

AKTIVITAS AMILASE PENDEGRADASI PATI MENTAH DARI BAKTERI AIR SUNGAI KARANG MUMUS

AMYLASE ACTIVITY AS DEGRADATION OF RAW STARCH FROM WATER OF KARANG MUMUS RIVER BACTERIUM

Rabiatul Adawiyah, Winni Astuti*, Djihan Ryn Pratiwi

Program Studi S1 Kimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mulawarman
Jalan Barong Tongkok No. 4 Kampus Gunung Kelua, Samarinda, 75123

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

Article History

Submitted : 01 July 2024

Accepted: 24 February 2025

ABSTRACT

Raw starch degrading amylase (RSDA) is an enzyme that can degrade raw starch into glucose without going through the gelatinization process. This research was conducted to isolate RSDA producing bacteria originating from the Karang Mumus River in Samarinda City. Isolation and selection of RSDA producing bacteria was carried out using a distribution method using nutrient media to contain raw starch. The results of bacterial isolation obtained 14 single colonies of bacteria. A total of 5 bacterial colonies out of 14 bacteria were able to produce RSDA. Then the RSDA enzyme from the 5 bacteria was tested for amylase activity quantitatively using the dinitrosalicylic acid (DNS) method. One of the five bacteria with colony code KM 5 exhibited the highest activity, namely 0.332 U/mL.

Keywords: Bacterium, Isolation, Raw Starch Degrading Amylase, Karang Mumus River.

1. PENDAHULUAN

Enzim adalah molekul protein yang berfungsi mengkatalisis reaksi metabolisme pada makhluk hidup di mana fungsi ini bisa dipengaruhi oleh faktor lingkungan misalnya konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, keasaman (pH) serta temperature.¹ Enzim merupakan salah satu produk bioteknologi yang potensial dan banyak digunakan di berbagai bidang industri. Penggunaan enzim yang semakin meningkat bisa menggantikan peran bahan kimia sintetik yang selama ini dipakai. Produksi dan perdagangan enzim didominasi oleh kelompok enzim hidrolitik, seperti katalase, protease, lipase dan amilase.²

Amilase adalah enzim yang mampu menghidrolisis amilum menjadi glukosa. Amilase bisa diperoleh dari semua makhluk hidup.³ Di bidang bioteknologi enzim amilase merupakan salah satu enzim yang paling penting, hal ini terhitung dari produksi amilase yang menyumbang sekitar 25-33% pada produksi enzim di seluruh dunia.² Amilase banyak dimanfaatkan pada teknologi bioproses dan dipakai berbagai industri seperti industri makanan, industri biodiesel dan industri kertas.⁴

Amilase dapat diisolasi dari berbagai jenis makhluk hidup seperti manusia, hewan, tanaman dan mikroba. Pada proses industri amilase menyumbang cukup tinggi produksi enzim seluruh dunia jadi untuk menurunkan tingkat konsumsi energi tersebut digunakan enzim amilase yang dapat memecah pati tanpa proses gelatinisasi. Penggunaan amilase pendegradasi pati mentah (APPM) dapat menurunkan tingkat konsumsi energi pada proses hidrolisis sehingga akan menurunkan biaya produksi. APPM yang paling banyak dikembangkan berasal dari mikroba.⁵

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



APPM yang berasal dari mikroba umumnya dapat digunakan pada berbagai jenis industri karena memiliki sifat yang lebih stabil di dibandingkan dengan APPM yang berasal dari hewan dan tanaman.⁵ Keunggulan lainnya APPM bisa diproduksi hingga skala tertentu yang produktivitasnya bisa di tingkatkan.⁶ Pada industri berbasis pati memberikan banyak manfaat seperti bisa menghemat energi dan waktu serta mengurangi biaya produksi secara signifikan jika di dibandingkan dengan proses konvensional.⁵

Beberapa penelitian telah memperoleh bakteri penghasil enzim amilase pendegradasi pati mentah. Penelitian Rida'i *et al.* (2017) memperoleh bakteri penghasil amilase pendegradasi pati mentah, yaitu *Bacillus* sp. APPM dari bakteri tersebut memiliki aktivitas optimum pada pH 6 dan suhu 50°C serta aktivitas spesifik sebesar 2893,47 U/mg.⁷ Frima *et al.* (2020) memperoleh bakteri penghasil amilase pendegradasi pati mentah, yaitu *Panninobacter phragmatetus*.⁸ APPM dari bakteri tersebut memiliki kondisi kerja optimum pada pH 7 dan suhu 45°C dengan aktivitas mendegradasi pati mentah sebesar 37,0688 µmol/mg. Puspasari *et al.* memperoleh bakteri penghasil amilase pendegradasi pati mentah, yaitu *Bacillus aquimaris* MKSC 6.2.⁹ APPM dari bakteri tersebut memiliki kondisi kerja optimum pada pH 6,5 dan suhu 50°C dengan aktivitas mendegradasi pati mentah sebesar 65-93%.

Sungai Karang Mumus merupakan salah satu sungai di Kota Samarinda yang mengalir dari hulu ke hilir sepanjang 34,7 km. Daerah hilir Sungai Karang Mumus bersebelahan dengan Pasar Segiri yang menjual kebutuhan sehari-hari masyarakat seperti ikan, sayur, buah-buahan dan lain-lain. Sampah yang dihasilkan Pasar Segiri kebanyakan dibuang langsung oleh masyarakat ke Sungai Karang Mumus dan menyebabkan sungai menjadi tercemar. Selain itu Sungai Karang Mumus juga digunakan oleh masyarakat sekitarnya untuk kegiatan-kegiatan rumah tangga, sehingga diduga Sungai Karang Mumus memiliki bakteri penghasil enzim APPM. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk menentukan aktivitas APPM dari isolat bakteri Sungai Karang Mumus.

2. METODE

2.1 Alat dan Bahan

2.1.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu *laminar air flow*, tabung reaksi, tabung mikro, cawan petri, pipet mikro, tip pipet mikro, *hotplate*, neraca digital, jarum ose, hoki stik, spatula, kaca arloji, batang pengaduk, tabung mikro, Erlenmeyer, *shaker waterbath*, *autoclave*, *magnetic stirrer*, dan spektrofotometer UV-Visible.

2.1.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu sampel air dari Sungai Karang Mumus, akuades, etanol, nutrien agar, NaCl, ekstrak yeast, tripton, pati mentah beras, iodium, glukosa, pereaksi 3,5-*dinitrosalicylic acid* (DNS), NaOH, K-Na-Tartrat, aluminium foil dan kain kasa.

2.2 Prosedur Penelitian

2.2.1. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel air dilakukan di Sungai Karang Mumus, Jln. Dr. Sutomo, Sidodadi, Kec. Samarinda Ulu, Kota Samarinda pada 3 titik berbeda, yaitu titik pertama (-0.481119,117.149508), titik kedua (-0.480664,117.149704) dan titik ketiga (-0.480225,117.148906). Sampel air diambil sebanyak 1500 mL dimasukkan kedalam wadah plastik. Lalu wadah ditutup dengan rapat dan diberi label. Selanjutnya sampel air dibawa ke Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Mulawarman.

2.2.2. Isolasi Bakteri dari Sampel Air Sungai Karang Mumus

Sebelum bakteri diisolasi, sampel air Sungai Karang Mumus diencerkan hingga 100x pengenceran menggunakan akuades steril. Setelah itu, sebanyak 0,1 mL sampel air Sungai Karang Mumus yang telah diencerkan dimasukkan ke dalam permukaan media nutrien agar

(NA) dan disebar menggunakan hoki stik dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Pada tiap koloni tunggal bakteri yang tumbuh, diambil satu ose dan dimasukkan ke dalam media cair luria bertani (LB). Lalu media berisi bakteri diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam menggunakan *shaker water bath*. Koloni tunggal bakteri yang telah diregenerasi disimpan dalam bentuk stok gliserol (20% gliserol dan 80% bakteri).

2.2.3. Produksi Enzim APPM

Setiap koloni bakteri penghasil APPM diinokulasi pada 250 mL media cair LB (Yeast 0,5%, Trypton 1% dan NaCl 1%) steril. Lalu media berisi bakteri tersebut diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam menggunakan *shaker water bath*. Bakteri yang telah diinkubasi, disaring untuk mendapatkan filtrat. Filtrat merupakan enzim APPM.

2.2.4. Produksi Enzim

Pada seleksi bakteri penghasil enzim APPM secara kualitatif digunakan media yaitu nutrisi agar (2,5%) mengandung pati mentah steril. Pada media ditambahkan pati mentah 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 di sekitar bakteri menunjukkan adanya bakteri penghasil APPM.

2.2.5. Penentuan Kurva Standar Glukosa

Penentuan dilakukan dengan menggunakan metode DNS. Pereaksi DNS dibuat menggunakan metode yang dilakukan oleh Puspasari *et al.* dengan komposisi 1% (w/v) DNS, 0,4 N NaOH dan 30% (w/v) K-Na-tartrat.¹⁰ Selanjutnya, larutan glukosa dibuat dengan konsentrasi 0 mM; 2 mM; 2,5 mM; 3 mM; 3,5 mM; 4 mM; 4,5 mM dan 5 mM. Kemudian sebanyak 50 μ L masing-masing larutan glukosa diambil dan dimasukkan ke dalam tabung mikro. Lalu 50 μ L pereaksi DNS ditambahkan ke dalam masing-masing tabung mikro dan dihomogenkan. Masing-masing tabung mikro tersebut dipanaskan selama 5 menit dan didinginkan pada suhu ruang. Setelah dingin, masing-masing larutan dalam tabung mikro tersebut ditambahkan 900 μ L akuades dan dihomogenkan. Masing-masing larutan tersebut diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer visibel dengan panjang gelombang 540 nm. Setelah nilai absorbansi di dapatkan, kurva standar glukosa dibuat dengan memplotkan masing-masing konsentrasi larutan glukosa dan nilai absorbansi sehingga diperoleh persamaan garis untuk menentukan kadar glukosa pada uji aktivitas APPM.

2.2.6. Seleksi Bakteri Penghasil Enzim APPM secara Kuantitatif

Seleksi bakteri penghasil enzim APPM secara kuantitatif diawali dengan menginokulasi koloni bakteri pada media cair LB. Koloni tunggal bakteri yang menghasilkan APPM diinokulasi pada media LB 50 mL dan diinkubasi selama 24 jam. Bakteri tersebut disaring dan diambil filtratnya. Filtrat berupa enzim APPM direaksikan dengan 1% pati mentah beras dan diinkubasi selama 48 jam. 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 yang telah ditambahkan akuades sebanyak 900 μ L. Masing-masing larutan yang telah ditambahkan akuades diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer *visible* dengan panjang gelombang 540 nm.

2.3 Analisis Data

Konsentrasi Glukosa dihitung dengan memasukkan nilai absorbansi ke dalam persamaan garis dari kurva standar glukosa yang telah diperoleh. Kemudian aktivitas APPM dihitung menggunakan **Persamaan 1** sebagai berikut.

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

Keterangan:

C = konsentrasi glukosa per mL ekstrak kasar enzim(μmol)

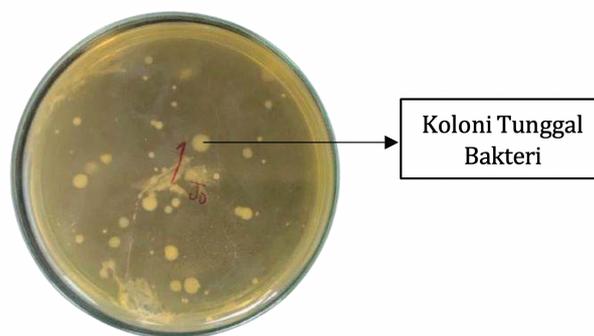
T = waktu inkubasi (menit)

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

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Isolasi Bakteri dari Sampel Air Sungai Karang Mumus

Sampel yang digunakan berasal dari air Sungai Karang Mumus, kemudian dilakukan isolasi bakteri untuk memperoleh koloni tunggal bakteri. Isolasi bakteri dilakukan dengan menggunakan metode cawan sebar. Hasil isolasi bakteri ditunjukkan pada **Gambar 1**.



Gambar 1. Hasil isolasi bakteri dari sampel air Sungai Karang Mumus.

Hasil isolasi bakteri dari sampel air Sungai Karang Mumus dipilih 14 koloni tunggal bakteri. Masing-masing koloni tunggal diberi kode KM (Karang Mumus), sehingga ke-14 koloni diberi kode KM 1-KM 14. Selanjutnya, koloni tunggal bakteri ditumbuhkan ke dalam media cair LB dan disimpan dalam bentuk stok gliserol. Koloni-koloni bakteri ini selanjutnya diseleksi sebagai penghasil enzim APPM.

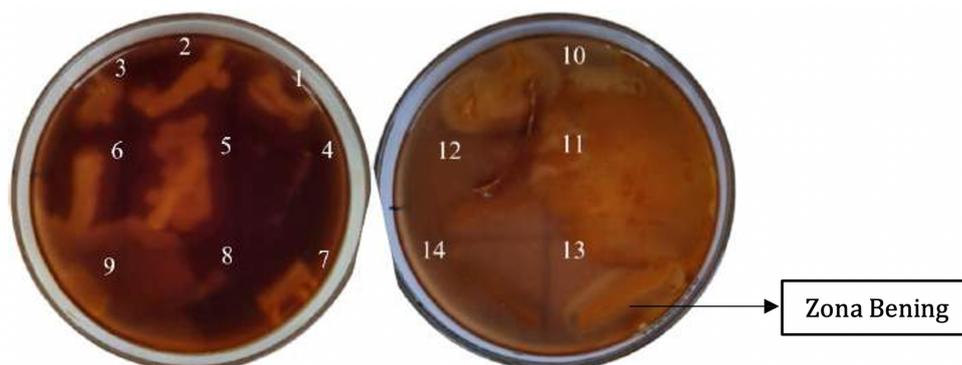
3.2 Produksi Enzim APPM

Produksi enzim APPM dilakukan untuk memperbanyak enzim APPM dari bakteri terpilih yang dari hasil tahap seleksi. Produksi enzim 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 mengandung enzim APPM. Selanjutnya, filtrat yang merupakan enzim APPM akan digunakan untuk penentuan kerja optimum enzim APPM.

3.3 Seleksi Bakteri Penghasil Enzim APPM secara Kualitatif

Seleksi bakteri penghasil enzim APPM secara kualitatif dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya bakteri penghasil enzim APPM ekstraselular. Media yang digunakan berupa media agar mengandung pati mentah. Pati mentah berfungsi sebagai substrat enzim APPM. Bakteri yang telah ditumbuhkan diatas media agar mengandung pati mentah ditetesi larutan iodium. Larutan iodium berfungsi sebagai indikator apakah media masih mengandung pati. Zona bening disekitar bakteri menunjukkan bahwa pati mentah yang terkandung di dalam media agar telah dihidrolisis oleh APPM dari bakteri, sehingga pati yang terdegradasi tidak dapat lagi berikatan dengan iodin. Sedangkan media yang berwarna biru kehitaman

menandakan bahwa pada daerah tersebut pati belum terhidrolisis. **Gambar 2** merupakan hasil seleksi bakteri penghasil enzim APPM secara kualitatif dari hasil isolasi bakteri sebelumnya.

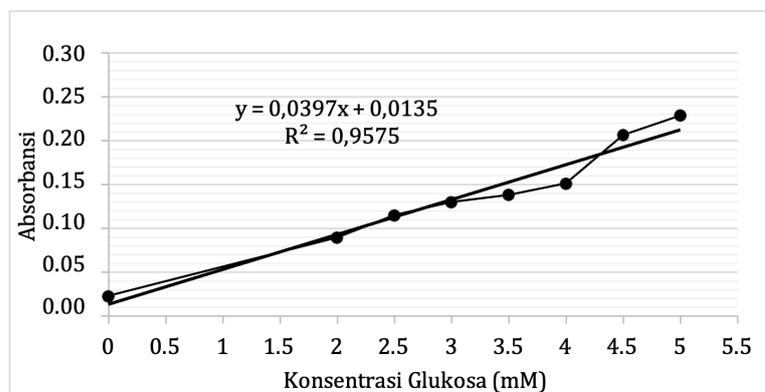


Gambar 2. Hasil seleksi bakteri penghasil enzim APPM secara kualitatif.

Hasil seleksi menunjukkan bahwa semua koloni bakteri dapat menghasilkan enzim APPM ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri (**Gambar 2**). Dari 14 isolat diperoleh 5 isolat dengan zona bening yang lebih besar, sehingga ke 5 isolat dengan kode Karang Mumus (KM) tersebut selanjutnya dilakukan seleksi secara kuantitatif. Lima isolat tersebut adalah KM 2, KM 5, KM 6, KM 11 dan KM 13.

3.4 Penentuan Kurva Standar Glukosa

Penentuan kurva standar glukosa dilakukan untuk menentukan hubungan antara konsentrasi glukosa dengan absorbansi menggunakan metode DNS. DNS akan bereaksi dengan gula pereduksi membentuk senyawa asam 3-amino-5-nitrosalisilat yang mampu menyerap radiasi gelombang elektromagnetik pada 540 nm.¹⁰ Grafik kurva standar glukosa ditunjukkan pada **Gambar 3**.



Gambar 3. Grafik kurva standar glukosa.

Grafik kurva standar glukosa menunjukkan persamaan garis dengan nilai $y = 0,0397x + 0,0135$ dan R^2 sebesar 0,9575. Persamaan ini digunakan untuk menghitung aktivitas enzim APPM pada penentuan kerja optimum enzim APPM.

3.5 Seleksi Bakteri Penghasil Enzim APPM secara Kuantitatif

Seleksi bakteri penghasil enzim APPM secara kuantitatif dilakukan untuk menentukan aktivitas APPM tertinggi dari ke lima isolat sebelumnya. Aktivitas enzim APPM ditentukan berdasarkan jumlah gula pereduksi yang terbentuk dari hasil degradasi pati oleh enzim APPM dan kemudian diuji menggunakan metode *Dinitrosalicylic Acid* (DNS). Jumlah gula pereduksi yang dihasilkan ditandai dengan adanya perubahan warna dari kuning menjadi merah kecoklatan. Hasil reaksi gula pereduksi dengan DNS diukur menggunakan spektrofotometer

visibel pada panjang gelombang 540 nm. Hasil seleksi bakteri penghasil enzim APPM secara kuantitatif ditunjukkan pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Hasil seleksi bakteri penghasil enzim APPM secara kuantitatif.

Kode Isolat Bakteri	Absorbansi (mM)	Aktivitas APPM (U/mL)
KM 2	0,309	0,104
KM 5	0,960	0,332
KM 6	0,305	0,116
KM 11	0,289	0,096
KM 13	0,222	0,072

Hasil seleksi bakteri penghasil enzim APPM secara kuantitatif, enzim dengan aktivitas tertinggi, yaitu enzim dari isolat KM 5 dengan aktivitas APPM sebesar 0,332 U/mL.

4. KESIMPULAN

Sebanyak 5 isolat bakteri penghasil APPM berhasil diisolasi dari air Sungai Karang Mumus Samarinda. Dari ke 5 isolat tersebut diperoleh isolat bakteri KM 5 memiliki aktivitas APPM tertinggi sebesar 0,332 U/mL.

DAFTAR PUSTAKA

1. Bahri, S.; Mirzan, M.; Hasan, M. Karakterisasi Enzim Amilase Dari Kecambah Biji Jagung Ketan (*Zea mays ceratina L.*). *Jurnal Natural Science* **2012**, 1(1), 132-143.
2. Ningtyas, N.; Mubarik, N.R.; Rahayuningsih, M. Penapisan dan Karakterisasi Amilase dari Bakteri Asal Ekoenzim (*Screening and Characterization of Amylase from Bacteria Derived from Eco-enzymes*). *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia (JIPI)* **2023**, 28(3), 441-448.
3. Istia'nah, D.; Utami, U.; Barizi, A. Karakterisasi Enzim Amilase dari Bakteri *Bacillus megaterium* pada Variasi Suhu, pH dan Konsentrasi Substrat. *Jurnal Riset Biologi dan Aplikasinya* **2020**, 2(1), 11-17.
4. Silaban, S.; Simamora, P. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Amilase dari Sampel Air Tawar Danau Toba. *Jurnal Kimia dan Pendidikan* **2018**, 3(2), 222-231.
5. Nangin, D.; Sutrisno, A. Enzim Amilase Pemecah Pati Mentah dari Mikroba: Kajian Pustaka. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* **2015**, 3(3), 1032-1039.
6. Soeka, Y.S. Optimasi dan Karakterisasi α -Amilase dari Isolat Aktinomisetes yang Berasal dari Kalimantan Timur. *Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati* **2010**, 10(3), 361-367.
7. Rida'i, M.T.A.A.; Astuti, W.; Erwin. Penapisan Bakteri Termofilik Penghasil Amilase dari Sumber Air Panas Dondang di Kecamatan Muara Jawa. *Prosiding Seminar Kimia FMIPA Universitas Mulawarman*, **2017**; pp 82-84.
8. Frima, F.K.; Satiyarti, R.B.; Anggraini, Y.; Syafitri, E.; Rini, I.A. Characteristics of Raw-Starch Degrading Amylase Bacteria from Natar Hot Spring Lampung. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi* **2020**, 23(7), 238-243.
9. Puspasari, F.; Nurachman, Z.; Noer, A.S.; Radjasa, 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.
10. Pratiwi, Y. H.; Ratnayani, O.; Wirajana, I. N. Perbandingan Metode Uji Gula Pereduksi dalam Penentuan Aktivitas α -L-Arabinofuranosidase dengan Substrat Janur Kelapa (*Cocos nucifera*). *Jurnal Kimia* **2018**, 12(2), 134-139.