

#### IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

##### 4.1 Hasil Isolasi Bakteri Amilolitik Penghasil PHA dari Sampel Tanah Taman Hutan Raya Sultan Syarif Hasyim

Sebanyak 21 isolat bakteri berhasil diisolasi dari beberapa lokasi pengambilan sampel tanah di kawasan Tahura SSH Provinsi Riau yang kemudian ditumbuhkan pada medium pati agar (PA) untuk mengetahui kemampuannya dalam mendegradasi pati. Isolat-isolat tersebut diperoleh dari 9 sampel tanah pada 3 stasiun yaitu Stasiun I (ST<sub>1</sub>), Stasiun II (ST<sub>2</sub>) dan Stasiun III (ST<sub>3</sub>), masing-masing dengan 3 titik sampel. Hasil isolasi bakteri dalam medium PA dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil isolasi bakteri yang tumbuh dalam medium PA masa inkubasi 3 hari.

No.	Kode Isolat	Tumbuh pada medium PA	pH
1.	ST <sub>1</sub> I <sub>1</sub>	+	5,1
2.	ST <sub>1</sub> I <sub>2</sub>	+	
3.	ST <sub>1</sub> I <sub>3</sub>	+	
4.	ST <sub>1</sub> I <sub>4</sub>	+	
5.	ST <sub>1</sub> I <sub>5</sub>	+	
6.	ST <sub>2</sub> I <sub>1</sub>	+	5,8
7.	ST <sub>2</sub> I <sub>2</sub>	+	
8.	ST <sub>2</sub> I <sub>3</sub>	+	
9.	ST <sub>3</sub> I <sub>1</sub>	+	5,6
10.	ST <sub>3</sub> I <sub>2</sub>	+	
11.	ST <sub>3</sub> I <sub>3</sub>	+	
12.	ST <sub>3</sub> I <sub>4</sub>	+	
13.	ST <sub>3</sub> I <sub>5</sub>	+	
14.	ST <sub>3</sub> I <sub>6</sub>	+	
15.	ST <sub>3</sub> I <sub>7</sub>	+	
16.	ST <sub>3</sub> I <sub>8</sub>	+	
17.	ST <sub>3</sub> I <sub>9</sub>	+	
18.	ST <sub>3</sub> I <sub>10</sub>	+	
19.	ST <sub>3</sub> I <sub>11</sub>	+	
20.	ST <sub>3</sub> I <sub>12</sub>	+	
21.	ST <sub>3</sub> I <sub>13</sub>	+	

Keterangan : + ( mampu tumbuh pada medium PA )

ST<sub>n</sub>I<sub>n</sub> = stasiun ke-n isolat ke-n

Table 1 menunjukkan bahwa 21 isolat bakteri mampu tumbuh dalam medium PA yang diperoleh dari sampel tanah kawasan Tahura SSH provinsi Riau. Berdasarkan tabel di atas dapat dilihat bahwa ada 5 isolat bakteri yang

ditemukan pada stasiun I dengan pH 5,1, 3 isolat pada stasiun II dengan pH 5,8 dan 13 isolat pada stasiun III dengan pH 5,6. Pada stasiun III diketahui ada lebih banyak isolat bakteri yang mampu tumbuh dibandingkan dengan stasiun I dan II. Hal ini disebabkan pada stasiun III jumlah kerapatan tumbuhan, serasah yang terdapat disekitar stasiun serta daun-daunan lebih banyak ditemukan dibandingkan stasiun I dan II. Sehingga memungkinkan lebih banyak bakteri yang mampu memanfaatkan sumber karbon dan energi.

Menurut Dirnawan, Suwanto dan Purwanaria (2000), tumbuh-tumbuhan termasuk dedaunan, rerumputan dan serasah yang ada disekitar lokasi pengambilan sample tersebut mengandung bahan-bahan organik seperti protein, pati, glikogen, lemak, selulosa, hemiselulosa dan kitin. Bahan-bahan organik kompleks tersebut dimanfaatkan oleh bakteri mesofilik sebagai sumber karbon dan energi dengan kemampuan hidrolitiknya.

Isolasi bakteri dari sampel tanah Tahura SSH mula-mula dilakukan pada medium PA. Karena sampai saat ini belum ada yang melaporkan medium selektif untuk isolasi pertumbuhan bakteri mengakumulasi sekaligus penghasil PHA. Pati digunakan sebagai substrat karena pati merupakan substrat yang relatif murah dan mudah diperoleh. Pati banyak diproses lebih lanjut menjadi glukosa dan senyawa lain dengan cara hidrolisis, biasanya menggunakan yeast dan bakteri. Jadi, pati bisa menjadi substrat (sumber karbon) alternatif pengganti substrat glukosa yang harganya lebih mahal, sehingga biaya produksi PHA dapat ditekan. Martani, Margino, Sembiring, Soesanto & Yuswanto (1995), telah menggunakan pati sebagai sumber karbon pengganti glukosa untuk produksi polihidroksialkanoat (PHA) dengan *Alcaligenes sp.* yang bersifat amilolitik.

#### 4.2 Uji Hidrolisis Pati

Tahap pertama dalam mengisolasi bakteri penghasil PHA adalah dengan cara menumbuhkan bakteri pada medium selektif. Medium selektif yang digunakan adalah medium PA. Bakteri-bakteri yang mampu tumbuh pada medium PA dimurnikan dan dikultivasi kembali kedalam medium PA untuk mendapatkan isolat bakteri yang mampu mendegradasi pati. Indikasi bahwa bakteri-bakteri tersebut mampu mendegradasi pati yaitu dengan mengamati zona bening yang tampak disekitar koloni bakteri yang kemudian diwarnai dengan pewarna Iodium.

Isolat-isolat bakteri yang dapat menghidrolisis pati (bakteri amilolitik) akan membentuk zona bening disekitar koloninya. Zona bening yang terbentuk sudah terlihat pada masa inkubasi 24 jam. Diameter zona bening akan bertambah besar sesuai dengan lamanya masa inkubasi. Isolat-isolat yang mampu membentuk zona bening diinkubasi selama 72 jam (3 hari).

Berdasarkan hasil pemurnian dan pengujian kemampuan isolat bakteri dalam mendegradasi pati maka dari 21 isolat bakteri yang tumbuh dalam medium PA ditemukan 12 isolat bakteri mampu menghidrolisis pati (bakteri amilolitik). Indikasi bahwa ke-12 isolat bakteri mampu menghidrolisis pati yaitu adanya zona bening disekitar koloni yang dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Diameter zona bening isolat bakteri amilolitik yang diuji dalam medium PA masa inkubasi 3 hari.

No.	Kode isolat	Pendegradasi Pati	Diameter Zona Bening (cm)
1.	ST <sub>1</sub> I <sub>1</sub>	+	1,2
2.	ST <sub>1</sub> I <sub>2</sub>	+	1,1
3.	ST <sub>1</sub> I <sub>3</sub>	+	1,1
4.	ST <sub>1</sub> I <sub>4</sub>	+	1,2
5.	ST <sub>1</sub> I <sub>5</sub>	+	2,1
6.	ST <sub>3</sub> I <sub>2</sub>	+	0,9
7.	ST <sub>3</sub> I <sub>5</sub>	+	1,5
8.	ST <sub>3</sub> I <sub>6</sub>	+	1,9
9.	ST <sub>3</sub> I <sub>7</sub>	+	1,4
10.	ST <sub>3</sub> I <sub>9</sub>	+	1,0
11.	ST <sub>3</sub> I <sub>11</sub>	+	1,0
12.	ST <sub>3</sub> I <sub>12</sub>	+	0,8

Ket : St<sub>n</sub>I<sub>n</sub> = Stasiun ke-n Isolat ke-n

Berdasarkan tabel 2 dapat dilihat bahwa zona bening yang terbentuk disekitar isolat bakteri menunjukkan isolat bakteri tersebut mampu menghidrolisis pati yang mengindikasikan penghasil enzim amilase. Enzim amilase memiliki kekhususan memotong ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosidik yang terdapat pada rantai amilosa dan amilopektin, tetapi tidak dapat memecah ikatan  $\alpha$ -1,6-glikosidik yang terdapat pada polimer bercabang dari rantai polisakarida (pati) (Kim, Gu, Jeong, Byum & Shin,1995). Enzim ini dikenal sebagai endoenzim yang memecah dan memotong substrat dari bagian tengah atau bagian dalam molekul secara acak, termasuk enzim ekstraseluler yaitu enzim yang dihasilkan di dalam sel tapi dikeluarkan ke medium pertumbuhan selama fermentasi.

Pengukuran aktivitas  $\alpha$ -amilase dapat dilakukan secara kuantitatif dan kualitatif. Pada penelitian ini, penentuan aktivitas  $\alpha$ -amilase dilakukan secara kualitatif dengan pewarnaan (staining) iodium terhadap hasil hidrolisis pati. Pati yang mengalami hidrolisis akan menunjukkan zona bening dan yang tidak terhidrolisis akan menghasilkan warna biru setelah pewarnaan dengan iodium. Salah satu aktivitas hidrolitik dari isolat bakteri amilolitik penghasil PHA dapat dilihat pada Gambar 3.



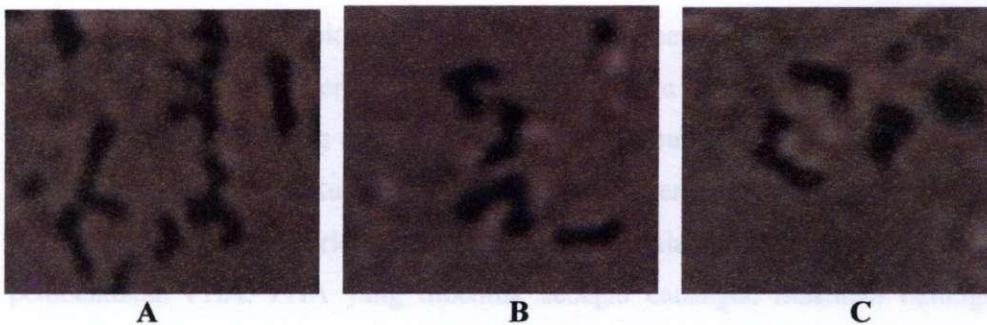
Gambar 3. Salah satu aktivitas hidrolitik dari isolat bakteri amilolitik (ST<sub>1</sub>I<sub>5</sub>) dalam membentuk zona bening dengan masa inkubasi 3 hari pada medium PA.

#### 4.3 Seleksi Bakteri Penghasil PHA

Seleksi bakteri penghasil PHA dilakukan dengan uji pewarnaan PHA terhadap isolat-isolat bakteri yang memiliki kemampuan menghidrolisis pati. Keduabelas isolat yang mampu menghidrolisis pati diuji dengan pewarnaan PHA untuk mengetahui kemampuannya dalam mengakumulasikan PHA di dalam selnya. Pewarnaan PHA dilakukan dengan dua warna yaitu Sudan Black B dan safranin. Granula PHA akan menyerap warna Sudan Black B, sehingga akan terlihat berwarna biru kehitaman. Pengamatan sel bakteri granula PHA dilakukan dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000 kali (Doetsch, 1981 *di dalam* Gerhardt, Murray, Costilow, Nester & Wood, 1981; Lay, 1994).

Menurut Lay (1994), PHA membentuk granula seperti lipid, yang dapat diwarnai dengan zat warna yang larut dalam lipid, seperti Sudan Black B. Sudan Black B mewarnai granula PHA menjadi biru tua kehitaman, sedangkan safranin mewarnai sitoplasma menjadi merah. Zat warna yang larut dalam lipid seringkali disebut dengan zat warna netral.

Dari hasil uji pewarnaan PHA, diperoleh hasil yang menunjukkan bahwa ke-12 isolat bakteri amilolitik hasil isolasi dari sampel tanah kawasan Tahura SSH Provinsi Riau memperlihatkan uji positif dengan uji pewarnaan PHA. Ini berarti bahwa semua isolat bakteri amilolitik tersebut dapat menghasilkan dan mengakumulasi PHA dalam selnya. Hal ini ditandai dengan adanya granula yang berwarna biru kehitaman di dalam selnya. Adanya inklusi bodi warna biru kehitaman dalam sel menunjukkan bahwa bakteri tersebut dapat mengakumulasi PHA (NCBE, 1995). Gambar hasil pewarnaan PHA dapat dilihat pada Gambar 4 di bawah ini.



Gambar 4. Beberapa hasil dari pewarnaan granula PHA. A. ST<sub>1</sub>I<sub>1</sub> bentuk basil; B. ST<sub>1</sub>I<sub>4</sub> bentuk basil; C. ST<sub>3</sub>I<sub>2</sub> bentuk basil.

PHA dikenal lebih dari 50 tahun sebagai cadangan energi yang diakumulasi oleh bermacam-macam mikroorganisme seperti *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Azotobacter* dan *Rhizobium* (Fernandes, *et al.*, 1988). Menurut Wang *et al.*, (1997), *A. eutrophus* dan *E. coli* rekombinan telah ditumbuhkan untuk produksi PHB dalam suatu medium terdefinisi secara kimia dengan sumber karbon yang terbaik adalah glukosa dan sukrosa untuk *A. latus*.

Masing-masing isolat yang di uji memiliki kemampuan yang berbeda-beda dalam menghasilkan PHA. Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa kemampuan isolat-isolat bakteri dalam menghidrolisis pati tidak berkorelasi dengan kemampuannya dalam menghasilkan PHA. Semakin besar zona bening yang terbentuk tidak selalu menunjukkan semakin besar kemampuan isolat bakteri tersebut dalam menghasilkan PHA. Menurut Mawarsari (1995), menunjukkan bahwa isolat-isolat bakteri yang memiliki kemampuan amilolitik lebih rendah dibandingkan isolat-isolat bakteri yang memiliki kemampuan amilolitik yang

lebih besar menghasilkan kadar PHA yang lebih tinggi. Ini berarti bahwa adanya sifat amilolitik yang tinggi belum dapat menghasilkan kadar PHA yang tinggi juga.

PHA adalah senyawa yang disintesis oleh mikroorganisme dalam kondisi sumber karbon yang berlebih dan merupakan cadangan energi. Proses metabolisme PHA dalam sel bakteri merupakan suatu sistem tertutup yang melibatkan proses akumulasi dan depolimerisasi (Fernandez *et al.*, 1986; Caldwell, 1994). Sumber karbon seperti glukosa membentuk asam piruvat melalui proses glikolisis. Oksidase asam piruvat menghasilkan asetil-KoA, sebagian besar asetil-KoA akan masuk ke dalam siklus Krebs atau siklus asam trikarboksilat dan sebagian lagi akan masuk ke dalam lintasan pembentukan PHA (Valentin & Dennis, 1996). Bila sumber karbon berlebih, maka laju pengambilan substrat akan lebih tinggi daripada yang dibutuhkan untuk pertumbuhan. Substrat yang diserap ini akan memicu pembentukan NADH<sub>2</sub> yang akan membentuk ATP. Jika jumlah ATP yang diproduksi berlebih, maka akan diakumulasikan dan akan mengikat pembentukan PHA. PHA yang dibentuk sebagai cadangan makanan berfungsi sebagai tempat penyimpanan NADH<sub>2</sub>. Akumulasi PHA ini dapat digunakan sebagai sumber karbon dan energi internal bila sumber karbon eksternal terbatas (Van Aalst-van Leuwen *et al.*, 1997).

Beberapa peneliti melaporkan bahwa granula PHA diakumulasi oleh sel sesudah fase pertumbuhan stasioner dan produk ini dapat didepolimerisasi apabila sumber karbon atau energi di dalam medium mulai berkurang (Bertrand, Ramsay & Chavarie, 1990). Hal ini disebabkan karena granula juga berfungsi sebagai cadangan makanan bagi sel bakteri.

#### **4.4 Karakterisasi Morfologi Isolat Bakteri Penghasil PHA**

Karakterisasi untuk 12 isolat bakteri yang mampu mengakumulasikan PHA di dalam selnya meliputi pengamatan makroskopis yaitu pengamatan morfologi koloni (bentuk, warna, tepian, elevasi dan konsistensi), pengamatan mikroskopis yaitu dengan pewarnaan PHA dan Gram serta pengamatan fisiologis dan biokimia (uji katalase dan uji oksidase). Hasil karakterisasi duabelas isolat bakteri dapat dilihat pada Tabel 3.

**Tabel 3. Karakterisasi morfologi, fisiologi dan biokimia isolat bakteri penghasil PHA yang diperoleh dari taman hutan raya sultan syarif hasyim provinsi riau masa inkubasi 3 hari.**

Kode Isolat	Koloni					Pewarnaan Gram		Oksidase	Katalase
	Bentuk	Wama	Tepian	Elevasi	Konsistensi	Gram	Bentuk Sel		
ST <sub>11</sub>	Bundar	krem	licin	cembung	lengket	positif	basil	-	+
ST <sub>12</sub>	Bundar	putih	berombak	cembung	lengket	positif	basil	-	+
ST <sub>13</sub>	Tak beraturan dan menyebar	krem	licin	cembung	lengket	positif	basil	-	+
ST <sub>14</sub>	Bundar	krem	licin	datar	lengket	positif	basil	-	+
ST <sub>15</sub>	Tak beraturan	kuning	berombak	datar	lengket	positif	basil	-	+
ST <sub>32</sub>	Berbenang-benang	Krem	licin	cembung	lengket	negatif	basil	-	+
ST <sub>35</sub>	Tak beraturan	krem	berombak	cembung	lengket	positif	basil	-	+
ST <sub>36</sub>	Bundar	putih	licin	cembung	lengket	positif	basil	-	+
ST <sub>37</sub>	Berbenang-benang	krem	licin	cembung	lengket	positif	basil	-	+
ST <sub>39</sub>	Tak beraturan	putih	seperti wol	datar	lengket	positif	basil	-	+
ST <sub>311</sub>	Keriput	krem	tak beraturan	cembung	lengket	positif	basil	-	+
ST <sub>312</sub>	Bundar	krem	licin	cembung	lengket	positif	basil	-	+

Ket : + = bereaksi

- = tidak bereaksi

#### 4.4.1 Pengamatan Makroskopis

Hasil pengamatan makroskopis yang diperoleh dapat dilihat pada Lampiran 4. Warna koloni bakteri yang ditemukan adalah 7 isolat berwarna krem, 1 isolat kuning, 3 isolat putih dan 1 isolat berwarna putih susu.

Bentuk morfologi koloni bakteri yang diperoleh yaitu bundar, tak beraturan, tak beraturan dan menyebar, dan berbenang-benang. Bentuk morfologi koloni bundar ada 5 isolat yaitu ST<sub>1I1</sub>, ST<sub>1I2</sub>, ST<sub>1I4</sub>, ST<sub>3I6</sub>, ST<sub>3I12</sub>. Bentuk morfologi koloni tak beraturan ada 3 isolat yaitu ST<sub>1I5</sub>, ST<sub>3I5</sub>, ST<sub>3I9</sub>, Bentuk morfologi koloni tak beraturan dan menyebar ada 2 isolat yaitu ST<sub>1I3</sub> dan ST<sub>3I2</sub>. Bentuk koloni keriput ada 1 isolat yaitu ST<sub>2I11</sub>. Selanjutnya ada 1 isolat yang bentuknya berbenang-benang yaitu ST<sub>3A7</sub>.

Tepian koloni bakteri yaitu licin, berombak, berlekuk, seperti wol dan tak beraturan. Koloni bakteri amilolitik dengan tepian licin ada 6 isolat yaitu ST<sub>1I1</sub>, ST<sub>1I3</sub>, ST<sub>1I4</sub>, ST<sub>3I6</sub>, ST<sub>3I7</sub>, ST<sub>3I12</sub>. Isolat dengan tepian berombak ada 4 isolat yaitu ST<sub>1I2</sub>, ST<sub>1I5</sub>, ST<sub>3I2</sub>, ST<sub>3I5</sub>. Isolat dengan tepian tak beraturan ada 1 isolat yaitu ST<sub>3I11</sub>. Ada 1 isolat dengan tepian seperti wol yaitu ST<sub>3I9</sub>.

Elevasi koloni bakteri amilolitik yang ditemukan yaitu cembung, datar dan timbul. Koloni bakteri dengan elevasi cembung ada 9 isolat yaitu ST<sub>1I1</sub>, ST<sub>1I2</sub>, ST<sub>1I3</sub>, ST<sub>3I2</sub>, ST<sub>3I5</sub>, ST<sub>3I6</sub>, ST<sub>3I7</sub>, ST<sub>3I11</sub>, ST<sub>3I12</sub>. Isolat bakteri dengan elevasi datar ada 3 isolat yaitu ST<sub>1I4</sub>, ST<sub>1I5</sub>, ST<sub>3I9</sub>.

Konsistensi koloni yang ditemukan adalah konsistensi lengket. Dari keduabelas isolat bakteri yang ditemukan seluruhnya memiliki konsistensi lengket. Berdasarkan hasil pengamatan mikroskopis diperoleh morfologi koloni bakteri yang berbeda-beda. Kemungkinan jenis bakteri tersebut ada yang berbeda dan ada juga yang sama. Gambar pertumbuhan bakteri yang mampu tumbuh di medium PA dapat dilihat pada Gambar 5.

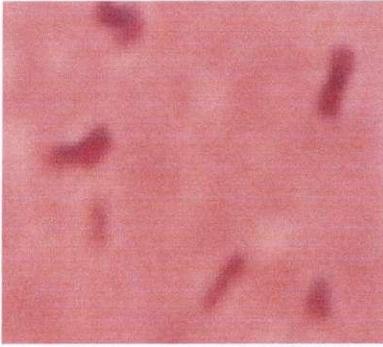
#### 4.4.2 Pengamatan Mikroskopis

Pengamatan mikroskopis isolat bakteri yang mampu menghasilkan dan mengakumulasi PHA meliputi pewarnaan Gram. Hasil yang diperoleh dari pewarnaan Gram yaitu 11 isolat merupakan bakteri Gram positif berbentuk batang. Sisanya ada 1 isolat bakteri merupakan bakteri Gram negatif yang berbentuk batang yang dapat dilihat pada Tabel 3.



Gambar 5. Salah satu pertumbuhan bakteri ( $ST_{3I_9}$ ) dengan masa inkubasi 3 hari pada suhu kamar dalam medium PA.

Pewarnaan Gram merupakan pewarnaan differensial yang digunakan untuk mengelompokkan bakteri kedalam 2 kelompok besar yaitu bakteri Gram positif (+) dan bakteri Gram Negatif (-). Apabila setelah dilakukan pewarnaan bakteri menunjukkan warna ungu maka bakteri tersebut tergolong bakteri Gram Positif dan warna merah muda menunjukkan bakteri Gram Negatif (-). Hal ini terjadi karena komposisi dinding sel bakteri Gram negatif yang terdiri dari kandungan lipid dan lemak jumlahnya lebih tinggi dari pada komposisi dinding sel bakteri Gram positif. Struktur dinding sel bakteri Gram negatif lebih tipis ( $\pm 10-15$  nm) dari pada dinding sel Gram positif ( $\pm 15-80$  nm). Pada pewarnaan Gram melalui perlakuan dengan etanol (alkohol) terhadap bakteri Gram negatif menyebabkan terekstraksinya lipid sehingga memperbesar daya rembes atau permeabilitas dinding sel Gram negatif. Jadi kompleks kristal violet dan iodium yang telah memasuki dinding sel selama langkah awal dalam proses pewarnaan dapat diekstraksi. Oleh karena itu organisme Gram negatif kehilangan warna kristal violet. Karena kandungan lipidnya yang lebih rendah, dinding sel bakteri gram positif menjadi terdehidrasi selama perlakuan dengan etanol. Ukuran pori-pori mengecil, permeabilitasnya berkurang dan komplek kristal violet dan iodine tidak dapat terekstraksi (Pelczar and Chan, 2002).



A



B

Gambar 6. Beberapa hasil pewarnaan Gram. A. ST<sub>3</sub>I<sub>2</sub> Gram negatif berbentuk basil; B. ST<sub>3</sub>I<sub>5</sub> Gram positif berbentuk batang.

Gambar 6 menunjukkan pengamatan mikroskopis bentuk sel bakteri yang diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. Hasilnya menunjukkan bahwa keduabelas isolat bakteri pengakumulasi PHA berbentuk batang.

#### 4.4.3 Pengamatan Fisiologi dan Biokimia

Pengamatan fisiologi dan biokimia isolat bakteri penghasil PHA dilakukan dengan 2 uji yaitu uji oksidase dan uji katalase.

##### 4.4.3.1 Uji Oksidase

Pada uji oksidase ditemukan semua isolat bakteri tidak memiliki kemampuan oksidase. Hal ini disebabkan tidak terjadinya reduksi O<sub>2</sub> yang dikatalisis oleh enzim sitokrom oksidase sehingga reaksi oksidasi tidak berlangsung (Jenkins, 1999).

##### 4.4.3.2 Uji Katalase

Pada uji katalase ke-12 isolat bakteri yang ditemukan memiliki kemampuan katalase. Hal ini disebabkan ke-12 isolat bakteri tersebut mampu menggunakan O<sub>2</sub> dalam menghasilkan hidrogen peroksida yang bersifat racun bagi metabolisme bakteri tersebut. Namun bakteri ini dapat hidup dengan adanya hidrogen peroksida. Hal ini disebabkan isolat bakteri mampu menghasilkan enzim katalase yang dapat mengubah hidrogen menjadi air dan oksigen (Hadioetomo, 1993).