

Biodegradasi Jerami Padi Menggunakan Kompos Termofilik dan Profil SSCP Konsorsium Mikroba

Christina Elsa Niron, Nies Suci Mulyani, ¹Agustina L.N. Aminin

Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang, Jawa Tengah

Email : agustina_lna@undip.ac.id

ABSTRAK

Jerami merupakan bahan lignoselulosa, terdiri atas lignin yang terikat pada hemiselulosa dan selulosa. Sebagian besar penelitian biodegradasi biomassa secara mikrobiologis, memanfaatkan kerja mikroba tunggal yang umumnya bekerja kurang optimal. Dalam penelitian ini jerami didegradasi menjadi gula pereduksi menggunakan konsorsium mikroba dari kompos termofilik. Fermentasi jerami padi dilakukan pada media semisolid menggunakan starter kompos termofilik, dan proses degradasi dipantau berdasarkan kadar gula pereduksi yang dihasilkan setiap 24 jam. Kelimpahan mikroba diamati melalui fragmen gen 16S dan 18S rRNA dengan teknik *SSCP* (*Single Strand Conformation Polymorphism*). Degradasi optimum jerami padi didapatkan pada jam ke-72 dengan kadar gula sebesar 0,474 mg/L. Profil pita-pita *SSCP* ditunjukkan dengan perbedaan jumlah dan intensitas pita-pita dari kelompok jamur maupun bakteri. Perbedaan pita-pita tersebut menunjukkan adanya perbedaan kelimpahan komunitas mikroba baik pada konsorsium kompos maupun mikroba pendegradasi jerami padi.

Keywords: biodegradasi, kompos termofilik, komunitas mikroba, SSCP

PENDAHULUAN

Kebutuhan energi untuk beberapa abad semakin meningkat sedangkan ketersediaan sumber energi minyak cenderung turun dari tahun ke tahun, sehingga diperlukan sumber energi alternatif. Bioetanol merupakan salah satu bahan bakar alternatif yang dapat diperbaharui dan ramah lingkungan (Sun and Cheng, 2002). Bioetanol dapat diproduksi dari gula yang berasal dari molase, pati dan lignoselulosa. Lignoselulosa merupakan biomassa sumber gula yang keberadaannya melimpah dialam dan belum dimanfaatkan secara maksimal. Tantangan pemanfaatan biomassa untuk dikonversi menjadi gula adalah keberadaan lignin yang terikat pada hemiselulosa dan selulosa (Iranmahboob et al., 2002). Jerami mengandung 41,3% selulosa, 20,4% hemiselulosa dan 12,1% lignin (Kumar et al., 2008).

Pretreatment secara kimia dan enzimatik adalah metode yang paling sering digunakan (Mussatto and Roberto, 2004). Degradasi senyawa lignin secara kimia akan menghasilkan senyawa-senyawa fenol yang berbahaya bagi mikroorganisme khususnya bagi membran dan matrik enzim dalam sel, sedangkan hidrolisa enzimatik memerlukan biaya yang mahal

(Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000). Biokonversi yang ramah lingkungan dan murah adalah melalui pemanfaatan mikroba. Sebagian besar penelitian, memanfaatkan mikroba tunggal untuk biodegradasi. Beberapa spesies jamur menunjukkan kemampuan mendegradasi polimer kompleks dan lignoselulosa. *Lentinus squarrosulus* dan *Psathyrella atroumbonata* dilaporkan dapat mendegradasi lignin (Wuyep et al., 2003). Spesies bakteri *Anaerocellum thermophilum* dapat mendegradasi biomassa lignoselulosa tanpa *pretreatment* kimia (Yang et al., 2009). Menurut Peters (2000), kerja komunitas mikroba lebih efisien dalam mendegradasi substrat karena menghasilkan enzim yang lebih beragam. Salah satu sumber komunitas mikroba pendegradasi lignoselulosa adalah dari kompos. Konsorsium kompos termofilik diduga memiliki peran optimal dalam mendegradasi lignin.

Dalam penelitian ini, jerami padi didegradasi menjadi gula menggunakan konsorsium mikroba termofilik kompos yang diukur aktivitasnya melalui pengukuran kadar gula pereduksi dengan metode Nelson Somogyi selama fermentasi. Kelimpahan komunitas masing-masing kultur dianalisis dengan pendekatan teknik *SSCP*.

METODOLOGI

Bahan. Jerami padi dan kompos termofilik diperoleh dari pertanian daerah Kendal. Bahan-bahan lain berasal dari Merck meliputi: CMC, K_2HPO_4 , $MgSO_4$, pepton, ekstrak ragi, buffer ekstraksi DNA, proteinase K, pasir laut steril, SDS, kloroform, isoamil alkohol, isopropanol, asam borat dan glukosa. Bahan-bahan dari Sigma meliputi: tris HCl EDTA, tris Base, EtBr (Ethidium Bromida), larutan *Mega Mix Blue*, agarosa, acrilamid, bisacrilamid, TEMED, amonium persulfat, asam asetat glacial, asam borat, perak nitrat, formaldehid, natrium karbonat, Natrium tiosulfat, EDTA pH 8, formamid, *bromophenol blue*, *xylene cyanol*, Nelson A, Nelson B, arsenomolibdat, $Ba(OH)_2$, $ZnSO_4$. Sedangkan primer PCR: primer NS1, GC-Fung dan pasangan primer Com1F- Com2R dipesan dari Oligo Singapura.

METODE

Preparasi starter konsorsium dan pengkulturan dalam media jerami

Sepuluh gram kompos termofilik (diambil pada suhu 57 °C) disuspensi kedalam 90 mL aquadest steril lalu disaring menggunakan kain steril. Sebagian filtrat tersebut disaring kembali menggunakan membran berpori 0,2 μm . Sebanyak 5 mL sisa filtrat ditambahkan masing-masing kedalam 6 g media jerami yang masing-masing telah berisi 5 mL media pengkaya. Kultur diinkubasi dalam inkubator goyang pada suhu 60 °C dengan kecepatan 50 rpm. Residu pada membran kemudian dipotong kecil-kecil untuk selanjutnya digunakan sebagai sumber mikroorganisme kompos pada tahap isolasi DNA kromosom.

Pengukuran kadar glukosa dengan metode Nelson Somogy

Pengukuran kadar gula pereduksi dilakukan dengan cara 0,1 mL larutan hasil inkubasi diencerkan dengan aquades hingga volume 1,5 mL. Konsentrasi gula ditentukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada $\lambda = 520$ nm. Penentuan kurva standar dilakukan dengan pengukuran absorbansi larutan glukosa standar yang dibuat dengan variasi konsentrasi 1 mg/L, 0,8 mg/L, 0,6 mg/L, 0,4 mg/L, dan 0,2 mg/L.

Isolasi DNA kromosom dan Amplifikasi fragmen gen 16S rRNA dan 18S rRNA

Potongan jerami yang telah ditumbuhi jamur dimasukkan dalam mikrotube 1,5 μL lalu diisolasi DNA kromosom dengan metode Zhou yang dimodifikasi. DNA kromosom diamplifikasi menggunakan *mega mix blue*, primer NS1 dan GC-Fung untuk 18S rRNA dan pasangan primer Com1F- Com2R untuk 16S rRNA. Amplikon yang diperoleh dianalisis menggunakan elektroforesis agaorsa.

SSCP analysis and silver staining

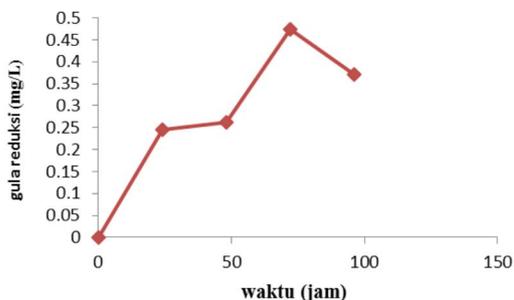
Lima mikroliter produk PCR dicampur dengan 15 μL larutan loading (95% formamide, 0,25% xylene cyanol, 0,25% bromofenol biru) dengan variasi NaOH dan 20 mM EDTA, lalu dipanaskan pada 100 °C selama 5 menit dan segera didinginkan dalam es. Sampel diisikan kedalam sumur gel poliakrilamid 10%. Sampel dielektroforesis di dalam gel sel elektroforesis dengan 1X bufer TBE pada 200 V selama 4 jam pada suhu 4 °C. Gel sebelumnya telah di *pre run* terlebih dahulu selama 30 menit. Gel hasil elektroforesis kemudian diwarnai dengan metode pewarnaan perak. Pertama-tama, gel direndam menggunakan 10% asam asetat selama 24 jam lalu dibilas dengan air destilasi selama 3 X 5 menit. Gel kemudian direndam selama 45 menit dalam 100 mL larutan perak nitrat yang mengandung 0,1% $AgNO_3$ dan 150 μL formaldehid 37%, lalu gel dibilas selama kurang lebih 10 detik dalam air destilasi dan segera direndam dengan larutan *developing* (100 mL larutan terdiri dari 3% sodium karbonat, 150 μL formaldehid dan 20 μL larutan stok sodium tiosulfat (10 mg/mL)) selama beberapa menit sampai intensitas pewarnaan pekat diperoleh, ketika warna gel hampir gelap reaksi dihentikan dengan pencucian menggunakan asam asetat 10%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Fermentasi Jerami Padi menggunakan konsorsium kompos termofilik

Jerami yang difermentasi pada suhu 60°C telah menunjukkan pertumbuhan jamur termofilik. Pertumbuhan jamur tampak pada jam ke-48. Pengukuran kadar glukosa kultur jerami diukur dengan metode Nelson-Somogyi pada $\lambda=520$ nm. Kadar glukosa yang terbentuk selama proses

fermentasi kultur jerami dapat dilihat pada gambar 1.

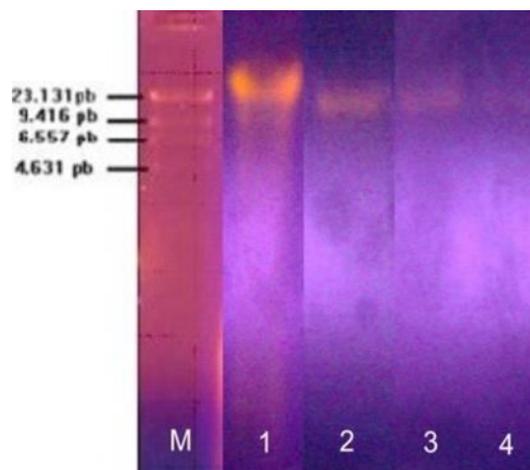


Gambar 1. Profil kadar glukosa selama fermentasi kultur jerami

Berdasarkan gambar 1 terlihat seiring bertambahnya waktu kadar glukosa yang terbentuk semakin bertambah. Kadar glukosa tertinggi diperoleh pada jam ke-72 sebesar 0,474 mg/L. Selama proses fermentasi mikroorganisme merombak bahan makanan yang tersedia. Pertambahan waktu membuat sumber makanan paling sederhana dalam media pengkaya habis, mikroorganisme mulai mendegradasi bahan lignoselulosa untuk kemudian diubah menjadi glukosa. Pada grafik terlihat semakin lama kadar glukosa meningkat, hal ini terjadi karena aktivitas mikroorganisme dalam merombak lignoselulosa meningkat.

2. Isolasi DNA kromosom konsorsium

Dalam rangka identifikasi keragaman konsorsium, DNA kromosom dari kultur jerami dan kompos harus diisolasi untuk kemudian dijadikan templat amplifikasi gen 16S rRNA dan 18S rRNA. Gen 16S rRNA adalah untuk identifikasi kelompok bakteri sedangkan 18S rRNA untuk kelompok jamur. Isolasi DNA kromosom menggunakan metode lisis alkali dan pemurnian dilakukan dengan ekstraksi kloroform-isoamilalkohol. Hasil isolasi DNA tampak pada gambar 2.



Gambar 2. Elektroforegram DNA kromosom mikroba dari kultur jerami dan kompos. Sumur M merupakan: *marker* DNA, 1: DNA kromosom mikroba dari kultur jerami (K_1), 2: DNA kromosom mikroba dari kultur jerami (K_2), 3: DNA kromosom mikroba dari kompos (M_1), 4: DNA kromosom mikroba dari kompos (M_2)

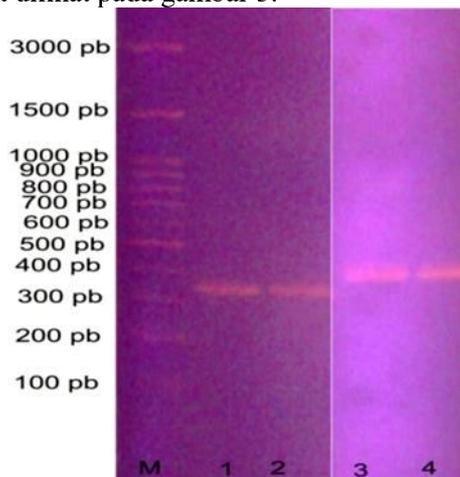
Hasil isolasi DNA kromosom terlihat pada gambar 3.1. Berdasarkan gambar 3.1 DNA kromosom terlihat sebagai pita yang berpendar (Sambrook dan Russell, 2002). Pita yang berpendar tersebut sejajar dengan *marker* DNA yang berukuran 23130 pb. DNA kromosom jamur berukuran $4,6 \cdot 10^6$ pb dan bakteri berukuran 10^6 pb (Yuwono, 2005), karena mengalami fragmentasi DNA kromosom jamur dan bakteri berukuran sejajar dengan pita *marker* berukuran 23130 pb.

3. Analisis kelimpahan komunitas dengan teknik SSCP

Teknik SSCP merupakan teknik dibidang molekular untuk mengetahui kelimpahan keragaman mikroorganisme dalam suatu komunitas. Urutan DNA gen yang menyusun makhluk hidup sama antara satu sama lain namun tidak identik. Perbedaan urutan nukleotida mampu dijadikan alat untuk mengetahui organisme yang berbeda. Konformasi tiga dimensi terbentuk melalui ikatan hidrogen intramolekular. DNA yang terhidrolisis hingga menjadi untai tunggal akan memiliki konformasi yang berbeda dalam hal pengikatan basa-basa yang berpola ditunjukkan karena urutan DNA yang berbeda. Fragmen DNA tersebut diperoleh

melalui amplifikasi gen 16S rRNA dan 18S rRNA pada DNA kromosom dengan teknik PCR. Amplifikasi gen 16S rRNA dan 18S rRNA menggunakan DNA kromosom sebagai cetakan. Prinsip amplifikasi DNA menggunakan PCR adalah perbanyakan fragmen DNA spesifik dimana terjadi penggandaan jumlah molekul DNA setiap siklusnya secara eksponensial dalam waktu yang relatif singkat. Pada amplifikasi DNA terdapat 3 tahap reaksi yaitu denaturasi, penempelan, dan pemanjangan untai (polimerisasi).

Pada daerah untai DNA yang panjang dibutuhkan suatu batas daerah yang akan diamplifikasi. Batas daerah ditentukan oleh dua oligonukleotida yaitu primer. Fragmen gen 16S rRNA digunakan untuk identifikasi kelompok bakteri, dalam hal ini digunakan pasangan primer Com1F-Com2R yang akan mengamplifikasi pada urutan basa 519-536 dan 907-926 (Schwieger dkk, 1998), sehingga secara teoritis akan menghasilkan fragmen-fragmen berukuran 400 pb. Fragmen gen 18S rRNA digunakan untuk identifikasi kelompok jamur, dalam hal ini digunakan pasangan primer NS1-GCfung yang akan mengamplifikasi pada urutan basa 600-1000 pb (O'Donnell, 1993), sehingga secara teoritis akan menghasilkan fragmen-fragmen berukuran 320 pb. Hasil amplifikasi dengan teknik PCR dapat dilihat pada gambar 3.

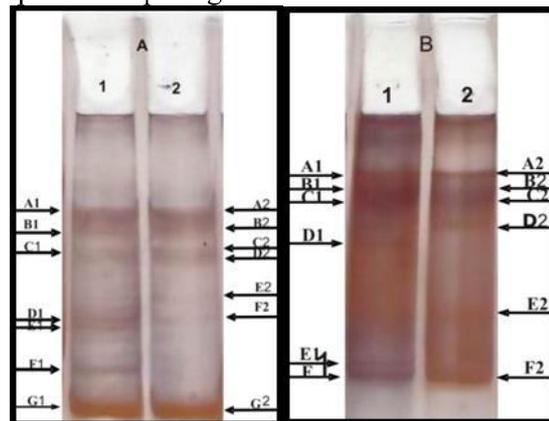


Gambar 3. Elektroforegram amplicon fragmen gen 18S rRNA dan 16S rRNA yang diambil dari kultur jerami dan kompos. Sumur M terdapat *marker* amplicon, sumur 1: amplicon fragmen gen 18S rRNA berasal dari kultur jerami, sumur 2: amplicon fragmen gen 18S rRNA berasal dari kompos, sumur 3: amplicon fragmen gen 16S

rRNA berasal dari kultur jerami, sumur 4: amplicon fragmen gen 16S rRNA berasal dari kompos

Hasil elektroforesis amplicon fragmen gen 16S rRNA dan 18S rRNA dapat dilihat pada gambar 3. Amplicon fragmen gen 18S rRNA terdapat pada sumur 1 dan 2 yang posisinya terhadap *marker* antara 300 dan 400 pb, secara teoritis hasil yang diperoleh benar yaitu 320 pb. Amplicon fragmen gen 16S rRNA terdapat pada sumur 3 dan 4 yang posisinya terhadap *marker* 400 pb, sehingga hasil yang diperoleh sesuai dengan teori.

Amplicon yang diperoleh diuji keragamannya menggunakan teknik SSCP dengan gel poliakrilamida 10%. Amplicon sebelumnya merupakan fragmen gen campuran yang mewakili keragaman jamur dan bakteri dari sampel yang diuji. Identifikasi keragaman menggunakan teknik SSCP memerlukan DNA untai tunggal. Untai tunggal tersebut memiliki urutan basa yang berbeda sehingga akan menghasilkan konformasi yang berbeda. Penguraian DNA untai ganda menjadi untai tunggal menggunakan panas sekitar 95 °C. Selain pemanasan digunakan denaturasi untuk mengoptimalkan pemisahan untai. Gel hasil elektroforesis dengan metode SSCP dianalisis menggunakan pewarnaan perak. Profil SSCP dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Profil SSCP yang mewakili kelimpahan mikroba kelompok jamur dan bakteri dengan sampel berbeda. (A₁) mewakili kelimpahan komunitas jamur kultur, (A₂) mewakili kelimpahan jamur pada kompos. (B₁) mewakili kelimpahan bakteri pada kultur, (B₂) mewakili kelimpahan bakteri pada kompos

Pada gambar 4. (A) tampak pita-pita A, B, C dan G sejajar pada kedua sumur, sedangkan pita-pita D, E dan F terletak tidak sejajar. Pada gambar 4. (B) menunjukkan kelimpahan kelompok bakteri. Pita-pita berbeda menunjukkan adanya kelimpahan bakteri yang berbeda dari kultur jerami dan kompos. Pita A, B, C dan F pada sumur 1 terletak sejajar dengan pita pada sumur 2, sedangkan posisi pita D dan E tidak sejajar. Pada dasarnya ragam komunitas mikroba kultur dan kompos sama hanya kelimpahannya yang berbeda. Mikroba yang ditumbuhkan pada kultur jerami menjadi dominan yang secara spesifik bekerja dalam mengurai jerami. Pita-pita yang tampak tidak sejajar menggambarkan kelimpahan mikroba pada kompos namun tidak dominan pada kultur, sehingga pita-pita yang tidak dominan tersebut tidak tampak.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Iranmahboob, J., Nadim, F. and Monemi, S., 2002, Optimizing Acid Hydrolysis: A Critical Step for Production of Ethanol from Mixed Wood Chips, *Biomass and Bioenergy*, 22, 401-404
- [2] Kumar, A., Gaiind, S. and Nain, L., 2008, Evaluation of Thermophilic Fungal Consortium for Paddy Straw Composting, *Biodegradation*, 19, 395-402
- [3] McDougall, G.J., Morrison, I.M., Stewart, D., Weyers, J.D.B. and Hillman, J.R., 1993, Plant Fibres: Botany, Chemistry and Processing for Industrial Use, *J. Sci. Food Agric*, 62, 1-20
- [4] Mussatto, S.I. and Roberto, I.C., 2004, Alternatives for Detoxification of Dilute Acid Lignocellulosic Hydrolyzates for Use In Fermentative process: A Review, *Bioresource Technology*, 93, 1-10
- [5] O'Donnell, K., 1993, Fusarium and Its Near Relatives. In: *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*. Reynolds, D. R and Taylor, J. W., Eds., CAB International: Wallingford, CT, pp, 225-233
- [6] Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., 2000, Review Paper: Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysates II: Inhibitors and Mechanisms of Inhibition, *Bioresource Technology*, 74, 25-33
- [7] Pelczar, M.J. and Chan, E.C.S., 2005, *Dasar-dasar Mikrobiologi I*, Alih Bahasa: Hadioetomo, R.S., Imas, T., Tjicroso, S.S. dan Angka, S.L., UI Press, Jakarta
- [8] Peters, S., Korschinsky, S., Schwieger, F. and Tebbe, C., 2000, Succession of Microbial Communities During Hot Composting As Detected by PCR-Single Strand Conformation Polymorphism-Based Genetic Processes of Small-Subunit rRNA Genes, *Applied Environment Microbial*, 66, 930-936
- [9] Sambrook, J. and Russell, D.W., 2001, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- [10] Schwieger, F. and Tebbe, C., 1998, A New Approach To Utilize PCR-Single Strand Conformation Polymorphism for 16S rRNA Gene-Based Microbial Community Analysis, *Applied Environment Microbial*, 64, 4870-4876
- [11] Sun, Y. and Cheng, J., 2002, Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review, *Bioresource Technol.*, 83, 1-11
- [12] Wuyep, P.A, Khan, A.U. and Nok, A.J., 2003, Production and Regulation of Lignin Degrading Enzymes from *Lentinus squarrosulus* (mont.) Singer and *Psathyrella Atrombonata Pegler*, *African Journal of Biotechnology*, 2, 11, 444-447
- [13] Yang, S.T., Kataeva, I., Brehm, S.D.H., Engle, N.L., Tschaplinski, T.J., Doepfke, C., Davis, M., Westpheling, J. and Adams, M. W.W., 2009, Efficient Degradation of Lignocellulosic Plant Biomass, Without Pretreatment, by The Thermophilic Anaerobe "*Anaerocellum thermophilum*" DSM 6725, *Applied And Environmental Microbiology*, 75, 14, 4762-4769
- [14] Yuwono, T., 2005, *Biologi Molekuler*, Erlangga, Jakarta