

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Enzim β -CGTase dari Tanah Perkebunan Ubi Jalar

Isolation and Characterization of Bacteria Producing β -CGTase Enzyme from Sweet Potato Plantation Soil

Helman Kurniadi^{1,3*}, Desi Sagita¹, Barmi Hartesi², Lili Andriani³, Dimbi Dahlia³

¹Program Studi Farmasi, Universitas Adiwangsa Jambi, 36125, Indonesia

²Fakultas Farmasi, Universitas Jenderal Ahmad Yani, Cimahi, 40633, Indonesia

³Program Studi Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Harapan Ibu Jambi, 36122, Indonesia

*corresponding author, Email: helmankurniadi@gmail.com

Rekam Jejak Artikel:

Diterima : 16/04/2024

Disetujui : 01/09/2024

Abstract

β -CGTase (β -cyclodextrin glycosyl transferase) is an enzyme that converts starch into CD (cyclodextrin). The CD is a high-value oligosaccharide used for modifying food, textiles, chemicals, medicines, cosmetics, and biotechnology. This research aims to obtain isolates of β -CGTase producing bacteria from sweet potato plantation soil. Screening is carried out using Horikoshi media which contains the color indicators phenolphthalein and methyl orange. Bacteria producing β -CGTase will give a yellow hollow zone if they grow on this media. CGTase activity was measured using a UV-Vis spectrophotometer. Three isolates producing CGTase were obtained, coded BSP6A, BSP6B, and BSP6C, which had the characteristics of being Gram-positive, shaped like bacilli, produced spores, were motile, had a positive catalase test, and could ferment acid. These three isolates were able to produce the optimum CGTase enzyme if incubated for 18 and 24 hours at a temperature of 37°C and pH 10 and were able to convert starch into CD if incubated for 30 minutes at a temperature of 37°C and pH 7.

Key Words: CGTase, Isolate, Cyclodextrin, Soil.

Abstrak

β -CGTase (β -siklodekstrin glikosil transferase) adalah enzim yang mengkonversi pati menjadi CD (siklodekstrin). CD adalah oligosakarida yang bernilai tinggi digunakan untuk modifikasi pangan, tekstil, kimia, obat-obatan, kosmetik hingga bioteknologi. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri penghasil β -CGTase dari tanah perkebunan ubi jalar. Skrining dilakukan menggunakan media Horikoshi yang mengandung indikator warna fenoltalein dan metil jingga, bakteri penghasil β -CGTase akan memberikan yellow hollow zone jika tumbuh pada media tersebut. Pengukuran aktifitas CGTase diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Didapatkan tiga isolat penghasil CGTase yang diberi kode BSP6A, BSP6B, dan BSP6C, yang memiliki karakteristik Gram positif, berbentuk basil, menghasilkan spora, bersifat motil, uji katalase positif, dan dapat memfermentasikan asam. Ketiga isolat ini mampu menghasilkan enzim CGTase optimum jika diinkubasi selama 18 dan 24 jam pada suhu 37°C dan pH 10, serta mampu mengubah pati menjadi CD jika diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C dan pH 7.

Kata kunci: CGTase, Isolat, Siklodekstrin, Tanah.

PENDAHULUAN

Siklodekstrin Glukosil Transferase (CGTase) berperan penting di berbagai bidang industri karena kemampuannya mengkonversi pati menjadi CD (siklodekstrin) yang berguna untuk mengubah sifat fisikokimia senyawa lain (Kamble & Gupte 2014; Ara *et al.*, 2015). CGTase dihasilkan secara ekstraseluler oleh beberapa bakteri terutama pada golongan *Bacillus*, tetapi ada juga diproduksi oleh *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Thermococcus* sp., *Brevibacterium* sp., dan beberapa mikroorganisme lain (Stankovic, 2016; Lim *et al.*, 2021). Enzim CGTase mengkatalis pembentukan siklodekstrin (CD) dari pati melalui reaksi transglukosilasi menggunakan residu glukosil yang berperan sebagai akseptor pembentukan produk utama yaitu siklodekstrin (Rostinawati, T. & Lestari, 2017).

Siklodekstrin telah digunakan untuk

meningkatkan kelarutan, memperbaiki sifat obat yang sukar larut, meningkatkan stabilitas, menutupi bau, rasa yang kurang enak, serta melindungi senyawa-senyawa yang mudah teroksidasi dengan cara membungkus (enkapsulasi) molekulnya (Rostinawati & Lestari, 2017; Saini *et al.*, 2022). Enkapsulasi ini terjadi dikarenakan siklodekstrin memiliki rongga pusat bersifat hidrofobik serta bagian luar bersifat hidrofilik (Panchal & Rajput, 2017).

Skrining bakteri penghasil CGTase terus dilakukan dan telah berhasil dipublikasikan, seperti bakteri *Bacillus alcalophilus* ditemukan di negara India tepatnya pada daerah ladang tebu Kanakapura. Isolat tersebut diproduksi pada suhu optimum 45°C dengan aktivitas maksimum setelah 6 hari masa inkubasi (R. & Sunsil S., 2010). Di Indonesia, bakteri penghasil CGTase telah diisolasi dari tanah

perkebunan singkong (isolat BTS-3A dan BTS-3B) dan tanah perkebunan kentang (isolat CK-2) (Rudheka *et al*, 2021), dari tanah perkebunan jagung di Sumedang, Jawa Barat yaitu bakteri JS-1, yang diproduksi dengan suhu inkubasi optimum 37°C dengan masa inkubasi selama 48 jam (Miftahurrohman & Moordiani, 2014). Bakteri penghasil CGTase rata-rata ditemukan di tanah perkebunan penghasil pati (Qi & Zimmermann, 2005). Salah satu tanaman penghasil pati adalah ubi jalar, dimana berdasarkan Badan Pusat Statistik, Kerinci merupakan daerah penghasil ubi jalar terbesar dengan angka produksi sebesar 71.305 ton pada tahun 2014. Dengan angka produksi yang besar yang sebanding dengan luasnya tanah perkebunan maka diduga terdapat bakteri penghasil CGTase, karena terdapat sisa-sisa amilum yang terurai pada tanah tersebut selama bertahun-tahun. Pati merupakan substrat bagi bakteri sebagai sumber karbon dan energi untuk menghasilkan sejumlah enzim salah satunya enzim CGTase (Qi & Zimmermann, 2005).

Pada penelitian ini akan dilakukan pencarian dan isolasi bakteri penghasil enzim β -CGTase yang berasal dari tanah perkebunan ubi jalar kemudian dilakukan karakterisasi enzim β -CGTase yang dihasilkan berdasarkan waktu inkubasi. Aktivitas enzim CGTase dilihat dari penurunan absorpsi fenoltalein yang sebanding dengan pembentukan siklodekstrin.

MATERI DAN METODE

Skrining Isolat

Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimental menggunakan sampel tanah yang diambil dari lahan kebun ubi jalar di Kabupaten Kerinci, Jambi. Sampel tanah diambil pada 4 titik dengan kedalaman ± 5 cm dari permukaan tanah yang berada ± 2 cm di sekitar umbi ubi jalar. Tanah tersebut dimasukkan ke dalam wadah steril dan dibawa ke laboratorium mikrobiologi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Harapan Ibu Jambi untuk diteliti. Setiap 1 g tanah disuspensikan dalam 9 ml *aquades* lalu dilakukan pengenceran 10^{-2} sampai 10^{-8} . Sebanyak 0.1 ml suspensi diinokulasikan ke masing-masing media Horikoshi padat. Sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya *yellow hollow zone* pada media di sekitar koloni (Higuti *et al*, 2003; Kamble & Gupta, 2014). Koloni yang berhasil diisolasi selanjutnya dilakukan identifikasi secara makroskopis, mikroskopis, dan uji biokimia.

Pembuatan Media Horikoshi β -CGTase

Media Horikoshi padat terdiri dari larutan I yaitu soluble starch 1% b/v, pepton 0.5% b/v, yeast extract 0.5% b/v, K_2HPO_4 0.1% b/v, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

0.02% b/v, Agar 2% b/v, PP 0.03% b/v, metil jingga 0.01% b/v, dilarutkan kedalam erlenmeyer 250 ml yang berisi aquadest steril. Larutan II terdiri dari Na_2CO_3 1% yang masing-masing dilarutkan dengan aquadest steril. Kemudian larutan I dan II disterilkan pada autoclave dengan suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya tambahkan larutan II ke larutan I (secara perlahan hingga diperoleh pH 10) (Miftahurrohman & Moordiani, 2014). Media Horikoshi cair dibuat tanpa menggunakan agar dan indikator warna (Rostinawati & Lestari, 2017).

Kurva Pertumbuhan Isolat

Satu ose isolat bakteri ditumbuhkan dalam 10 mL media Horikoshi cair. Kemudian kultur diinkubasi dengan inkubator *shaker* 200 rpm pada suhu 37°C selama 18 jam. Starter bakteri diukur pada nilai OD_{600} dan aktivitas enzim diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 600 nm. Nilai OD_{600} diukur setiap 4, 8, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, dan 72 jam (Miftahurrahman & Moordiani, 2014).

Penetapan Waktu Inkubasi Optimum Isolat dalam Produksi β -CGTase

Sebanyak 20 μ L Isolat diinokulasikan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 mL media Horikoshi cair, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C. Pengukuran aktivitas siklus dilakukan setiap 4, 8, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, dan 72 jam. Pengulangan dilakukan sebanyak *triplo*

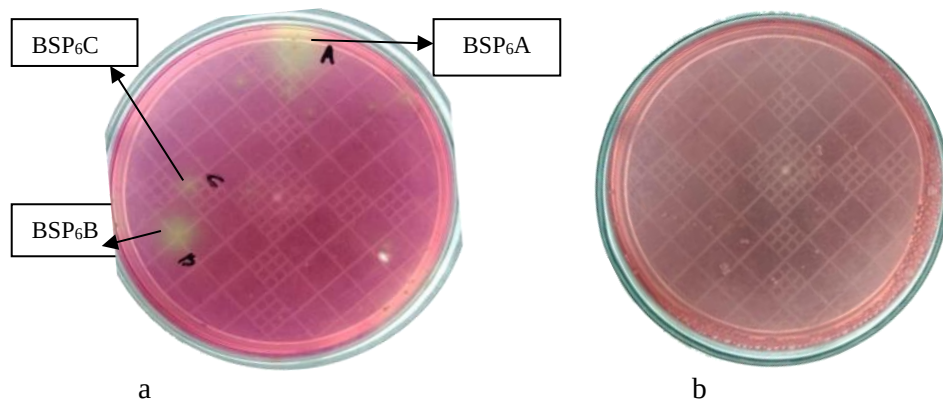
Pengukuran Aktivitas Siklisasi CGTase menggunakan spektrofotometri

Sebanyak 500 μ L supernatan diinkubasikan dengan 1% *soluble starch* dalam 2,5 ml buffer Tris-HCl 50 mM pH 7 pada suhu 37°C, selama 30 menit. Hasil inkubasi diambil dan tambahkan 1.2 N HCl (0.25 ml) untuk pemberhentian reaksi, kemudian larutan dihomogenkan dengan cara dikocok 30 detik. Selanjutnya tambahkan 0.25 ml NaOH 1.2 N untuk menetralkan reaksi. Supernatan campuran reaksi kemudian dicampurkan ke dalam 2 ml indikator warna fenolflatin 4 mM yang dibuat segar. Larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 552 nm (Miftahurrahman & Moordiani, 2014; Wang & Wu, 2018)⁸. Dari penetapan waktu inkubasi isolat dalam memproduksi β -CGTase akan dilihat nilai persen penurunan absorbansi indikator fenoltalein yang setara dengan produksi CD.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Skrining dan Isolasi

Terdapat tiga isolat yang membentuk *yellow hollow zone*, isolat diberi kode BSP₆A, BSP₆B, dan BSP₆C yang dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. (a) Hasil isolat yang didapatkan pada media β -CGTase, (b) Horikoshi agar yang ditumbuhkan bakteri asam sebagai kontrol (-).

Tabel 1. Uji morfologi dan Uji biokimia Isolat

Uji	Hasil Pengamatan Isolat BSP ₆		
	BSP ₆ A	BSP ₆ B	BSP ₆ C
Bentuk koloni	Bundar	Bundar	Bundar
Tepi koloni	Halus	Halus	Halus
Elevasi isolat	Cembung	Cembung	Cembung
Warna koloni	Putih Susu	Putih Susu	Putih Susu
Pewarnaan Gram	(+)	(+)	(+)
Spora	(+)	(+)	(+)
Katalase	(+)	(+)	(+)
Motil	(+)	(+)	(+)
Sulfur	(-)	(-)	(-)
Indol	(-)	(-)	(-)
Fermentasi Glukosa	(-)	(-)	(+)
Fermentasi Laktosa	(-)	(-)	(-)
Fermentasi Sakarosa	(-)	(-)	(-)
Fermentasi Manitol	(-)	(-)	(-)
Fermentasi dekstrosa	(-)	(-)	(-)
TSIA	K/K	K/K	K/A
Methyl Red	(-)	(-)	(+)
Voges Proskauer	(+)	(+)	(-)
Simmon citrat	(-)	(-)	(-)

Hasil positif ditandai dengan terbentuknya *yellow hollow zone* pada media disekitar koloni. Zona ini terbentuk karena adanya suatu penyerapan molekul indikator warna yang membentuk kompleks inklusi di dalam rongga CD sehingga indikator warna pada media berubah menjadi tidak berwarna (Miftahurrahmah & Moordiani, 2014).

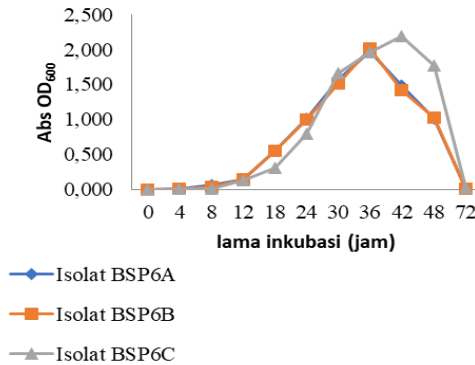
Media Horikoshi yang digunakan dalam penelitian ini juga dapat membedakan antara bakteri penghasil CGTase dan bakteri asam yang belum tentu menghasilkan enzim CGTase yang telah diantisipasi dengan menambahkan indikator metil jingga pada media, dimana metil jingga akan berubah menjadi merah akibat asam yang dihasilkan oleh bakteri

(Rostinawati, T. & Lestari, 2017; Miftahurrahmah & Moordiani, 2014; Min *et al*, 2008).

Ketiga isolat diduga memiliki kecocokan karakteristik pada jenis bakteri *Bacillus sp.* Hasil ini didukung kuat dari hasil uji morfologi dan uji biokimia yang telah dilakukan oleh Rao & Narasu, dimana telah dilaporkan bahwa bakteri *Bacillus firmus 7728* memiliki morfologi dengan ciri-ciri berupa bentuk koloni bulat, sel berbentuk batang, dapat membentuk spora, dapat tumbuh pada suhu 25°C - 42°C (Rao & Narasu, 2014). Strain *Basillus* juga mendominasi sebagai bakteri penghasil CGTase yang sebagian besar diproduksi secara ekstraselular (Lim *et al*, 2021).

Kurva Pertumbuhan Isolat

Hasil pengukuran nilai absorpsi pertumbuhan isolat BSP₆A, BSP₆B, dan BSP₆C yang diukur selama 3 hari menunjukkan pola pertumbuhan bakteri yang berbeda-beda dari masing-masing isolat, yang dapat dilihat pada gambar 3. sebagai berikut.



Gambar 2. Kurva Pertumbuhan Isolat BSP₆

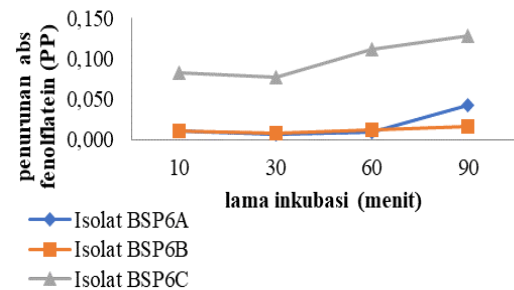
Kurva pertumbuhan isolat BSP₆A, BSP₆B, dan BSP₆C ini diawali dengan fase lag, yang dimulai dari jam ke-0 hingga jam ke-8 masa inkubasi. Jam ke-0 hingga jam ke-8 masa inkubasi. Pada fase tersebut peningkatan jumlah sel bakteri berlangsung lambat. Setelah fase lag selesai, pertumbuhan bakteri berlangsung sangat cepat (fase log) (Suprastyani *et al*, 2017).

Log merupakan fase dalam kurva pertumbuhan selama populasi bakteri tumbuh pada tingkat yang konstan dan maksimum, membagi dan menggandakan secara berkala. Pada penelitian ini, fase log dimulai pada jam ke-8 hingga jam ke-30 isolat BSP₆A dan BSP₆B. Bakteri *Bacillus oshimensis* dan *Bacillus subtilis* telah dilaporkan bahwa masa fase log dari bakteri ini mencapai 24-30 jam yang diikuti fase stasioner setelahnya (Kamble & Gupte, 2014; Suprastyani *et al*, 2017), sedangkan fase log dari BSP₆C dimulai dari jam ke-8 hingga jam ke-36 masa inkubasi. Kamble & Gupte (2014) menyatakan pada fase inilah produksi CGTase signifikan dan terus meningkat hingga mendekati fase stasioner (Suprastyani *et al*, 2017).

Selanjutnya, pada fase stasioner, laju pertumbuhan mencapai titik maksimal. Fase stasioner terjadi pada jam ke-36 masa inkubasi isolat BSP₆A dan BSP₆B dengan nilai absorpsi sebesar 1,977. Sedangkan pada isolat BSP₆C mengalami fase stasioner setelah 42 jam masa inkubasi dengan absorpsi sebesar 2,188. Fase stasioner adalah keadaan seimbang antara laju pertumbuhan dan laju kematian. Menurut Purwanti dan Imron (2016), semakin tinggi laju pertumbuhan spesifik bakteri semakin rendah waktu generasi bakteri. Laju pertumbuhan spesifik untuk setiap bakteri berbeda – beda. Hal ini disebabkan karena kandungan enzim pada masing – masing bakteri berbeda yang mempengaruhi proses metabolisme bakteri (Purwanti & Imron, 2016).

Kurva Waktu Inkubasi Optimum Aktivitas Siklisasi Siklodekstrin

Dari hasil yang diperoleh, waktu inkubasi optimum bagi isolat BSP₆A, BSP₆B, dan BSP₆C adalah 30 menit dengan suhu inkubasi isolat BSP₆ yaitu 37°C yang dapat dilihat pada gambar 3. Penurunan absorpsi pada pengukuran aktivitas siklisasi terjadi akibat adanya penyerapan molekul PP oleh β-CD. Sehingga warna yang dihasilkan oleh PP, saat direaksikan bersama β-CD berubah menjadi bening. Diketahui penurunan absorpsi yang diakibatkan oleh terserapnya PP kedalam rongga β-CD terjadi pada menit ke-30.

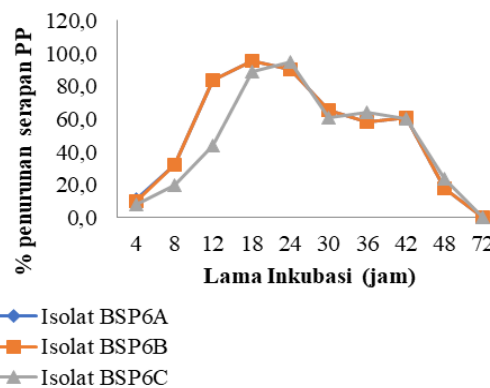


Gambar 3. Waktu inkubasi optimum aktivitas CGTase pada isolat BSP₆

Hasil persentase penyerapan PP sebanding dengan pembentukan β-CD, semakin besar persen serapan PP maka semakin besar pula β-CD yang terbentuk (Rostinawati, T. & Lestari, 2017; Rostinawati, Sumirtapura, & Retnoningrum, 2016). Serupa dengan penelitian lain, masa inkubasi enzim selama 30 menit telah dilaporkan sebagai masa inkubasi optimum aktivitas siklisasi siklodekstrin oleh bakteri *Bacillus circulans* (Stankovic, 2016).

Kurva Penentuan Aktivitas Siklisasi Siklodekstrin dengan metode Spektrofotometri

Pengukuran ini menggunakan *crude* enzim yang telah disentrifus dengan masa inkubasi enzim selama 30 menit, dimana waktu inkubasi enzim ini sebelumnya telah dioptimasi terlebih dahulu.



Gambar 4. Kurva Persen Penyerapan Absorbansi pp

Berdasarkan data pada Gambar 4, Enzim CGTase dari isolat BSP₆A dan BSP₆B paling banyak disekresikan setelah 18 jam masa inkubasi, pada suhu 37°C. Hasil ini ditandai dengan penurunan absorbansi sebesar 0.044 dengan persentase penyerapan PP sebesar 95,5% (BSP₆A), dan 94,73% (BSP₆B). Sedangkan isolat BSP₆C serapan PP terbesar setelah 24 jam diinkubasi pada suhu 37°C. Penelitian terdahulu telah menguji *Bacillus oshimensis* dan *Bacillus licheniformis* dengan masa inkubasi optimum pada 24 jam dan *Bacillus circulans* pada 48 jam (Sivakumar & Banu, 2011; Stankovic, 2016)

SIMPULAN

Telah diisolasi tiga isolat bakteri penghasil CGTase dari tanah ubi jalar Kerinci yaitu BSP₆A, BSP₆B, dan BSP₆C. Karakteristik isolat BSP₆A, BSP₆B, dan BSP₆C secara biokimia diduga menyerupai karakteristik dari bakteri jenis *Bacillus* sp. Isolat BSP₆A dan BSP₆B memproduksi CD optimum pada jam ke 18 masa inkubasi, sedangkan isolat BSP₆C memproduksi CD optimum pada jam ke 24 masa inkubasi, enzim CGTase yang dihasilkan dari ketiga isolat ini memiliki aktivitas terbesar pada menit ke-30 masa inkubasi.

DAFTAR REFERENSI

- Ara, Kazi Z G., Lundemo, Pontus., Fridjonsson, Olafur H., Hreggvidsson, Gudmundur O., Adlercreutz, Patrick., Karlsson, Eva Nordberg. 2015. A CGTase with High Coupling Activity Using γ -Cyclodextrin Isolated from a Novel Strain Clustering Under the Genus *Carboxydodecyl*. *Glycobiologi* 25, 514–523. Vol-2.
- Budianto & Suprastyani, Heny. 2017. Aktivitas Antagonis *Bacillus subtilis* terhadap *Streptococcus iniae* dan *Pseudomonas fluorescens*. *J. Vet.* 18, 409–415. ISSN 2477-5665.
- Higuti, I. H., Grande, S. W., Sacco, R. & Do Nascimento, A. J. 2003. Isolation of Alkalophilic CGTase Producing Bacteria and Characterization of Cyclodextrin-Glycosyltransferase. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 46, 183–186.
- Imron, I. F., Purwanti, M. F. 2016. Uji Kemampuan Bakteri *Azotobacter* S8 dan *Bacillus subtilis* untuk Menyisihkan Trivalent Chromium. *J. Tek. ITS* 5.
- Kamble, R. & Gupte, A. 2014. Cyclodextrin Glycosyltransferase Production by Alkaliphilic *Bacillus* SP. Isolated from Rice Cultivated Soil and Media Optimization using Taguchi Method. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 5, 2754–2762.
- Lim, Chin Hui., Rasti, Babak., Sulisty, Joko., Mansoor Abdul Hamid. 2021. Comprehensive study on transglycosylation of CGTase from various source. *Heliyon* 7 e06305
- Miftahurrohman, N. & Moordiani. 2014. Karakterisasi Isolat JS-1, Bakteri Alkalofilik Penghasil Siklodekstrin Glikosiltransferase (CGTase) dari Sumedang, Jawa Barat. *J. Ilmu Kefarmasian Indones.* 12, 216–221.
- Ong, Min R., Goh, M., Mahadi, Muhammad, N., Osman, M. 2008. Cloning, extracellular expression and characterization of a predominant β -CGTase from *Bacillus* sp. G1 in *E. coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*
- Rao, K. & Narasu, M. L. 2014. Alkaline Protease from *Bacillus firmus* 7728. *African J. Biotechnol.* 0–4. doi:10.5897/AJB2007.000-2395
- Rostinawati, T., Sumirtapura, Y. C. & Retnoningrum, D. S. 2016. Penentuan Aktivitas Siklisasi- β Siklodekstrin Glukosiltransferase Wild Type, H43K, P84Y, Y93F, Y188L, dan S468F dari *Bacillus* sp. A2-5a terhadap Pati Terlarut. *Pharmauho Vol.* 2, 1–5.
- Rostinawati, T. & Lestari, H. S. 2017. Skrining Bakteri Penghasil Enzim β -Siklodekstrin Transferase (β -CGTase) dari Tanah Jatianangor Glukosil. *J. Farm. Sains, dan Kesehat.* 3, 10–17.
- Saini, Kuldeep., Pathak, Vinay Mohan., Tyagi, Arpit., Gupta, Rani. 2022. Microbial Cyclodextrin Glycosyltransferases: Sources, Production, and Application in Cyclodextrin Synthesis. *Catalysis Research*; 2(3)
- Sivakumar, N. & Banu, S. 2011. Standardization of Optimum Conditions for Cyclodextrin Glycosyltransferase Production. *Int. conference Food Eng. Biotechnol.* 9, 102–106.
- Stankovic, S., Pešić, D., Beric, T. & Simic, D. 2016. Determination of Cyclodextrin Production by Cyclodextrin Glycosyltransferase from Alkalophilic *Bacillus circulans* strain B-65. *Bot. Serbica* 40, 49–54 (2016).
- Waber, N. F., Risandiansyah, R. & Airlangga, H. 2017. Perbandingan Frekuensi Resistensi Bakteri *Bacillus subtilis* terhadap Antibiotik Tetracycline Tunggal dan Kombinasi dengan Dekokta *Hibiscus sabdariffa* L. *J. Islam. Med. Res.* 1, 29–35 (2017).
- Wang, L., Chen, S. & Wu, J. 2018. Cyclodextrin Enhanced the Soluble Expression of *Bacillus* *Clarkii* γ -CGTase in *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol.* 1–9 (2018).