

**IDENTIFIKASI GEN TERMOASIDOFILIK ALKOHOL  
DEHIDROGENASE PADA *Bacillus sp-Pjv*<sup>1</sup>  
[Gene Identification Thermoacidophilic Alcohol  
Dehydrogenase Encoding *Bacillus sp-Pjv*<sup>1</sup>]**

**Yulia Atika MS<sup>1✉</sup>, I Made Artika<sup>1</sup> dan Novik Nurhidayat<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Institut Pertanian Bogor

Jl. Agatis Gedung Fapet Lt. 5 W. 5 Kampus IPB Darmaga;

<sup>2</sup>Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI

Jl. Raya Jakarta-Bogor km 46 Cibinong Science Center

e-mail: atika.90ms@gmail.com

**ABSTRACT**

One of the constrains in the conversion process of biomass to bioethanol is the unoptimum technology for the conversion process. One of the causes is the difference between optimum temperature for enzymatic hydrolytic saccharification and for fermentation. Enzymatic hydrolysis requires high temperature and acidic pH, while fermentation operates at mild condition. Hence, thermophilic fermentative microbes are needed so that simultaneous saccharification and fermentation processes can be carried out. Alcoholdehydrogenase(ADH), an enzyme functions in the final step of fermentation, catalyzes reduction of acetaldehydeto ethanol so that it being one of indicator fermentative microbial. *Protium javanicum*, a typical fruit from Lombok grow at high temperature and has sour taste so that it predicted has a thermo acidophilic ADH. This study was aimed to identify gene encoding ADH in *Protium javanicum*(*Pjv*) microbial isolates. ADH gene identification was carried out by DNA amplification using spesific *adh* primers in qPCR machine. Results showed that all isolates tested had *adh* gene and that of *Bacillus sp-Pjv* was the most efficiently amplified. Results of fermentation test also showed that the *Bacillus sp-Pjv* isolate was a better ethanol-producer than the others.

**Key words:** alcohol dehydrogenase, thermoacidophilic, *Bacillus sp-Pjv*.

**ABSTRAK**

Salah satu kendala konversi biomassa menjadi bioetanol yakni belum optimalnya proses dan teknologi konversi. Konversi dengan menggunakan metode sakarifikasi dan fermentasi serentak terkendala oleh perbedaan suhu optimal antara sakarifikasi enzimatik dan fermentasi. Hidrolisis memerlukan suhu termofilik dan pH asam supaya enzim selulase dapat bekerja optimal sedangkan fermentasi berlangsung pada suhu mesofilik. Oleh karena itu diperlukan enzim fermentatif termoasidofilik supaya proses tersebut dapat berlangsung serentak. Alkohol dehidrogenase (ADH) merupakan enzim pada tahap akhir lintas fermentasi yang mereduksi asetaldehida menjadi etanol. *Protium javanicum*, buah khas Lombok yang rasanya masam dan tumbuh pada temperatur cukup tinggi sehingga diprediksi memiliki enzim ADH. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi gen penyandi ADH dari isolat buah *Protium javanicum* (*Pjv*). Identifikasi gen *adh* dilakukan dengan amplifikasi menggunakan primer spesifik *adh* dalam mesin qPCR. Hasil identifikasi gen *adh* menunjukkan semua isolat dari buah *Pjv* memiliki gen *adh* dengan isolat *Bacillus sp-Pjv* paling cepat teramplifikasi. Hasil uji fermentasi juga menunjukkan bahwa isolat *Bacillus sp-Pjv* memiliki kemampuan produksi etanol lebih baik dibandingkan isolat lain.

**Kata Kunci :** alkohol dehidrogenase, termoasidofilik, *Bacillus sp-Pjv*.

**PENDAHULUAN**

Menipisnya cadangan bahan bakar fosil mendorong pemerintah mengembangkan bahan bakar alternatif salah satunya bioetanol. Pada mulanya, bahan baku bioetanol berasal dari pati dan gula sederhana yang disebut bioetanol generasi pertama (G1) kemudian berkembang generasi kedua (G2) yang berasal dari biomassa lignoselulosa. Ketersediaan yang melimpah, murah, tidak kompetitif dengan bahan makanan dan membebaskan lingkungan dari limbah (*zero waste*) menjadikan bioetanol G2 lebih menarik untuk dikembangkan. Hanya saja, tahapan konversi bioetanol dari G2 lebih kompleks dibandingkan G1.

Proses konversi bioetanol G2 terdiri atas tiga tahap yakni *pretreatment* (perlakuan pendahuluan), hidrolisis dan fermentasi. *Pretreatment* dan hidrolisis dapat dilakukan secara kimia dan biologi (enzimatis). *Pretreatment* bertujuan untuk mereduksi lignin (delignifikasi) sementara hidrolisis bertujuan untuk memecah polisakarida menjadi gula sederhana yang siap untuk difermentasi (Arshadi dan Grundberg, 2011). Hidrolisis secara enzimatik dibedakan menjadi dua yakni sakarifikasi dan fermentasi terpisah (SFT) dan sakarifikasi fermentasi serentak (SFS). Metode SFS yang dilakukan secara serentak dalam satu reaktor lebih disukai dibanding SHT karena menghasilkan etanol yang lebih banyak dan

menghemat biaya produksi. Kondisi optimal enzim pada reaksi hidrolisis secara enzimatis adalah pH 4.8 dengan temperatur 45-50°C. Balla *et al.* (2013) mengemukakan, proses hidrolisis secara enzimatis menggunakan enzim selulase, bekerja optimal pada suhu 50°C.

Fermentasi bioetanol secara komersial sampai saat ini masih menggunakan mikroorganisme jenis ragi *Saccharomyces cerevisiae* sedangkan penggunaan bakteri belum sampai pada skala komersial (Riyanti, 2010). *Saccharomyces cerevisiae* merupakan yeast mesofilik yang bekerja optimal pada suhu 30°C. Artinya, suhu optimal pada hidrolisis enzimatis lebih tinggi daripada suhu fermentasi. Perbedaan suhu optimal menyebabkan perlunya proses pendinginan sebelum fermentasi atau penggunaan enzim selulase yang lebih tinggi. Selain itu, yeast mesofilik diketahui mudah mengalami kontaminasi oleh spesies *Lactobacilli* sehingga produk akhir berupa asam laktat lebih banyak daripada etanol (Bischoff *et al.*, 2007).

Alkohol dehidrogenase bekerja pada tahap akhir dalam pembentukan etanol. Enzim ini mengkatalisis reaksi *reversible* oksidoreduktase, mereduksi asetaldehid menjadi etanol. Oleh karena itu, adanya enzim inimenjadi salah satu petunjuk sifat fermentatif suatu mikroorganisme.

Buah ketimus (*Protium javanicum*) asal Lombok Timur Indonesia, hidup pada temperatur yang cukup tinggi dan rasanya masam. Buah ini sering disebut buah spritus karena mengeluarkan aroma alkoholik. Aroma alkoholik diduga disebabkan karena pembentukan etanol oleh mikroba di dalam buah. Dengan karakteristik tersebut, diharapkan buah ini memiliki enzim termoasidofilik alkohol dehidrogenase. Penelitian ini difokuskan untuk menyeleksi mikroorganisme termoasidofilik pembawa gen *adh*.

## BAHAN DAN CARA KERJA

### Isolasi dan Kultivasi

Sebanyak satu gram sampel dari buah

*Protium javanicum* (*Pjv*) diencerkan dengan menambahkan 9 ml akuades kemudian diencerkan kembali sebanyak  $10^{-4}$  kali. Setelah itu, 100µL sampel diinokulasikan pada media heterotrof padat (15 g bacto agar, 15 g pepton, 3 g tripton, 5 g NaCl, 2.5 g  $K_2HPO_4$  dilarutkan dalam 1000 ml akuades) dan diinkubasi pada suhu 50°C selama 24-48 jam. Morfologi koloni yang tumbuh kemudian diamati pada mikroskop. Isolat khamir ditumbuhkan pada media padat yeast manitol (15 g bacto agar, 3 g yeast ekstrak, 5 g pepton,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g, 1 g  $K_2HPO_4$ , dan 10 g glukosa yang dilarutkan dalam 1000 ml akuades) dan isolat bakteri ditumbuhkan pada media padat heterotrof.

### Identifikasi Gen *adh* dengan *quantitative real time*PCR(qPCR)

Kultur yang didapatkan kemudian dibiakkan pada media cair dan diinkubasi pada suhu 50°C selama 24-48 jam. Selanjutnya, konsentrasi sel masing-masing kultur disamakan hingga mencapai kerapatan optis (OD) 0.5. DNA sel kemudian diekstraksi dengan cara *heatshock* pada suhu 90°C selama 20 menit dan *coldshock* pada suhu -18°C selama 20 menit. DNA yang diperoleh digunakan sebagai *template* dan direaksikan dengan komponen reaksi PCR yang lain. Amplifikasi DNA menggunakan mesin *real time* PCR Biorad CFX96 dengan komponen reaksi yang digunakan sebagai berikut : SsoFast Eva Green supermix sebanyak 10 µL, primer alkohol dehidrogenase 1µL dengan konsentrasi 10µM, DNase-free water dan DNA cetakan masing-masing sebanyak 1 µL yang dicukupkan dengan ddH<sub>2</sub>O sehingga total volume 20 µL. qPCR diprogram untuk 40 siklus dengan pengaturan; pre denaturasi 95°C 3 menit, denaturasi 95°C 15 detik, *annealing* 55°C 15 detik, elongasi 72°C 15 detik dan elongasi tambahan 10 menit. Untuk menginisiasi amplifikasi digunakan primer spesifik penyandi gen *adh*, urutan nukleotidanya ditampilkan pada tabel berikut ini.

**Tabel 1.** Primer spesifik untuk gen alkohol dehidrogenase (*Specific primers for adh gene*)

Subyek Primer ( <i>Primer</i> )	Sekuens DNA ( <i>DNA sequence</i> ) (5' — 3')	Referensi ( <i>Reference</i> )
Alkohol Dehidrogenase (ADH)	<i>Forward</i> CGGTGAATATGTCTGGCACTTC	Quintero <i>et al.</i> (2008)
	<i>Reverse</i> ATCTGCTGAACCGAGGTGTAAT	

### Uji Fermentasi Termoasidofilik

Isolat yang membawa gen *adh* diuji kemampuan fermentasinya pada suasana asam. Komposisi media fermentasi berupa : gula lontar 10%, 0.1 % serbuk TKKS (Tandan Kosong Kelapa Sawit) yang telah diberi perlakuan dengan NaOH 10%, 10 % kultur cair inokulum dengan OD 0.5 dan pH 5 (diatur dengan penambahan buffer asetat). Fermentasi dilakukan pada suhu 50°C dengan kecepatan 100 rpm selama 48 jam. Komposisi media fermentasi salah satunya serbuk TKKS yang sudah diberi perlakuan dengan 10% NaOH dan diinkubasi pada suhu 150°C dengan tekanan 4 bar selama 30 menit. Serbuk TKKS yang digunakan belum melalui proses hidrolisis enzimatis menjadi glukosa. Oleh karena itu, digunakan gula lontar dengan persentase tertentu sebagai pengganti glukosa. Kadar etanol yang dihasilkan ditentukan dengan kromatografi gas Shimadzu 14 B.

### Optimasi Kadar Etanol dengan Metode Respon Permukaan

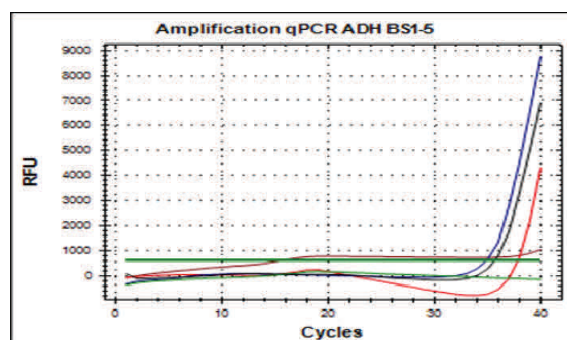
Optimasi kadar etanol dilakukan dengan metode respon permukaan desain box Behnken dengan dua kali replikasi. Faktor-faktor yang dioptimasi antara lain waktu fermentasi, konsentrasi inokulan (dinyatakan dalam kerapatan optis/OD) dan persentase substrat. Rentang masing-masing berturut-turut yakni 24-72 jam, 0.5-1.5 dan 1-10%. Fermentasi dilakukan berdasarkan *output* desain respon permukaan pada program minitab 16. Data respon kadar etanol hasil fermentasi kemudian ditabulasi ke dalam *software* untuk dianalisis kombinasi yang terbaik dan faktor yang

berpengaruh signifikan.

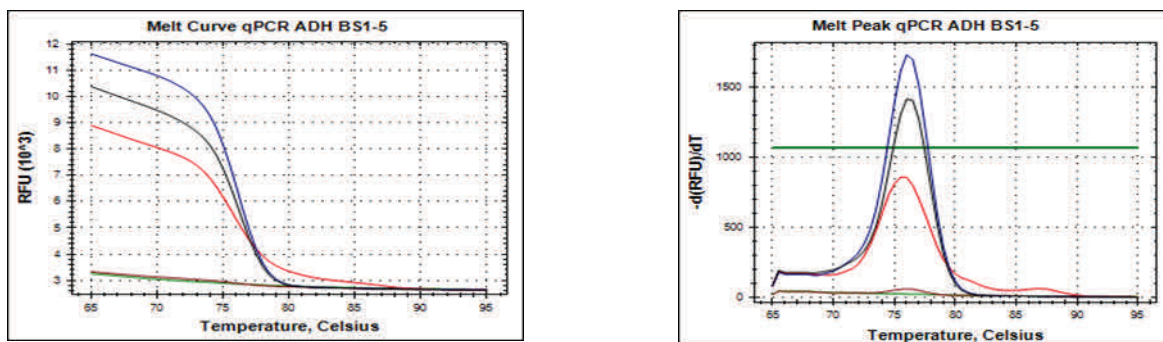
## HASIL

### Seleksi Mikroorganisme Termofilik Penyandi Gen *adh*

Sebanyak empat buah isolat dari buah *Pjv* (*Protium javanicum*) berhasil ditumbuhkan pada suhu 50°C. Pengamatan pada mikroskop menunjukkan dua isolat berupa khamir dan dua lagi bakteri. Isolat diberi kode BS (Buah Spiritus) 1, 2, 4 dan 5. BS 1 dan 2 merupakan yeast sementara BS 4 dan 5 adalah bakteri. Penentuan panjang gelombang untuk mengukur konsentrasi inokulum dilakukan dengan metode spektrum. Didapatkan panjang gelombang maksimal untuk khamir BS 1 416 nm dan BS 2,460.5 nm, BS 4 dan BS 5 berturut-turut yakni 414 dan 439 nm (Gambar 1).



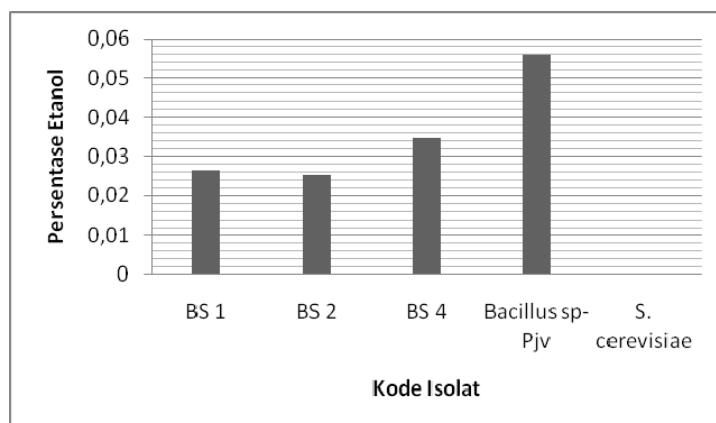
**Gambar 1.** Pola amplifikasi gen alkohol dehidrogenase (*adh*) pada tiap isolat terseleksi BS1 = garis hitam, BS2 = garis biru, BS4 = garis merah, BS5 = garis coklat dan NTC (kontrol) = garis hijau (*Amplification pattern of adh gene for each selected isolate. BS 1 = black line, BS 2 = blue line, BS 4 = red line, BS 5: brown line, and NTC (control) = green line.*)



**Gambar 2.** Kurva dan puncak leleh dari tiap isolat terseleksi BS1 = garis hitam, BS2 = garis biru, BS4 = garis merah, BS5 = garis coklat dan NTC (kontrol) = garis hijau. (*Curve and melting peak for each selected isolate, BS 1 = black line, BS2 = blue line, BS4 = red line, BS5: brown line, and NTC (control) = green line*)

**Tabel 2.** Nilai kuantitas (Cq) dari amplifikasi gen alkohol dehidrogenase (*adh*) empat isolat terseleksi [*Quantity value (Cq) from amplicon (adh) of four selected isolates*]

No	Subyek Kode Isolat	Cq	Melting T°C
1	BS1	35,51	76
2	BS2	34,70	76
3	BS4	37,77	76
4	BS5	14,68	76
5	NTC (Non Template Control)	NA	NA



**Gambar 2.** Grafik persentase kadar etanol hasil fermentasi oleh isolat buah *Pjv* (*Graphic of percentage of ethanol content fermented by Pjv isolates*).

Pola amplifikasi pada gambar 1 menunjukkan bahwa primer yang digunakan bersifat spesifik karena hanya mendeteksi satu fragmen DNA utas ganda, hanya terdapat satu amplicon DNA.

Keempat isolat terseleksi memiliki nilai *melting point* yang sama yakni 76°C artinya gen yang diamplifikasi merupakan gen yang sama. Nilai Cq menunjukkan jumlah siklus yang harus

## PEMBAHASAN

Alkohol dehidrogenase (ADH) merupakan kelompok enzim *reversible* oksidoreduktase dan merupakan enzim akhir pada pembentukan etanol yang mereduksi asetaldehid menjadi etanol. Enzim ini tersebar luas pada bakteri, eukariot dan archaea. Baik bakteri maupun archaea memiliki enzim tetramer ADH sementara eukariotik memiliki enzim dimer ADH (Littlechild *et al.*, 2003). Hasil identifikasi gen *adh* dengan real time PCR berkorelasi dengan hasil uji fermentasi yang menunjukkan isolat *Bacillus sp-Pjv* paling potensial. *Bacillus sp-Pjv* diduga memiliki enzim tetramer ADH sehingga lebih optimal dalam membentuk etanol dibanding khamir.

Beberapa spesies *Bacillus* fermentatif termofilik yang telah dikaji sebelumnya yakni *Bacillus coagulans*, *Geobacillus thermoglucosidasius* dan *Bacillus stearothermophilus*. Kelebihan mikroorganisme termofilik adalah mereka mampu memfermentasi gula pentosa dan heksosa, resisten terhadap perubahan pH dan temperatur tinggi (Zaldivar *et al.*, 2001; Hild *et al.*, 2003; Takami *et al.*, 2004). *B. coagulans* yang memfermentasi gula heksosa dan pentosa pada suhu 50-55°C pH 5 lebih efektif dibandingkan fermentasi oleh *S. cerevisiae*, *Zymomonas mobilis* dan *Lactococcus lactis*. *B. coagulans* menurunkan penggunaan enzim selulase hingga tiga kali dibandingkan *S. cerevisiae* dan *Z. mobilis* dengan waktu fermentasi 48 jam (Ou *et al.*, 2009).

Sifat *reversible* ADH bisa menyebabkan etanol yang telah dibentuk mengalami reaksi balik (oksidasi) membentuk asetaldehid. Faktor tersebut diduga menyebabkan rendahnya etanol yang dihasilkan. Faktor lain yang diduga mempengaruhi yakni pembentukan metabolit selain etanol lebih besar. Ou *et al.* (2009) melakukan fermentasi menggunakan *B. coagulans*, menghasilkan metabolit utama berupa asam laktat 0.67 g/g, kemudian asetat 0.03 g/g dan etanol 0.02 g/g. Cripps *et al.* (2009) mengeliminasi gen *ldh* (laktat

dehidrogenase) dan *pfl* (piruvat liase) untuk mengoptimasi pembentukan etanol sebagai metabolit utama dari *G. thermoglucosidasius*. Penggunaan isolat tersebut berhasil meningkatkan konsentrasi etanol 0.47 g/g (substrat xilosa), 0.42 g/g (substrat glukosa) dan 0.47 g/g (substrat selobiosa) (Extance *et al.*, 2013).

Sifat termostabil dari enzim ditentukan oleh asam amino penyusunnya. Mekanisme kestabilan protein enzim termofilik bisa disebabkan karena adanya interaksi hidrofobik, jembatan garam, ikatan hidrogen dan stabilisasi oleh pembentukan loop (Zeikus *et al.*, 1998). Mekanisme kestabilan enzim ADH pada *Bacillus sp-Pjv* belum dipelajari lebih lanjut. Sebagai referensi, sifat termostabil alkohol dehidrogenase pada *G. thermoglucosidasius* disebabkan adanya loop yang lebih pendek dan lebih rigid dibandingkan mesofilik ADH *Escherichia coli* (Extance *et al.*, 2013).

Spesies *Bacillus* selanjutnya yang memiliki enzim ADH adalah *B. stearothermophilus* yang tumbuh optimal pada suhu 50-63°C. ADH dari *B. stearothermophilus* (htADH) memiliki kesamaan 55% dengan ADH mesofilik dari *E. coli* (EcADH). Residu Prolin 242 pada *B. stearothermophilus* sejajar dengan alanin 242 pada ADH *E. coli*. Adanya residu prolin pada loop menambah kekompakan dari rantai polipeptida yang menyebabkan enzim ADH *B. stearothermophilus* termostabil (Ceccareli *et al.*, 2004).

## KESIMPULAN

Gen pembawa alkohol dehidrogenasi berhasil diamplifikasi pada empat isolat dari buah *Protium javanicum* dengan isolat *Bacillus sp-Pjv* yang paling potensial. Hasil penelitian ini memberi sinyal positif bahwa isolat *Bacillus sp-Pjv* memiliki gen penyandi alkohol dehidrogenase yang masih perlu diteliti lebih lanjut terkait mekanisme kerja enzim tersebut.

## DAFTAR PUSTAKA

Arshadi and Grundberg, 2011. *Biochemical Production of Bioethanol 199-216*. Handbook of Biofuels Production.

- Woodhead Publishing. Sweden.
- Bhalla A, B Namita, K Sudhir, K Bischoff and KS Rajesh. 2013.** Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. *Journal of Bioresource Technology* **128**, 751–759.
- Bischoff KM, N Skinner and T Leathers. 2007.** Antimicrobial susceptibility of *Lactobacillus* species isolated from commercial ethanol plants. *J. Industrial Microbiol Biotechnology* **34**, 739-744.
- Ceccarelli C, L Zhao-Xun, S Michael, P Gerd, MG Barry, PK Judith and B Brian. 2004.** Crystal Structure and Amide H/D Exchange of Binary Complexes of Alcohol Dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*: Insight into Thermostability and Cofactor Binding. *Journal of Biochemistry*, **43**.
- Cripps R, K Eley, DJ Leak, B Rudd, M Taylor, M Todd, S Boakes, S Martin, and T Atkinson. 2009.** Metabolic engineering of *Geobacillus thermoglucosidasius* for high yield ethanol production. *Journal of metabolic engineering* **11**, 398-40.
- Extance J, SJ Crennell, K Eley, R Cripps, DW Hough and MJ Danson. 2013.** Structure of a bifunctional alcohol dehydrogenase involved in bioethanol generation in *Geobacillus thermoglucosidasius*. *Journal of Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **69**, 2104-2115.
- Hild HM, DC Stuckey and DJ Leak. 2003.** Effect of nutrient limitation on product formation during continuous fermentation of xylose with thermoanaerobacter ethanolicus JW200 Fe (7). *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **60**, 679-686.
- Littlechild JA, MN Isupov and JE Guy. 2003.** Hyperthermophilic Dehydrogenase Enzymes. *Journal of Biochemical Society Transactions* **32**, part 2.
- Ou M, N Mohammed, LO Ingram and KT Shanmugam. 2009.** Thermophilic *Bacillus coagulans* Requires Less Cellulases for Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cellulose to Products than Mesophilic Microbial Biocatalysts. *Journal of Applied Biochemistry and Biotechnology* **155**, 76-82.
- Quintero Y, M Poblet, JM Guillamo and A Mas. 2008.** Quantification of the expression of reference and alcohol dehydrogenase genes of some acetic acid bacteria in different growth conditions. *Journal of Applied Microbiology* **766**, 1365-2672.
- Riyanti I. 2010.** Beberapa Gen pada Bakteri yang Bertanggung Jawab terhadap Produksi Bioetanol. *Jurnal Litbang Pertanian Bogor*. **30**, 41-47.
- Takami H, Y Takaki, G Chee, S Nishi, Shigeru, H Suzuki, S Matsui and I Uchiyama. 2004.** Thermoadaptation trait revealed by the genome sequence of thermophilic *Geobacillus kaustophilus*. *Oxford Journal* **32**, 6292-6303.
- Zaldivar J, J Nielson and Olsson. 2001.** Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *J. Appl Microbiol Biotechnology* **56**, 17-34.
- Zeikus GJ, C Vicille and Savchenko. 1998.** Thermozyms: Biotechnology and Struktur function. *Journal of Extremophiles* **2**, 179-183.