

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Termofilik Penghasil Inulinase dari Sumber Air Panas

Isolation and Characterization Thermophilic Bactery Produced Inulinase from Hot Spring Water

Husnin Nahry Yarza¹, Yuni Ahda², Mades Fifendi²

¹ProGram Studi Pendidikan Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan
Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. Hamka (UHAMKA)

²ProGram Studi Biologi, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Padang

ABSTRACT

Inulinase producing thermophilic bacteria is a bacteria that can produce a thermostable inulinase enzyme. This study aimed to isolate the inulinase-producing thermophilic bacteria from hot springs Padang Ganting Kabupaten Tanah Datar and knowing the characteristics of inulinase producing thermophilic bacteria from hot springs Padang Ganting Kabupaten Tanah Datar. The procedure is done several steps of research is the isolation bacteria from hot springs Padang Ganting Kabupaten Tanah Datar using water samples. Bacteria acquired up to purified single colonies, staining Gram isolate bacterial. In this research get it five isolates inulinase producing thermophilic bacteria. The results of the morphological identification showed that isolates 1 (IKA 1) a rizoid shaped, surface smooth and color of chocolate. Isolates 2 (IKA 2) filament-shaped, shiny surface and color brown . Isolates 3 (IKA 3) filament-shaped, surfaces smooth, elevation and flat brown. Isolate 4 (IKA 4) is round, wavy edges, smooth surface, flat elevation and brown. The results of identified microscopically (Gram stain) in all five isolates were classified as Gram negative. The conclusion was found 4 isolates of inulinase-producing thermophilic bacterial colonies from hot springs Padang Ganting Kabupaten Tanah Datar.

Keywords: phosphate solubilizing, Indole Acetic Acid bacteria, nutrien broth, red pepper

ABSTRAK

Bakteri termofilik penghasil inulinase merupakan bakteri yang dapat menghasilkan enzim inulinase yang tahan pada suhu tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri termofilik penghasil inulinase dari sumber air panas Padang Ganting Kabupaten Tanah Datar dan mengetahui karakteristik bakteri penghasil inulinase dari sumber air panas. Prosedur penelitian ini dilakukan beberapa tahap yaitu isolasi bakteri dari sumber air panas dengan menggunakan sampel air. Bakteri yang didapatkan dimurnikan sampai dihasilkan koloni tunggal, dan dilakukan pewarnaan Gram dari isolat bakteri. Pada penelitian ini diperoleh empat isolat koloni bakteri termofilik penghasil inulinase. Hasil identifikasi secara morfologi menunjukkan bahwa Isolat koloni 1(IKA 1) berbentuk rizoid, permukaan halus, dan warna coklat. Isolat koloni 2 (IKA 2) berbentuk filamen, permukaan mengkilat dan warna coklat. Isolat koloni 3 (IKA 3) berbentuk filamen, permukaan halus, elevasi datar dan berwarna coklat. Isolat koloni 4 (IKA 4) berbentuk bulat, tepi bergelombang, permukaan halus, elevasi datar dan warna coklat. Hasil identifikasi secara mikroskopis (pewarnaan Gram) pada keempat isolat koloni tergolong Gram negatif dan sel berbentuk batang (bacillus). Kesimpulan adalah ditemukan 4 isolat koloni bakteri termofilik penghasil inulinase dari sumber air panas Padang Ganting Kabupaten Tanah Datar.

Kata kunci: seleksi, karakterisasi, bakteri termofilik, enzim, inulinase

Journal Bio-Site Vol.06 (01) Mei 2021, pp 01-09
DOI: 10.22437/bs.v4i2.5658

Accepted (diterima) : 22 Januari 2020
Received (disahkan) : 22 Januari 2020
Published (diterbitkan) online : 19 Mei 2021
Corresponding email : husnin.rahry@uhamka.ac.id
© The Author(s) 2018. This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

The online version of this article is located on the World Wide Web at:
<https://online-journal.unja.ac.id/BST/issue/archive>



PENDAHULUAN

Inulin merupakan senyawa karbohidrat alamiah dan merupakan polimer dari unit-unit fruktosa. Inulin ini dapat dihasilkan dari tanaman umbi-umbian (seperti pada dahlia, jerusalem artichoke dan chicory) dan berperan sebagai karbohidrat cadangan (Gupta *et al.*, 1990 dalam Wijanarka *et al.*, 2004). Inulin dihidrolisis dengan bantuan enzim inulinase. Inulin dapat larut pada suhu 55°C dan dapat melarutkan 5% inulin. Inulin ini dapat mengendap dalam campuran etanol-air (Vandamme dan Derycke, 1983 dalam Saryono *et al.*, 2002).

Inulin dihidrolisis oleh enzim inulinase dapat menghasilkan 90% fruktosa. Hidrolisis inulin secara enzimatik menggunakan enzim inulinase menguntungkan karena lebih mudah diekstraksi, dan produk yang dihasilkan jernih dan lebih manis (Allais *et al.*, 1986).

Inulinase ini dapat dihasilkan oleh jamur, bakteri, yeast maupun tumbuh-tumbuhan. Menurut Sing dan Gill (2006) tingkat produksi inulinase dari bakteri tidak sebanding dengan yeast dan jamur. Hal ini disebabkan karena bakteri mampu bertahan hidup pada suhu tinggi dan pertumbuhan bakteri relatif lebih cepat. Bakteri termofilik merupakan bakteri yang mampu hidup pada daerah dengan suhu tinggi yaitu 40-75°C, dengan suhu optimum 50-65°C. Allais *et al.* (1987) bakteri termofilik yang mampu hidup pada inulin adalah genus *Bacillus* dan dapat tumbuh pada suhu 45°C sampai dengan 60°C. Rata-rata pertumbuhan spesifik dari bakteri termofilik ini di atas 50°C pada medium mineral dan inulin merupakan substrat yang bagus untuk pertumbuhannya.

Dalam penelitian ini diupayakan untuk mendapatkan bakteri termofilik penghasil inulinase yang hidup di sumber air panas. Lokasi yang dipilih adalah sumber air panas Padang Ganting Kabupaten Tanah Datar karena pada sumber air panas ini hidup bakteri termofilik.

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini adalah penelitian deskriptif. Menggunakan analisis secara deskriptif. Sampel diambil dari bakteri sumber air panas Padang Ganting Kabupaten Tanah Datar.

Pengambilan Sampel Air

Sampel air sebagai sumber isolat diambil dan disimpan dalam botol sampel yang telah disterilisasi. Suhu dan pH air diukur pada saat pengambilan sampel air. Botol sampel diisi dengan air sampai terisi sepertiga bagian. Botol ditutup dan segera dibawa ke laboratorium untuk proses selanjutnya.

Isolasi Bakteri

Isolasi bakteri dilakukan dengan prosedur Castro *et al.* (1995), 5 mL sampel air dilarutkan ke dalam 10 mL 145 mM NaCl steril dan divortex. Larutan dipanaskan selama 10 menit pada suhu 52°C. Suspensi dibiarkan beberapa saat. Suspensi sebanyak 5 mL ditambahkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 15 mL medium cair inulin, ekstrak yeast dan pepton. Selanjutnya larutan dishaker selama 48 jam pada suhu 52°C.

Sebanyak 1,5 mL campuran yang telah di shaker dicampurkan ke dalam medium yang sama (ekstrak yeast, pepton dan inulin) dan campuran dishaker

selama 48 jam pada suhu 52°C. Sebanyak 0,5 mL campuran larutan dicampurkan ke dalam minimal media+ inulin. Campuran dishaker pada suhu 52°C selama 48 jam.

Langkah berikutnya melakukan pengenceran sebelum diinokulasikan ke medium agar inulin. Campuran dari medium cair diambil sebanyak 100 µL dan dimasukkan ke dalam tabung *ependorff* yang berisi 900 µL akuades steril dan dihomogenkan. Dari sini didapatkan larutan dengan pengenceran 10^{-1} . Untuk selanjutnya dibuat larutan dengan pengenceran seterusnya hingga 10^{-5} dengan cara mencampurkan 100 µL larutan pada pengenceran sebelumnya dengan 900 µL akuades steril.

Setiap larutan pada tiap pengenceran diinokulasikan pada medium agar inulin. Hal ini dilakukan untuk memulai proses isolasi bakteri. Inokulasi ini dilakukan dengan mengambil 100 µL suspensi dan ditebarkan (*spread*) pada medium agar inulin. Selanjutnya inokulasi diratakan dengan *grill glass*, agar pertumbuhan bakteri merata pada seluruh permukaan medium. Kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 52°C.

Koloni bakteri dimurnikan dengan cara ditumbuhkan pada medium baru. Tujuan dilakukan hal ini adalah untuk mendapatkan kultur murni bakteri pada medium. Pemurnian dilakukan berulang (tiga kali) hingga didapatkan kultur murni yang seragam pada satu cawan medium. Bakteri (kultur murni) ini selanjutnya diamati secara morfologi dan mikroskopis.

Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan untuk mengamati struktur mikroskopis dari kultur murni bakteri yang didapatkan dan menentukan golongan Gram bakteri. Prosedur pewarnaan Gram ini adalah sebagai berikut: siapkan kaca objek steril. Buat apusan dari masing-masing bakteri yang didapatkan dari hasil isolasi. Teteskan satu tetes NaCl di bagian tengah kaca objek. Ambil biakan bakteri dengan menggunakan jarum inokulasi dan campurkan dengan NaCl yang ada pada kaca objek. Sebarkan biakan tersebut dan buat campuran yang tipis dan merata pada suatu area dengan diameter sekitar 1 cm. Biarkan suspensi kering di udara. Fiksasi dengan cara melewatkan 2-3 kali diatas nyala lampu spritus. Genangi apusan dengan kristal violet dan biarkan selama 1 menit. Cuci apusan dengan air kran. Genangi kembali apusan dengan lugol dan biarkan selama 1 menit. Cuci lagi dengan air kran.

Apusan dilunturkan dengan menggunakan etil alkohol 95% setetes demi setetes sehingga kristal violet tidak ada lagi yang mengalir dari apusan. Apusan dicuci lagi dengan air. Apusan diwarnai dengan pewarna safranin selama 45 detik. Cuci dengan air mengalir. Langkah terakhir adalah mengeringkan apusan dengan kertas saring. Setelah tahap ini apusan dapat diamati di bawah mikroskop dengan lensa minyak imersi (Pelczar dan Chan, 2006)

Pengamatan yang dilakukan adalah pengamatan morfologi dan mikroskopis koloni bakteri yang didapatkan dari proses isolasi. Pengamatan morfologi meliputi bentuk, tepian, warna koloni dan permukaan melalui pengamatan secara mikroskop. Pengamatan secara mikroskopis dengan pengamatan hasil pewarnaan Gram. Bakteri (kultur murni) ini selanjutnya diamati secara morfologi dan mikroskopis serta dibuat biakan dalam minimal media untuk psoses isolasi DNA.

Isolasi DNA Genom Bakteri

Isolasi DNA genom bakteri dilakukan dengan prosedur seperti berikut: masukkan 1 ose biakan bakteri ke dalam minimal media dan disentrifus selama 2 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Supernatan dibuang dan pelet dilisis dengan 500 μ L bufer TE, pipet up dan down sampai homogen, ditambahkan 30 μ L SDS 10% dan dipipet up dan down lagi. Pelet ditambahkan 6 μ L proteinase K 10 mg/mL dan campuran dihomogenkan. Campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Campuran ditambahkan fenol 200 μ L dan kloroform : isoamilalkohol (24:1) 200 μ L dan dihomogenkan. Campuran disentrifus 10.000 rpm selama 15 menit pada suhu ruang. Terbentuk 2 lapisan, diambil *aquos layer* dan dipindahkan ke tabung *ependorff* baru. Lapisan *aquos layer* ditambahkan fenol 200 μ L dan kloroform : isoamilalkohol (24:1) 200 μ L dan dihomogenkan. Campuran ini disentrifus 10.000 rpm selama 15 menit pada suhu ruang. Terbentuk 2 lapisan, diambil *aquos layer* dan dipindahkan ke tabung *ependorff* baru. Lapisan *aquos layer* ditambahkan sodium asetat (1/10) volume *aquos* dan dibolak-balik. Campuran ditambahkan 1 mL alkohol absolut dingin dan disimpan pada suhu -20°C semalam. Campuran disentrifus 12.000 rpm selama 30 menit. Supernatan dibuang.

Pelet dicuci dengan alkohol 70%. Disentrifus lagi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit dan supernatan dibuang. Pelet dikeringanginkan dengan posisi tabung *ependorff* terbalik. Setelah kering, DNA dilarutkan dalam 20 μ L akuabides steril dan disimpan pada suhu -20°C.

Amplifikasi Gen 16S rRNA dengan PCR

Fragmen DNA gen 16S rRNA diamplifikasi menggunakan teknik PCR menggunakan primer 27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' dan 1525R: 5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3'. Mix PCR terdiri dari: 10 μ L DNA genom; 1,5 μ L primer forward (27F \pm 20 pmol); 1,5 μ L primer reverse (1525R \pm 20 pmol); 12,5 μ L Taq Polymerase. Siklus PCR dimulai dengan denaturasi awal pada suhu 94°C selama 5 menit, annealing pada suhu 55°C selama 40 detik dan elongasi pada suhu 72°C selama 1,5 menit sebagai siklus awal. Siklus selanjutnya (2-35) adalah dengan denaturasi pada suhu 94°C selama 60 detik, annealing selama 40 detik pada suhu 55°C- 58°C dan elongasi pada suhu 72°C selama 1,5 menit. Diikuti dengan tahap pemanjangan akhir pada akhir siklus (pada siklus ke-35), tahap elongasi diperpanjang selama 7 menit untuk memberikan kesempatan pada mesin PCR melengkapi seluruh ampikon yang belum selesai amplifikasinya. Ini dilakukan dengan suhu 72°C selama 10 menit. Produk PCR di analisis menggunakan elektroforesis gel agarosa 1%. Hasil amplifikasi diharapkan fragmen tunggal 1.500 pb dikontrol menggunakan teknik elektroforesis.

Elektroforesis Produk PCR

Tahapan untuk elektroforesis produk PCR diawali dengan membuat gel agarose 1% dengan cara: agarose ditimbang sebanyak 0,5 g dengan menggunakan timbangan digital, agarose tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan 50 mL TAE 1x, lalu erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil. Agarose dihomogenkan dan dipanaskan dengan *magnetic stirrer*. Agarose didinginkan dan dimasukkan ke dalam cetakan.

Pembuatan TAE 1x dengan cara mengencerkan TAE 1x 50x. langkah awal diambil 10 mL TAE 50x dengan menggunakan gelas ukur, lalu dimasukkan ke dalam gelas piala 1.000 mL. Tambahkan akuades sampai volumenya menjadi 500

mL. Larutan dihomogenkan. Larutan disimpan ke dalam botol kaca, ditutup dengan aluminium foil dan disimpan di dalam lemari es. Elektroforesis produk PCR dilakukan dengan cara sebagai berikut: 1) Gel agarose 1% dipanaskan sampai mencair dengan menggunakan kompor listrik. Setelah gel larut ditambahkan 2 µL EtBr. 2) Disediakan cetakan yang telah diberi selotip sekelilingnya lalu dituangkan gel agarose 1%. Diletakkan sisir pada salah satu ujung cetakan tujuannya untuk membentuk sumur-sumur pada gel. 3) Gel mengeras, sisir diangkat dan terbentuklah sumur-sumur pada gel. 4) Cetakan diletakkan ke dalam *chamber* elektroforesis, setelah itu *chamber* diisi dengan TAE 1x sampai gel menutupi. 5) Marker (*leader*) dimasukkan ke dalam salah satu sumur sebanyak 5 µL. Fungsinya sebagai penanda panjang basa. 6) *Up down mix* PCR dengan cetakan dan dengan *loading* buffer dengan konsentrasi 5:1 sampai homogen, dan masukkan ke salah satu sumur. 7). *Chamber* ditutup dengan kutub negatif searah (berada dekat sumur). Tujuannya adalah karena DNA bermuatan negatif maka DNA akan bergerak ke kutub positif. 8) Setelah itu diatur tegangan sampai 90 Volt selama 1 jam. 9) Selanjutnya gel diletakkan di atas UV transluminator untuk diamati dan difoto.

Analisis Data

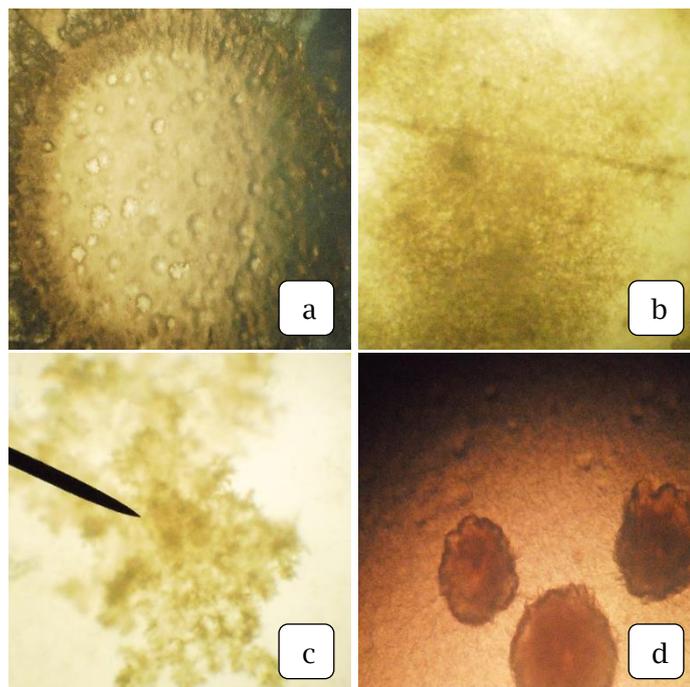
Data hasil pengamatan dianalisis secara deskriptif dengan memperhatikan morfologi koloni dan mikroskopis bakteri termofilik penghasil enzim inulinase dari sumber air panas Padang Ganting Kabupaten Tanah Datar

HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses isolasi bakteri merupakan proses pemisahan bakteri dengan lingkungannya ke lingkungan laboratorium dari kultur campuran menjadi kultur murni (kultur tunggal). Penelitian ini dilakukan proses isolasi bakteri dengan mengambil sampel air panas Padang Ganting Kabupaten Tanah Datar. Pada saat pengambilan sampel dilakukan pengukuran suhu air yaitu 52°C dan pH air 8. Sampel yang diambil adalah sampel air dan sampel sedimen. Sampel ini diinokulasikan pada suhu yang sesuai dengan lingkungan awalnya yaitu 52°C. Medium yang digunakan untuk proses isolasi bakteri adalah medium cair, medium cair inulin, dan medium agar inulin.

Berdasarkan hasil penelitian isolasi bakteri termofilik penghasil inulinase didapatkan 5 jenis koloni bakteri dari 5 pengenceran dengan sampel air dan sampel sedimen. Koloni yang didapatkan ini belum seragam. Koloni bakteri itu adalah (gambar 1):

- a. Koloni 1 memiliki ciri-ciri bentuk bulat seperti benang, tepi seperti benang, permukaan halus, tekstur berlendir warna coklat.
- b. Koloni 2 memiliki ciri-ciri bentuk tidak beraturan, tepi tidak beraturan, permukaan mengkilat, tekstur berlendir warna tepi krem tengah coklat.
- c. Koloni 3 memiliki bentuk tidak beraturan seperti akar, tepi tidak beraturan permukaan halus, tekstur berlendir dan warna tepi transparan tengah coklat.
- d. Koloni 4 memiliki bentuk bulat, tepi bergelombang, permukaan halus, dan warna transparan coklat.



Gambar 1. Struktur Morfologi Koloni Bakteri a. bakteri 1; b. bakteri2; c. bakteri 3; d. bakteri 4

Dari pengenceran 10^1 air didapatkan 3 jenis koloni bakteri yaitu koloni 1, koloni 2, dan koloni 3 dengan penyebaran koloni yang bervariasi. Dari pengenceran 10^2 air dan 10^4 air didapatkan 2 koloni yaitu koloni 2 dan 3. Pengenceran 10^3 air didapatkan 3 koloni yaitu koloni 1, 3 dan 4. Dan pengenceran 10^5 air didapatkan 2 koloni yaitu koloni 3 dan 4.

Dari pengenceran 10^1 sedimen, 10^2 sedimen dan 10^5 sedimen didapatkan koloni 4 yaitu koloni yang seragam. Pengenceran 10^3 sedimen didapatkan 3 koloni yaitu koloni 2, koloni 3 dan koloni 4. Keempat koloni ini diamati di bawah mikroskop.

Selanjutnya dilakukan pemurnian yang kedua yaitu dengan memurnikan kelima koloni yang didapatkan pada medium agar inulin. Hasil pemurnian ini adalah kelima koloni yang digoreskan pada medium agar inulin tumbuh pada masing-masing petri dan bentuk koloninya sudah seragam.

Selanjutnya dilakukan pemurnian yang ketiga dengan memurnikan kelima koloni pada medium agar inulin. Hasil pemurnian ini adalah empat koloni yaitu koloni 1, 2, 3 dan 5 tumbuh seragam sedangkan koloni 4 tidak tumbuh. Keempat koloni ini dimurnikan lagi.

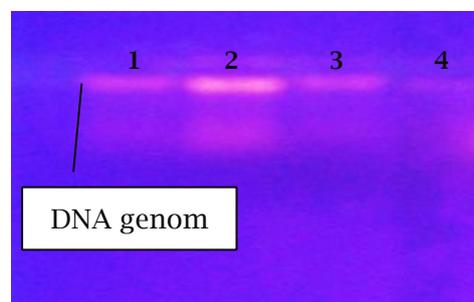
Selanjutnya keempat koloni dimurnikan lagi pada medium agar inulin. Hasil pemurnian ini adalah koloni 1 dan 2 yang lebih dominan dalam pertumbuhan bakteri. Koloni ini memiliki bentuk yang seragam dan sudah koloni murni. Koloni 1 ini memiliki ciri bentuk koloni bulat, tepi seperti benang, permukaan halus, tekstur berlendir dan elevasi datar warna coklat. Sedangkan koloni 2 memiliki bentuk tidak beraturan, tepi tidak beraturan, permukaan mengkilat dan tekstur berlendir.

Berdasarkan hasil isolasi bakteri termofilik didapatkan dari sumber air panas didapatkan 4 koloni setelah dilakukan pemurnian. Keempat koloni ini kemudian diamati secara struktur mikroskopis sel dengan menggunakan metode pewarnaan Gram untuk mengetahui golongan bakteri. Dari hasil pewarnaan Gram

didapatkan keempat koloni bakteri tergolong ke dalam Gram negatif dengan ciri yaitu berbentuk batang, warna koloni merah saat diamati secara mikroskopis.

Menurut Rahayu, (2007) isolat bakteri termofilik penghasil protease yang didapatkan dari sumber air laut panas di perairan Laut Poso, Sulawesi Tengah termasuk ke dalam golongan bakteri Gram negatif, bentuk sel batang berpasangan (diplobacillus). Sedangkan Menurut Allais *et al.*, (1987) juga didapatkan bakteri termofilik penghasil enzim inulinase Gram negatif genus *Flavobacterium* dan juga bakteri Gram positif genus *Bacillus* spp. Menurut Wijanarka dan Pujiyanto, (2002) bakteri yang disolasi dari tanah sekitar umbi *Dahlia variabilis* dihasilkan 2 isolat yaitu: isolat 1 tergolong Gram positif dengan ciri morfologi sel bulat, koloni besar dan koloni putih mengkilat. Isolat 2 tergolong Gram positif, morfologi sel bulat, koloni kecil-kecil dan koloni putih mengkilat. Ini menunjukkan bahwa bakteri penghasil enzim inulinase tidak hanya golongan Gram positif saja tapi juga golongan Gram negatif.

Isolasi DNA genom dilakukan pada isolat 1 dan isolat 2 karena pertumbuhannya lebih dominan dibandingkan isolat lainnya. DNA genom dielektroforesis menggunakan gel agarose 1% dan divisualisasikan dengan UV transluminator. Hasil isolasi DNA genom dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil Elektroforesis DNA Genom dengan Gel Agarose 1%.
1 dan 2 = isolat 1, 3 dan 4 = isolat 2



Gambar 3. Hasil elektroforesis produk PCR dengan gel agarose 1 %. M. marker gen reseptor FSH dengan panjang basa 231 pb; 1. bakteri isolat 1 dengan panjang basa kurang lebih 300 pb.

Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa pita DNA genom isolat 1 tampak jelas karena DNA yang terdeteksi banyak sedangkan DNA genom isolat 2 tidak begitu jelas karena DNA genom yang terdeteksi tidak terlalu banyak. Ini disebabkan karena pada saat mengisolasi DNA, tidak mendapatkan DNA genom yang banyak. DNA genom yang didapatkan ini dekat dengan sumur menunjukkan bahwa DNA genom yang terdeteksi cukup panjang. Panjang DNA genom pada bakteri adalah 23.000 basa (23 kb).

DNA genom yang sudah diisolasi, selanjutnya dijadikan template untuk diamplifikasi dengan primer 16S rRNA (27F dan 1525R) menggunakan teknik PCR.

PCR dilakukan sebanyak 35 siklus. Selanjutnya hasil PCR dielektroforesis dengan gel agarose 1 % dan divisualisasikan dengan UV transluminator. PCR ini dilakukan pada satu isolat yaitu isolat 1. Hasil produk PCR dapat dilihat pada Gambar 3.

Hasil produk PCR ini tidak sesuai dengan hasil produk PCR yang seharusnya yaitu 1.500 pb. Produk dari DNA genom 1 yang didapatkan hanya kurang lebih 300 pb. Tidak didapatkannya pita DNA sebesar 1.500 pb kemungkinan disebabkan beberapa hal, seperti 1) primer yang digunakan untuk proses PCR tidak cocok, 2) suhu yang dipakai untuk proses PCR belum optimal atau 3) produk PCR yang diharapkan cukup panjang (sebesar 1.500 pb) sehingga membutuhkan modifikasi waktu untuk setiap tahapan PCR. Proses optimasi yang penting untuk dilakukan dalam proses PCR adalah dengan cara menambah template DNA, memodifikasi suhu *annealing*, penambahan waktu *annealing* dan waktu ekstensi (Adikara, 2016)

Proses penempelan primer pada untai DNA yang sudah terbuka memerlukan suhu optimum, sebab suhu yang terlalu tinggi, menyebabkan *annealing* tidak terjadi atau sebaliknya suhu yang terlalu rendah menyebabkan primer menempel pada sisi lain genom, akibatnya dapat teramplifikasi banyak daerah tidak spesifik dalam genom tersebut. Suhu penempelan (*annealing*) ini ditentukan berdasarkan primer yang digunakan yang dipengaruhi oleh panjang dan komposisi primer (Suryanto, 2003).

Mesin PCR mempunyai keterbatasan kemampuan di dalam mengamplifikasi gen yang panjangnya lebih dari 1.000 pb. Waktu yang normal untuk amplifikasi produk PCR sepanjang kurang lebih 500 pb adalah denaturasi 1 menit, *annealing* 30 detik dan elongasi 1,5 menit untuk setiap siklusnya (Yuwono, 2006). Produk PCR yang diharapkan pada penelitian ini adalah 1.500 pb sehingga memerlukan modifikasi waktu untuk setiap tahapan tersebut.

Hal-hal yang menentukan keberhasilan proses PCR adalah kecocokan primer dengan gen yang akan diamplifikasi, optimasi suhu pada siklus PCR, produk PCR yang cukup panjang sehingga tidak optimal, kemurnian DNA template, konsentrasi DNA template, konsentrasi mix yang digunakan, konsentrasi enzim (Yuwono, 2006).

KESIMPULAN

Didapatkan 4 koloni bakteri termofilik penghasil enzim inulinase dari sumber air panas Padang Ganting Kabupaten Tanah Datar. Dari hasil pewarnaan Gram didapatkan keempat koloni tergolong Gram negatif dengan ciri bentuk sel bulat dan berwarna merah muda. Karakteristik secara molekuler tidak bisa ditentukan karena ketidakberhasilan dalam amplifikasi gen 16S r RNA.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih terutama ditujukan kepada Ibu Dr. Yuni Ahda dan Bapak Mades Fifendi sebagai pembimbing dan telah membantu pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Adikara, I.J., Wirajana, I.N., Yowani, S.C. (2016). Optimasi Suhu Annealing Tiga Regio Berbeda Isolat *Multidrug Resistance Mycobacterium Tuberculosis* dengan Metode *Multiple Polymerase Chain Reaction*. *Jurnal Veteriner*. 17(4): 535-539.

YARZA dkk., *isolasi dan karakterisasi bakteri termofilik*

- Allais, J.J., Kammoun, S., Barrati, J.C., Blanc, P. Girard, C. (1986). Isolation and Characterization of Bacterial Strains with Inulinase Activity. *Applied and Environmental Microbiology*. 53(5).
- Allais, J.J., Kammoun, S., Barrati, J.C., Lopez, G.H. (1987). Isolation and Characterization of Thermophilic Bacterial Strains with Inulinase Activity. *Applied and Environmental Microbiology*. 53(5).
- Castro, G.R., Baigori, M.D. Sineriz F. (1995). A Plate Technique for Screening of Inulin Degrading Microorganism. *Journal of Microbial Methods*. 22.
- Pelczar, M.J., dan Chan, E.C.S. (1986). *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Terjemahan oleh Hadioetomo, dkk. 2006. Jakarta. UI Press.
- Rahayu, U. (2007). Skrining Bakteri Termofilik Penghasil Protease. *Buletin Teknik Litkayasa Akuakultur*. 6(2).
- Saryono, Martina, A., Chainulfiah. (2002). Isolasi dan Karakterisasi Jamur Penghasil Enzim Inulinase yang Tumbuh pada Umbi Dahlia (*Dahlia variabilis*). *Jurnal Natur Indonesia*. 4(2).
- Sing, P., dan Gill, P.K. (2006). Production of Inulinases : Recent Advances. *Biotechnol*. 44(2).
- Suryanto, D. (2003). *Melihat Keanekaragaman Organisme Melalui Beberapa Teknik Genetika Molekuler*. Digitized by USU digital library.
- Wijanarka dan Pujianto, S. (2002). Optimasi Produksi Enzim Inulinase Termostabil oleh Bakteri Termofilik oleh Umbi Dahlia (*Dahlia variabilis*). <http://eprints.undip.ac.id/2331/> di akses tanggal 12 April 2010.
- Wijanarka., Ferniah, R.S., Salamah. (2004). Produksi Inulinase *Pichinia alni* DUCC-W4 pada Tepung Umbi Dahlia (*Dahlia variabilis* Willd) dengan Variasi Konsentrasi Amonium Nitrat pada Waktu Inkubasi. *Bioma*. 10(2).
- Yuwono, T. (2006). *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Yogyakarta : Andi.