

Aktivitas Amilolitik Bakteri Sedimen Mangrove Pantai Logending, Ayah, Kebumen pada Suhu dan pH Berbeda

Alfiani Rahmawati, Oedjijono, Dini Ryandini*

Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman
Jalan dr. Suparno 63 Purwokerto 53122
Korespondensi, e-mail: dini.ryandini@unsoed.ac.id

Rekam Jejak Artikel:

Diterima : 23/07/2021
Disetujui : 14/06/2022

Abstract

Mangrove sediment is a source of various microorganisms that degrade leaf litter or parts of mangrove plants, including amylolytic bacteria. Bacteria isolated from the mangrove sediments of the Logending beach have not yet known their amylolytic ability. Optimum amylase activity can be influenced by temperature and pH. This study aims to determine the ability of mangrove sediment bacterial isolates to produce amylase enzymes, to determine the pH and temperature for optimum amylase activity, and to identify amylase-producing bacteria. The research was conducted by survey method. The research stages included screening for amylolytic bacteria, preparation of growth curves, amylase production, optimizing amylolytic activity at various temperatures (35°C; 36°C; 37°C; 38°C) and pHs (4.5; 5; 5.5; 6) and characterization of amylolytic isolates. The parameters measured were amylolytic index, amylase activity quantitatively, total number of bacteria, and identity of amylolytic bacteria from mangrove sediments. Data analysis was done descriptively. The results showed that the highest amylolytic index were shown by isolate LG113 with an amylolytic index value of 9.86 from 10 amylolytic isolates from mangrove sediments. The optimum temperature for amylase activity was 37°C, which was 2.13 U/mL and the optimum pH was 6, which was 2.14 U/mL. The total number of amylolytic bacterial cells at the end of the production period was $1.94 \cdot 10^{13}$ cfu/mL. The amylolytic isolate LG113 belongs to *Bacillus* genera.

Key words: *Amylase, Amylolytic Bacteria, Mangrove Sediment, pH, Temperature*

Abstrak

Sedimen mangrove merupakan sumber berbagai mikroorganisme pendegradasi serasah daun atau bagian tumbuhan mangrove, di antaranya bakteri amilolitik. Bakteri yang diisolasi dari sedimen mangrove pantai Logending belum diketahui kemampuan amilolitiknya. Aktivitas amilase optimum dapat dipengaruhi oleh suhu dan pH. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri sedimen mangrove dalam menghasilkan enzim amilase, mengetahui pH dan suhu optimum aktivitas amilase yang dihasilkan, dan mengidentifikasi bakteri penghasil amilase. Penelitian dilakukan dengan metode survei. Tahap penelitian meliputi, skrining bakteri amilolitik, pembuatan kurva tumbuh, produksi amilase, optimasi aktivitas amilolitik pada variasi suhu (35°C; 36°C; 37°C; 38°C) dan pH (4,5; 5; 5,5; 6) serta karakterisasi isolat amilolitik. Parameter yang diukur yaitu indeks amilolitik, unit aktivitas enzim amilase, jumlah total bakteri, dan identitas bakteri amilolitik asal sedimen mangrove. Analisis data dilakukan secara deskriptif. Hasil pengukuran indeks amilolitik tertinggi ditunjukkan oleh isolat LG113 dengan nilai indeks amilolitik 9,86 dari 10 isolat amilolitik asal sedimen mangrove. Suhu optimum aktivitas amilase adalah 37°C yaitu sebesar 2,13 U/mL dan pH optimum adalah 6 yaitu sebesar 2,14 U/mL. Jumlah total sel bakteri amilolitik pada akhir masa produksi adalah $1,94 \cdot 10^{13}$ cfu/mL. Identitas isolat bakteri amilolitik LG113 termasuk anggota genus *Bacillus*.

Kata Kunci: *Amilase, Bakteri Amilolitik, pH, Sedimen Mangrove, Suhu.*

PENDAHULUAN

Lingkungan pantai Logending, Kebumen, merupakan area wisata pantai Selatan dan merupakan muara sungai Bodo dan dibatasi daratan bukit berhutan. Area muara dan sebagian pantai wisata ditumbuhi oleh mangrove, terutama *Rhizophora* sp. dan *Nypa* sp., serta sebagian lingkungan merupakan area penanaman mangrove. Kawasan mangrove merupakan ekosistem unik dan ekstrim karena ekosistem berada pada daerah peralihan antara

daratan dan lautan, dipengaruhi oleh pasang surut air laut, terjadi percampuran antara air tawar dan air laut, akumulasi berbagai mineral dan memiliki aktivitas mikroorganisme yang tinggi. Organisme lingkungan mangrove, baik makroorganisme maupun mikroorganisme bersifat toleran terhadap kondisi lingkungan yang ekstrim, seperti kondisi tanah tidak stabil, kadar garam tinggi dan konsentrasi karbon tinggi (Nurfajriyah *et al.*, 2017). Sedimen mangrove merupakan tempat pelapukan serasah daun dan bagian tumbuhan mangrove yang mengandung

amilum, karenanya bakteri sedimen mangrove mampu mendegradasi amilum dan mengubahnya menjadi molekul gula sederhana yang selanjutnya dimanfaatkan oleh organisme yang hidup pada lingkungan mangrove sebagai sumber nutrisi (Silitonga *et al.*, 2019). Diversitas mikroba dominan pada ekosistem mangrove memiliki kemampuan yang beragam dan potensiil untuk dikembangkan dalam produksi/industri enzim dan industri lainnya (Sahoo & Dhal, 2009). Kondisi alami lingkungan dan aktivitas masyarakat dapat berpengaruh terhadap diversitas, mikroorganisme. Penelitian mikrobiologi di sedimen mangrove pantai Logending belum banyak dilaporkan, terutama tentang bakteri amilolitik yang berperan mendegradasi komponen amilum yang bersumber pada serasah daun mangrove atau bagian tanaman mangrove.

Bakteri amilolitik merupakan bakteri yang mampu menghidrolisis amilum atau pati, karena dapat menghasilkan enzim amilase (Kresnawaty *et al.*, 2019). Bakteri amilolitik yang kontak langsung dengan substrat amilum akan memutuskan ikatan glikosida pada senyawa polimer amilum menjadi monomer yang lebih sederhana seperti maltosa, dekstrin, dan glukosa (Nurfajriyah *et al.*, 2017). Produksi dan aktivitas enzim amilase oleh bakteri dipengaruhi oleh beberapa faktor di antaranya suhu, pH, waktu, jenis bakteri, jenis dan konsentrasi substrat (Arun & Sivashanmugam., 2017; Istia'nah *et al.*, 2020). Amilase bermanfaat dalam industri makanan, tekstil, kertas, dan detergen (de Souza & de Oliveira e Magalhães, 2010).

Isolat bakteri LG8, LG13, LG20, LG21, LG37, LG45, LG50, LG85, LG108 dan LG113 telah diisolasi dari sedimen mangrove pantai Logending (Pramono *et al.*, 2021) dan belum diketahui kemampuan amilolitiknya. Tujuan dari penelitian ini yaitu mengetahui kemampuan isolat bakteri sedimen mangrove pantai Logending dalam menghasilkan enzim amilase, mengetahui suhu dan pH optimum aktivitas amilase, dan mengetahui identitas isolat bakteri amilolitik asal sedimen mangrove pantai Logending.

MATERI DAN METODE

Penelitian dilakukan dengan metode survei dan dilaksanakan dari bulan Februari-Mei 2021. Bahan penelitian terdiri atas 10 isolat bakteri asal sedimen mangrove pantai Logending koleksi Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Biologi Unsoed, media *Nutrient Agar* (NA, Oxoid), *Nutrient Broth* (NB, Oxoid), *Tryptone Soya Broth* (TSB, Oxoid) +1% pati, *Starch Agar* (Soluble starch-Merck 10g/L, beef extract 3g/L, agar 12g/L, akuades 1L), larutan pati, larutan NaCl fisiologis, alkohol 69%, buffer sitrat fosfat, *lugol's iodine*, reagen asam dinitrosalisilat (DNS), etanol 96%, NaOH. Alat yang digunakan

adalah autoklaf, *Laminar Air Flow* (LAF), timbangan analitik, *shacker incubator*, *hotplate stirrer*, oven, mesin sentrifugasi, spektrofotometer, mikroskop cahaya, refrigerator, *waterbath*, pembakar spiritus, microtube, dan alat gelas yang lazim digunakan kerja mikrobiologi.

Skrining bakteri amilolitik (Istia'nah *et al.* (2020)

Isolat bakteri diinokulasikan secara *spot inoculation* pada medium SA. Kultur diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang ($\pm 28^{\circ}\text{C}$). Biakan ditetesi reagen iodine dan zona bening yang terbentuk di sekitar koloni diukur dengan menggunakan penggaris. Indeks amilolitik ditentukan dengan rumus:

$$\text{Indeks Amilolitik (IA)} = \frac{\text{DZB} - \text{DKB}}{\text{DKB}}$$

Keterangan:

DZB : Rata-rata diameter zona bening (mm)

DKB : Rata-rata diameter koloni bakteri (mm)

Pembuatan kurva standar dan kurva pertumbuhan (Istia'nah *et al.*., 2020)

Pengukuran fase pertumbuhan diawali dengan membuat kurva standar bakteri dengan menginokulasikan sebanyak 1 mL inokulum ke dalam 100 mL medium TSB, kemudian diinkubasi pada *shaker incubator* 150 rpm pada suhu 30°C selama 24 jam. Kultur bakteri dibuat seri pengenceran sampai dengan tingkat pengenceran suspensi 10^{-1} - 10^{-6} menggunakan larutan NaCl fisiologis 0,85%. Masing-masing tingkat pengenceran suspensi diukur absorbansi pada λ 600 nm dan penghitungan dengan metode *total plate count* (TPC) pada medium NA yang diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Hubungan antara nilai absorbansi dan hasil TPC adalah kurva standar dan dihitung persamaan regresi yang terbentuk, selanjutnya digunakan sebagai pedoman untuk penghitungan jumlah bakteri pada pengamatan kurva pertumbuhan. Penghitungan jumlah koloni yang tumbuh pada metode TPC yang memenuhi persyaratan yakni 25-250 koloni dengan rumus:

$$\text{Jumlah bakteri (CFU/mL)} = \Sigma \times \frac{1}{p} \times \frac{1}{pp}$$

Keterangan:

Σ : Jumlah koloni pada cawan

P : volume pengenceran

SP : volume inokulum

Pembuatan kurva tumbuh, sebanyak 15 mL kultur bakteri diinokulasikan ke dalam 150 mL medium TSB. Kultur diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Sebanyak 3 mL dari hasil propagasi dimasukkan ke dalam kuvet untuk diukur nilai *Optical Density* (OD) setiap 2 jam selama 24 jam

pada λ 600 nm. Blanko pada pembuatan kurva standard dan kurva tumbuh menggunakan medium TSB. Hasil pengukuran absorbansi dikonversi menjadi cfu/mL menggunakan persamaan yang telah diperoleh sebelumnya. Plotting cfu/mL (sumbu y) dan waktu (sumbu x) menghasilkan kurva pertumbuhan bakteri. Kultur pada fase logaritmik digunakan untuk pengujian selanjutnya.

Produksi ekstrak kasar amilase (Istia'nah *et al.*, 2020 dengan modifikasi)

Sebanyak 10% (v/v) inokulum yang berasal dari fase logaritmik dengan kepadatan sel $4,36.10^{10}$ cfu/mL diinokulasikan ke dalam 100 mL medium TSB+1% pati. Kultur diinkubasi dalam *shaker incubator* pada suhu 30°C selama 48 jam dengan kecepatan 150 rpm. Ekstraksi enzim amilase dilakukan dengan cara, kultur yang telah diinkubasi disentrifus pada suhu rendah 4°C dengan kecepatan 6720 G selama 10-15 menit. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak kasar enzim.

Pembuatan kurva standar glukosa (Rismawati *et al.*, 2016; Yasin *et al.*, 2017)

Glukosa sebanyak 1 mg dilarutkan dalam 1 L akuades. Larutan glukosa dibuat konsentrasi 0, 10, 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm. Masing-masing konsentrasi glukosa diambil sebanyak 1 mL dan ditambahkan 1 mL reagen DNS, tabung dipanaskan pada suhu 100°C selama 5-15 menit hingga larutan berwarna merah-coklat. Masing-masing konsentrasi ditambahkan akuades hingga volume 10 mL. Larutan diukur absorbansi pada λ 540 nm dengan spektrofotometer. Nilai hasil absorbansi dibuat kurva regresi linier.

Penentuan Suhu Optimum Aktivitas Enzim (Supriyanti & Heryanto., 2013)

Sebanyak 1 mL supernatan ekstrak kasar enzim dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan larutan pati sebanyak 1 mL (larutan pati dalam buffer sitrat fosfat pH 7). Tabung-tabung selanjutnya diinkubasi selama 10 menit pada *waterbath* dengan variasi suhu 35°C; 36°C; 37°C; 38°C. Reaksi dihentikan dengan menambahkan sebanyak 2 mL reagen DNS ditambahkan pada tiap-tiap tabung. Tabung dipanaskan selama 5 menit pada suhu 90°C, kemudian didinginkan dan ditambahkan akuades sebanyak 10 mL. Masing-masing larutan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada λ 540 nm.

Penentuan pH Optimum Aktivitas Enzim (Supriyanti & Heryanto, 2013)

Sebanyak 1 mL supernatan ekstrak kasar enzim dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan larutan pati sebanyak 1 mL (larutan 1 g/100 mL dilarutkan buffer sitrat posfat) dengan variasi pH 4,5;5,5;6. Tabung-tabung selanjutnya

diinkubasi selama 10 menit pada *waterbath* dengan suhu optimum yang telah diperoleh dari percobaan sebelumnya. Reaksi dihentikan dengan menambahkan sebanyak 2 mL reagen DNS ditambahkan pada tiap tabung. Tabung dipanaskan selama 5 menit pada suhu 90°C, kemudian didinginkan dan ditambahkan akuades sebanyak 10 mL. Masing-masing larutan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada λ 540 nm. Blanko dibuat dengan tahapan yang sama tanpa menambahkan ekstrak kasar enzim amilase. Nilai absorbansi yang dihasilkan, kemudian dimasukkan ke dalam persamaan pada kurva standar glukosa. Satu unit aktivitas enzim dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$AE = \frac{C}{BMG \times t} \times \frac{H}{E}$$

Keterangan :

AE : Aktivitas Enzim

C : Konsentrasi glukosa (ppm)

BMG : Berat molekul glukosa (180)

T : Waktu inkubasi (10 menit)

H : Volume substrat+enzim

E : Volume enzim

Karakterisasi morfologi koloni, sel, dan fisiologi bakteri amilolitik potensial (Cappuccino & Sherman, 2014)

Karakterisasi isolat bakteri amilolitik potensial dengan kode LG113 asal sedimen mangrove meliputi karakterisasi morfologi koloni, sel dan fisiologis. Karakterisasi morfologi koloni bakteri meliputi bentuk, permukaan, diameter, tepi, elevasi dan warna koloni. Karakterisasi morfologi sel meliputi pengujian sifat dinding sel atau pewarnaan Gram, bentuk sel, adanya endospora dan pengujian motilitas. Isolat bersifat Gram positif bila sel tampak berwarna ungu pada pengamatan mikroskopis, dan hasil uji positif pada uji endospora dan motilitas bila terdapat endospora dan menunjukkan pertumbuhan menyebar dari garis inokulasi karena sifat motil. Karakterisasi fisiologi meliputi pengujian katalase, oksidase, sitrat, fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa dan sukrosa, maltosa, dan manitol) dan oksidatif fermentatif (O/F), pertumbuhan pada pH 3 dan 9 serta suhu 4°C dan 55°C. Hasil uji positif ketika terbentuk gelembung gas pada uji katalase, terbentuk warna biru marun pada uji oksidase, terbentuk warna kuning pada uji karbohidrase dan uji O/F, terbentuk suspensi sel yang keruh ketika tumbuh pada pH dan suhu tertentu.

Analisis data

Data aktivitas amilase dianalisis secara deskriptif dan hasil karakterisasi bakteri mengacu pada buku "*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition* (Vos *et al.*, 2009)

Tabel 1. Indeks Amilolitik Isolat Bakteri Sedimen Mangrove Pantai Logending

No	Kode Isolat	Rata-rata Diameter Zona Bening (mm)	Rata-rata Diameter Koloni (mm)	Indeks Amilolitik
1	LG 108	2,5	1,35	0,85
2	LG 85	2,6	1,3	1
3	LG 50	3,75	2,75	0,36
4	LG 8	3,75	2,7	0,38
5	LG 37	2,6	1,65	0,57
6	LG 21	3	1,85	0,62
7	LG 113	2,5	0,23	9,86
8	LG 20	2,75	1,85	0,48
9	LG 45	1,7	1	0,7
10	LG 13	1,75	1	0,75

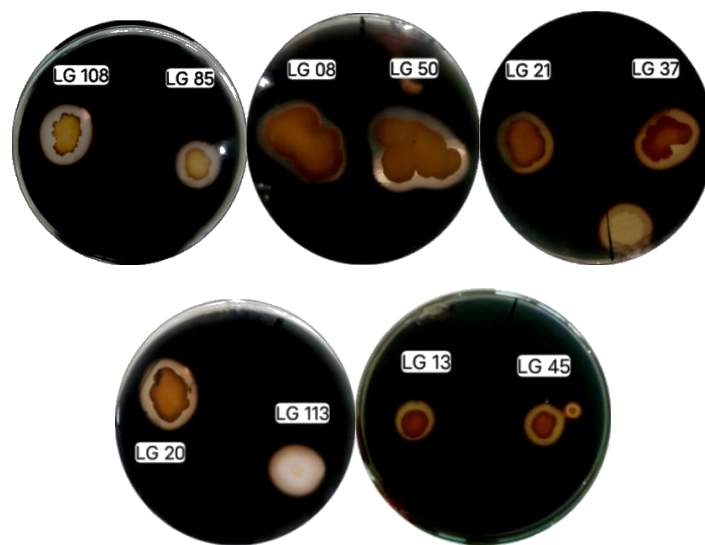
HASIL DAN PEMBAHASAN

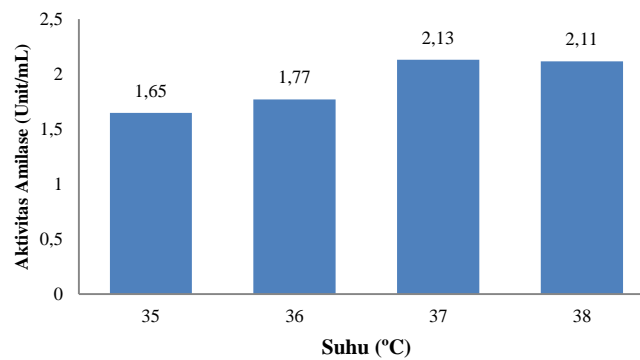
Hasil uji amilolitik terhadap isolat LG108, LG85, LG50, LG8, LG37, LG21, LG113, LG20, LG45 dan LG13 menunjukkan indeks amilolitik berkisar antara 0,36-9,86 (Tabel 1). Isolat LG113 menghasilkan indeks amilolitik tertinggi yaitu 9,86, sehingga isolat LG113 digunakan untuk tahap pengujian aktivitas enzim pada variasi suhu dan pH. Indeks amilolitik yang tinggi ditandai dengan zona bening yang terbentuk lebih besar dibanding koloni bakteri, karena berkaitan dengan enzim amilase yang disekresikan pada medium (Gambar 1). Zona bening yang terbentuk merupakan hasil reaksi dari pemecahan senyawa pati menjadi senyawa sederhana, semakin luas zona bening yang terbentuk, maka aktivitas amilolitiknya semakin tinggi (Zubaidah *et al.*, 2019).

Produksi ekstrak kasar enzim amilase isolat LG 113 menggunakan inokulum fase eksponensial 10 jam dengan jumlah sel $4,36.10^{10}$ cfu/mL. Jumlah sel

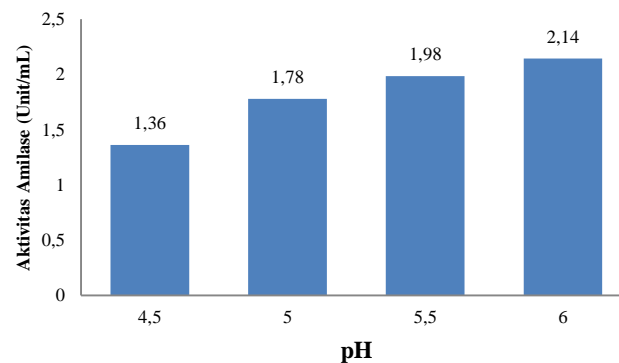
bakteri setelah produksi diperoleh $1,94.10^{13}$ cfu/mL. Jumlah sel bakteri pada awal inokulasi dan akhir masa produksi menunjukkan adanya penambahan jumlah sel. Hal ini menandakan populasi bakteri mengalami masa pertumbuhan logaritmik. Sudin *et al* (2020) menyatakan bahwa pada fase logaritmik sel bakteri yang mampu beradaptasi dengan lingkungan baru akan aktif membelah sehingga terjadi peningkatan sel bakteri. Sumber nutrisi pada medium yang memadai menyebabkan aktivitas metabolisme bakteri berada pada kondisi optimum dalam menghasilkan senyawa metabolit primer, salah satunya enzim. Setelah bakteri masuk ke dalam fase stasioner jumlah selnya konstan dan/atau menurun karena kompetisi dalam menggunakan nutrisi.

Aktivitas amilase tertinggi isolat LG113 dicapai pada suhu 37°C yaitu sebesar 2,13 U/mL (Gambar 2). Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Isti'annah *et al.* (2020) bahwa aktivitas amilase tertinggi yang dihasilkan oleh *Bacillus megaterium* pada suhu 37°C yaitu sebesar 1,279 U/mL. Aktivitas


Gambar 1. Aktivitas amilolitik isolat bakteri asal mangrove secara kualitatif pada medium *Strach Agar* (skala 1:0,3)



Gambar 2. Aktivitas amilase isolat LG113 pada suhu yang berbeda



Gambar 3. Aktivitas amilase isolat LG113 pada pH yang berbeda

amilase tertinggi yang dihasilkan oleh *Arthrobacter arilaitensi* ditunjukkan pada suhu 30°C yaitu sebesar 2,7 U/mL (Purnawan *et al.*, 2016). Perbedaan suhu optimum aktivitas amilase dapat dipengaruhi oleh jenis isolat bakteri yang digunakan karena setiap bakteri memiliki suhu optimum pertumbuhan yang berbeda (Wulandari *et al.*, 2017). Aktivitas enzim meningkat dengan meningkatnya suhu karena peningkatan energi kinetik yang menyebabkan adanya peningkatan tumbukan antara enzim dan substrat, sehingga menghasilkan katalisis produk-substrat yang lebih tinggi (Fatoni & Zufahair, 2012). Suhu merupakan salah satu faktor lingkungan yang mempengaruhi aktivitas enzim. Suhu optimum akan meningkatkan aktivitas enzim dalam proses hidrolisis substrat, sehingga meningkatkan produk proses hidrolisis substrat (Vaikundamoorthy *et al.*, 2018). Rodriguez *et al.* (2006) menyatakan bahwa enzim amilase umumnya tetap aktif pada kisaran suhu 37°C-75°C.

Aktivitas amilase pada variasi pH 4,5; 5; 5,5; 6 menunjukkan aktivitas amilase isolat LG113 tertinggi diperoleh pada pH 6 yaitu sebesar 2,14 U/mL

(Gambar 3). Istia`nah *et al.* (2020), melaporkan bahwa aktivitas amilase tertinggi yang dihasilkan oleh *Bacillus megaterium* pada pH 5 yaitu sebesar 1,241 U/mL. Wahyuningsih *et al.* (2019), melaporkan bahwa *Bacillus amyloliquefaciens* memiliki aktivitas amilase tertinggi pada pH 6,5 yaitu sebesar 1,4467 U/mL. Purnawan *et al.* (2016), melaporkan bahwa bakteri *Arthrobacter arilaitensi* memiliki aktivitas amilase tertinggi pada pH 7 yaitu sebesar 2,1 U/mL. Istia`nah *et al.* (2020), menyatakan bahwa pH sangat berpengaruh terhadap kinerja dari aktivitas amilase dalam proses hidrolisis pati. Perubahan pH dapat mengubah ionisasi rantai samping asam amino pada sisi aktif enzim, maka pada pH optimum enzim berada dalam konformasi terbaik. Kondisi pH optimum menghasilkan aktivitas amilase yang tertinggi (Fatoni & Zufahair, 2012). Enzim amilase tetap aktif dalam proses hidrolisis umumnya pada kisaran pH 4,0-8,0 (Carvalho *et al.*, 2008). Subagiyo *et al.* (2017), menyatakan bahwa bakteri hidrolitik yang toleran terhadap kondisi lingkungan yang ekstrim akan menghasilkan metabolit primer seperti enzim yang juga toleran terhadap kondisi lingkungan yang ekstrim.

Hasil karakterisasi bakteri amilolitik secara makromorfologi, mikromorfologi, biokimiawi, nutrisi dan fisiologi (Tabel 2) yang mengacu pada Vos *et al.* (2009) menunjukkan bahwa isolat LG113 merupakan anggota dari genus *Bacillus*. Koloni anggota genus *Bacillus* berbentuk bulat atau tidak beraturan. Permukaan koloni dapat mengkilap, lembab, bergranula hingga berkerut. Genus *Bacillus* memiliki warna koloni dari abu-abu cream hingga putih pucat, namun beberapa spesies dapat menghasilkan warna hitam, coklat, oranye, merah muda atau kuning. Elevasi koloni *Bacillus* beragam dari rata hingga cembung, dan tepi koloni beragam dari rata hingga bergelombang. Bentuk sel *Bacillus* batang dengan tipe Gram positif. Spesies dari genus *Bacillus* memiliki kemampuan membentuk endospora pada akhir fase eksponensial sebagai bentuk pertahanan hidup pada saat kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan. Sebagian besar spesies dari genus *Bacillus* bersifat motil. Puspita *et al.* (2017), melaporkan bahwa makromorfologi koloni dari 12 isolat *Bacillus* sp. memiliki elevasi koloni dari datar hingga cembung dan tepi koloni rata. Koloni berbentuk bulat dengan warna putih. Karakter mikromorfologi dari 12 isolat *Bacillus* sp. yang diamati memiliki sel berbentuk batang dan Gram positif, memiliki endospora dan bersifat motil.

Vos *et al.* (2009) memaparkan bahwa sebagian besar anggota genus *Bacillus* tidak memiliki kemampuan dalam memproduksi indol. Berdasarkan penggunaan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon, tidak semua genus *Bacillus* dapat menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon. Pengujian katalase pada sebagian bakteri dari genus *Bacillus* yang bukan termasuk ke dalam kelompok bakteri asam laktat (BAL)

menginterpretasikan hasil positif. Pengujian oksidase pada genus *Bacillus* hasilnya beragam, pada spesies *B. subtilis* beberapa strain menginterpretasikan hasil positif dan sebagian negatif. Rahayuningsih *et al.* (2018), dan Darmayasa (2008), melaporkan bahwa isolat *Bacillus* sp. menunjukkan uji indol negatif. Habibie *et al.* (2014), melaporkan bahwa pengujian sitrat pada *B. lichenformis* menginterpretasikan hasil negatif dan pada *B. aerius* positif. Ismail *et al.* (2018), melaporkan bahwa uji katalase BAL menginterpretasikan hasil negatif. Kelompok BAL tidak membutuhkan O₂ dalam pertumbuhannya karena kelompok BAL termasuk ke dalam golongan bakteri anaerob. Puspita *et al.* (2017), melaporkan bahwa pengujian oksidase pada isolat *Bacillus* sp. menginterpretasikan hasil positif.

Flori *et al.* (2020), melaporkan bahwa pada uji oksidatif-fermentatif, *Bacillus* spp. menunjukkan hasil positif pada medium yang diberi dan yang tidak diberi parafin, hal ini menunjukkan bahwa *Bacillus* spp. bersifat fakultatif anaerob. Anggota genus *Bacillus* bersifat aerob, anaerob dan fakultatif anaerob dalam kebutuhan oksigen (Vos *et al.*, 2009).

Pengujian fermentasi karbohidrat pada *Bacillus* sp. LG113 menunjukkan hasil positif pada glukosa dan sukrosa, sedangkan laktosa negatif. Pengujian nutrisi menunjukkan isolat LG113 mampu menggunakan glukosa, sukrosa dan fruktosa, sebagai satu-satunya sumber karbon, sebaliknya tidak pada laktosa, maltosa dan manitol. Sebagian besar *Bacillus* sp. dapat menggunakan glukosa, sukrosa dan fruktosa sebagai satu-satunya sumber karbon serta dapat memfermentasikan glukosa dan sukrosa (Vos *et al.*, 2009). Triandini & Suryadi (2018), melaporkan bahwa isolat *Bacillus* sp. menginterpretasikan hasil positif pada glukosa dan sukrosa serta negatif pada laktosa.

Tabel 2. Hasil karakterisasi bakteri amilolitik isolat LG113

Karakterisasi	Hasil	Karakterisasi	Hasil
Makromorfologi:		Fermentasi Karbohidrat:	
Bentuk koloni	Bulat	Glukosa (A/G)	+/+
Permukaan koloni	Mengkilap	Laktosa (A/G)	-/-
Ukuran koloni	Kecil (3mm)	Sukrosa (A/G)	+/+
Tepi koloni	Rata	Nutrisional:	
Elevasi koloni	Timbul/Raised	Glukosa	+
Warna koloni	Cream putih	Laktosa	-
Mikromorfologi :		Sukrosa	+
Bentuk sel	Batang	Fruktosa	+
Dinding sel	Gram +	Maltosa	-
Endospora	ada	Manitol	-
Motilitas	motil	Fisiologis:	
Biokimiawi :		Suhu 4 °C	-
Indol	-	Suhu 55 °C	+
Sitrat	+	pH 3	-
Oksidase	+	pH 9	-
Katalase	+		
Oksidatif/Fermentatif	+/+		

Pengujian fisiologis bakteri amilolitik *Bacillus* sp. LG113 menunjukkan bahwa isolat tidak tumbuh pada suhu 4°C dan tumbuh pada suhu 55°C. Isolat LG113 merupakan bakteri neutrofilik karena tidak tumbuh pada pH 3 dan 9. Vos *et al.* (2009), menjelaskan bahwa anggota genus *Bacillus* tidak dapat tumbuh pada suhu 4°C dan beberapa strain dapat tumbuh pada suhu 55°C, meskipun pertumbuhannya tidak sebaik pada suhu optimum. Suhu optimum *Bacillus* sp. pada umumnya berkisar 28-40°C. *Bacillus* sp. tidak dapat tumbuh pada pH 3 dan 9, karena pH optimum *Bacillus* sp. berkisar pada pH 5,5-8,5. Islamiah *et al.* (2017), melaporkan bahwa isolat *Bacillus* sp. tumbuh pada suhu 28-37°C dan suhu maksimumnya 40°C. *Bacillus* sp. tumbuh rata-rata pada pH 6-7. Behera *et al.* (2016), menyatakan bahwa beberapa bakteri asal mangrove, salah satunya yakni anggota genus *Bacillus* hidup pada rentang pH 5-7 dengan suhu maksimum 40°C.

SIMPULAN

Sepuluh isolat bakteri asal mangrove (LG108, LG85, LG50, LG8, LG37, LG21, LG113, LG20, LG45 dan LG13) menunjukkan kemampuan amilolitik dengan nilai indeks amilolitik berkisar antara 0,36-9,86. Isolat LG113 memiliki kemampuan amilolitik tertinggi dengan nilai indeks amilolitik 9,86. Aktivitas amilase isolat ini memiliki suhu optimum pada 37°C dengan aktivitas amilase sebesar 2,13 U/mL dan pH optimum adalah 6 dengan aktivitas amilase sebesar 2,14 U/mL. Berdasarkan karakter morfologi dan fisiologi, isolat LG113 termasuk ke dalam genus *Bacillus*.

Ucapan terima kasih

Terima kasih kepada projek penelitian yang didanai oleh Badan Layanan Umum (BLU) Unsoed 2020 dengan skema penelitian Riset Peningkatan Kompetensi.

DAFTAR REFERENSI

- Arun, C. & Sivashanmugam, P., 2017. Study on Optimization of Process Parameters for Enhancing the Multi-Hydrolytic Enzyme Activity in Garbage Enzyme Produced from Preconsumer Organic Waste. *Bioresource Technology*, 226, pp. 200-210.
- Behera, B.C., Singdevsachan, S.K., Mishra, R R., Sethi, B.K., Dutta, S.K. & Thatoi, H.N., 2016. Phosphate Solubilising Bacteria from Mangrove Soils of Mahanadi River Delta, Odisha, India. *World journal of agricultural research*, 4(1), pp. 18-23.
- Cappuccino, J.G. & Sherman, N. 2014. *Microbiology: A Laboratory Manual*, 10th Edition. England: Pearson Education Press.
- Carvalho, R.V.D., Correa, T.L.R., Silva, J.C.M.D., Mansur, L.R.C.D O. & Martins, M.L.L., 2008. Properties of an Amylase from Thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1), pp. 102-107.
- Darmayasa I.B.G., 2008. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Pendeградasi Lipid (Lemak) pada Beberapa Tempat Pembuangan Limbah dan Estuari DAM Denpasar. *Jurnal Bumi Lestari*, 8(2), pp. 122-127.
- Fatoni, A. & Zufahair. 2012. Thermophilic Amylase from *Thermus* sp. Isolation and Its Potential Application for Bioethanol Production. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 34 (5), pp. 525-531
- Flori, F., Mukarlina, M. & Rahmawati, R., 2020. Karakterisasi *Bacillus* spp. dan *Fusarium* sp. dari Tanaman Lada (*Piper nigrum* L.) di Desa Jaga. *Protobiont*, 9(1), pp. 50-55.
- Habibie, F.M., Wardani, A K. & Nurcholis, M., 2014. Isolasi dan Identifikasi Molekuler Mikroorganisme Termofilik Penghasil Xilanase dari Lumpur Panas Lapindo. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 2(4), pp. 231-238.
- Islamiah, D. N. & Rahmawati, R. L., 2017. Jenis-jenis Bakteri Rizosfer Kawasan Tanah Mangrove Avicennia di Kelurahan Terusan, Kecamatan Mempawah Hilir, Kalimantan Barat. *Protobiont*, 6(3), pp. 165-172.
- Istia'nah, D., Utami, U. & Barizi, A., 2020. Karakterisasi Enzim Amilase dari Bakteri *Bacillus megaterium* pada Variasi Suhu, pH dan Konsentrasi Substrat. *Jurnal Riset Biologi dan Aplikasinya*, 2(1), pp. 11-17.
- Kresnawaty, I., Wahyu, R. & Sasongko, A., 2019. Aktivitas Amilase Bakteri Amilolitik Asal Larva *Black Soldier Fly* (*Hermetia illucens*). *Menara Perkebunan*, 87(2), pp. 140-146.
- Nurfajriyah, S., Inggraini, M. & Ilsa, N.A., 2017. Skrining Rhizobakteri Mangrove *Rhizosphora* sp. Penghasil Amilase. *Jurnal Mitra Kesehatan*, 1(1), pp. 12-17.
- Pramono, H., Mariana, A., Ryandini, D., Sudiana, E. 2021. Diversity of Cellulolytic Bacteria Isolated from Coastal Mangrove Sediment in Logending Beach, Kebumen, Indonesia. *Biodiversitas* 22(4), pp.1869-1878
- Purnawan, A., Capriyanti, Y., Kurniatin, P.A. & Rahmani, N., 2016. Optimasi Produksi Enzim Amilase dari Bakteri Laut Jakarta (*Arthrobacter arilaitensis*). *Jurnal Biologi Indonesia*, 11(2), pp. 215-244.

- Puspita, F., Ali, M. & Pratama, R., 2017. Isolasi dan Karakterisasi Morfologi dan Fisiologi Bakteri *Bacillus* sp. Endofitik dari Tanaman Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Jurnal Agroteknologi Tropika*, 6(2), pp. 44-49.
- Rahayuningsih, T., Isnatin, U. & Parwi, P., 2018. Isolasi dan Seleksi Bakteri sebagai Agen Bioremediasi Limbah Cair Pabrik Kayu Putih. *Jurnal Agri-Tek: Jurnal Penelitian Ilmu-Ilmu Eksakta*, 19(2), pp. 96-99.
- Rismawati, Y., Bahri, S. & Prismawiryanti, P., 2016. Produksi Glukosa dari Jerami Padi (*Oryza sativa*) Menggunakan Jamur *Trichoderma* sp. *KOVALEN: Jurnal Riset Kimia*, 2(2), pp. 67-76.
- Rodriguez, V.B., Alameda, E.J., Gallegos, J.M., Requena, A.R. & Lopez, A.G., 2006. Enzymatic Hydrolysis of Soluble Starch with an α -Amylase from *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology progress*, 22(3), pp. 718-722.
- Sahoo, K. & Dhal, N.K. & 2009. Potential Microbial Diversity in Mangrove Ecosystems: A Review. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences* 38(2), pp. 249-256.
- Silitonga, L. R., Nursyirwani, N. & Effendi, I., 2019. Isolation, Identification and Sensitivity of Amylolytic Bacteria from Mangrove Ecosystem Sediment in Purnama Marine Station Dumai on the Pathogenic Bacteria. *Asian Journal of Aquatic Sciences*, 2(3), pp. 257-266.
- de Souza, P.M. & de Oliveira e Magalhães, P. 2010. Application of Microbial α -Amylase in Industry—A Review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, pp. 850-861
- Subagiyo, S., Djarod, M.S.R. & Setyati, W.A., 2017. Potensi Ekosistem Mangrove sebagai Sumber Bakteri untuk Produksi Protease, Amilase dan Selulase. *Jurnal Kelautan Tropis*, 20(2), pp. 106-111.
- Sudin, S., Sulistijowati, R. & Hermain, R.M. 2020. Penapisan dan Pola Pertumbuhan Bakteri Kitinolitik dari Cangkrang Rajungan (*Portunus pelagicus*). *Jambura Fish Processing Journal*, 2(1), pp. 36-45.
- Supriyanti, F.M.T. & Heryanto, T.E., 2013. Penentuan Aktivitas Amilase Kasar Termofil *Bacillus subtilis* Isolat Kawah Gunung Darajat Garut, Jawa Barat. *Bionatura Jurnal Ilmu-ilmu Hayati dan Fisik*, 15(2), pp. 107-113.
- Triandini, I.G.A.A.H. & Suryadi, B.F., 2018. Uji Aktivitas dan Produksi Antibakteri *Bacillus lentus* yang diisolasi dari Sistem Pencernaan Landak Laut dalam Menghambat Bakteri Penyebab Infeksi pada Kehamilan. *Jurnal Sangkareang Mataram*, 4(2), pp. 34-40.
- Vaikundamoorthy, R., Rajendran, R., Selvaraju, A., Moorthy, K. & Perumal, S., 2018. Development of Thermostable Amylase Enzyme from *Bacillus cereus* for Potential Antibiofilm Activity. *Bioorganic chemistry*, 77, pp. 494-506.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A. & Whitman, W.B., 2009. *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes. 2nd Edition*. New York: Springer Science & Business Media.
- Wahyuningsih, S.S., Mursyanti, E. & Atmodjo, P.K., 2019. Pola Pertumbuhan dan Produksi α -Amilase *Bacillus amyloliquefaciens* pada Substrat Pati Jagung dengan Variasi pH Awal Media dan Waktu Inkubasi. *Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati*, 9(2), pp. 84-91.
- Wulandhari, P.S., Rachmawati, D. & Susilowati, T. 2017. Pengaruh Kombinasi Ekstrak Nanas dalam Pakan Buatan dan Probiotik pada Media terhadap Efisiensi Pemanfaatan Pakan dan Pertumbuhan Ikan Tawes (*Puntius javanicus*). *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 6(4), pp. 157-166.
- Yasin, M.N., Astuti, W. & Gunawan, R., 2017. Screening Bakteri Penghasil Amilase dari Sedimen Sumber Air Panas Dondang Muara Jawa. *Jurnal Atomik*, 2(2), pp. 213-215.
- Zubaidah, A., Prasetyo, D., Handajani, H., Rohmah, S. P. & Puspita, D. A., 2019. Screening Bakteri Selulolitik dan Amilolitik pada Rumen Sapi sebagai Kandidat Probiotik Pada Budidaya Ikan secara *In Vitro*. *Jurnal Riset Akuakultur*, 14(4), pp. 261-271