

AKTIVITAS AMILASE PENDEGRADASI PATI MENTAH DARI BAKTERI TANAH TEMPAT PEMBUANGAN AKHIR BUKIT PINANG

AMYLASE ACTIVITY AS DEGRADATION OF RAW STARCH FROM SOIL BUKIT PINANG LANDFILL BACTERIUM

Amanda Aulia Putri, Winni Astuti*, Djihan Ryn Pratiwi

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mulawarman
Jalan Barong Tongkok, Kampus Gn. Kelua, Samarinda 75123, Kalimantan Timur, Indonesia

*Corresponding Author : winniastuti@fmipa.unmul.ac.id

Article History

Submitted : 01 July 2024

Accepted: 28 August 2024

ABSTRACT

Raw starch-degrading amylase (RSDA) is a hydrolytic enzyme that can degrade raw starch into glucose. This study was conducted to obtain raw starch-degrading amylase-producing bacteria from the soil of the Bukit Pinang Landfill, Samarinda City. Isolation of bacteria using the spread plate method. Screening of RSDA-producing bacteria using nutrient media to contain raw starch. Isolation of bacteria obtained 10 single colonies of bacteria. The isolated bacteria were selected for their ability to produce RSDA. All single colonies of bacteria could produce RSDA and their activity was tested quantitatively using the 3,5 Dinitrosalicylic Acid (DNS) method. Bacteria with the TPA 1 colony code had the highest activity of 3.837 U/mL.

Keywords: Bukit Pinang landfill, bacteria, raw starch degrading amylase.

1. PENDAHULUAN

Enzim berperan untuk mempercepat reaksi-reaksi kimia sehingga banyak digunakan dalam bidang-bidang industri. Dalam industri minuman alkohol, enzim digunakan untuk memecah pati menjadi gula.¹ Pada industri detergen, enzim digunakan sebagai bahan penghilang noda pada pakaian.² Enzim-enzim tersebut termasuk enzim hidrolase yaitu amilase

Enzim hidrolase merupakan enzim yang dapat memecah zat kompleks menjadi zat yang lebih sederhana dengan bantuan air. Salah satu enzim hidrolase adalah amilase. Amilase dapat memecah pati menjadi gula.³ Proses hidrolisa pati oleh enzim amilase memiliki beberapa tahapan yaitu gelatinisasi, likuifikasi dan sakarifikasi. Pada tahapan gelatinisasi yaitu terbentuknya gel pada granula pati yang diakibatkan penyerapan air saat proses pemanasan.⁴

Saat ini, amilase yang banyak dikembangkan yaitu amilase pendegradasi pati mentah (APPM). APPM merupakan amilase yang dapat menghidrolisis pati tanpa melalui proses gelatinisasi (pati mentah) menjadi gula sederhana. Enzim ini memiliki banyak keuntungan bagi bidang industri yang menggunakan bahan pati. Pada industri tersebut diperlukan energi yang besar untuk proses produksinya karena industri menggunakan bahan pati memerlukan proses gelatinisasi dengan suhu tinggi. APPM dapat bekerja memecah pati tanpa harus melalui proses gelatinisasi dibandingkan proses hidrolisa pati secara konvensional yang memerlukan pemanasan. Oleh karena itu, enzim ini dapat menghemat konsumsi energi menjadi lebih kecil

selama proses produksi karena dihilangkannya proses pemanasan untuk gelatinisasi. Selain itu, dengan menggunakan APPM dapat mengurangi biaya produksi akibat diperlukannya energi

This is an open-access article under the [CC-BY-SA](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/) license.



yang besar pada proses pemanasan pada pati dan proses produksinya mudah untuk dimodifikasi.⁵

Adapun enzim APPM dapat diperoleh dari tanaman, hewan hingga mikroorganisme. Enzim APPM yang saat ini banyak dikembangkan berasal dari mikroorganisme, khususnya bakteri. Pada penelitian yang dilakukan oleh Vidilaseris dkk. (2009) telah mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri yang bersumber dari air laut Cilauteuren Pameungpeuk, Garut. Bakteri tersebut menghasilkan enzim amilase yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi pati mentah.⁶ Nurachman dkk. (2010) melakukan penelitian dan diperoleh bakteri penghasil amilase pendegradasi pati mentah yang berasal dari permukaan karang laut tropis *Acropora* sp. pada Perairan Bandengan, Jepara.⁷ Penelitian lain yang dilakukan oleh Puspasari dkk. (2011) mendapatkan bakteri *Bacillus aquimaris* MKSC 6.2. penghasil amilase pendegradasi pati mentah yang diisolasi dari karang lunak *Sinularia* sp.⁸ Berdasarkan penelitian di atas, amilase pendegradasi pati mentah diisolasi dari kekayaan alam laut. Namun, hanya sedikit penelitian mengenai amilase pendegradasi pati mentah yang berasal dari tanah.

2. METODE

2.1 Alat dan Bahan

2.1.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *laminar air flow*, tabung reaksi, tabung mikro, cawan petri, pipet mikro ukuran 0,5 – 10 μ L, pipet mikro 10-100 μ L, tip pipet mikro, wadah sampel, gelas ukur, *beaker glass*, *hotplate*, neraca digital, labu Erlenmeyer, *freezer*, *incubator*, hoki stik, *shaker waterbath*, *autoclave* dan spektrofotometer *UV-Visible*.

2.1.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi sampel tanah dari TPA Bukit Pinang, Samarinda, akuades, etanol, nutrien agar (NA), NaCl, ekstrak *yeast*, tripton, gliserol, iodium, glukosa, amilum, pati beras, *3,5-dinitrosalicylic acid* (DNS), K-Na-tartrat, serta NaOH.

2.2 Prosedur Penelitian

2.2.1. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel tanah dilakukan di TPA, Jln. P. Suryanata, Kel. Bukit Pinang, Kec. Samarinda Ulu, Kota Samarinda pada 3 titik yaitu titik pertama (-0.457052,117.115849), titik kedua (-0.457595,117.115710) dan titik ketiga (-0.457639,117.114780). Ketiga titik sampel tanah tersebut diambil dari tanah yang berada diatas tumpukan sampah pada kedalaman 10-20 cm menggunakan alat penggerus tanah. Sampel tanah dimasukkan ke dalam wadah plastik. Lalu wadah ditutup dengan rapat dan diberi label. Kemudian, sampel dibawa ke Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Mulawarman.

2.2.2. Isolasi Bakteri dari Sampel Tanah TPA Bukit Pinang

Sampel tanah TPA Bukit Pinang sebelum diisolasi dibuat menjadi suspensi. Suspensi sampel diencerkan hingga 100x pengenceran menggunakan akuades steril. Setelah itu, sebanyak 0,1 mL suspensi sampel tanah yang telah diencerkan dimasukkan kedalam permukaan media nutrien agar 2,5% dan disebar menggunakan hoki stik dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Koloni tunggal bakteri yang tumbuh diinokulasi pada 5 mL media cair Luria Bertani (*yeast* 0,5%, NaCl 1% dan tripton 1%) pada tabung reaksi yang berbeda. Bakteri-bakteri yang telah diinkubasi disimpan dalam bentuk gliserol stok (80% bakteri dan 20% gliserol).

2.2.3. Seleksi Bakteri Penghasil Amilase Pendegradasi Pati Mentah Secara Kualitatif

Seleksi secara kualitatif digunakan media nutrien agar (2,5%) mengandung pati mentah steril. Pada media ditambahkan pati beras dan dihomogenkan. Lalu media tersebut dituang pada cawan petri steril dan ditunggu hingga memadat. Masing-masing koloni tunggal bakteri diambil satu ose dan digores pada permukaan agar. Setelah itu, biakan bakteri diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Bakteri yang telah diinkubasi ditambahkan larutan iodium. Zona bening yang terbentuk disekitar bakteri menunjukkan bakteri menghasilkan amilase pendegradasi pati mentah.

2.2.4. Produksi Enzim

Setiap koloni bakteri penghasil amilase pendegradasi pati mentah diinokulasi pada 250 mL media cair Luria Bertani (tripton 1%, yeast 0,5% dan NaCl 1 %) steril. Lalu media berisi bakteri tersebut diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam menggunakan *shaker water bath*. Bakteri yang telah diinkubasi, disaring untuk mendapatkan filtrat. Filtrat tersebut merupakan enzim.

2.2.5. Uji Aktivitas Amilase Pendegradasi Pati Mentah

Aktivitas Amilase Pendegradasi Pati Mentah (APPM) yaitu filtrat berupa enzim APPM dengan 1% pati mentah beras dan diinkubasi selama 60 menit. Kemudian, 50 μ L masing-masing larutan hasil inkubasi ditambahkan pereaksi DNS sebanyak 50 μ L dan dihomogenkan. Masing-masing larutan yang telah homogen dipanaskan pada air mendidih selama 5 menit dan didinginkan pada suhu ruang. Setelah dingin, masing-masing larutan tersebut ditambahkan akuades sebanyak 900 μ L. Masing-masing larutan yang telah ditambahkan akuades diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer visibel dengan panjang gelombang 540 nm. Setelah nilai absorbansi didapatkan, konsentrasi glukosa dihitung dengan memasukkan nilai absorbansi tersebut kedalam persamaan garis dari kurva standar glukosa yang telah diperoleh. Kemudian aktivitas amilase pendegradasi pati mentah dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut (**Persamaan 1**).

$$\text{Aktivitas APPM} = \frac{C}{T} \times 1 \text{ Unit}/\mu\text{mol} \quad \text{Persamaan 1}$$

Keterangan :

C = konsentrasi glukosa per mL ekstrak kasar enzim (μ mol)

T = waktu inkubasi (menit)

Aktivitas enzim yang diperoleh dinyatakan sebagai 1 unit enzim. Unit didefinisikan sebagai banyaknya μ mol glukosa hasil degradasi oleh 1 mL enzim amilase pendegradasi pati mentah per menit.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Isolasi Bakteri dari Sampel Tanah TPA Bukit Pinang

Isolasi bakteri dari tanah TPA bertujuan untuk mendapatkan bakteri dalam bentuk koloni tunggal. Sampel tanah diencerkan 100x yang bertujuan untuk mengurangi kepadatan bakteri pada sampel sehingga diperoleh koloni tunggal.⁹ Isolasi bakteri dilakukan dengan metode cawan sebar menggunakan hoki stik pada permukaan media nutrisi agar, pada media tersebut bakteri akan membentuk koloni sel yang tetap pada tempatnya sehingga mudah untuk diinokulasi.¹⁰ Pada proses inkubasi, posisi cawan petri dibalik yang bertujuan untuk menghindari menetesnya air dari dinding tutup cawan petri.¹¹ Setelah diinkubasi selama 24 jam, diperoleh koloni tunggal bakteri yang ditunjukkan pada **Gambar 1**. Hasil isolasi bakteri dari sampel tanah TPA Bukit Pinang diperoleh 10 koloni tunggal bakteri dan diberi kode TPA1-10.

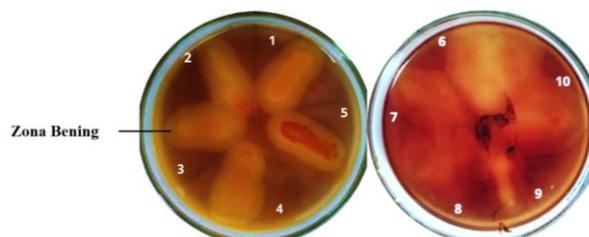


Gambar 1. Hasil Isolasi Bakteri dari Tanah TPA Bukit Pinang

3.2 Seleksi Bakteri Penghasil Amilase Pendegradasi Pati Mentah Secara Kualitatif

Seleksi bakteri penghasil APPM secara kualitatif bertujuan untuk menyeleksi ada atau tidaknya bakteri penghasil enzim APPM ekstraselular. Seleksi ini dilakukan dengan

menumbuhkan bakteri pada media nutrisi agar yang mengandung pati mentah beras. Pati mentah beras merupakan substrat enzim APPM. Setelah diinkubasi selama 24 jam, bakteri yang tumbuh pada media diuji dengan penambahan iodium yang berfungsi sebagai pereaksi untuk mengetahui ada atau tidak pati. Larutan iodium yang ditambahkan berikatan dengan molekul pati yang menghasilkan kompleks berwarna biru kehitaman. Warna tersebut menunjukkan bahwa adanya pati pada media. Sebaliknya, jika pada media tersebut menunjukkan zona bening maka pati telah didegradasi menjadi molekul sederhana.¹² Hasil seleksi secara kualitatif ditunjukkan pada **Gambar 2**.



Gambar 2. Hasil Seleksi Isolat Bakteri Penghasil APPM

Hasil seleksi secara kualitatif diperoleh 10 isolat bakteri yang memiliki aktivitas APPM. Bakteri penghasil APPM ditandai dengan adanya zona bening yang muncul disekitar bakteri. Zona bening menunjukkan bakteri tersebut menghasilkan enzim ekstraseluler APPM. Enzim ekstraseluler merupakan enzim yang bekerja diluar sel namun disintesis di dalam sel.¹³

3.3 Produksi Enzim

Produksi Amilase Pendegradasi Pati Mentah (APPM) dilakukan untuk memperbanyak enzim APPM dari bakteri yang telah dipilih pada tahap seleksi. Produksi APPM dilakukan dengan menumbuhkan bakteri terpilih pada media LB selama 24 jam dengan pengadukan. Enzim APPM hasil produksi diperoleh dengan menyaring kultur bakteri. Residu merupakan bakteri sedangkan filtrat berisi enzim APPM digunakan untuk uji penentuan kondisi optimum.

3.4 Uji Aktivitas Amilase Pendegradasi Pati Mentah

Uji aktivitas Amilase Pendegradasi Pati Mentah (APPM) dilakukan untuk memperoleh aktivitas enzim APPM dalam mendegradasi pati mentah. Sebanyak 10 enzim APPM ditentukan aktivitasnya berdasarkan jumlah gula reduksi yang dihasilkan dari degradasi pati mentah dengan menggunakan uji DNS (*Dinitrosalicylic Acid*).⁸ Uji positif DNS ditandai adanya perubahan warna menjadi merah kecoklatan yang menunjukkan bahwa gula reduksi tersebut mereduksi gugus nitro (-NO₂) menjadi amina (-NH₂) pada DNS. Sedangkan DNS mengoksidasi gugus aldehyd (-CHO) menjadi gugus karboksil (-COOH) pada gula reduksi.¹⁴ Nilai aktivitas APPM yang diperoleh disajikan dalam **Tabel 1**.

Tabel 1. Aktivitas APPM

Isolat Bakteri	Aktivitas APPM (U/mL)
TPA1	3,837
TPA 2	2,880
TPA 3	1,469
TPA 4	0,932
TPA 5	1,083
TPA 6	1,184
TPA 7	0,193
TPA 8	0,529
TPA 9	0,932
TPA10	0,714

Hasil seleksi bakteri secara kuantitatif yang diperoleh isolat bakteri TPA1 memiliki nilai aktivitas APPM tertinggi sebesar 3,837 U/mL.

4. KESIMPULAN

Sebanyak 10 isolat bakteri dari sampel tanah TPA Bukit Pinang, Samarinda mampu menghasilkan amilase pendegradasi pati mentah dengan kode TPA1-10. Isolat TPA1 memiliki aktivitas amilase pendegradasi pati mentah tertinggi sebesar 3,837 U/mL.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kurniawan, T. B.; Bintari, S. H.; & Susanti, R. Efek Interaksi Ragi Tape dan Ragi Roti terhadap Kadar Bioetanol Ketela Pohon (*Manihot Utilissima, Pohl*) Varietas Mukibat. *Biosaintifika* **2014**, 6(2), 152–60.
2. Ariandi. Pengenalan Enzim Amilase (Alpha-Amylase) dan reaksi Enzimatiknya Menghidrolisis Amilosa Pati menjadi Glukosa. *Jurnal Dinamika* **2016**, 7(1), 74–82.
3. Naully, P. G. Isolasi dan Kloning Gen α -Amilase dari Bakteri Termofilik pada *Escherichia coli* DH5 α . *Sigma-Mu* **2016**, 8(1), 35–43.
4. Ainezzahira; Multri, H. D.; Kiyat, W. E.; Nacing, N.; & Dari, D. W. Pemanfaatan Enzim Alpha-amilase pada Modifikasi Pati Singkong sebagai Substitusi Gelatin Produk Marsmallow. *Jurnal Agroindustri Halal* **2019**. 5(2), 220–227.
5. Nangin, D.; & Sutrisno, A. Enzim Amilase Pemecah Pati Mentah dari Mikroba: Kajian Pustaka. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* **2015**, 3(3), 1032–1039.
6. Vidilaseris, K.; Hidayat, K.; Retnoningrum, D.S.; Nurachman Z.; Noer, A.S.; & Natalia, D. Biochemical Characterization of a Raw Starch Degrading α -Amylase from the Indonesian Marine Bacterium *Bacillus* sp. ALSHL3. *Biologia* **2009**, 64(4), 1047–1052.
7. Nurachman, Z.,;Kono, A.; Radjasa, O. K.; & Natalia, D. (2010). Identification a Novel Raw-Starch-Degrading- α -Amylase from a Tropical Marine Bacterium. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* **2010**, 6(4), 300–306.
8. Puspasari, F.; Nurachman, Z.; Noer, A. S.; Padjasa, O. K.; Maarel, M. J. E. C. V. D.; & Natalia, D. Characteristics of Raw Starch Degrading α -Amylase from *Bacillus aquimaris* MKSC 6.2 Associated with Soft Coral *Sinularia* sp. *Pati-Starke* **2011**, 63(8), 461–467.
9. Kadri, A. N.; Gelgel, K. T. P.; & Suarjana, I. G. K. Perbedaan Cara Penyebaran Suspensi terhadap Jumlah Bakteri pada Media Eoisin Methylene Blue Agar. *Indonesian Medicus Veterinus* **2015**, 4(3), 205–212.
10. Sabbathini, G.C.; Pujiyanto, S.;Wijanarka; & Lisdiyanti, P. Isolasi dan Identifikasi bakteri Genus *Sphingomonas* dari Daun Padi (*Oryza sativa*) di Area Persawahan Cibinong. *Jurnal Biologi* **2017**, 6(1), 59–64.
11. Wardhani, A. K.; Uktolseja, J. L. A.; dan Djohan. Identifikasi Morfologi dan Pertumbuhan Bakteri pada Cairan Terfermentasi Silase Pakan Ikan. *Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Biologi dan Saintek (SNPBS)* **2020**, 411–419.
12. Jannah, S. N.; Hanifa, Y. R.; Utomo, A. B.; Prambodo, A. K. D.; & Lunggani, A. T. Isolasi dan Potensi Enzim Hidrolase Bakteri Symbion *Padina* sp. dari Pantai Lengkuas Belitung. *Bioma* **2021**, 23(1), 11–17.
13. Wahyudiati, D. *Biokimia*. Mataram: Leppim. **2017**.
14. Gusakov, A. V. Comparison of Two Method for Assaying Reducing Sugar in The Determination of Carbohydrate Activities. *Hindawi Publishing Corporation Enzyme Research*. **2011**.