenakan bakteri yang mensekresikan enzim selulase telah teradaptasi pada substratnya, sehingga dapat memproduksi enzim lebih optimal.

Isolasi bakteri dilakukan untuk mendapatkan isolate bakteri yang Memiliki aktivitas selulolitik. Isolate bakteri yang Memiliki aktivitas selulolitik tertinggi dilakukan karakterisasi molekuler gen 16S

rRNA. Gen penyandi 16S rRNA ini umum digunakan untuk menganalisis keragaman bakteri karena gen penyandi 16S rRNA spesifik untuk amplifikasi DNA bakteri dan arcahe (Heijs *et al* 2007).

METODE DAN BAHAN PENELITIAN

Bahan yang digunakan terdiri dari sampel makroalga *Eucheuma* sp dan *Sargassum* sp yang berasal dari sekitar wilayah perairan Pantai Palabuhan Ratu. Untuk proses pengambilan sampel, digunakan botol fial yang berisi NaCl fisiologis steril yang digunakan untuk tempat sampel dan cool box untuk tempat menyimpan botol fial yang berisi sampel. Bahan yang digunakan dalam proses kultivasi bakteri serta pemurnian bakteri menggunakan marine agar, sedangkan pada tahapan uji aktivitas selulolitik dilakukan penambahan CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*) sebanyak 1% dan pewarnaan untuk melihat kenampakan zona bening menggunakan *red congo*

0,1% dan dibilas menggunakan NaCl 1M. untuk perbanyakan bakteri dilakukan kultur cair terlebih dahulu menggunakan *Nutrient Broth*. Isolasi DNA menggunakan *solution 1*, *solution 2* dan *solution 3*. Presipitasi DNA menggunakan ethanol absolute dan pencucian menggunakan ethanol 70%. Tahapan amplifikasi menggunakan primer spesifik 16S rRNA dengan daerah target 1.500 bp. Hasil dari amplifikasi kemudian dilakukan pengecekan dengan elektroforesis menggunakan gel agarose 1%.

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan analisis deskriptif untuk mendapatkan data yang diperlukan. Untuk isolasi bakteri menggunakan metode sebar, dan untuk pemurnian bakteri menggunakan metode gores. Tahapan isolasi DNA genom bakteri menggunakan metode *Alkaline Lysis* dari Sambrook *et al* (1989) dan untuk amplifikasi gen 16S rRNA mengadopsi siklus dari penelitian Rachim 2008.

Tabel 1. Siklus Amplifikasi Gen 16S rRNA

Siklus	Suhu	Waktu	Jumlah Siklus
Inisialisasi	94 °C	2 menit	1
- Denaturasi	94 °C	30 detik	30
- Annealing	42 °C	1 menit	
- Elongasi	72 °C	2 menit	
Final elongasi	72 °C	10 menit	1
Final hold	4 °C	-	1

Setelah hasil amplifikasi gen 16S rRNA mendapatkan hasil yang sesuai target, kemudian dilanjutkan ketahap sekuensing yang dilakukan menggunakan jasa 1st BASE Malaysia. Data hasil sekuensing yang di dapat kemudian diterjemahkan menggunakan program Bioedit dan hasilnya dicocokkan dengan data di genebank dengan mengakses website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemilihan penggunaan CMC digunakan dalam penentuan aktivitas enzim selulase. Hal ini didasarkan pada penelitian Fitriani (2003) yang menyatakan bahwa CMC merupakan substrat paling murni dibandingkan substrat-substrat lain seperti kertas saring, avicel, kapal dan lain-lain. Selain itu, CMC adalah selulosa murni yang dapat larut lebih mudah terhidrolisis dibandingkan jika selulosa yang diambil dari alam yang masih berikatan dengan lignin dan hemiselulosa serta masih memiliki struktur kristalin (tidak larut) yang tinggi (Astutik 2012).

Tabel 2. Uji Aktivitas Selulolitik pada Isolat Bakteri Sampel *Eucheuma* sp.

No	Kode Isolat	Indeks Selulolitik (mm)
1	A.2	-
2	A.3	-
3	B.1	-
4	B.1.1	-
5	B.1.2	2,477
6	B.2	1,930
7	B.3	2,155

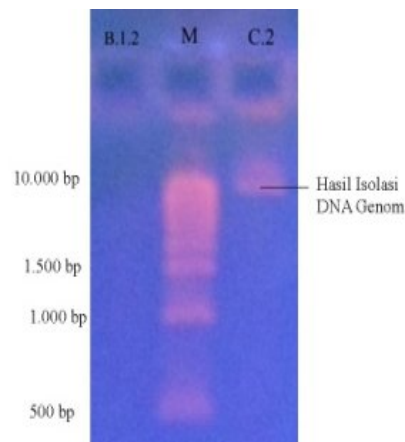
Tabel 3. Uji Aktivitas Selulolitik pada Isolat Bakteri Sampel *Sargassum* sp.

No	Kode Isolat	Indeks Selulolitik (mm)
1	C.1	-
2	C.1.1	-
3	C.1.2	-
4	C.2	6,102
5	C.2.1	-
6	C.3	-
7	C.4	-
8	D.1	-
9	D.2	1,411

Dari tabel diatas menunjukan bahwa dua isolat yang menghasilkan indeks selulolitik terbesar adalah kode isolate bakteri B.1.2 dan C.2. Kemudian pada kedua bakteri tersebut kemudian dilakukan karakterisasi secara molekuler untuk mengetahui jenis/ spesies bakteri tersebut.

Isolasi DNA secara umum mempunyai empat tahap, yaitu

pemecahan sel, ekstraksi DNA presipitasi DNA dan pencucian DNA. Penggunaan *solution 1*, *solution 2* dan *solution 3* berperan dalam proses pemecahan sel dan ekstraksi DNA sedangkan dalam tahap presipitasi digunakan menggunakan ethanol absolute dan terakhir pencucian pellet hasil isolasi DNA genom menggunakan etanol 70%.

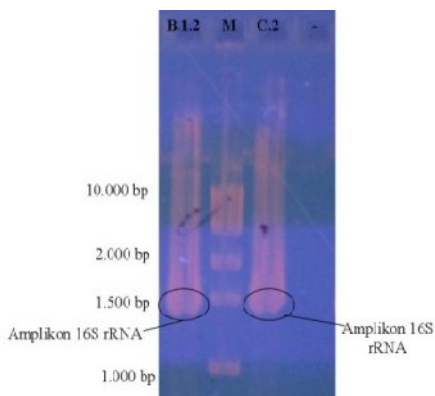


Gambar 1. Hasil Isolasi DNA Genom

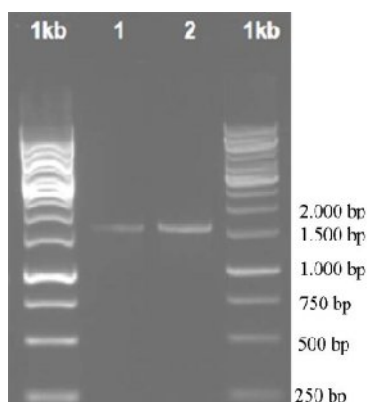
Pada proses amplifikasi gen 16S rRNA digunakan siklus PCR pada tabel dibawah yang merupakan hasil optimasi dari penelitian Rachim (2008). Primer yang digunakan adalah primer universal yang digunakan untuk amplifikasi gen 16S rRNA dengan target amplicon 1.500 bp. Primer merupakan komponen paling penting dalam reaksi PCR karena primer

iniilah yang akan menentukan daerah genom yang akan di amplifikasi (Rafsanjani 2011).

Berikut merupakan gambar hasil amplifikasi gen 16S rRNA. Tampak bahwa pita amplicon berada pada ukuran 1.500 bp. Kemudian setelah ahapan ini dilanjutkan dengan sekuensing.



Gambar 2. Hasil Amplifikasi Gen 16S rRNA



Gambar 3. Hasil Purifikasi Produk Amplifikasi oleh 1st BASE

Hasil sekuensing yang diperoleh berupa data mentah yang harus diolah menggunakan perangkat/ program bioedit. Data yang diperoleh dari hasil penggunaan program BioEdit digunakan sebagai data dasar untuk diolah kembali

pada *multiple alignment* (pensejajaran berganda) dengan database

Sekuen yang ada di *GeneBank* dengan NCBI BLAST pada level nukleotida dan dapat diakses di website <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>.

Tabel 4. Hasil BLASTN

Sampel	Query Coverage (%)	Deskripsi
B.1.2	97	<i>Bacillus subtilis</i>
C.2	97	<i>Bacillus thuringiensis</i>

Data hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa sampel memiliki tingkat kesesuaian/ homologi yang tinggi berdasar pada urutan sekuen DNA yang tercover yaitu 97% dengan data di *GeneBank* (Lampiran 10 dan 12). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan Khumaida dkk dalam Addinilia (2012) yang menyatakan bahwa tingkat kesamaan nukleotida sekitar 80% termasuk cukup tinggi.

Strain *Bacillus subtilis* dapat digunakan untuk mendegradasi substrat selulosa seperti sekam padi, tebu ampas tebu, dan rumput liar (Deka *et al* 2011).

Enzim dari strain *Bacillus thuringiensis* dapat diterapkan dalam biokonversi biomassa lignoselulosa menjadi gula melalui fermentasi (Lin *et al* 2012).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

- Dari kelima Isolat bakteri penghasil zona bening, isolat bakteri dengan kode B.1.2 dan C.2 merupakan isolat yang memiliki indeks selulolitik terbesar pada pengujian aktivitas selulolitik menggunakan penambahan CMC 1% pada medium *marine agar* yaitu 2,477 mm dan 6,102 mm.
- Hasil karakterisasi molekuler dengan gen penyandi 16S rRNA pada kedua isolate bakteri penghasil indeks selulolitik terbesar, mendapatkan hasil sequen yang memiliki kesamaan atau homologi yang tinggi yaitu 97% pada hasil BLAST di website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Kode Isolat B.1.2 dari sampel *Eucheuma* sp memiliki kesamaan dengan *Bacillus subtilis*, sedangkan kode isolat C.2 dari *Sargassum* sp memiliki kesamaan dengan *Bacillus thuringiensis*.
- Hasil analisis berdasarkan data sekunder dari jurnal-jurnal penelitian sebelumnya, menyatakan bahwa kedua bakteri tersebut memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai bakteri penghasil enzim selulase.

DAFTAR PUSTAKA

- Addinilia, Dewi. 2012. *Analisis Karakter Genetik Berdasarkan Gen Cytochrome B pada Sidat (Anguilla Bicolor Dan A. Marmorata)*. Skripsi. program studi perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Padjadjaran. Jatinangor.
- Ambriyanto., K. S. 2010. *Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Aerob Pendegradasi Selulosa dari Serasah Daun Rumput Gajah (Pennisetum Purpureum Schaum)*. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Teknologi Sepuluh November. Surabaya.
- Anggadiredja., J. T. Zatinika., A. Purwoto., H. Istini., S. 2008. *Rumput Laut*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Astutik., R. P. Kuswytasari., N. D. Shovitri., M. 2012. *Uji Aktivitas Enzim Selulase dan Xilanase Isolat Kapang Tanah Wonorejo Surabaya*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Teknologi Sepuluh November. Surabaya.
- BPPT. 2010. *Eksistensi Rumput Laut Indonesia*. <http://www.btt.go.id> (diakses tanggal 28 Februari 2012).
- Deka., D. Bhargavi., P. Sharma., A. Goyal., D. Jawed., M. Goyal., A. 2011. *Enhancement of Cellulase Activity from a New Strain of Bacillus subtilis by Medium Optimization and Analysis with Various Cellulosic Substrates*. Research Article. Indian Institute of Technology Guwahati. India.
- Fithriani., D. Rodiah., N. Bakti., B. S. 2006. *Ekstraksi selulosa dari limbah pembuatan karaginan*. Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan. 2(2).91-97.

- Heijs., S.K. Haese., R.R. Paul., W.J.J. Wielen., V.D. Forney., L.J. and Elsas., J.D.V. 2007. *Use of 16S rRNA Gene Based Clone Libraries to Assess Microbial Communities Potentially Involved in Anaerobic Methane Oxidation in a Mediterranean Cold Seep*. Department of Microbiology, Laboratory of Microbial Ecology, Center for Ecological and Evolutionary Studies, University of Groningen. Netherland. Volume 53, 384–398.
- Lin., L. Kan., X. Yan., D. Wang., D. 2012. *Characterization of extracellular cellulose-degrading enzymes from Bacillus thuringiensis strains*. Research Article. Anhui Normal University. Republic of China. Electron. J. Biotechnol Vol. 15 No. 3, Issue of May 15, 2012.
- Rachim,R.F. 2008. *Isolasi dan Karakterisasi Gen Pengkode Endoglukanase Termotabil dari Sumber Air Panas Secara Metagenomik*. Thesis. Tidak dipublikasikan. Bioteknologi, Institut Teknologi Bndung. Bandung.
- Rafsanjani, Ali. 2011. *Analisis Keragaman Genetik Ikan Mas (Cyprinus carpio) di Waduk Saguling dengan Menggunakan Metode RAPD PCR*. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Padjadjaran. Jatinangor.
- Salamah., E. Susanti., D dan Wikanta., T. 2005. *Kualitas Agarosa Hasil Isolasi Dari Rhodymenia Ciliata Menggunakan Deae-Selulosa*. Jurnal Ilmiah. Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Sambrook., J. Fritsch., E.F and Maniatis., T. 1989. *Molecular Cloning. 2nd edition*. Cold Spring Harbor Press. USA.
- Sastrohamidjojo, H. 2005. *Kimia Organik, Stereokimia, Karbohidrat, Lemak, dan Protein*. Yogyakarta : Gadjah Mada