LAPORAN AKHIR
PROGRAM KREATIVITAS MAHASISWA

ISOLASI BAKTERI-TERMOFILIK ASAM LAKTAT DARI SUMBER AIR PANAS GUNUNG PANCAR, BOGOR

BIDANG
PKM PENELITIAN

Oleh

1. Suyono	G44104023	2004
2. Chairunisa	G44104021	2004
3. Eka Kurnia Sari	G44104017	2004
4. Imam Sucipto	G44104004	2004
5. Hairul Anwar	G84050511	2005

INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2008

LEMBAR PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR PROGRAM KREATIVITAS MAHASISWA

1. Judul Kegiatan: Isolasi Bakteri-Termofilik Asam Laktat Dari Sumber Air Panas Gunung Pancar, Bogor
2. Bidang Kegiatan: PKMP
3. Bidang Ilmu : MIPA
4. Ketua Pelaksana Kegiatan
   a. Nama Lengka : Suyono
   b. NIM : G44104023
   c. Departemen : Biokimia
   d. Universitas : Institut Pertanian Bogor
   e. Alamat Rumah : Jl. Pahlawan No.34 Bondongan, Bogor
   f. Alamat e-mail : ion_rad33@yahoo.com
5. Anggota Pelaksana Kegiatan: 4 orang
6. Dosen Pemdamping
   a. Nama Lengkap dan Gelar : Ir. H. A. E. Zainal Hasan, Msi
   b. NIP. : 131 866 204
   c. Alamat Rumah : Jl. Pangeran Shogiri No 48 Bogor
7. Biaya Kegiatan Total
   Dikti : 5.700.000
   Sumber lain : -
8. Jangka Waktu Pelaksana : 6 bulan

Bogor, 4 Juli 2008

Menyetujui,
Ketua Departemen Biokimia

(drh. Sulistiyani, M.Sc. PhD.)
NIP. 131 415 135

Ketua Pelaksana Kegiatan

(Suyono)
NIM. G44104023

Wakil Rektor Bidang Akademik dan Kemahasiswaan

(Prof. Dr. Ir. Yonny Koesmaryono, MS)
NIP. 131 473 999

Dosen Pembimbing

(Ir. H. A. E. Zainal Hasan, Msi)
NIP. 131 866 204

A. PENDAHULUAN

1. Judul Penelitian

Isolasi Bakteri-Termofilik Penghasil Asam Laktat dari Sumber Air Panas Gunung Pancar, Bogor.

2. Latar Belakang

Indonesia memiliki banyak gunung berapi. Potensi gunung berapi ini menjadi pelengkap keanekaragaman biota salah satunya adalah mikroorganisme yang luput menjadi sumber potensi. Kondisi tanah dan perairan kita ini sangat mendukung pertumbuhan bakteri termofil. Salah satu daerah tersebut adalah Bogor yang memiliki salah satu kawasan wisata alam dengan sumber air panas Gunung Pancar. Kawasan ini telah diteliti keanekaragaman bakteri termofilnya pada penelitian PKM tahun sebelumnya.

Bakteri merupakan pabrik biologis penghasil berbagai macam senyawa, tidak hanya untuk keperluan mikroba tersebut tetapi juga bagi makhluk lain termasuk manusia. Pabrik molekuler mempunyai kecanggihan sintesis yang luar biasa. Jangkauan keragaman senyawa dan spesifitas yang dihasilkan sangat tinggi. Selain itu senyawa yang dihasilkan sangat kompleks, jauh melampaui hasil sintesis dengan teknologi manusia sekarang. Bakteri merupakan sel dengan organel sederhana dan sedikit di bawah sel eukariot. Walaupun demikian, adaptasi satuan selnya terhadap lingkungan sangat tinggi karena kemampuan berkembang biak dan kemampuan sintesis senyawa biologis yang memenuhi hampir semua kebutuhan sel. Hal ini yang menyebabkan bakteri menempati 60% biomassa bumi.

Bakteri yang sudah dimanfaatkan dalam bidang industri adalah bakteri asam laktat pada keju, yogurt, dan kefir. Bakteri ini rentan mati pada kondisi suhu tinggi. Padahal kemampuan menghasilkan metabolit asam laktat dari bakteri yang stabil pada suhu tinggi dalam proses industri, menghasilkan tekstur dan penambahan cita rasa pada keju dan yogurt. Sensitifitas terhadap suhu ini menyebabkan perlakuan yang ketat terhadap proses enzimatis pembentukan asam laktat sehingga biaya produksi menjadi tinggi.

Penelitian tentang bakteri termofilik asam laktat belum ada di Indonesia. Padahal Indonesia memiliki banyak kawasan sumber mata air panas. Jika Indonesia mampu mengembangkan penelitian dalam bidang ini, banyak sekali keuntungan yang akan diperoleh, antara lain: (1) biaya produksi dapat ditekan karena bakteri dapat bertahan dan stabil pada suhu tinggi serta kecepatan laju pembentukan asam laktat bakteri termofil tinggi sehingga laju produksi akan cepat; (2) Aplikasi pangan pada suhu tinggi, salah satunya mempengaruhi rasa, tekstur dan menghindari kontaminasi; dan (3) industri dan peneliti tidak perlu membeli mahal dari luar negeri dan menunggu lama pesanan tiba karena enzimnya yang diisolasi.

Saat ini banyak penelitian bioteknologi dilakukan dari tahap isolasi, identifikasi, modifikasi genetik, dan optimasi substrat. Isolasi bakteri merupakan hal yang sangat potensial. Metabolisme yang dapat bekerja pada suhu tinggi menjadi incaran industri. Hal ini yang menyebabkan bioteknologi maju pesat, dengan berbasis antara dunia teknologi industri dan kemampuan sintesis luar biasa dari mikroorganisme. Bakteri yang utama menjadi perhatian adalah bakteri termofil karena dapat menyelenggarakan metabolisme pada suhu tinggi. Banyak aplikasi bioteknologi dan mikrobiologi yang butuh suhu tinggi. Aplikasi ini intensif dilakukan dengan bakteri termofilik yang dapat menghasilkan enzim-enzim termofilik.

Enzim merupakan katalis biologis yang spesifik namun rentan mengalami disfungsi akibat perubahan kecil dari lingkungannya. Disfungsi ini akibat denaturasi yang dapat diakibatkan oleh suhu dan pH. Mesin biologis ini sangat sensitif. Oleh karena itu enzim mudah rusak dalam proses isolasi. Hal ini menyebabkan mahalnya enzim yang diperjual-belikan di pasaran. Harga mahal juga disebabkan karena proses impor enzim karena negara kita belum dapat memproduksi enzim sendiri, kalau ada belum tentu maksimal. Produksi ini melibatkan mikroorganisme karena belum ada alat sintetis kimiawi yang melakukannya. Oleh karena itu, timbul ketergantungan kita pada eksplorasi dan isolasi mikroba untuk kebutuhan ekonomis. Eksplorasi ini dapat teroptimasi dengan riset berbagai pakar multidisiplin ilmu. Enzim yang banyak digunakan untuk industri adalah enzim hidrolitik (memecah molekul besar menjadi molekul kecil secara hidrolisis), protease (pemecah atau pendenaturasi protein) dan lipase (emulsifikator lemak).

3. Perumusan Masalah

Indonesia kaya dengan habitat vulkanik yang menyimpan keanekaragaman biota termasuk mikroorganisme, salah satunya bakteri termofilik. Hal ini disayangkan karena luput dari perhatian ekonomis. Banyak industri luar negeri yang menghabiskan banyak uang untuk proyek isolasi bakteri ini dari tanah air kita, bahkan sampai pada tahap paten.

Indonesia belum memanfaatkan bakteri termofilik asam laktat dalam industri sehingga prosesnya mensyaratkan suhu yang rendah dan stabil. Industri sering menemukan kendala ini. Hal ini menyebabkan perlakuan ketat terhadap proses enzimatiknya yang rentan dipengaruhi suhu.

4. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini mengisolasi bakteri termofilik penghasil asam laktat dari sumber air panas Gunung Pancar, Bogor.

5. Luaran Yang Diharapkan

Penelitian ini diharapkan menghasilkan isolat-isolat yang mampu menghasilkan asam laktat pada sistem industri syarat proses suhu tinggi. Hal ini dapat diaplikasikan secara luas dalam industri fermentasi pangan, misalnya keju dan yoghurt.

6. Kegunaan Penelitian

Penelitian ini akan menghasilkan bakteri asam laktat yang stabil pada suhu tinggi dalam proses industri sehingga timbul kemampuan modifikasi produk pada suhu tinggi untuk mendapatkan tekstur dan penambahan cita rasa dalam aplikasi pangan. Ketahanan suhu ini menyebabkan perlakuan yang tidak ketat terhadap proses enzimatis pembentukan asam laktat sehingga biaya produksi dapat ditekan. Selain itu, bakteri termofilik mempunyai laju pembentukan asam laktat yang tinggi sehingga laju produksi akan cepat.

B. METODE PELAKSANAAN PROGRAM

1. Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan dari bulan Januari sampai Juni 2008 di Laboratorium Biokimia Departemen Biokimia , Kampus Darmaga, Institut Pertanian Bogor.

2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan, antara lain termos atau botol (insulator panas) volume 1 liter, gayung gagang panjang, cawan petri, jarum ose, inkubator, gelas ukur, *magnetic stirrer*, neraca analitik, termometer, autoklaf, *laminar air flow cabinet*, pH meter kertas dan digital, spektrofotometer, *freezer*, mikropipet, tip, dan berbagai peralatan gelas lainnya.

Bahan-bahan yang digunakan adalah Man Rogossa S Agar (MRSA), *yeast extract*, pepton atau tripton, susu bubuk skim, $MgS0_4.7H_20$, K_2HPO_4, $(NH_4)2S0_4$, NaCl, agar bakto, yogurt atau minuman fermentasi lain, akuades, dan etanol 95%.

3. Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam 3 tahap, meliputi: (1) Eksplorasi dan Isolasi bakteri termofil; (2) Pengujian aktivitas dan pemurnian bakteri, (3) Karakterisasi isolat bakteri asam laktat.

a. Eksplorasi dan Isolasi Bakteri Termofil

Habitat pengambilan contoh diukur suhu dan pH-nya terlebih dahulu. Air dan sedikit lumpur dari sumber air panas ditampung sebanyak 1 liter dalam termos atau botol (bersifat insulator panas) yang steril kemudian dibawa ke laboratorium. Sebanyak 60 ml contoh secara aseptik dikulturkan ke dalam 50 ml media cair Thermus kemudian diinkubasi selama 2-3 hari pada suhu 55°C tanpa di-*shaker*.

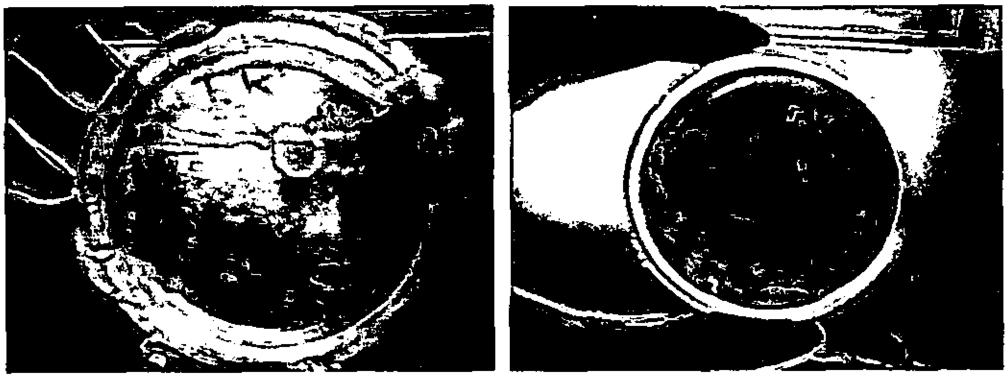
Semua kultur tersebut lalu diinokulasikan atau dituang pada agar Thermus pH 8,2. Selain itu, ada agar Thermus tidak diberikan inokulasi (kontrol negatif) dan juga ada yang diberikan bakteri *Lactobacillus casei* (kontrol positif). Semua media tersebut diinkubasikan lagi pada suhu 55°C selama 2-3 hari dan sebaiknya dalam perlakuan anaerobik, artinya lebih baik disimpan dalam *anaerobik jar*.

merupakan masalah, dikhawatirkan sampel tercampur air hujan dan mengurangi suhu. Aktivitas manusia tinggi di Kawah Putih, karena menjadi objek wisata pemandian air panas. Hal ini dikhawatirkan menjadi sumber kontaminasi bakteri luar habitat karena terbawa pengunjung. Kawah Hitam juga menjadi objek wisata, namun sepi dari pengunjung. Prospek isolasi bakteri diharapkan pada sampel kawah merah karena aktivitas pengunjung yang rendah dan suhu yang tinggi.

Ada dua media yang digunakan dalam proses isolasi, yaitu media Termus-Agar dan Man, Rogossa, and Sharpe Agar (MRSA). Thermus cocok untuk bakteri termofil, sedangkan MRSA untuk bakteri asam laktat (BAL). Kultur dibiakkan berseling antara Termus dan MRSA, sehingga diperoleh kombinasi karakteristik BAL dan termofil. Sampel dikulturkan terlebih dahulu ke media Termus cair (tanpa agar), Sebelum dikultur ke media agar (Termus-Agar dan MRSA). Hal ini untuk memulihkan kembali bakteri karena cekaman lingkungan, metabolit, atau dalam masa statis pertumbuhan.

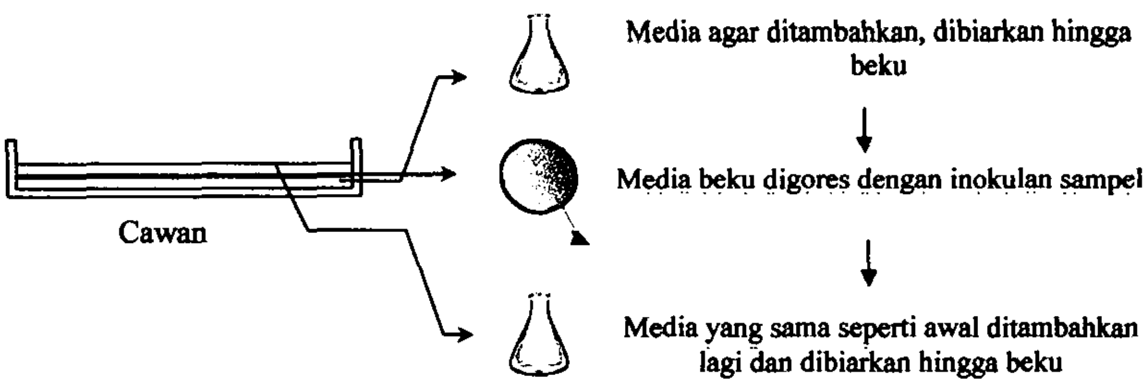
Media cair yang dipilih adalah Termus bukan MRS (tanpa A, artinya agar) karena kondisi MRS tidak mendukung pertumbuhan bakteri tahan panas ini. Volume sampel sebanyak 10 ml dicampur dengan 50 ml media Termus cair. Sampel yang ditambahkan cukup banyak karena berfungsi sebagai ekstrak nutrisi untuk mendukung bakteri termofil yang butuh nutrisi spesifik habitatnya. Nutrisi ini tidak disediakan dalam media termus atau sulit ditandingi dengan media lain, terutama komposisi vitaminnya yang khas untuk untuk bakteri termofil.

Media MRSA mengandung faktor pertumbuhan *Lactobacillus*, yaitu polisorbat (Tween 80), magnesium, mangan, dan asetat. Amonium sitrat dan natrium sitrat menghambat banyak bakteri Gram positif, negatif, dan fungi. Senyawa K_2HPO_4 dan $NaCH_3COOH$ sebagai agen buffer pada pH asam. Pepton, ekstrak daging, dan ragi sebagai sumber nitrogen, vitamin, mineral, dan asam amino. Dekstrosa sebagai sumber karbohidrat. MRSA tidak tahan suhu tinggi, bahkan pada suhu biasa kadaluarsanya 90 hari. Suhu tinggi ini menyebabkan akumulasi asetat di permukaan yang toksik bagi bakteri sehingga akan menyebabkan kematian kultur yang lebih cepat. Akumulasi asetat ini juga diduga tampak sebagai zona berwarna putih dan menyebar rata di media. Semula ini diduga sebagai koloni bakteri, namun timbulnya zona ini di luar goresan (/strik) dan menyebar rata.



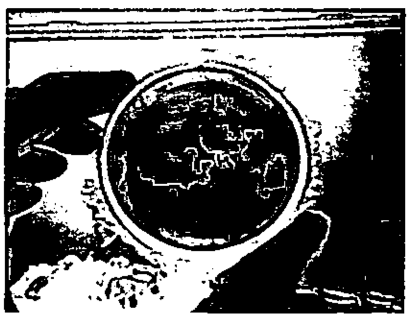
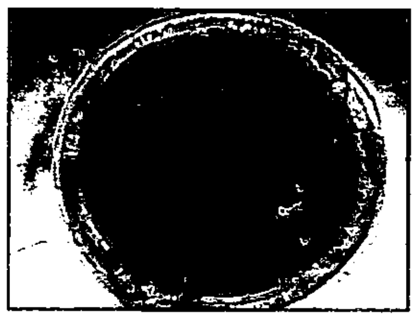
Gambar 2 Kontrol positif BAL pada MRSA pada pH 6,2 (kiri) dan pH 8,2 (kanan).

Koloni BAL terutama *Lactobacillus* tumbuh membentuk koloni berwarna putih. Hal ini terlihat tegas atau kontras, karena latar/media yang berwarna cokelat. Media ini mulanya dibuat sendiri dengan kombinasi komposisi bahan media tersebut, namun ekstrak daging sudah kadaluarsa sehingga hasilnya menumbuhkan kontrol positif BAL (*L. casei*) dengan tidak baik. Ada sebagian yang tumbuh namun koloni tidak tampak jelas atau tegas. Media MRSA yang rusak tersebut diganti dengan MRSA jadi/instan dalam bentuk dehidrasi. Setelah dicobakan lagi pada kontrol positif, koloni bakteri terlihat (Gambar 2, kiri). Media MRSA juga dimodifikasi dengan mengubah pH dari 6,2 menjadi 8,2. Hal ini mengikuti daya tumbuh baik bakteri termofil pada pH 8,2. Kontrol positif juga dicobakan pada media modifikasi ini, hasilnya bakteri tumbuh dengan koloni berwarna putih dan tumbuh di jalur goresan (Gambar 2, kanan).



Gambar 3 Metode media rangkap.

Bakteri asam laktat, misalnya *Lactobacillus* merupakan bakteri anaerob. Kondisi ini dapat diusahakan dengan sungkup anaerobik dengan penambahan gas karbon dioksida dan katalis pengikat oksigen. Kondisi ini sulit diusahakan karena tidak ada sungkup anaerobik di laboratorium, jika adapun tidak muat dimasukkan ke inkubator. Oleh karena itu, diusahakan metode media rangkap. Media agar dirangkapkan, setelah sebelumnya bidang tengah rangkap (permukaan agar pertama) digoreskan inokulan (Gambar 3). Teknik ini untuk meniadakan oksigen udara terbuka dengan menghalangi lapisan media agar atas. Teknik ini dapat diusahakan pada media Termus-agar atau MRSA Teknik ini sulit dilakukan karena media agar bagian atas mudah pecah dan kultur yang tumbuh sulit dilihat dan diambil untuk diinokulasikan lagi. Kesulitan tersebut menjadikan prosedur inkubasi langsung saja dilakukan di inkubator, tanpa kondisi anaerob. Kondisi anaerob coba didekati dengan memberikan plastik wrap untuk membungkus petri dan selama inkubasi tidak dilakukan aerasi (misalnya di*shaker*).

Gambar 4 Koloni BAL terduga pada media MRSA (kiri) dan Termus-Agar (kanan).

Bakteri *Lactobacillus* merupakan Gram positif sehingga tampak berwarna ungu pada pewarnaan gram, tetapi hasil kerja laboratorium menunjukkan warna merah. Hal ini diduga karena bakteri sudah melemah atau degeneratif karena jangka waktu inkubasi yang lama disertai suhu tinggi (di atas 45 °C). Bakteri yang tumbuh pada media MRSA mempunyai ciri fisik berwarna putih dan kadang membentuk badan gelembung berisi cairan, sedangkan pada Termus-agar timbul zona putih pudar (Gambar 4). Beberapa subkultur telah diuji pewarnaan Gram, hasilnya berwarna ungu, artinya bakteri ini merupakan Gram positif, menguatkan dugaan ke dalam kelompok bakteri asam laktat (BAL). Bakteri ini tetap menunjukkan warna ungu walaupun telah diinkubasi pada suhu 45-55°C (Gambar 5). Hal ini menunjukkan bakteri ini tidak mengalami degeneratif pada suhu tinggi, sehingga mengindikasikan karakteristik bakteri termofil.

Penelitian belum sampai pada proses karakterisasi dan identifikasi bakteri karena isolat masih perlu dimurnikan lebih lanjut. Proses ini akan diselesaikan sebagai penelitian skripsi dengan dana PKM yang tersisa. Oleh karena itu, isolat yang telah diperoleh pada pengerjaan sebelumnya akan dikering-bekukan agar tahan selama 6 bulan.

d. Rencana lanjutan

- Pemurnian bakteri
- Identifikasi dengan uji biokimia dan visualisasi dengan mikroskop perbesaran tinggi
- Pengujian aktivitas dan analisis metabolit laktat
- Karakterisasi Bakteri Asam Laktat

2. Kendala yang dihadapi

Kendala utama yang dihadapi adalah sibuknya tiap anggota kelompok dengan penelitian dan praktik lapangannya masing-masing (2 orang sedang praktik lapangan, 3 penelitian) sehingga tidak ada yang bisa meluangkan waktu secara penuh untuk melaksanakan rencana lanjutan. Kendala lainnya :

Fasilitas

- Laboratorium departemen penuh
- Satu alat dipakai banyak laboran, sehingga harus bergilir
- Suhu inkubator sering ter-reset sendiri sehingga kondisi inkubasi tidak tercapai
- Inkubator rusak sehingga dipakai oven, namun suhunya berubah-ubah antara 45-58 °C