

**AKTIVITAS BAKTERI AMILOLITIK YANG DIISOLASI DARI SUMBER AIR  
PANAS SINGGAHAN, TUBAN**

**ACTIVITY OF AMILOLYTIC BACTERIA ISOLATED FROM HOT SPRING OF  
SINGGAHAN, TUBAN**

**Unique Pratami Putri\* dan Nuniek Herdyastuti**

*Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences  
State University of Surabaya*

Jl. Ketintang Surabaya (60231), Telp. 031-8298761

\*Corresponding author, email: [unique.putri@gmail.com](mailto:unique.putri@gmail.com)

**Abstrak.** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas ekstrak kasar amilase dan mengetahui spesies isolat aktivitas amilase tertinggi yang telah diisolasi dari Sumber Air Panas Singgahan, Tuban. Berdasarkan penelitian sebelumnya, diperoleh 51 isolat yang telah positif menghasilkan amilase ditunjukkan dengan clear zone. Lima puluh satu isolat tersebut diuji aktivitasnya menggunakan metode Miller (1959) dengan reagen 3,5-Dinitrocalycylic acid (DNS). Diperoleh hasil isolat ST-21 memiliki aktivitas amilase tertinggi yaitu sebesar 1,4413 U/mL. Berdasarkan uji morfologi dan fisiologi isolat ST-21 menunjukkan spesies *Bacillus amylofaciens*.

**Kata kunci:** bakteri amilolitik termofilik, pati, aktivitas amilase

**Abstract.** This research aims to find out amylase crude extract activity and find out species of isolates that have highest activity isolated from hot spring Singgahan, Tuban. Building on last research, obtained 51 isolates that positive produced amylase based on clear zone. One and fifty isolates tested their activity used Miller metode (1959) with 3,5-Dinitrocalycylic acid (DNS) reagent. Obtained that isolate ST-21 that have the highest amylase activity is 1,4413 U/mL. Based on morphology and physiology ST-21 isolate shown species *Bacillus amylofaciens*.

**Keywords:** amylolytic thermophilic bacteria, starch, amylase activity

## PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara agraris yang kaya akan sumber daya alam karbohidrat, terutama pati. Pati adalah polimer karbohidrat dengan rumus molekul  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . Penggunaan pati dalam bahan baku industri baik pada industri pangan maupun non pangan sangat nyata, misalnya industri sirup glukosa, sirup fruktosa, amilodekstrin, dan alkohol. Enzim merupakan molekul biopolimer protein yang tersusun dari serangkaian asam amino dalam komposisi dan susunan rantai yang teratur dan tetap. Enzim berfungsi sebagai katalisator dalam reaksi biokimia dan bersifat spesifik terhadap substrat, sehingga mempermudah proses pemutusan suatu rantai kompleks tertentu. Enzim meningkatkan kecepatan reaksi dan spesifik untuk reaksi yang dikatalisnya, artinya satu macam

enzim hanya dapat bekerja pada satu macam senyawa atau reaksi kimia [1].

Enzim yang digunakan dalam proses biokonversi pati menjadi produk-produk industri adalah enzim amilase. Enzim amilase merupakan salah satu enzim yang mampu mengkatalisis hidrolisis ikatan glikosida pada amilum. Amilase dapat digunakan untuk mengkonversi bahan-bahan berpati menjadi monomernya yaitu glukosa, maltosa, dan dekstrin [2]. Proses di industri membutuhkan kondisi khusus seperti suhu tinggi, tahan terhadap denaturasi dan proteolisis yang dapat menyebabkan enzim terdenaturasi dan aktivitasnya menurun. Oleh sebab itu, enzim amilase termotabil dapat dinilai lebih komersial dan lebih dibutuhkan dalam dunia industri [3].

Sumber air panas merupakan salah satu lingkungan tempat kehidupan bagi beberapa organisme yang tahan terhadap suhu air yang panas tersebut, seperti bakteri, fungi, ataupun alga yang bersifat termofilik [4]. Dari survei yang telah dilakukan di lokasi sumber air panas Singgahan, Tuban terdapat sumber air panas dengan suhu 50-55 °C dan pH netral yaitu pH 7. Sumber air panas Singgahan, Tuban ditampung langsung dalam sebuah bak semen kecil, terdapat sedikit kotoran berwarna putih dan bau belerang yang menyengat pada air panas tersebut.

Dari penelitian sebelumnya yang melakukan isolasi dan screening dari sampel air panas sumber air panas Singgahan Tuban tersebut, diperoleh 51 isolat yang positif menghasilkan enzim amilase berdasarkan *clear zone*. Isolat-isolat tersebut kemudian dilakukan uji aktivitas oleh peneliti untuk dapat mengetahui aktivitas dari enzim yang dihasilkan bakteri dari sampel tersebut agar untuk kedepannya dapat dijadikan sumber referensi dalam eksplorasi sumber-sumber daya alam yang berpotensi menghasilkan enzim amilase termostabil.

Beberapa peneliti telah berhasil menentukan aktivitas dan mengidentifikasi beberapa jenis bakteri amilolitik termofilik dari sumber air panas, salah satunya adalah Resmi (2011) yang berhasil mengisolasi bakteri amilolitik termofilik dari sumber air panas Cangar, Batu di daerah Malang. Suhu inkubasi yang digunakan adalah 55 °C, sedangkan aktivitas ekstrak kasar amilase termostabil tersebut adalah 2,175 Unit/mL yang merupakan bakteri *Bacillus alvei* [2]. Selain itu, Sutiamiharja (2008) juga berhasil mengisolasi bakteri amilolitik termofilik dari Sumber Air Panas Gurukinyan Karo Sumatera Utara yang memiliki kemiripan dengan *Bacillus amyloliquens*, kemiripannya terletak pada aktivitas optimum amilase pada pH 7 yang dihasilkan bakteri isolat GK 4 dan GK 14 dengan aktivitas enzim masing-masing 0,154 (U/mL)/menit dan 0,145 (U/mL)/menit [1].

Pada penelitian ini, dilakukan uji aktivitas ekstrak kasar amilase dan identifikasi isolat yang memiliki aktivitas amilase tertinggi.

## METODE PENELITIAN

### Alat

Peralatan yang digunakan adalah peralatan gelas yang umum digunakan, pipet volum, karet penghisap, mikropipet, aluminium foil, plastik wrap, kantong plastik, botol semprot, termometer, neraca analitik, kompor listrik, kawat ose, inkubator, shaker, mikroskop, *laminar flow*, *autoclave*, (Hirayama), sentrifus, spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu 1800), dan *magnetic stirrer*.

### Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam yaitu 51 isolat dari sumber air panas Singgahan-Tuban, *bacto* agar, pati,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , buffer fosfat pH 6.5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , D- glukosa, 3,5-Dinitrosalicic acid (DNS), NaOH, *Sodium Potassium tartarate*, aquades.

## PROSEDUR PENELITIAN

### Penentuan Aktivitas Enzim Amilase

Aktivitas enzim ditentukan berdasarkan jumlah gula reduksi yang dilepaskan dan diukur secara kolorimetri dengan Metode Miller (1959). Sebanyak 1 mL ekstrak amilase kasar hasil sentrifugasi dimasukkan dalam tabung uji, lalu ditambahkan 1% larutan pati yang sudah dilarutkan dalam bufer fosfat pH 6.5. Diinkubasi pada suhu  $\pm 50$  °C selama 20 menit. Selanjutnya ditambahkan 2 mL reagen DNS dan dipanaskan pada suhu 100 °C selama 5 menit. Selanjutnya didinginkan segera dalam es selama 15 menit untuk menginaktivasi enzim. Lalu ditentukan serapan cahaya dengan spektrofotometer pada  $\lambda = 471$  nm. Selanjutnya absorbansi di konversi ke dalam kurva standar glukosa [5].

### Penentuan Spesies Bakteri yang Memiliki Aktivitas Amilase

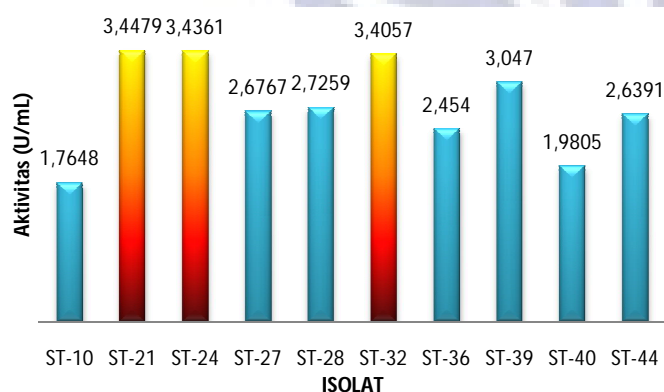
Penentuan spesies bakteri yang memiliki aktivitas amilase tertinggi dilakukan dengan uji morfologi dan fisiologi (biokimia). Untuk uji morfologi salah satunya adalah pewarnaan gram. Bakteri diambil 1 ose dan dioleskan di atas preparat. Sebanyak 3 mL larutan kristal violet (3 g dalam 100 mL alkohol dan 900 mL aquades) diteteskan di atas preparat dan didiamkan selama 2 menit. Bakteri yang sudah ditetesi kristal violet selanjutnya ditetesi lugol di

atasnya, dilanjutkan dengan alkohol sebanyak 3 mL, lalu preparat dibasuh dengan aquades. Sebanyak 3 mL safranin diteteskan di atas preparat dan didiamkan selama 1 menit. Lalu preparat dicuci kembali dengan aquades dan diletakkan dalam posisi miring untuk mempercepat pengeringan. Setelah preparat kering, dilakukan pengamatan di bawah mikroskop [6]. Untuk uji fisiologi (biokimia) dilakukan secara *rapid test*, yaitu menggunakan *kit microbact 12A dan 12B*.

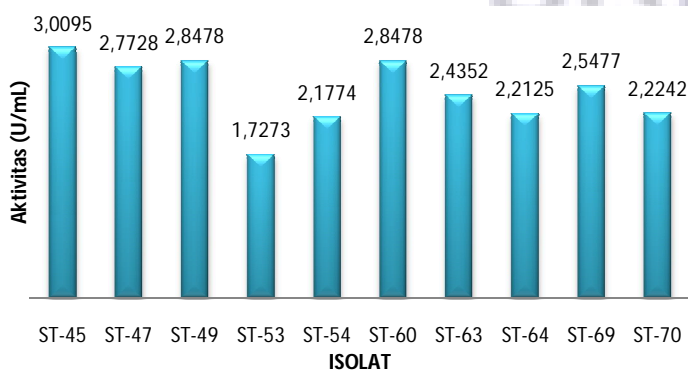
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Penentuan Aktivitas Amilase

Lima puluh satu isolat yang positif menghasilkan amilase berdasarkan penelitian sebelumnya diuji aktivitasnya menggunakan metode Miller (1959) dengan reagen DNS [7]. Aktivitas 51 isolat sangat beragam, yaitu antara 0,3466 – 3,4479 U/mL. Nilai aktivitas beberapa sampel ditunjukkan dalam Gambar 1 – 3.



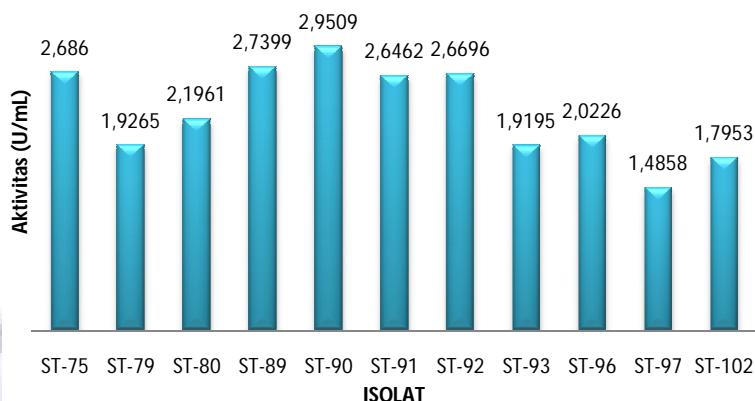
Gambar 1. Grafik Nilai Aktivitas Amilase 10 Isolat



Gambar 2. Grafik Nilai Aktivitas Amilase 10 Isolat

Gambar 1 dan 2 menunjukkan nilai aktivitas 20 isolat. Berdasarkan dua gambar tersebut,

diperoleh tiga isolat yang memiliki aktivitas amilase tertinggi. Gambar 3 juga mendukung hal tersebut.



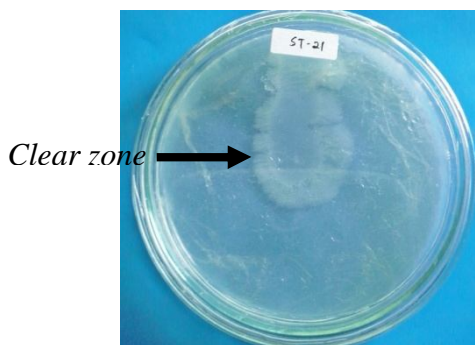
Gambar 3. Grafik Nilai Aktivitas Amilase 11 Isolat

Didapatkan tiga isolat yang mempunyai nilai aktivitas yang hampir sama. Oleh karena itu, dilakukan uji aktivitas kembali untuk mengetahui isolat yang memiliki aktivitas amilase tertinggi seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Amilase Tiga Isolat

No.	Nama Isolat	Aktivitas (U/mL)
1.	ST-21	1,4413
2.	ST-24	1,0686
3.	ST-32	1,2725

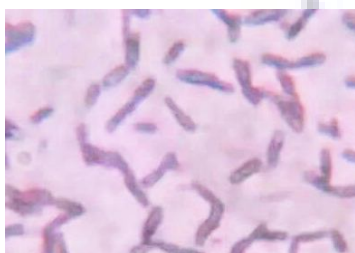
Berdasarkan Tabel 1 aktivitas tertinggi amilase ditunjukkan oleh isolat ST-21 yaitu 1,4413U/ml. Hal tersebut menunjukkan bahwa dalam ekstrak kasar enzim dari isolat ST-21 mengandung enzim amilase yang tinggi. Bakteri amilolitik menghasilkan enzim amilase untuk mendegradasi pati menjadi glukosa sebagai nutrisinya [5]. Sehingga, diketahui bahwa kemampuan isolat ST-21 dalam mendegradasi pati menjadi glukosa besar karena dapat menghasilkan enzim amilase yang banyak. Glukosa yang dihasilkan dari proses degradasi oleh enzim amilase akan bereaksi dengan DNS dan akan terdeteksi pada spektrofotometer UV-Vis. Hasil uji *clear zone* memperjelas bahwa memang ada aktivitas amilase dari isolat ST-21.



**Gambar 4.** Hasil Uji Clear Zone Isolat ST-21

### Penentuan Spesies Isolat ST-21 berdasarkan Uji Morfologi dan Fisiologi

Berdasarkan pengamatan spesimen, isolat ST-21 berbentuk *irregular* (tidak beraturan) dengan tepian bergerigi (*filamentous*), memiliki ketinggian koloni *raised* (naik atau terangkat), dan berwarna krem transparan. Dari hasil pewarnaan Gram, didapatkan hasil bahwa isolat ST-21 berbentuk batang dan merupakan bakteri genus *Bacillus*. Warna ungu pada sel bakteri seperti yang ditunjukkan dalam Gambar 4.10 menandakan bahwa isolat ST-21 merupakan bakteri Gram positif karena pada saat penambahan alkohol, dinding sel bakteri mengalami dehidrasi, pori-pori menciut, sehingga mengakibatkan daya rembes dinding sel dan membran menurun. Kompleks UK-Y (Ungu Kristal-Iodium) dalam sel yang masuk di awal tidak dapat ke luar dari sel dan sel tetap berwarna ungu [8].



**Gambar 5.** Hasil Pewarnaan Gram Isolat ST-21

Berdasarkan hasil uji morfologi tersebut dan fisiologi (biokimia) dengan *kit microbact 12A dan 12B* diduga bahwa isolat ST-21 adalah bakteri *Bacillus amylofilaciens*.

## PENUTUP

### Simpulan

Aktivitas ekstrak kasar amilase dari 51 isolat berkisar antara 0,3466 – 3,4479U/mL. Dari 51 isolat tersebut didapatkan 3 isolat dengan aktivitas tertinggi yaitu isolat ST-21, ST-24, dan ST-32, dan setelah dilakukan uji aktivitas kembali diperoleh hasil isolat ST-21 memiliki aktivitas tertinggi yaitu sebesar 1,4413U/mL, dan berdasarkan uji fisiologi dan morfologi menunjukkan bahwa isolat ST-21 merupakan *Bacillus amylofilaciens*.

### Saran

Perlu dikaji lebih lanjut tentang kondisi optimum aktivitas amilase dan identifikasi bakteri menggunakan analisis secara genetik dengan menggunakan 16S rRNA.

### UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih yang tak terhingga kepada Dr. Aline Puspita Kusumadaja, M.Si dengan begitu banyak jasa yang diberikan dalam penyelesaian tulisan ini.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Sutiamiharja, Nurhalijah. 2008. Tesis: *Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Amilase Kasar Termofilik dari Sumber Air Panas Gurukinayan Karo Sumatera Utara*. Sekolah Pasca Sarjana: Universitas Sumatera Utara
2. Resmi, Syarifah Citra. 2011. Skripsi: *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Termofilik Penghasil Amilase Termotabil dari Sumber Air Panas Cangar-Batu*. Jurusan Kimia Fakultas MIPA: Universitas Negeri Malang
3. Raharjo, Sapto, dkk. 2012. *Isolasi Enzim  $\alpha$ -Amilase Termotabil dari Hasil Skrining Bakteri Termofilik di Sumber Air Panas Sonai Sulawesi Tenggara*. Kendari: Universitas Haluoleo
4. Hastuti, Wira, dkk. 2012. Penapisan dan Karakterisasi Bakteri Amilo-Termofilik dari Sumber Air Panas Semurup, Kerinci, Jambi. *Jurnal Biologi*. Laboratorium Riset Mikrobiologi Jurusan Biologi: Universitas Andalas
5. Sianturi, Dessy Christina. 2008. Tesis: *Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Amilase Termofil*

*Kasar dari Sumber Air Panas Penen Sibirubiru Sumatera Utara. Sekolah Pasca Sarjana: Universitas Sumatera Utara*

6. Kusumadjaja, Aline Puspita, *et al.* 2009. *Screening Mikroorganisme Termofilik Penghasil Enzim Fitase yang Tumbuh Di Kawah Ijen Banyuwangi. Indonesian Journal of Chemistry: 500 – 504*
7. Lehninger, Alberth L.1994. *Dasar-Dasar Biokimia Jilid 1*. Diterjemahkan oleh: Maggy Thenawidjaja. Jakarta: Erlangga
8. Pelczar, Michael J. dan Chan, E.C.S. 2008. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Diterjemahkan oleh: Ratna Siri Hadioetomo, dkk. Jakarta: UI Press.

