

# ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PENGHASIL AMILASE DARI SAMPEL AIR TAWAR DANAU TOBA

Saronom Silaban<sup>1</sup>, Polmar Simamora<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup>*Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Negeri Medan, Medan 20221, Indonesia*

E-mail: saronomsilaban@unimed.ac.id

Diterima: 07 Juni 2018. Disetujui: 11 Juli 2018. Dipublikasikan: 30 Juli 2018

DOI: 10.30870/educhemia.v3i2.3438

**Abstract:** Amylases are starch hydrolyzing enzymes. These proteins are very important to various industrial processes. Microorganisms are considered as a best source of amylase production. This study aims to isolate the amylolytic bacteria from freshwater samples of Lake Toba which have the potential to produce amylase enzymes. Freshwater samples of Lake Toba were collected from three locations, that is Muara, Tipang and Bakkara and subjected for isolation on defined medium. The isolate was identified and characterized on microscopically and biochemically with catalase and MR-VP test. The results showed that from three locations, obtained 18 bacteria isolates were potential to produce amylase. The microscopic characterization show results in irregular, cream-colored, wavy edges and elevation arise, while the catalase and MR-VP tests also showed positive results.

**Keywords:** starch; amylase; amylolytic bacteria; isolation

**Abstrak:** Amilase adalah enzim penghidrolisis pati. Protein ini sangat penting untuk berbagai proses industri. Mikroorganisme dianggap sebagai sumber produksi amilase terbaik. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri amilolitik dari sampel air tawar Danau Toba yang berpotensi menghasilkan enzim amilase. Sampel air tawar Danau Toba dikumpulkan dari tiga lokasi, yaitu Muara, Tipang dan Bakkara dan diisolasi pada media yang ditentukan. Isolat diidentifikasi dan dikarakterisasi secara mikroskopis dan biokimia dengan uji katalase dan MR-VP. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari tiga lokasi, diperoleh 18 isolat bakteri yang berpotensi menghasilkan amilase. Karakterisasi mikroskopis menunjukkan hasil yang tidak teratur, berwarna krem, tepi bergelombang dan timbul elevasi, sementara uji katalase dan MR-VP juga menunjukkan hasil positif.

**Kata kunci:** pati; amylase; bakteri amilolitik; isolasi

## PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu Negara yang memiliki sumber karbohidrat yang melimpah, salah satunya adalah pati. Pati diperoleh dari berbagai macam sumber antara lain: singkong, jagung, kentang, dan sagu. Pati dan hasil hidrolisis pati banyak dimanfaatkan untuk industri makanan, farmasi, dan sebagai sumber energi alternatif yang terbarukan. Pati juga bisa diolah menjadi bentuk pati termodifikasi yang memiliki nilai ekonomi lebih tinggi, dimana sampai saat ini Indonesia masih mengimpor pati jenis ini (Howeler & Hershey 2002).

Amilase merupakan enzim yang banyak dimanfaatkan dalam teknologi bioproses (Indrawati & Fifendi 2011). Sebagaimana LIPI (1999) melaporkan bahwa enzim ini menyumbang 30% dari total enzim dunia. Amilase merupakan enzim yang berperan dalam mendegradasi pati menjadi gula yang lebih sederhana seperti maltosa, dekstrin, dan glukosa. Amilase telah dipakai pada berbagai bidang industri seperti industri makanan (Van der Maarel *et al.* 2002), industri alkohol, gula, tekstil dan sirup (Pangastuti *dkk.* 2002; Wirawan *dkk.* 2008), industri kertas (Mitidieri *et al.* 2006), industri deterjen (Gupta *et al.* 2003) dan industri biodisel (Singh *et al.*

2014). Amilase yang paling umum digunakan dalam industri makanan adalah golongan  $\alpha$ -amilase (EC.3.2.1.1) dan  $\beta$ -amilase (EC 3.2.1.2) (Souza, 2010; Singh *et al.* 2014). Sampai saat ini, Indonesia masih mengimpor enzim ini dari beberapa negara, karena belum adanya industri yang memproduksi enzim ini. Padahal Indonesia memiliki biodiversitas mikroba yang tinggi (Widyastuti 2008; Panjaitan & Madayanti 2017, yang potensial untuk menghasilkan  $\alpha$ -amilase.

Amilase umumnya dapat diisolasi dari berbagai macam sumber, seperti tanaman, hewan dan mikroorganisme. Namun, enzim amilase untuk keperluan industri sebagian besar diisolasi dari mikroba. Pemilihan mikroba sebagai sumber enzim karena mempunyai beberapa keuntungan bila dibandingkan dengan enzim yang diisolasi dari tumbuhan maupun hewan, seperti mudah ditumbuhkan, pertumbuhan cepat, skala produksi sel mudah ditingkatkan, biaya produksi relatif lebih murah, dan kondisi produksi tidak tergantung perubahan musim dan waktu (Poernomo & Djoko 2003). Untuk pemanfaatan kekayaan biodiversitas mikroba nasional sebagai salah satu sumber enzim amilase yang potensial, maka dalam penelitian ini dilakukan eksplorasi enzim golongan

hidrolitik seperti amilolitik melalui isolasi mikroba lokal yang bersumber dari air tawar yang tercemar. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan bermanfaat bagi pengembangan produksi enzim amilase dari mikroba lokal.

## **METODE**

### ***Bahan, Bahan Kimia dan Media***

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel air dari air tercemar Danau Toba Sumatera Utara. Bahan untuk isolasi dan karakterisasi digunakan nutrien agar (NA), Triple Sugar Iron Agar, Simmons Citrate Agar, *Methyl Red-Voges Proskauer* (MR-VP), *Methyl Red*, hidrogen peroksida, natrium klorida, akuades, alkohol, spiritus, larutan iodine, kristal violet, safranin dan lugol.

### ***Isolasi Mikroorganisme Amilolitik***

Sampel air diambil dari tiga lokasi yaitu Bakkara, Muara dan Tipang dari kedalaman 5 cm. Masing-masing 1 mL sampel air disebar ke permukaan media NA menggunakan mikropipet, selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Koloni mikroba yang tumbuh diambil dan digoreskan kedalam cawan petri yang mengandung media NA, kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Isolasi dilakukan berulang-ulang sampai diperoleh koloni

tunggal untuk masing-masing sampel. Selanjutnya ditetaskan larutan iodine pada permukaan medium NA yang telah mengandung koloni tunggal, kemudian didiamkan selama 15 menit. Penambahan larutan iodine bertujuan untuk mendeteksi keberadaan enzim amilase dalam sampel (Setyati & Subagiyo 2012). Zona bening pada media NA mengindikasikan enzim amilase diproduksi oleh isolat, sehingga di daerah tersebut pati sudah dihidrolisis. Media yang berwarna biru kehitaman mengindikasikan bahwa pati pada media tersebut belum terhidrolisis. Tahapan isolasi bakteri amilolitik menggunakan metode Sebayang (2005).

### ***Karakterisasi Morfologi Isolat Penghasil Amilase***

Bakteri hasil isolasi dari ketiga sampel, selanjutnya dikarakterisasi secara makroskopis menggunakan lup. Setiap koloni bakteri yang tumbuh pada media NA diamati morfologinya. Pengamatan morfologi dari tiap isolat meliputi warna, bentuk dan tepi koloni yang diamati dari bagian atas, sedangkan permukaan koloni diamati dari bagian samping.

### ***Karakterisasi Mikroskopis dengan Perwarnaan Garam***

Kultur isolat yang berumur 24 jam diambil dengan menggunakan jarum ose, kemudian dibuat preparat olesan (pada

objek kaca) dengan menggunakan natrium klorida fisiologis dan dikeringkan. Kemudian difiksasi di atas Bunsen. Preparat ditetesi larutan Gram A (kristal violet) dan dibiarkan selama 3 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir. Selanjutnya ditetesi dengan larutan Gram B (lugol) selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir. Larutan Gram B (lugol) berfungsi untuk mengikat warna dasar ungu atau sebagai penguat warna dan membentuk kristal iodin (Marc 2001). Selanjutnya ditetesi dengan alkohol sampai sisa zat warna hilang (sekitar 30 detik), dibilas kembali dengan air mengalir. Pada tahap akhir, preparat ditetesi dengan larutan gram C (safranin) dan dibiarkan hingga mengering. Sebelum pengamatan dilakukan, preparat terlebih dahulu ditetesi dengan minyak imersi, selanjutnya dilakukan pengamatan di bawah mikroskop dengan pembesaran 1000x. Pengamatan dilakukan dengan melihat morfologi sel dan warna. Bakteri Gram-positif akan memberikan warna biru keunguan, sedangkan bakteri Gram-negatif memberikan warna merah (Dali *dkk.* 2013).

#### ***Uji Biokimia Bakteri Penghasil Amilase***

Uji bakteri penghasil amilase dilakukan dalam dua tahap pengujian,

yaitu uji katalase dan uji *Methyl Red-Voges Proskauer* (MR-VP). Uji katalase dilakukan dengan cara mengambil 2 tetes hidrogen peroksida 3% diletakkan pada kaca objek, selanjutnya isolat diambil dengan menggunakan jarum ose dan diletakkan di atas cairan hidrogen peroksida tersebut. Uji katalase positif jika dihasilkannya gelembung udara. Sedangkan uji *Methyl Red-Voges Proskauer* (MR-VP) dilakukan dengan menginokulasi 1 ose biakan bakteri ke dalam media MR-VP, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Untuk pengujian *Methyl Red*, inokulat ditetesi dengan 2 tetes reagen *Methyl Red*, jika terbentuk cincin merah artinya reaksi positif (Dali *dkk.* 2013).

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### ***Isolasi Mikroorganisme Amilolitik***

Dari ketiga lokasi sampel diperoleh sebanyak 69 isolat mikroba (Tabel 1). Selanjutnya isolat dari Bakkara di beri simbol MR, Bakkara diberi simbol BK, dan Tipang diberi simbol TP. Adanya koloni dalam sampel air menunjukkan bahwa mikroorganisme dalam sampel memiliki kemampuan untuk tumbuh pada medium agar NA (Aiyer 2004; Kathiresan dan Manivannan 2006; Mahdavi *et al.* 2010; Demirkan 2011). Hal ini sejalan dengan Singh *et al.* (2014)

yang menyatakan bahwa kemampuan mikroorganisme untuk tumbuh pada medium agar pati karena kemampuan mikroorganisme tersebut menggunakan pati sebagai substratnya.

**Tabel 1.** Karakterisasi Pertumbuhan Mikroba pada Medium Isolasi Agar NA

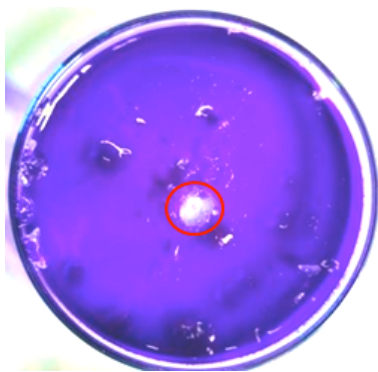
Lokasi Sampel Air	Koloni	Isolat
Muara	26	BK1, BK2, BK3, BK4, BK5, BK6, BK7, BK8, BK9, BK10, BK11, BK12, BK13, BK14, BK15, BK16, BK17, BK18, BK19, BK20, BK21
Bakkara	21	MR1, MR2, MR3, MR4, MR5, MR6, MR7, MR8, MR9, MR10, MR11, MR12, MR13, MR14, MR15, MR16, MR17, MR18, MR19, MR20, MR21, MR22, MR23, MR24, MR25, MR26
Tipang	22	TP1, TP2, TP3, TP4, TP5, TP6, TP7, TP8, TP9, TP10, TP11, TP12, TP13, TP14, TP15, TP16, TP17, TP18, TP19, TP20, TP21, TP22

Kemampuan untuk mendegradasi pati digunakan sebagai kriteria untuk penentuan produksi amilase oleh mikroba pada reaksi dengan yodium. Isolat yang ditandai menunjukkan respon secara berbeda dengan yodium seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Analisis Kualitatif Produksi Amilase oleh Isolat

Isolat	Hasil
MR2, MR7, MR9, MR10	Positif
MR3	Negatif
BK5, BK6, BK7, BK8	Positif
BK1, BK2, BK9	Negatif
TP5, TP6, TP10	Positif
TP2, TP4, TP8	Negatif

Hasil positif dalam Tabel 2 menunjukkan adanya zona hidrolisis, sementara hasil negatif berarti tidak ada zona bening yang diamati pada penambahan larutan yodium pada pati (Gambar 1). Ini menyiratkan tidak adanya produksi enzim ekstraseluler. Produksi warna di atas adalah karena fakta bahwa yodium (dalam bentuk ion  $I_3^-$ ) terjebak dalam gulungan molekul beta amilosa. Pati memaksa atom yodium menjadi pengaturan linier di alur pusat koil amilosa. Ada beberapa transfer muatan antara pati dan yodium. Itu mengubah cara elektron terkurung dan dengan demikian mengubah jarak dari tingkat energi. Kompleks tepung yodium memiliki jarak level energi yang tepat untuk menyerap cahaya tampak yang memberikan warna biru intens yang kompleks. Ketika pati dipecah menjadi unit karbohidrat yang lebih kecil karena aksi amilase, warna biru-hitam tidak diproduksi.



**Gambar 1.** Penentuan Kualitatif Produksi Amilase Pada Media Agar NA

Zona yang jelas diamati ke berbagai luasan karena berbagai jumlah produksi amilase, kecuali dalam kontrol di mana seluruh kemiringan tetap biru karena

reaksi yodium dengan pati dalam medium. Tidak adanya penampakan zona bening menunjukkan tidak adanya produksi enzim intraseluler atau tidak adanya produksi enzim (Singh *et al.*, 2014).

### **Karakterisasi Morfologi Isolat Penghasil Amilase**

Isolat positif dimurnikan pada medium agar pati. Koloni yang terisolasi ditandai secara morfologis. Terlihat muncul dengan fitur yang berbeda seperti yang diberikan pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Karakterisasi Morfologi Isolat Murni pada Media Agar Pati

Lokasi Sampel	Kode Isolat	Bentuk	Warna	Tepi	Elevasi
Muara	MR2	Tidak Beraturan	Putih	Licin	Timbul
	MR3	Tidak Beraturan	Krem	Licin	Timbul
	MR7	Tidak Beraturan	Krem	Bercabang	Datar
	MR9	Bundar	Putih	Bercabang	Datar
	<b>MR10</b>	<b>Tidak Beraturan</b>	<b>Krem</b>	<b>Licin</b>	<b>Timbul</b>
Bakkara	BK1	Bundar	Putih	Licin	Timbul
	BK2	Tidak Beraturan	Putih	Licin	Timbul
	BK5	Tidak Beraturan	Krem	Berombak	Cembung
	BK6	Tidak Beraturan	Putih	Berombak	Cembung
	BK7	Tidak Beraturan	Putih	Licin	Timbul
	BK8	Tidak Beraturan	Putih	Berombak	Cembung
	BK10	Tidak Beraturan	Putih	Berombak	Timbul
Tipang	TP2	Bundar	Putih	Licin	Cembung
	TP4	Tidak Beraturan	Putih	Licin	Cembung
	TP5	Tidak Beraturan	Krem	Bundar	Cembung
	TP6	Tidak Beraturan	Putih	Bundar	Timbul
	TP8	Bundar	Putih	Bundar	Timbul
	TP10	Bundar	Krem	Bundar	Timbul

### **Karakterisasi Mikroskopis dengan Perwarnaan Garam**

Isolat bakteri yang berpotensi menghasilkan amilase selanjutnya

dikarakterisasi kembali dengan pewarnaan gram. Isolat positif ditandai dengan perubahan warna isolat menjadi

violet, sedangkan isolat negatif ditandai dengan perubahan warna isolat menjadi merah (Tabel 4).

**Tabel 4.** Karakterisasi Bakteri Amilolitik secara Mikroskopis dengan Pewarnaan Gram

Isolat	Hasil
MR2, MR7, MR9, MR10	Gram Positif
MR3	Gram Negatif
BK5, BK6, BK7, BK8	Gram Positif
BK1, BK2, BK9	Gram Negatif
TP5, TP6, TP10	Gram Positif
TP2, TP4, TP8	Gram Negatif

### Uji Biokimia Bakteri Penghasil Amilase

Bakteri yang berpotensi menghasilkan enzim amilase diuji secara biokimia menggunakan uji MR-VP dan uji katalase. Terbentuknya cincin merah setelah penambahan reagen *Methyl Red* menunjukkan reaksi positif. Terbentuknya gelembung udara setelah penambahan hidrogen peroksida pada uji katalase menunjukkan hasil positif (Tabel 5).

**Tabel 5.** Uji Katalase Isolat Bakteri Amilolitik

Isolat	Hasil
MR2, MR3, MR9, MR10	Positif
MR7	Negatif
BK2, BK5, BK6, BK8, BK9	Positif
BK1, BK7	Negatif
TP5, TP6	Positif
TP2, TP4, TP8, TP10	Negatif

Meningkatnya kandungan fosfor di perairan Danau Toba dari bahan organik

pakan ikan, menyebabkan sumber nitrogen bagi pertumbuhan dan kelimpahan mikroorganisme semakin meningkat (Wardoyo 1981). Selain itu, dalam pakan ikan juga terdapat kandungan protein, lemak dan karbohidrat. Jumlah karbohidrat dalam pakan ikan diperkirakan sekitar 40,2%. Karbohidrat yang terdapat dalam air memicu tumbuhnya bakteri amilolitik (Marzuqi 2015). Bakteri amilolitik adalah jenis bakteri yang dapat memproduksi enzim amilase dan mampu memecah pati (Türker & Özcan 2015). Mikroba tersebut dapat menempati habitat air tawar, seperti danau, sungai dan kolam (Waluyo 2009). Genus bakteri amilolitik yang cukup luas dikenal adalah *Bacillus*, *Bacteriodes*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Micrococcus*, *Thermus*, dan *Actinomycetes* (Reddy 2003).

### KESIMPULAN

Telah berhasil diisolasi mikroba amilolitik dari sumber air tawar Danau Toba yang potensial menghasilkan enzim amilase. Berdasarkan zona bening yang dihasilkan, isolat MR10 merupakan isolat positif yang paling berpotensi menghasilkan enzim amilase dalam jumlah besar.

**DAFTAR RUJUKAN**

- Aiyer, PD, 2004, 'Effect of C: N ratio on alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* SPT 27', *Afr J Biotechnol*, vol. 3, no. 10, hh. 519-522.
- Dali, S, Arfah, R, Karim, A, & Patong, AR, 2013, 'Eksplorasi enzim amilase dari mikroba yang diisolasi dari sumber air panas di Sulawesi Selatan dan aplikasinya dalam produksi maltodekstrin'. Laporan Penelitian BOPTN, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Demirkan, E, 2011, 'Production, purification, and characterization of alpha-amylase by *Bacillus subtilis* and its mutant derivatives', *Turkish J Biology*, vol. 35, no. 6, hh. 705-712.
- Gupta, R, Gigras, P, Mohapatra, H, Goswami, VK, & Chauhan, B, 2003, 'Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective', *Process Biochem*, vol. 38, no. 11, hh. 1599-1616.
- Howeler, RH, & Hershey, CH, 2002, 'Cassava in Asia: Research and development to increase its potential use in food', feed and industry: a Thai example.
- Irdawati & Fifendy, M, 2011, 'Isolasi bakteri termofilik penghasil amilase dari sumber air panas Rimbo Panti Pasaman. Laporan Penelitian DIPA Reguler UNP', Universitas Negeri Padang, Padang.
- Kathiresan, K, & Manivannan, S, 2006, 'Amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil', *Afr J Biotechnol*, vol. 5, no. 10, hh. 929-932.
- Mahdavi, A, Hassan Sajedi, R, Rassa, M, & Jafarian, V, 2010, 'Characterization of an  $\alpha$ -amylase with broad temperature activity from an acid-neutralizing *Bacillus cereus* strain', *Iranian J Biotechnol*, vol. 8, no. 2, hh. 103-111.
- Marc, J, Maarel, D, & Bart, V, 2001, 'Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family', *J. Biotech*, vol. 94, no. 1, hh. 137-155.
- Marzuqi, M, 2015, 'Pengaruh kadar karbohidrat dalam pakan terhadap pertumbuhan, efisiensi pakan dan aktivitas enzim amilase pada ikan bandeng (*Chanos chanos Forrskal*)', (Doctoral dissertation, Tesis. Universitas Udayana).
- Mitidieri, S, Martinelli, AHS, Schrank, A, & Vainstein, MH, 2006, 'Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with



- commercial detergent formulations', *Bioresource Technology*, vol. 97, no. 10, hh. 1217-1224.
- Panjaitan, RS, & Madayanti, F, 2017, 'Uji aktivitas antibakteri ekstrak kasar lipid ulva fasciata terhadap *Bacillus cereus*', *EduChemia (Jurnal Kimia dan Pendidikan)*, vol. 2, no. 1, hh. 14-24.
- Pangastuti, A, Wahjuningrum, D, & Suwanto, A, 2002, 'Isolasi, karakterisasi dan kloning gen penyandi alfa-amilase bakteri halofil moderat asal bledug kuwu', *Hayati*, vol. 9, no. 1, hh. 10-14.
- Poernomo, AT, & Djoko, DA, 2003, 'Uji aktivitas crude enzim proteolitik *Bacillus subtilis* FNCC0059 hasil fermentasi curah', *Majalah Farmasi Erlangga*, vol. 3, hh. 103-107.
- Reddy, NS, Nimmagadda, A, Rao, KRSS, 2003, 'A overview of the microbiology  $\alpha$ -amylase family', *African J. Biotechnol*, vol. 2, hh. 645-648.
- Setyati, WA, & Subagiyo, S, 2012, 'Isolasi dan seleksi bakteri penghasil enzim ekstraseluler (proteolitik, amilolitik, lipolitik dan selulolitik) yang berasal dari sedimen kawasan mangrove', *Ilmu Kelautan: Indonesian Journal of Marine Sciences*, vol. 17, no. 3, hh. 164-169.
- Sebayang, F, 2005, 'Isolasi dan pengujian aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase dari *Aspergillus niger* dengan menggunakan media campuran onggok dan dedak', *Jurnal Komunikasi Penelitian*, vol. 17, no. 5, hh. 81-86.
- Singh, H, Saharan, R, & Sharma, KP, 2014, 'Isolation and characterization of amylase producing bacteria from diverse environmental samples', *J. Microbiol Biotech Res*, vol. 4, no. 4, hh. 8-18.
- Souza, PMD, 2010, 'Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry-A review', *Brazilian J. Microbiol*, vol. 41, no. 4, hh. 850-861.
- Türker, C, & Özcan, BD, 2015, 'Isolation of Alpha-amylase producing thermophilic bacillus strains and partial characterization of the enzymes', *Turkish J Agriculture-Food Sci Technol*, vol. 3, no. 6, hh. 387-393.
- Van Der Maarel, MJ, Van der Veen, B, Uitdehaag, JC, Leemhuis, H, & Dijkhuizen, L, 2002, 'Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family', *J. Biotech*, vol. 94, no. 2, hh. 137-155.
- Wardoyo, STH, 1981, 'Kriteria kualitas air untuk keperluan pertanian dan perikanan, *Traning Analisa*

- Dampak Lingkungan PPLH-PSL*, Bogor.
- Waluyo, L, 2009, '*Mikrobiologi lingkungan*', UMM Press, Malang.
- Widyastuti, 2008, 'Kadar alginat rumput laut yang tumbuh di perairan laut Lombok', *J. Teknologi Pertanian*, vol. 10, no. 3, hh 144-152.
- Wirawan, SK, Rismijana, J, & Hidayat, T, 2008, 'Aplikasi  $\alpha$ -amilase dan selulase pada proses deinking kertas bekas campuran', *Berita Selulosa*, vol. 43, no. 1, hh. 11, 18.