

Penapisan dan Karakterisasi Amilase dari Bakteri Asal Ekoenzim (Screening and Characterization of Amylase from Bacteria Derived from Eco-enzymes)

Ninda Ningtyas, Nisa Rachmania Mubarik*, Mulyorini Rahayuningsih

(Diterima Juli 2022/Disetujui Mei 2023)

ABSTRAK

Ekoenzim merupakan salah satu sumber potensial untuk mendapatkan isolat bakteri amilolitik. Penelitian ini bertujuan menapis isolat bakteri amilolitik dari ekoenzim, melakukan karakterisasi enzim amilase hasil semipemurnian, serta mengidentifikasi bakteri amilolitik secara molekuler menggunakan marka 16S rRNA. Penapisan bakteri amilolitik dilakukan dengan mengukur indeks amilolitik pada media Nutrient agar yang mengandung 1% pati tapioka. Isolat amilolitik yang memiliki indeks tertinggi dan tidak patogen dipilih untuk proses karakterisasi amilase. Pengujian aktivitas amilase dilakukan menggunakan metode Bernfeld dan protein diukur menggunakan metode Bradford. Ekstrak ekstraseluler dipekatkan menggunakan presipitasi amonium sulfat. PKL2 adalah bakteri gram positif yang berasal dari ekoenzim dengan indeks amilolitik tertinggi 1,77, dan tidak patogen pada pengujian menggunakan media agar-agar darah. Amilase optimum dihasilkan oleh PKL2 pada fase stasioner pada 21 jam inkubasi. pH dan suhu optimum aktivitas amilase pada pH 7,0 dan suhu 50°C. Enzim amilase dari PKL2 meningkat kemurniannya 1,82 kali lipat dengan pengendapan amonium sulfat pada konsentrasi jenuh 60%. Hasil identifikasi secara molekuler menunjukkan bahwa isolate PKL2 memiliki kemiripan dengan *Bacillus amyloliquefaciens*.

Kata kunci: aktivitas Amilase, *Bacillus amyloliquefaciens*, ekoenzim, pH optimum

ABSTRACT

Eco-enzymes are one of the potential sources for obtaining amylolytic bacterial isolates. The study aims to screen amylolytic bacteria from eco-enzymes, characterize semi-purification amylase, and identify amylolytic bacteria molecularly using the 16S rRNA gene. Screening for amylolytic bacteria was carried out by measuring the amylolytic index on a Nutrient agar medium containing 1% tapioca starch. The amylolytic isolate which had the highest index and was non-pathogenic was selected for the amylase characterization process. Testing of amylase activity was carried out using the Bernfeld method while the protein enzymes were measured using the Bradford method. The extracellular extract was concentrated using ammonium sulfate precipitation. PKL2 is gram-positive bacteria that was derived from eco-enzymes with the highest amylolytic indexes of 1.77, which were not pathogenic on the blood agar test. Optimum amylase was produced by PKL2 at the stationary phase at 21 h. The optimum pH and temperature of the amylase activity were observed to be 7.0 and 50°C, respectively. The amylase enzyme from PKL2 increased its purity 1.82-fold upon precipitation of ammonium sulfate at a concentration of 60%. Identification of bacteria based on molecular identification showed that PKL2 obtained was putatively identified as *Bacillus amyloliquefaciens*.

Keywords: Amylase activity, *Bacillus amyloliquefaciens*, eco-enzyme, optimum pH

PENDAHULUAN

Enzim merupakan salah satu produk bioteknologi yang potensial dan banyak dimanfaatkan untuk berbagai bidang industri. Penggunaan enzim yang semakin meningkat dapat menggantikan peran bahan kimia sintetik yang selama ini dipakai. Selain itu, penggunaan enzim dapat meningkatkan efisiensi yang

kemudian mampu meningkatkan jumlah produksi. Kebutuhan enzim cenderung meningkat setiap tahunnya, dan di Indonesia sendiri diperkirakan mencapai 2.500 ton dengan nilai impor 200 milyar pada tahun 2017 (Nurhayati *et al.* 2020). Sementara itu, untuk memenuhi permintaan pasar global atas amilase diperkirakan akan mencapai 320,1 juta USD pada tahun 2024 (Asraf *et al.* 2018). Produksi dan perdagangan enzim didominasi oleh kelompok enzim hidrolitik, seperti lipase, protease, katalase, dan amilase. Amilase merupakan salah satu enzim yang paling penting dalam bidang bioteknologi, terhitung dengan produksi amilase yang menyumbang sekitar 25–33% pada produksi enzim di seluruh dunia (Alvez *et al.* 2020).

Amilase dapat diproduksi oleh mikroba seperti bakteri, kapang, maupun fungi. Enzim yang digunakan pada umumnya diisolasi dari bakteri. Genus bakteri

¹ Sekolah Pascasarjana, Program Studi Bioteknologi, IPB Univeristy, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

² Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB Univeristy, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

³ Departemen Teknik Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB Univeristy, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

* Penulis Korespondensi:

E-mail: nrachmania@apps.ipb.ac.id

yang termasuk dalam kelompok bakteri amilolitik antara lain *Bacillus*, *Clostridium*, *Bacteriodes*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, dan *Thermus* (Reddy *et al.* 2003). Beberapa upaya telah dilakukan untuk mengisolasi bakteri amilolitik dari berbagai sumber, seperti dari limbah buah-buahan, limbah dapur, limbah rumah tangga (Mamulak 2018), dan dari hasil fermentasi buah durian (Nurmalinda *et al.* 2013).

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengeksplorasi mikroorganisme dari berbagai sumber yang menjadi habitatnya. Ekoenzim adalah ekstrak cairan yang diperoleh dari fermentasi limbah dapur, misalnya sisa sayuran dan buah-buahan dengan penambahan substrat gula merah, gula pasir, atau molase (Kerkar dan Salvi 2020). Ekoenzim diduga menjadi salah satu habitat bakteri penghasil amilase. Hal ini karena ekoenzim merupakan cairan hasil fermentasi dari limbah organik buah dan sayuran yang masih mengandung karbohidrat (Verma *et al.* 2019). Fermentasi tersebut akan menghasilkan aktivitas enzim dari bakteri atau fungi yang terkandung pada limbah-limbah tersebut. Dengan demikian, ekoenzim dapat menjadi sumber nutrisi bagi mikro penghasil amilase. Vama dan Cherekar (2020) melaporkan telah menganalisis berbagai aktivitas enzim termasuk protease, amilase, dan lipase pada ekoenzim dengan menggunakan limbah buah jeruk. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk melakukan penapisan bakteri amilolitik yang diisolasi dari ekoenzim, dan karakterisasi amilase serta melakukan identifikasi bakteri secara molekuler.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan antara lain, cawan Petri, botol, tabung reaksi, labu Erlenmeyer (50–1000 mL), *magnetic stirrer* (*Faithful*, SH-2) inkubator bergoyang, *water bath*, mesin PCR (Major Science Thermal Cycler, CYCLER-25), sentrifuger (MPW Med Centrifuge, MPW-260R), spektrofotometer (UV1720 Single Beam UV-Vis Spectrophotometer), mesin elektroforesis (Eurogentec, Mupid@exU), mesin *gel-doc* (Axygen™ Gel Documentation), dan NanoDrop (Thermo Scientifific, NanoDrop 1000). Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 26 isolat bakteri amilolitik hasil isolasi dari fermentasi limbah kulit buah mangga dan lemon dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB University.

Peremajaan dan Penapisan Isolat Bakteri Amilolitik

Isolat bakteri disubkulturkan pada media *Nutrient Agar* (NA) dan diinkubasi pada suhu 27°C selama 24 jam. Setiap isolat bakteri digores ulang pada media *Nutrient Agar* (NA) yang mengandung 1% pati tapioka di cawan Petri. Setelah diinkubasi pada suhu kamar (27–28°C), koloni bakteri yang terpisah ditumbuhkan pada media *Nutrient Agar* miring yang mengandung

1% pati tapioka. Pengujian aktivitas amilolitik dilakukan secara kualitatif dengan mengukur indeks amilolitik pada media cawan *Nutrient Agar* (NA) yang mengandung 1% pati tapioka. Isolat yang menghasilkan zona bening di sekitar koloni dengan indeks amilolitik (IA) tertinggi digunakan untuk pengujian selanjutnya (Saputro 2018). Indeks amilolitik diukur berdasarkan rumus berikut (Sundari *et al.* 2019).

$$\text{Indeks amilolitik} = \frac{\text{Diameter zona bening (DZB)} - \text{Diameter koloni bakteri (DKB)}}{\text{Diameter koloni bakteri (DKB)}}$$

Karakterisasi Bakteri Amilolitik

Tiga isolat bakteri dengan indeks amilolitik tertinggi dipilih untuk dikarakterisasi secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis meliputi morfologi koloni bakteri yang dilakukan setelah koloni bakteri diinkubasi pada media *Nutrient Agar* (NA) selama 24–48 jam. Pengamatan yang dilakukan meliputi tepian koloni, bentuk koloni, elevasi, permukaan koloni, dan warna koloni. Pengamatan mikroskopik meliputi pewarnaan Gram. Karakter fenotipe lain yang dikarakterisasi, yaitu kemampuan bakteri amilolitik dalam menghidrolisis sel darah merah. Uji hemolisis dilakukan dengan diinokulasikan bakteri berumur 24 jam melalui teknik inokulasi titik pada media agar-agar darah (media NA yang ditambah 5% darah domba dan 2,5% NaCl) untuk mendeteksi isolat yang patogen. Pengamatan zona bening di sekitar koloni bakteri dilakukan setelah 24 jam inkubasi pada suhu ruang. Zona bening yang terbentuk menandakan bakteri uji memiliki kemampuan hemolisis sel darah merah.

Perhitungan Jumlah Sel dan Penentuan Kurva Pertumbuhan

Sebanyak 2 lup isolat terpilih dari biakan agar-agar miring ditumbuhkan di media *Nutrient Broth* (NB) + 1% pati dalam 30 ml Erlenmeyer dan diinkubasi pada suhu 27°C dengan kecepatan 120 rpm selama 8 jam pada inkubator bergoyang. Tahap berikutnya dilakukan pengenceran serial 10^{-1} hingga 10^{-7} untuk menghitung jumlah sel bakteri dengan metode *total plate count* dan turbiditas sel. Sebanyak 3 ml kultur (1:1), masing-masing diencerkan ke dalam 3 ml media NB steril dengan konsentrasi (+ 1% (b/v) pati tapioka) dengan perbandingan 1:2, 1:4, 1:8, dan 1:16. Setiap pengenceran diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer (Jamilah *et al.* 2009). Selanjutnya dibuat kurva standar berdasarkan hubungan antara OD terkoreksi dan jumlah sel bakteri/ml. Kurva hubungan log sel dan aktivitas spesifik amilase dibuat berdasarkan hasil pengamatan laju pertumbuhan sel dan produksi amilase.

Produksi Amilase

Produksi enzim dilakukan berdasarkan metode yang dilakukan oleh Kurniasih (2012). Sebanyak 1–2 lup bakteri ditumbuhkan pada 30 ml media cair *Nutrient Broth* (NB) + 1% pati dan diinkubasi selama 8 jam pada suhu 27°C dengan kecepatan 120 rpm. Sebanyak 10%

(10 sel/ml) inokulum dimasukkan ke dalam 200 ml media *Nutrient Broth* (NB) lalu diinkubasi pada suhu 27°C dengan kecepatan 120 rpm. Enzim ekstrak kasar diperoleh dengan mensentrifugasi kultur pada kecepatan 6000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit (Kurniasih 2012). Supernatan yang mengandung ekstrak enzim kasar dipisahkan dan diuji aktivitas serta konsentrasi proteinnya.

Pengujian Aktivitas Amilase

Pengujian aktivitas enzim amilase dilakukan menggunakan metode Bernfeld. Larutan maltosa digunakan sebagai standar dan diukur dengan konsentrasi 100–1000 ppm dengan selang 100 ppm. Aktivitas enzim dihitung dengan menggunakan persamaan berikut yang mengacu pada Bernfeld (1995).

$$\text{Aktivitas enzim (U/mL)} = \frac{\text{Jumlah gula reduksi} \times 1000 \times \text{faktor pengenceran}}{\text{Berat molekul glukosa} \times \text{waktu} \times \text{volume enzim}}$$

Pengukuran Kadar Protein

Kadar protein diukur dengan metode Bradford. Sebanyak 100 µl sampel enzim ditambahkan dengan 5 ml pereaksi Bradford, dikocok dengan vortex, dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang (27°C) lalu diukur dengan spektrofotometer (UV-Vis) pada panjang gelombang 595 nm. Standar protein menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA) dengan konsentrasi 0–1 mg/ml. Aktivitas spesifik adalah jumlah unit enzim amilase per miligram total protein. Pengukuran aktivitas spesifik dilakukan dengan persamaan berikut:

$$\text{Aktivitas spesifik enzim (U/mg)} = \frac{\text{Aktivitas amilase (U/mL)}}{\text{Kadar protein (mg/mL)}} \quad (\text{Bradford 1976})$$

Pengendapan Enzim Amilase dari Isolat Terpilih

Ekstrak kasar amilase diendapkan dengan amonium sulfat (Dennison 2002). Amonium sulfat ditambahkan dengan fraksi kejenuhan yang berbeda (20, 40, 60, dan 80%). Setiap 20 ml enzim amilase ekstrak kasar ditambahkan amonium sulfat secara bertahap sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan lambat dalam kondisi dingin, yaitu dengan menggunakan tabung yang diberi batu es, hingga mencapai tingkat kejenuhan tertentu. Suspensi dibiarkan selama satu malam untuk mencapai keseimbangan. Setelah itu disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 14000 rpm selama 15 menit. Filtrat yang diperoleh dilanjutkan untuk tahap fraksinasi selanjutnya, sedangkan endapan dilarutkan dengan bufer fosfat 0,05 M pH 7 hingga terjadi pemekatan. Selanjutnya kadar protein dan aktivitas enzim ditentukan untuk masing-masing fraksi terpisah. Aktivitas spesifik enzim ditentukan dengan membagi aktivitas enzim dengan kadar protein.

Optimasi pH dan Suhu Isolat Terpilih

Karakterisasi amilase dilakukan untuk mengetahui kondisi optimum enzim pada berbagai suhu dan pH (Vengadaramana *et al.* 2011). Pengaruh pH diuji

dengan menggunakan 0,05M bufer sitrat untuk pH 4, 5, dan 6, kemudian 0,05M bufer fosfat untuk pH 7 dan 8, serta 0,05M bufer glisin-NaOH untuk pH 9 dan 10. Pengaruh suhu pada enzim amilase diuji dengan cara mengukur aktivitas pada berbagai macam suhu, yaitu 30, 37, 40, 50, 60, 70, 80, dan 90°C (Kurniasih 2012).

Identifikasi Bakteri Amilolitik Berdasarkan Gen 16S rRNA

Satu isolat bakteri amilolitik dengan aktivitas terbaik kemudian diidentifikasi berdasarkan gen penyandi 16S rRNA. Isolasi genom bakteri amilolitik dilakukan dengan menggunakan Presto TM Mini gDNA Bacteri Kit, Geneaid Biotech Ltd., dengan tahapan sesuai petunjuk manufaktur. Kemurniaan dan konsentrasi DNA diukur dengan menggunakan alat Nanodrop 2000 spektrofotometer. Amplifikasi gen penyandi 16S rRNA menggunakan primer forward 63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') primer reverse 1387R (5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC3') pada mesin PCR (Marchesi *et al.* 1998). Gradien suhu PCR yang digunakan adalah proses *predenaturasi* dengan suhu 94°C selama 4 menit, diikuti 30 siklus *denaturasi* dengan suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* dengan suhu 55°C selama 45 detik, *elongation* dengan suhu 72°C selama 1 menit 30 detik dan *post-elongation* dengan suhu 72°C selama 7 menit, serta proses *cooling* dengan suhu 4°C selama 5 menit. Produk hasil PCR divisualisasi dengan elektroforesis pada gel agarosa 1% dalam bufer TAE 1x dengan tegangan 85 volt selama 40 menit. Pita DNA diwarnai dengan direndam di dalam EtBr selama 10 menit dan divisualisasi dengan menggunakan UV Illuminator. Produk PCR kemudian dilakukan proses sekuensing melalui jasa 1st BASE DNA Sequencing Service, Malaysia untuk mengidentifikasi urutan gen. Sekuens gen 16S rRNA yang diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan program MEGA 7, kemudian disejajarkan dengan *database* gen 16S rRNA di NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) menggunakan program BLASTN. Program MEGA 7 juga digunakan untuk analisis pohon filogenetik dengan metode *Neighbor Joining* dengan nilai *bootstrap* 1000 kali.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penapisan Bakteri Amilolitik dan Karakteristik Isolat Bakteri Asal Ekoenzim

Hasil penapisan dari dua puluh enam isolat bakteri asal ekoenzim pada media *Nutrient Agar* (NA) yang mengandung 1% pati tapioka, diperoleh tiga isolat bakteri dengan zona bening terbesar di sekitar koloni setelah ditetesi dengan larutan Iodin (Gambar 1). Zona bening menunjukkan bahwa amilum di area tersebut telah didegradasi oleh bakteri amilolitik. Perbandingan luasan zona bening terhadap luasan koloni bakteri selanjutnya diukur sebagai representasi kualitatif aktivitas amilase atau indeks amilolitik (IA). Indeks



Gambar 1 Hasil pengujian sifat amilolitik pada isolat bakteri (A) PKM3; (B) PKL2; (C) CKM2 pada *Nutrient Agar* (NA) yang mengandung 1% pati tapioka yang ditandai dengan adanya zona bening (zb) di sekitar koloni (k) bakteri setelah ditetesi larutan iodin.

amilolitik digunakan untuk seleksi awal secara kualitatif untuk menentukan aktivitas enzim amilase yang dihasilkan oleh bakteri. Enzim amilase akan memutus ikatan glikosida yang terdapat pada molekul amilum. Hasil hidrolisis berupa maltosa, glukosa, dan dekstrin. Molekul-molekul sederhana tersebut tidak akan memberikan warna biru tua pada saat ditetesi larutan kalium iodida, sedangkan amilum yang tidak terhidrolisis akan memberikan warna biru tua (Reddy *et al.* 2003).

Indeks amilolitik tertinggi diperoleh pada isolat PKL2, yaitu sebesar 1,77 (Tabel 1). Sementara pada penelitian yang dilakukan oleh Kurniasih (2012), hasil isolasi bakteri amilolitik asal Pulau Gili Meno, Nusa Tenggara Barat menunjukkan indeks amilolitik yang terbentuk berkisar antara 0,1–0,8. Hal ini menunjukkan bahwa kemampuan amilolitik bakteri dari ekoenzim lebih baik daripada isolat bakteri dari Pulau Gili Meno. Setelah diperoleh tiga isolat bakteri dengan aktivitas amilolitik tertinggi, isolat-isolat tersebut dilakukan karakterisasi morfologi serta dilakukan uji patogenitasnya pada media agar darah.

Hasil pewarnaan Gram menunjukkan isolat bakteri tergolong ke dalam Gram positif. Kumar dan Shree (2016) telah melaporkan hasil penelitiannya bahwa keenam isolat bakteri amilolitiknya termasuk Gram positif. Temuan ini lebih lanjut didukung oleh Parmar dan Pandaya (2012) yang memperoleh 18 isolat bakteri amilolitik, 13 isolatnya adalah Gram positif.

Hasil pengujian pada agar darah menunjukkan satu dari tiga isolat yang diujikan ada aktivitas hemolitik terhadap sel-sel darah merah, yaitu pada isolat PKM3, yang ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni (Gambar 2A). Sebaliknya, hasil uji hemolisis pada 2 isolat lainnya, yaitu PKL2 dan CKM2 menunjukkan reaksi negatif dengan tidak terbentuknya zona bening di sekitar koloni pada media agar-agar darah yang artinya isolat tersebut tidak memiliki aktivitas hemolisin terhadap sel darah merah (Gambar 2B dan 2C). Berdasarkan hasil uji hemolisis, dapat diketahui bahwa isolat PKL2 dan CKM2 memiliki aktivitas gamma hemolisis yang ditandai dengan tidak adanya perubahan warna dalam media. Media yang digunakan adalah media agar-agar darah yang merupakan media diferensial dan media ini digunakan

Tabel 1 Hasil pengukuran indeks amilolitik isolat bakteri asal ekoenzim

Kode isolat	Indeks amilolitik
PKM3	1,44
PKL2	1,77
CKM2	1,69

untuk membedakan bakteri berdasarkan kemampuan melisis sel darah merah (Suryanto *et al.* 2007).

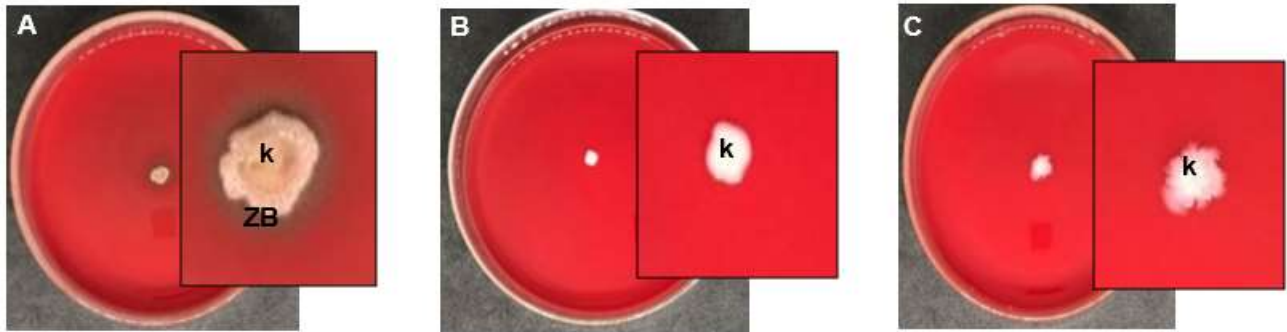
Produksi Optimum Enzim Amilase dari Isolat Bakteri Terpilih

Kurva pertumbuhan sel dan aktivitas amilase optimum diukur menggunakan isolat PKL2 karena memiliki nilai indeks amilolitik tertinggi dari 26 isolat dan tidak berpotensi sebagai patogen. Pengukuran yang dilakukan setiap tiga jam selama 48 jam yang menunjukkan fase eksponensial terjadi pada jam ke-0 hingga jam ke-21, fase stasioner terjadi pada jam ke-21 hingga jam ke-39, sedangkan fase kematian terjadi setelah jam ke-39 (Gambar 3).

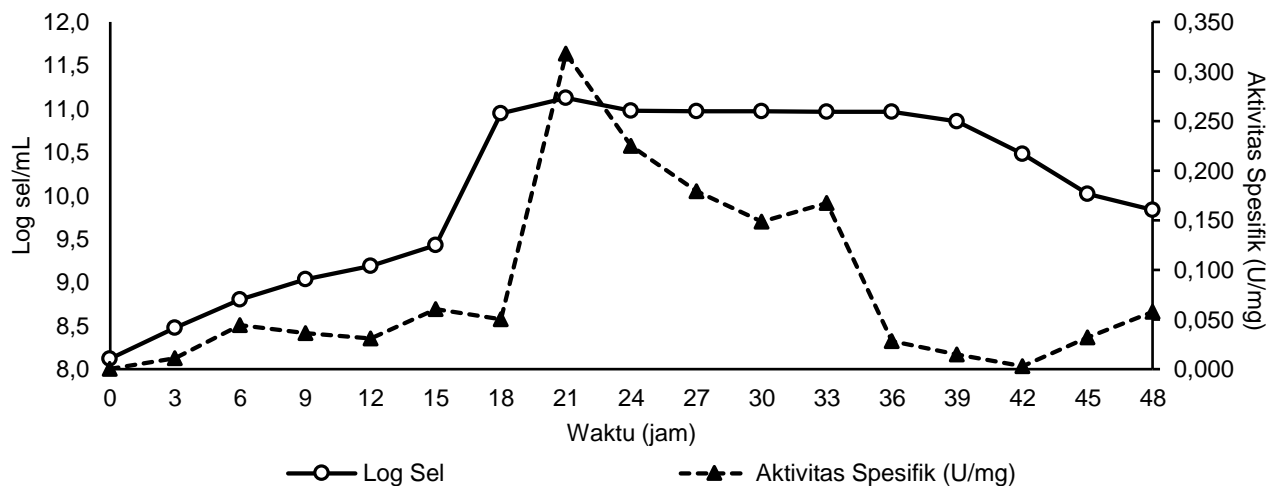
Puncak aktivitas amilase tertinggi terdapat pada jam ke-21 produksi enzim, yaitu pada fase stasioner pertumbuhan bakteri, sebesar 0,318 U/mg. Kurva pertumbuhan dan produksi enzim, mencapai maksimum pada saat sel mengalami fase stasioner (Fossi *et al.* 2014). Hal ini didukung oleh Abate *et al.* (1999) yang melaporkan bahwa produksi amilase oleh *Bacillus amyloliquefaciens* dimulai pada awal fase pertumbuhan eksponensial mencapai tingkat maksimum setelah 24 jam dan setelah itu, tingkat amilase menurun drastis mungkin karena akumulasi aktivitas protease yang tinggi seiring dengan proses sporulasi pada akhir fase pertumbuhan eksponensial.

Pengendapan Enzim dengan Ammonium Sulfat

Presipitasi amonium sulfat banyak digunakan untuk pemurnian enzim yang dihasilkan oleh bakteri dengan menghilangkan senyawa dan protein lain yang dapat mengganggu aktivitas enzim. Aktivitas spesifik endapan enzim fraksi amonium sulfat dari isolat PKL2 diketahui meningkat 1.824 kali dari aktivitas spesifik supernatan dan perolehan (*yield*) endapan sebesar 31,17% (Tabel 2). Aktivitas spesifik endapan enzim terukur sebesar 3,97 U/mg pada tingkat kejenuhan amonium sulfat 60%



Gambar 2 Aktivitas hemolisin (A) PKM3; (B) PKL2; (C) CKM2 pada agar-agar darah yang ditandai dengan adanya zona bening (zb) di sekitar koloni (k) bakteri setelah waktu inkubasi 48 jam inkubasi pada suhu 30°C.



Gambar 3 Kurva pertumbuhan dan produktivitas enzim amilase isolat bakteri PKL2.

Tabel 2 Aktivitas spesifik enzim amilase setelah pengendapan dengan Ammonium Sulfat

Tahap pemurnian (%)	Total protein (mg)	Aktivitas total (unit)	Aktivitas spesifik (U/mg)	Tingkat kemurnian (kali)	Perolehan (%)
EEK	14,552	31,747	2,182	1	100
20	1,744	2,524	1,447	0,663	7,949
40	1,782	4,259	2,391	1,096	13,417
60	2,488	9,897	3,979	1,824	31,175
80	1,284	1,671	1,301	0,596	5,263

(b/v), yang meningkat dibandingkan aktivitas spesifik dari supernatant sebesar 31,175% (Tabel 2). Berdasarkan hasil pengukuran menunjukkan isolat PKL2 mengalami peningkatan aktivitas unit maupun aktivitas spesifik yang optimum pada pengendapan 60% (Tabel 2). Hal ini sesuai dengan laporan sebelumnya yang menjelaskan saturasi yang tepat dari presipitasi amonium sulfat dalam pemurnian amilase berada pada kisaran 40–60% (Singh *et al.* 2014). Akan tetapi, ternyata nilai aktivitas isolate PKL2 ini masih tergolong rendah jika dibandingkan dengan aktivitas spesifik amilase yang dihasilkan *Streptomyces sp.*, yakni sebesar 254651.2 U mg⁻¹ (Singh *et al.* 2014).

Kondisi Optimum Aktivitas Amilase Isolat PKL2

Faktor pH dan suhu inkubasi dapat menentukan aktivitas suatu enzim. Hasil pengukuran aktivitas optimum ekstrak kasar amilase dan hasil pengendapan

dari isolat PKL2 sama-sama optimum pada suhu 50°C, yaitu dengan aktivitas unit masing-masing sebesar 0,192 U/mL dan 1,109 U/mL (Gambar 4A). Pengujian suhu dilakukan pada pH 7. Aktivitas optimum terhadap suhu yang diperoleh kemudian digunakan sebagai dasar untuk suhu inkubasi pada karakterisasi pH isolat. Beberapa spesies *Bacillus*, seperti *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, dan *B. amiloliquefaciens* mampu memproduksi amilase dengan kisaran suhu yang lebih luas, yaitu 37–60°C (Sivaramakrishnan *et al.* 2006). Nusrat dan Rahman (2007) juga telah melaporkan untuk pertumbuhan optimum dan produksi amilase pada bakteri berkisar pada suhu 35–80°C.

Di antara parameter fisik, pH media pertumbuhan memainkan peran penting dalam sekresi enzim. Kisaran pH yang diamati selama pertumbuhan mikroba juga memengaruhi stabilitas produksi. Amilase isolat

PKL2 optimum pada pH 7 dengan aktivitas unit enzim ekstrak kasar sebesar 0,317 U/mL dan setelah pengendapan sebesar 1,112 U/mL. Penelitian sebelumnya mengungkapkan kisaran pH optimum untuk pertumbuhan bakteri dan produksi enzim antara 6,0 dan 7,0 (Gupta *et al.* 2003). Hal ini sejalan dengan penelitian Nusrat dan Rahman (2007) yang melaporkan bahwa, produksi amilase oleh *Bacillus amyloliquefaciens* secara maksimum terjadi pada pH 7,0.

Identitas Isolat Bakteri Terpilih

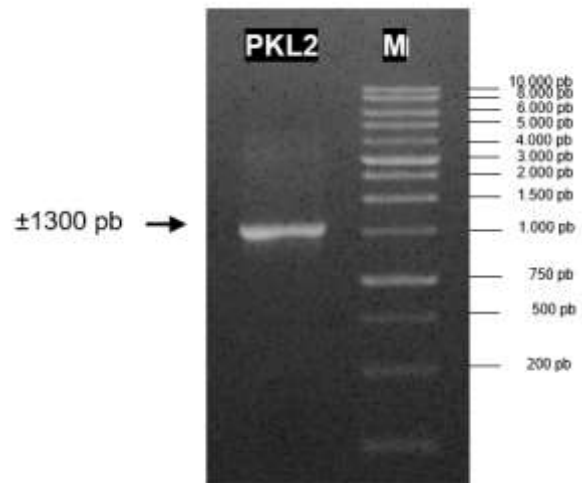
Identifikasi 16rRNA dilakukan pada satu isolat yang memiliki aktivitas amilolitik tertinggi. Proses identifikasi 16S rRNA diawali dengan ekstraksi DNA, kemudian dilanjutkan dengan amplifikasi. Hasil amplifikasi berhasil dilakukan dengan diperolehnya fragmen DNA target yang berukuran ± 1300 pb pada gel agarose menggunakan elektroforesis (Gambar 5). Setelah itu, DNA hasil amplifikasi dipurifikasi untuk menghilangkan kelebihan primer dan nukleotida yang selanjutnya akan disekuensing dan dilakukan analisis kontig untuk diperoleh sekuens komplement antara primer forward dan reverse. Selanjutnya, isolat PKL2 diidentifikasi dengan analisis homologi sekuens menggunakan BLAST (Tabel 3) dan konstruksi pohon filogenetik berdasarkan sekuens gen 16S rRNA dari data bank gen.

Hasil BLAST (Tabel 3) menunjukkan bahwa isolat PKL2 memiliki kemiripan dengan *Bacillus amyloliquefaciens*. *Barcoding* bakteri jika menggunakan marka 16S rRNA maka dikatakan identical (*similar*) pada level spesies jika nilai “*percentage identity*” nya di atas 97,5%, dan pada level genus jika nilai “*percentage identity*” nya di atas 95% dengan panjang nukleotida 1.381 pb (Stackebrandt dan Goebel 1994). Berdasarkan hubungan pohon kekerabatan (Gambar 6) diketahui bahwa isolat PKL2 lebih cenderung berkerabat dengan spesies *Bacillus amyloliquefaciens*. Beberapa bakteri seperti *Bacillus amyloliquefaciens* (Uygut 2018) dan *Bacillus*

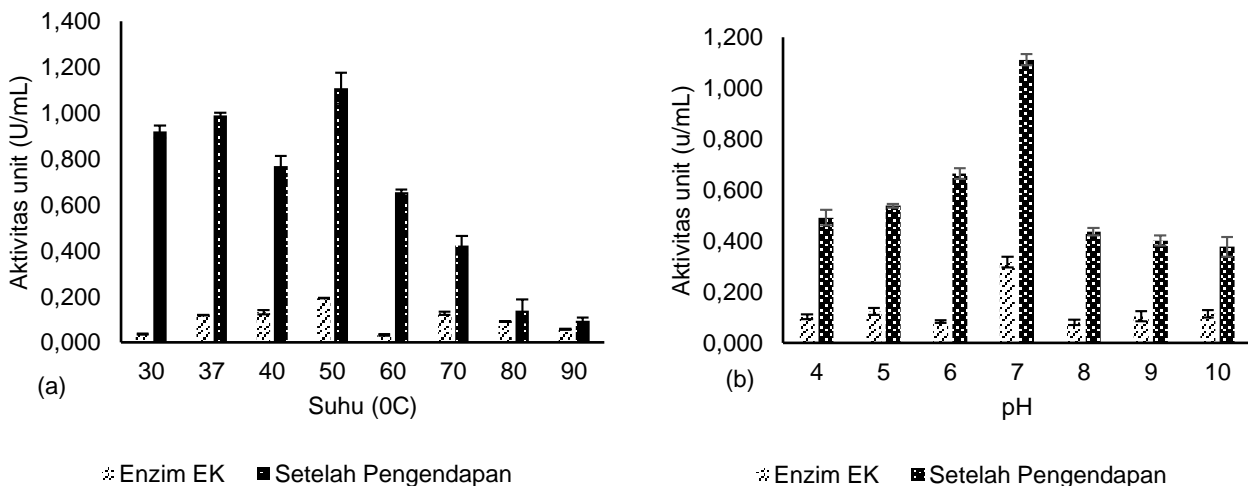
licheniformis (Baltaci *et al.* 2020) telah terbukti mampu menghasilkan amilase dalam jumlah tinggi untuk aplikasi industri. Spesies *Bacillus amyloliquefaciens* dapat ditemukan di berbagai sumber seperti tanah, tumbuhan, kotoran hewan, dan lingkungan perairan. Strain bakteri yang termasuk dalam spesies *Bacillus amyloliquefaciens* dapat menghasilkan berbagai enzim penting, antara lain amilase, protease, lipase, selulase, xilanase, pektinase, dan lakase (Ngalimat *et al.* 2021).

KESIMPULAN

Isolat PKL2 menunjukkan aktivitas amilase yang berhasil ditapis dari 26 isolat bakteri asal ekoenzim dengan nilai Indeks Amilolitik terbesar, yaitu 1,77. Isolat ini tidak dapat melisis sel darah merah. Aktivitas amilase PKL2 optimum pada suhu 50°C dan pH 7,0. Pengendapan dengan 60% ammonium sulfat mampu



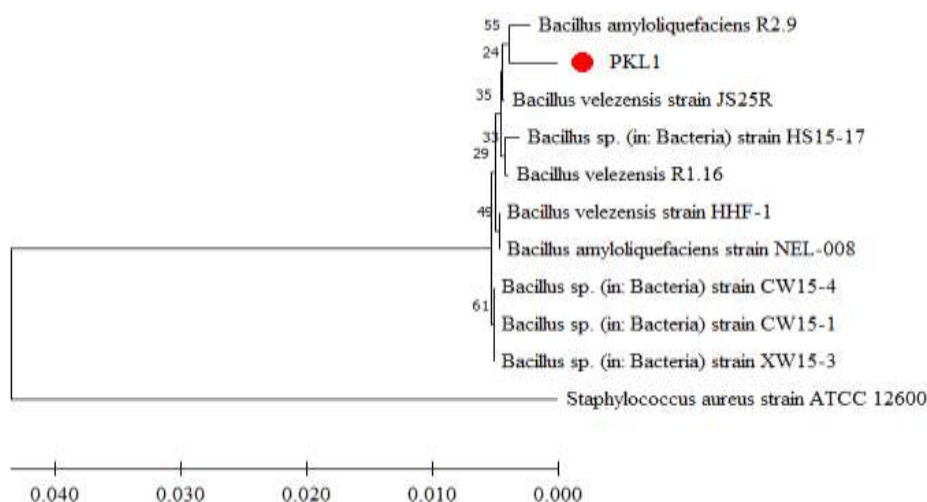
Gambar 5 Elektroforegram hasil amplifikasi sekuens gen 16S rRNA berukuran ± 1300 bp dari isolat bakteri terpilih (PKL2) dengan marker 1 Kb DNA Ladder RTU.



Gambar 4 Karakterisasi ekstrak kasar amilase isolat PKL2 pada (A) suhu dan (B) pH.

Tabel 3 Homologi isolat bakteri terpilih berdasarkan hasil BLASTn pada situs NCBI

Galur bakteri rujukan	Isolat PKL2		No. akses
	Identitas (%)	Query cover (%)	
<i>Bacillus velezensis</i> strain JS25R	99,57	100	MF280167.1
<i>Bacillus velezensis</i> strain HHF-1	99,50	100	MG757677.1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain NEL-008	99,50	100	OK147921.1
<i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain CW15-4	99,43	100	MH769261.1
<i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain CW15-3	99,43	100	MH769260.1
<i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain CW15-1	99,43	100	MH769258.1
<i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain XW15-3	99,43	100	MH769239.1
<i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain HS15-17	99,43	100	MH769165.1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> R2.9	99,43	100	LC414181.1
<i>Bacillus velezensis</i> R1.16	99,43	100	LC414171.1



Gambar 6 Konstruksi pohon filogenetik sekuens gen 16S rRNA dari isolat bakteri terpilih PKL2, menggunakan metode *Neighbour Joining* (NJ) dengan *bootstrap* 1000 kali.

meningkatkan aktivitas amilase hingga 1,82 kali dari enzim ekstrak kasarnya. Berdasarkan hasil identifikasi spesies menggunakan marka gen 16S rRNA menunjukkan bahwa isolat PKL2 memiliki kemiripan dengan spesies *Bacillus amyloliquefaciens*.

decaying potatoes and sweet potatoes. *BioResources*. 13(3): 4931–4945. <https://doi.org/10.15376/biores.13.3.4931-4945>

DAFTAR PUSTAKA

Abate CM, Castro NGR, Sineriz F, Callieri DAS. 1999. Production of amylolytic enzymes by *Bacillus amyloliquefaciens* in pure culture and in co-culture with *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol Lett*. 21(3): 249–252. <https://doi.org/10.1023/A:1005477505683>

Alves KJ, Silva MCP, Cotta SR, Ottoni JR, Elsas JD, Oliveira VM, Andreote FD. 2020. Mangrove soil as a source for novel xylanase and amylase as determined by cultivation-dependent and cultivation-independent methods. *Braz J Microbiol*. 51: 217–228. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00162-7>

Ashraf MA, Arshad MI, Rahman S, Khan A. 2018. Characterization of moderately thermostable α -amylase-producing *Bacillus licheniformis* from

Baltaci MO, Orak T, Taskin M, Adiguzel A, Ozkan H. 2020. Enhancement of amylase and lipase production from *Bacillus licheniformis* 016 using waste chicken feathers as peptone source. *Waste Biomass Valor*. 11: 1809–1819. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0468-6>

Bernfeld P. 1995. Amylases α - dan β -. Di dalam : Coloowick SP dan Kaplan No. (Eds). *Methods In Enzymology*. New York (US): Academic Press. Pp: 149–150.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72(1–2): 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Dennison C. 2002. *A guide to protein isolation*. New York (US): Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1007/0-306-46868-9>

Fossi BT, Tavea F, dan Ndjouenkeu R. 1995. Production and partial characterization of a

- thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. *African J. of Biotechnology*. 4(1):14-18.
- Gupta A, Rajeela K, Gopal M, Hegde V, Thomas G. 2018. Evaluation of combinatorial capacity of coconut and cocoa plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) with biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Curr Investig Agric Curr Res*. 3(4): 404–409. <https://doi.org/10.32474/CIACR.2018.03.000168>
- Jamilah I, Meryandini A, Rusmana I, Suwanto A, Mubarik NR. 2009. Activity of proteolytic and amylolytic enzymes from *Bacillus* spp. isolated from shrimp ponds. *Microbiol. Indones*. 3: 67–71. <https://doi.org/10.5454/mi.3.2.4>
- Kerker SS dan Salvi SS. 2020. Application of eco-enzyme for domestic waste water treatment. *International Journal for Research in Engineering Application & Management (IJREAM)*. 5(11): 2454–9150
- Kumar P dan Shree RP. 2016. Isolation and characterization of halophilic amylolytic bacteria. *J. Microbiol. Biotech. Res*. 6(4): 7–13.
- Kurniasih H, Mubarik NR, dan Meryandini A. 2012. Isolasi bakteri amilolitik dan karakterisasi enzim amilase asal tanah Pulau Gili Meno Nusa Tenggara Barat. [Tesis]. Bogor (ID): IPB University.
- Mamulak YI. 2018. Isolasi dan karakteristik bakteri amilolitik dari limbah rumah tangga di Kelurahan Merdeka Kupang. In: *Proceedings of Seminar Nasional Biologi Tropika 2018*, Yogyakarta (ID): 29th June 2018.
- Ngalimat MS, Yahaya RSR, Baharudin MMA, Yaminudin SM, Karim M, Ahmad SA, dan Sabri S. 2021. A Review on the biotechnological applications of the operational group *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microorganisms*. 9: 614. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030614>
- Nurhayati T, Nugraha R, dan Lihuana DN. 2020. Karakterisasi fraksi amonium sulfat tripsin yang diisolasi dari usus ikan tongkol (*Euthynnus affinis*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 23(2): 372–382. <https://doi.org/10.17844/jphpi.v23i2.32221>
- Nurmalinda A, Periadnadi, Nurmiati. 2013. Isolasi dan karakterisasi parsial bakteri indigenous pemfermentasi dari buah durian (*Durio zibethinus Murr.*). *J. Bio. UA*. 2(1): 8–13.
- Nusrat A, Rehman SR. 2007. Partial characterization of extracellular α -Amylase from three *Bacillus* isolates. *Bangladesh Journal of Microbiology*. 25(1): 76–78. <https://doi.org/10.3329/bjm.v25i1.4864>
- Parmar D dan Pandya A. 2012. Characterization of amylase producing bacterial isolates. *Bull. Environ. Pharmacol. Life Sci*. 1(6): 42–47.
- Reddy NS, Nimmagadda A, Rao K. 2003. An overview of the microbial α -amylase family. *African Journal of Biotechnology*. 2(12): 645–648. <https://doi.org/10.5897/AJB2003.000-1119>
- Saputro MNB. 2008. Karakterisasi α -amilase dan glukamilase dari bakteri proteolitik asal pencernaan ikan nila GIFT. [Skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Singh R, Kumar V, dan Kapoor V. 2014. Partial purification and characterization of a heat stable α -amylase from a thermophilic actinobacteria, *Streptomyces* sp. MSC702. *Enzyme Research*. 6: 106363. <https://doi.org/10.1155/2014/106363>
- Sivaramkrishnan SD, Gangadharan KD, Nampoothiri CR, Sossol, Pandey A. 2006. α -Amylase from microbial sources: An overview on recent developments. *Food. Technology Biotechnology*. 44(2): 173–184.
- Sundari AS, Purwani NNP, Kurniati A. 2019. Isolasi dan penentuan indeks amilolitik bakteri dari sediment mangrove di Wonorejo, Surabaya. *Jurnal Inovasi Pendidikan Sains*. 10(1): 38–44. <https://doi.org/10.20527/quantum.v10i1.5879>
- Suryanto D, Irmayanti, Lubis, S. 2007. Karakterisasi dan uji kepekaan antibiotik beberapa isolat *Staphylococcus aureus* dari Sumatera Utara. *Majalah Kedokteran Nusantara*. 40(2): 104–107.
- Uygut, MA, Tanyuldizi MS. 2018. Optimization of alpha-amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens* grown on orange peels. *Iran J Sci Technol Trans Sci*. 42: 443–449. <https://doi.org/10.1007/s40995-016-0077-9>
- Vama L dan Cherekar MN. 2020. Production, extraction and uses of eco-enzyme using citrus fruit waste: wealth from waste. *Asian Jr. of Microbiol. Biotech. Env. Sc*. 22(2): 346–351.
- Verma D, Singh AN, Skhula AN. 2019. Use of garbage enzyme for treatment of waste water. *International Journal of Scientific Research and Review*. 7(7): 201–205.