

Pengaruh Suhu terhadap Produksi Amilase dari Bakteri sebagai Bahan Praktikum di Laboratorium Teknologi Rekayasa Pangan

Effect of Temperature on Amylase Production from Bacteria as Learning Materials in the Food Engineering Technology Laboratory

Wahyu Setyaji Dwiantara^{1*}, Widya Rahmawati¹

¹ Jurusan Teknologi Pertanian, Politeknik Negeri Jember

* wahyu.sd@polije.ac.id

ABSTRAK

Beberapa praktikum di Program Studi Teknologi Rekayasa Pangan memerlukan enzim sebagai bahannya. Selama ini, praktikum enzim dilakukan menggunakan nanas untuk enzim bromelin dan kentang untuk enzim katalase. Penelitian ini dilakukan untuk memperbanyak jenis enzim yang digunakan untuk praktikum. Enzim yang ingin dicari adalah enzim amilase. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh suhu inkubasi bakteri terhadap aktivitas amilase yang dihasilkan. Dengan adanya penelitian ini, diharapkan dapat memenuhi kebutuhan bahan praktikum. Tiga isolat yang diuji yaitu A3-04, A3-02 dan G1-01 menunjukkan ketiganya memiliki aktivitas amilase. Zona bening yang dimiliki A3-04 terlihat memiliki ukuran yang paling besar dibandingkan dengan A3-02 dan G1-01, hal ini diduga A3-04 memiliki aktivitas amilase paling tinggi. Isolasi dilakukan dengan metode sebar pada media *nutrient agar* (NA), kemudian koloni tunggal yang tumbuh ditumbuhkan kembali dengan metode gores. Pewarnaan gram dilakukan pada kultur murni yang didapatkan. Kemudian, isolat yang berbentuk batang dan gram positif dilakukan pengamatan morfologi koloni di NA miring, uji katalase dan hidrolisis pati serta diidentifikasi secara molekuler. Hasilnya, hanya isolat D4-02 yang berbentuk batang dan gram positif. Isolat tersebut berasal dari sampel tanah. Kemampuan dalam hidrolisis pati dan penguraian hidrogen peroksida dimiliki oleh D4-02. Hasil identifikasi secara molekuler menunjukkan bahwa D4-02 memiliki kesamaan dengan *Priestia megaterium* NBRC 15308 dengan presentase kemiripan sebesar 99,93%. Isolat ini dapat digunakan untuk kegiatan praktikum di Laboratorium seperti saat melakukan pengamatan morfologi mikroskopis mikroba sebagai contoh bakteri gram positif berbentuk batang.

Kata kunci — *Bacillaceae*, *Priestia megaterium*, tanah, susu

ABSTRACT

Microorganisms or microbes are needed to be studied in the Food Engineering Technology Study Program. For example, how to control harmful microbes. Not only that, but also the uses of beneficial microbes, especially in food, can also be explored. This study aims to obtain *Bacillaceae* bacterial isolates to complete the learning materials in our Laboratory. There were two samples used for isolation, those were soil and milk samples. Isolation was carried out by spread-plate method on nutrient agar (NA), then the single colonies grown were reinoculated by streak method. Gram staining was performed on the pure cultures obtained. After that, rod-shaped and gram-positive isolates were observed for colony morphology in NA slant, catalase test, starch hydrolysis test and molecular identification. As a result, only D4-02 isolate was rod-shaped and gram-positive. The isolate was derived from soil samples. The ability to hydrolyze starch and decompose hydrogen peroxide is owned by D4-02. Molecular identification results show that D4-02 has similarity with *Priestia megaterium* NBRC 15308 with a similarity percentage of 99.93%. This isolate can be used for learning material in the laboratory such as when observing microscopic morphology of microbes as an example of gram-positive rod-shaped bacteria.

Keywords — *Bacillaceae*, *Priestia megaterium*, soil, milk

1. Pendahuluan

Beberapa praktikum di Program Studi Teknologi Rekayasa Pangan memerlukan enzim sebagai bahannya. Selama ini, praktikum enzim dilakukan menggunakan nanas untuk enzim bromelin. Enzim ini termasuk enzim protease. Sebagian besar enzim proteolitik dalam nanas adalah enzim ini (Hikisz & Bernasinska-Slomczewska, 2021). Enzim ini dapat bekerja pada pH 3-8 dan suhu 37-70°C (Hikisz & Bernasinska-Slomczewska, 2021). Selain dari nanas, kentang digunakan sebagai sumber enzim katalase. Menurut Wang et al. (2019), aktivitas katalase dari kentang di suhu 4°C lebih tinggi dari pada di suhu 16°C.

Penelitian ini dilakukan untuk memperbanyak jenis enzim yang digunakan untuk praktikum. Enzim yang ingin dicari adalah enzim amilase. Amilase adalah enzim yang mempunyai kemampuan sebagai katalis dalam proses hidrolisa polimer pati yang dapat memecah ikatan glukosida pada polimer pati untuk menghasilkan molekul lebih sederhana seperti glukosa, maltosa, dan dekstrin (Nangin et al., 2015). Dalam industri pangan, salah satu manfaat enzim amilase adalah dapat membuat roti menjadi lebih tahan lama (Farooq et al. 2021). Pada alat pencuci piring otomatis, enzim ini bermanfaat untuk membersihkan sisa makanan yang mengandung pati seperti puding, kentang dan coklat (Yassin et al., 2021).

Penelitian ini juga masih melanjutkan penelitian sebelumnya. Pada penelitian sebelumnya ditemukan isolat bakteri G1-01 yang memiliki aktivitas hidrolisis pati (Dwiantara & Rahmawati, 2023). Ini juga yang menjadi sebab pada penelitian kali ini enzim yang ingin diperoleh adalah amilase. Manfaat dari produksi enzim dengan bakteri adalah dapat mengurangi biaya produksi (Rajesh & Gummadi, 2022) karena waktu produksi yang lebih cepat, kebutuhan ruangan yang lebih kecil dan kemudahan dalam memodifikasi dibandingkan tanaman dan hewan (Raveendran et al., 2018). Maka dari itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh suhu inkubasi bakteri terhadap aktivitas amilase yang dihasilkan. Dengan adanya penelitian ini, diharapkan dapat memenuhi kebutuhan bahan praktikum.

2. Metodologi

2.1. Penapisan Bakteri Penghasil Amilase

Kemampuan bakteri dalam menghasilkan amilase dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada media yang mengandung agar pati (pH 7,0) (Cappuccino & Welsh, 2019) pada cawan petri. Satu ose penuh kultur bakteri digoreskan pada agar pati membentuk satu garis lurus dan diinkubasi selama 24 jam. Koloni yang tumbuh ditetesi dengan larutan iodine gram dan diamati warna yang muncul. Adanya bakteri penghasil amilase ditandai dengan keberadaan zona bening di sekitar koloni (Dwiantara & Rahmawati, 2023).

2.2. Media Produksi Amilase

Media yang digunakan untuk produksi amilase sama seperti pada penapisan bakteri penghasil amilase tetapi tidak diberi agar. Satu ose penuh kultur bakteri diinokulasikan pada media cair dan diinkubasi selama 24 jam dengan agitasi 180 rpm (Rajesh & Gummadi 2022). Produksi amilase dilakukan dengan memindahkan 250 µl kultur bakteri 24 jam ke dalam 50 media kaldu pati. Sel bakteri dipisahkan dari media dengan sentrifugasi pada kecepatan 7.000 rpm selama 15 menit (Rakaz et al., 2021). Supernatan hasil sentrifugasi digunakan untuk pengukuran aktivitas enzim.

2.3. Penentuan Aktivitas Amilase

Metode *DNS (Dinitrosalicylic acid)* dilakukan untuk menentukan aktivitas amilase. Supernatan sebanyak 0,5 ml ditambahkan larutan penyangga fosfat (pH 6,0) sebanyak 4,5 ml dan pati 1% sebanyak 2 ml dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 30°C (Yassin et al., 2021). Setelah diinkubasi, sebanyak 3 ml larutan diambil kemudian ditambahkan 1 ml larutan asam 2,3-dinitrosalisilat (*DNS*). Larutan diinkubasi selama 10 menit pada air mendidih lalu didinginkan hingga suhu ruang dan tambahkan 1 ml sodium sulfat 0,5% untuk menstabilkan warna. Dilakukan pengukuran absorbansi larutan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Satu unit aktivitas enzim sama dengan jumlah enzim untuk membebaskan satu µmol maltosa per menit. (Jain et al., 2020)



2.4. Pengaruh Suhu dan Waktu Inkubasi

Pengaruh suhu dan waktu inkubasi pada aktivitas amilase ditentukan dengan menumbuhkan kultur bakteri pada suhu 30, 35 dan 40°C. Sampel diambil pada waktu inkubasi 15, 16 dan 17 jam untuk dilakukan pengukuran aktivitas amilase. Selain aktivitas amilase, dilakukan juga pengukuran kepadatan sel bakteri dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm.

2.5. Identifikasi Bakteri

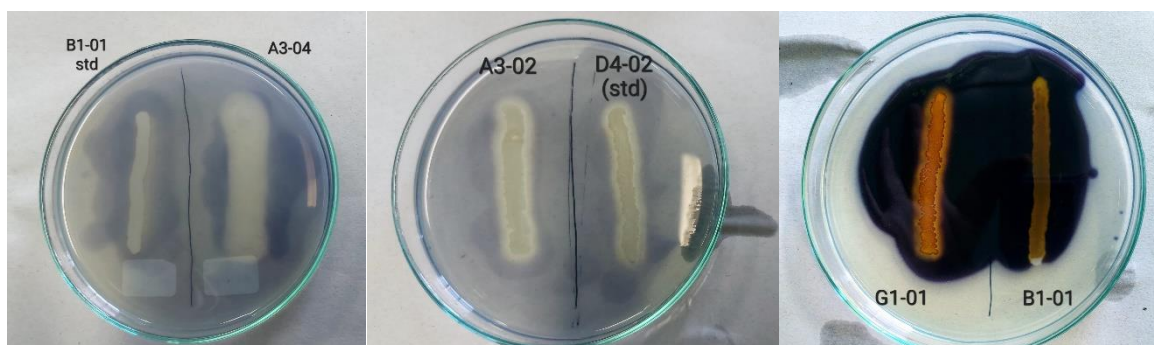
Identifikasi bakteri secara molekuler dilakukan melalui pengurutan *DNA* bakteri (gen 16S *rRNA*) di PT. Genetika Science Indonesia.

3. Pembahasan

Kemampuan bakteri menghidrolis pati dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada cawan petri yang berisi media agar pati. Bakteri

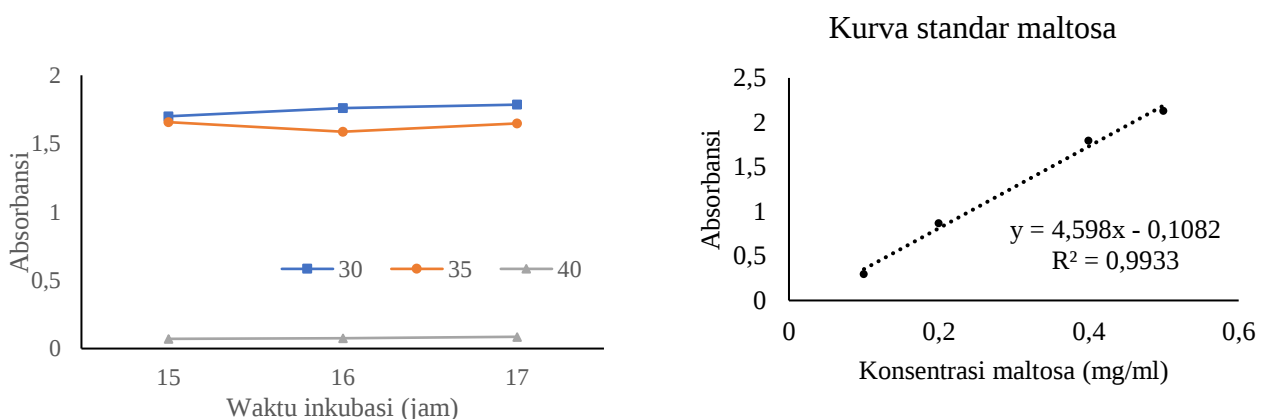
yang mampu menghidrolisis pati diketahui melalui penambahan larutan iodine gram permukaan agar setelah bakteri tersebut tumbuh dan terdapat zona bening disekitar bakteri. Keberadaan pati ditandai dengan warna biru kehitaman sehingga pada daerah yang tidak terjadi hidrolisis pati akan berwarna biru kehitaman (Andrades & Contreras, 2017).

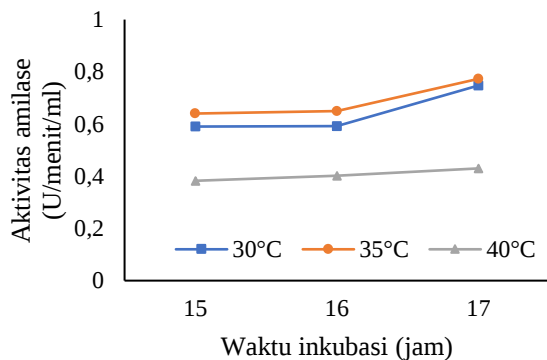
Tiga isolat yang diuji yaitu A3-04, A3-02 dan G1-01 menunjukkan ketiganya memiliki aktivitas amilase. Hal ini terlihat dari zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri. Isolat bakteri A3-04 dan A3-02 diisolasi dari tanah (Dwiantara et al., 2021) sedangkan G1-01 diisolasi dari sampel udara laboratorium (Dwiantara & Rahmawati, 2022). Zona bening yang dimiliki A3-04 terlihat memiliki ukuran yang paling besar dibandingkan dengan A3-02 dan G1-01, hal ini diduga A3-04 memiliki aktivitas amilase paling tinggi (Gambar 1). Oleh karena itu, isolat A3-04 yang digunakan pada pengujian selanjutnya.



* Kontrol negatif: B1-01 (*Pseudocitrobacter faecalis*)
Kontrol positif: D4-02 (*Priestia megaterium*)

Gambar 1. Penapisan Bakteri Penghasil Amilase





Enzim amilase sangat besar kegunaannya dalam berbagai macam industri. Enzim amilase dianggap memenuhi 30% kebutuhan enzim global yang digunakan pada industri makanan, kesehatan, dan industri-industri lain (Ojha et al., 2020). Salah satu mikroba penghasil enzim amilase secara alami adalah bakteri dari genus *Bacillus*. Bakteri *Bacillus* banyak digunakan dan dikembangkan sebagai produsen enzim amilase. Hal ini dikarenakan banyak spesies bakteri dari genus *Bacillus* yang merupakan penghasil enzim amilase, salah satu contohnya bakteri *Bacillus Megaterium* (Istia'nah et al., 2020). Beberapa strain *Bacillus* lain seperti *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis* dan *Bacillus amyloliquefaciens* juga merupakan produsen α -amilase yang efisien untuk berbagai aplikasi (Suriya et al., 2016). Bakteri *Bacillus* dianggap sebagai mikroba yang sesuai untuk produksi enzim komersial karena bakteri ini dapat mempertahankan keadaan aslinya, yaitu keadaan alami yang tidak berubah dan stabil terhadap berbagai rekayasa bioproses, selain itu bakteri ini juga mengeluarkan protein langsung ke media ekstraseluler sehingga memfasilitasi ekstraksi dan pemurnian yang mudah sehingga dapat menghemat waktu proses, biaya dan komplikasi (Ojha et al., 2020).

4. Kesimpulan

Tiga isolat yang diuji yaitu A3-04, A3-02 dan G1-01 menunjukkan ketiganya memiliki aktivitas amilase. Diduga A3-04 memiliki aktivitas amilase paling tinggi.

5. Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini Dibiayai oleh DIPA Politeknik Negeri Jember SP DIPA-023.18.2.677607/2023 30 November 2022. Tahun Anggaran 2023

6. Daftar Pustaka

- [1]. Aiyer, P.V. 2005. Amylases and Their Applications. *African Journal of Biotechnology* 4: 125–135.
- [2]. Andrades, A., & Contreras, L. M. (2017). Amylase Zymography. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1626, 301–308. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7111-4_29
- [3]. Cappuccino, J. G., & Welsh, C. T. (2019). *Microbiology: A Laboratory Manual*. Pearson Education.
- [4]. Dwiantara, W. S., & Rahmawati, W. (2023). Isolasi Bakteri Bacillaceae untuk Memenuhi Kebutuhan Bahan Praktikum di Laboratorium Teknologi Rekayasa Pangan. *Jurnal Pengembangan Potensi Laboratorium*, 2(1), 12-17.
- [5]. Farooq, M. A., Ali, S., Hassan, A., Tahir, H. M., Mumtaz, S., & Mumtaz, S. (2021). Biosynthesis and industrial applications of α -amylase: a review. *Archives of microbiology*, 203(4), 1281–1292. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02128-y>
- [6]. Hii, S.L., Tan, J.S., Ling, T.C., & Ariff, A.B. 2012. Pullulanase: Role in Starch Hydrolysis and Potential Industrial Applications. *Hindawi Publishing Corporation Enzyme Research*. doi:10.1155/2012/921362
- [7]. Hikisz, P., & Bernasinska-Slomczewska, J. (2021). Beneficial Properties of Bromelain. *Nutrients*, 13(12), 4313. <https://doi.org/10.3390/nu13124313>
- [8]. Istia'nah, Dina., Ulfah U., & Ahmad Barizi., 2020. Karakterisasi Enzim Amilase dari Bakteri *Bacillus megaterium* pada Variasi Suhu, pH dan Konsentrasi Substrat. *Jurnal Riset Biologi dan Aplikasinya*, Volume 2, No.1: 11-17
- [9]. Jain, A., Jain, R., & Jain, S. (2020). *Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology: Principles and Techniques*. New York: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9861-6_43



- [10]. Naiola, E. 2008. Mikrobial Amilolitik pada Nira dan Laru dari Pulau Timor, Nusa Tenggara Timur. *Biodiversitas bidang mikrobiologi*, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). 9 (3): 165-168.
- [11]. Nangin, Debora dan Aji Sutrisno. 2015. Enzim Amilase Pemecah Pati Mentah dari Mikorba: Kajian Pustaka. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* 3(3):1032-1039.
- [12]. Puspitaningrum, R. & Adhiyanto, C., (2016). *Enzim dan Pemanfaatannya*. Ghalia Indonesia.
- [13]. Rajesh, R., & Gummadi, S. N. (2022). α -Amylase and cellulase production by novel halotolerant *Bacillus* sp. PM06 isolated from sugarcane pressmud. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(1), 149-159.
- [14]. Rakaz, M. A., Hussien, M. O., & Ibrahim, H. M. (2021). Isolation, extraction, purification, and molecular characterization for thermostable α -amylase from locally isolated *Bacillus* species in Sudan. *Biochemistry research international*, 2021, 1-8.
- [15]. Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalyma, S. B., Abraham, A., Mathew, A. K., Madhavan, A., Rebello, S., & Pandey, A. (2018). Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. *Food technology and biotechnology*, 56(1), 16–30. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5491>
- [16]. Reddy, N. S., Nammagadda, A., Rao, K. R. S. dan Sambusiva. (2003). An Overview of the microbiology α -amilase family. *African Journal Biotechnology*, 2, 645-64
- [17]. Sakinah, Anniesah R., dan Insan Sunan K., 2018. *Isolasi, Karakterisasi sifat Fitokimia, dan Aplikasi Pati Jagung dalam Bidang Farmasetik*. Farmaka Suplemen Volume 16, No.2: 430-442.
- [18]. Wang, S. Q., Tang, J., Hu, K. D., Huang, Z. Q., Yang, F., Zhang, H. Y., Hu, L. Y., Li, Y. H., Yao, G. F., & Zhang, H. (2019). Antioxidative system in sweet potato root is activated by low-temperature storage. *Journal of the science of food and agriculture*, 99(8), 3824–3833. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9604>
- [19]. Yassin, S. N., Jiru, T. M., & Indracanti, M. (2021). Screening and characterization of thermostable amylase-producing bacteria isolated from soil samples of afdera, Afar region, and molecular detection of amylase-coding gene. *International journal of microbiology*, 2021, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2021/5592885>

