

DIPA REGULER-UNP

LAPORAN PENELITIAN



**ISOLASI BAKTERI TERMOFILIK PENGHASIL AMILASE
DARI SUMBER AIR PANAS RIMBO PANTI, PASAMAN**

Oleh

**Irdawati, M.Si (Ketua)
Drs. Mades Fifendy, M.Biomed (Anggota)**

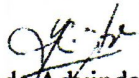
**Penelitian ini dibiayai oleh:
Dana DIPA/Rutin Universitas Negeri Padang
Surat Perjanjian kontrak
Nomor: 308 / UN35.2 / PG / 2011
Tanggal 19 Juli 2011**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2011**


LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN

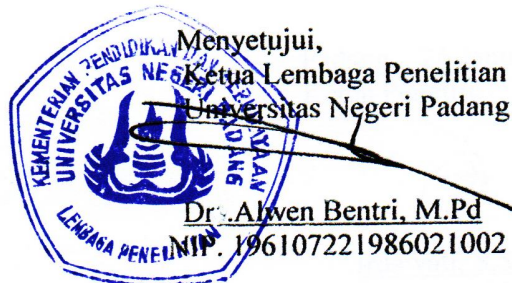
1. a. Judul Penelitian : Isolasi Bakteri Termofilik Penghasil Amilase dari
Sumber Air Panas Rimbo Panti, Pasaman
- b. Bidang Ilmu : Non Pendidikan Biologi
2. Ketua Peneliti
- a. Nama Lengkap dan Gelar : Irdawati,S.Si,M.Si
 - b. Jenis Kelamin : Perempuan
 - c. Gol/Pangkat/NIP : Penata / IIIc/ NIP. 197104302001122001
 - d. Jabatan Fungsional : Lektor
 - e. Fakultas/Jurusan : FMIPA/ Biologi
 - f. Pusat Penelitian : MIPA
4. Jumlah Tim Peneliti : 1 orang
- a. Nama Anggota Peneliti : Drs. Mades Fifendy,M.Biomed
5. Lokasi Penelitian : Kota Padang
6. Jumlah Biaya yang diusulkan : Rp 7.500.000
(Tujuh juta lima ratus ribu rupiah)

Menyetujui
Pembimbing Penelitian


Dr. Linda Advinda, M.Kes
NIP. 196109261989032003

Padang, 26 Januari 2012
Ketua Peneliti,


Irdawati, S.Si, M.Si
NIP. 197104302001122001



ABSTRAK

Isolasi Bakteri Termofilik Penghasil Amilase dari Sumber Air Panas Rimbo Panti Pasaman

Irdawati, Mades Fifendy

Pemanfaatan mikroba dari bakteri termofilik saat ini memiliki nilai komersial. Hal ini karena kestabilan enzim yang dihasilkan dari bakteri termofilik terhadap panas. Amilase merupakan salah satu enzim yang banyak diperlukan oleh aplikasi industri. Habitat dari bakteri termofilik dapat ditemui pada lingkungan bakteri termofilik, seperti pada sumber air panas. Air Panas Rimbo Panti Pasaman merupakan salah satu lingkungan ekstrim yang ada di Sumatera Barat. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri termofilik yang mampu hidup pada suhu tinggi dan menguji aktivitas isolat bakteri yang diperoleh dalam menghasilkan amilase dari sumber air panas Rimbo Panti Pasaman.

Penelitian ini telah dilaksanakan dari bulan Maret sampai Juni 2011 bertempat di Sumber Air Panas Rimbo Panti Pasaman dan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA UNP. Jenis penelitian adalah deskriptif pada lima kolam air panas yang ada di Rimbo Panti Pasaman.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa didapatkan sebanyak 27 isolat bakteri termofilik yang mampu hidup pada suhu inkubasi 52°C dan sebanyak 17 isolat yang menghasilkan amilase. Isolat yang menunjukkan aktivitas tertinggi memiliki diameter 28,1 mm.

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Bakteri termofilik merupakan salah satu mikroorganisme yang saat ini memiliki nilai komersial. Bakteri termofilik mampu hidup pada suhu diatas 45°C dan hidup optimal pada kisaran 55°C - 65°C (Lestari, 1999; Pelczar, dkk., 1988; Prescott, dkk., 1983). Kemampuan hidupnya pada lingkungan bersuhu tinggi menyebabkan mikroba ini unggul dari mikroba lainnya. Genus dari *Cyanobacteria*, Bakteri ungu, Bakteri hijau, *Bacillus*, *Clostridium*, *Thiobacillus* dan *Spirochaeta* dilaporkan oleh Brock (1997) merupakan kelompok mikroba yang bersifat termofilik.

Pemanfaatan mikroba dari bakteri termofilik ini erat kaitannya dengan enzim yang dihasilkannya. Enzim sebagai katalis hayati banyak digunakan dalam aplikasi industri. Prayitno, dkk (1996) menambahkan bahwa enzim yang dihasilkan dari bakteri termofilik bersifat termostabil. Kestabilan enzim ini menyebabkan aktifitas kerjanya tetap bertahan pada suhu yang tinggi. Hal ini karena enzim sebagai senyawa protein memiliki sifat yang mudah mengalami denaturasi sehingga pemakaian enzim dari bakteri termofilik lebih baik digunakan (Muharni, 2009). Salah satu enzim yang dapat dihasilkan dari bakteri termofilik adalah amilase (Ginting, 2008).

Amilase merupakan enzim yang banyak dimanfaatkan dalam teknologi bioproses. 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. Berbagai industri di Indonesia telah menggunakan amilase sebagai katalis, seperti pada industri pangan amilase berperan dalam industri makanan, minuman, ataupun gula cair. Pada industri non pangan enzim ini digunakan pada industri tekstil, kertas dan deterjen (Pangastuti, dkk., 2002; Wirawan, dkk., 2006). Untuk mendapatkan enzim yang tahan terhadap suhu tinggi perlu dilakukan penapisan mikroorganisme yang dapat menghasilkan enzim termostabil dari berbagai sumber alam salah satunya adalah sumber air panas.

Sumber air panas sebagai lingkungan yang bersuhu tinggi berpotensi sebagai habitat bagi mikroba termofilik (Prayitno, dkk., 1996). Junaidi (2008); Danial (2010) menyebutkan bahwa bakteri termofilik yang mampu memproduksi amilase dapat dideteksi dengan terbentuknya zona bening pada medium selektif berupa pati setelah ditetesi dengan larutan iodin. Larutan iodin berperan sebagai uji kepastian terhadap kemampuan bakteri dalam menghasilkan amilase. Adanya zona bening menandakan bahwa bakteri mampu menggunakan pati sebagai sumber karbon. Semakin besarnya zona bening yang dibentuk oleh aktivitas bakteri maka produksi amilase dari bakteri juga semakin besar.

Berbagai penelitian telah berhasil memperoleh bakteri termofilik penghasil amilase ini berdasarkan adanya zona bening, diantaranya Sianturi (2008) mendapatkan 16 isolat termofilik amilase pada sumber air panas Penen Sibiru-biru Sumatera Utara dengan diperoleh tiga isolat terpilih (PN9, PN1, dan PN4). Ginting

(2009) juga telah mendapatkan 8 isolat termofilik penghasil amilase dari sumber air panas di Desa Semangat Gunung, Sumatera Utara dengan diperoleh tiga isolat terpilih (SG1, SG2, dan SG3). Sutiamiharja (2008) juga telah memperoleh 20 isolat yang mampu menghasilkan amilase dengan 3 isolat terpilih (GK4, GK13, dan GK14).

Sumatera Barat merupakan propinsi yang memiliki beberapa sumber air panas salah satunya adalah Air Panas Rimbo Panti Pasaman. Berdasarkan survei lapangan yang dilakukan oleh peneliti sumber air panas ini memiliki suhu berkisar 60°C - 94°C. Berbagai peneliti telah mendapatkan isolat bakteri termofilik dalam memproduksi suatu enzim tertentu pada sumber air panas di Rimbo Panti Pasaman. Sebagaimana dilakukan oleh Thamrin (2001) yang telah memperoleh isolat bakteri termofilik dalam menghasilkan protease. Oleh karena itu, perlu adanya penelitian terhadap bakteri yang berada pada sumber air panas Rimbo Panti yang mampu menghasilkan amilase termostabil. Berdasarkan uraian sebelumnya maka telah dilakukan penelitian tentang "Isolasi Bakteri Termofilik Penghasil Amilase dari Sumber Air Panas Rimbo Panti Pasaman".

B. Rumusan Masalah

Masalah dalam penelitian ini dapat dirumuskan sebagai berikut:

1. Berapa jumlah isolat bakteri termofilik yang diperoleh dari sumber air panas Rimbo Panti Pasaman.
2. Bagaimana aktivitas amilase dari isolat bakteri termofilik sumber air panas Rimbo Panti Pasaman.

C. Tujuan Penelitian

1. Mendapatkan isolat bakteri termofilik yang diisolasi dari sumber air panas Rimbo Panti Pasaman.
2. Mengetahui aktivitas amilase dari isolat bakteri termofilik air panas Rimbo Panti Pasaman.

D. Kegunaan Penelitian

1. Sebagai informasi awal untuk penelitian selanjutnya terutama dalam mencari informasi tentang jenis bakteri termofilik yang berpotensi menghasilkan amilase termostabil.
2. Untuk menambah khasanah ilmu pengetahuan terutama ilmu mikrobiologi dan bioteknologi.

BAB II

KERANGKA TEORITIS

A. Bakteri Termofilik Penghasil Amilase

Berdasarkan suhu optimum pertumbuhannya, Pelczar, dkk (1988) mengelompokkan bakteri kepada beberapa kelompok diantaranya: bakteri psikofil yang tahan hidup pada suhu 0°C – 20°C, bakteri mesofil yang hidup pada suhu 25°C – 40°C, dan bakteri termofil yang mampu bertahan hidup pada suhu 50°C atau lebih. Ginting (2008) mendefinisikan bakteri termofilik sebagai mikroorganisme yang mampu hidup pada suhu yang tinggi. Kemampuan hidupnya dilaporkan oleh Lestari (1999); Danial (2010) berada pada suhu di atas 45°C. Prescott (1997) juga menyebutkan bahwa pada temperatur 55°C atau lebih merupakan habitat mikroba ini. Suhu minimumnya adalah 45°C dan optimum pada suhu 55°C - 65°C.

Bakteri termofilik dapat dikelompokkan menjadi dua kelompok, diantaranya obligat termofilik yaitu bakteri yang tidak mampu hidup pada suhu di atas 50°C, dan fakultatif termofilik yang dapat tumbuh pada kisaran suhu 50-66°C atau pada suhu yang lebih rendah 38°C. Beberapa obligat termofilik dapat tumbuh pada suhu 77°C (Kusnandar, dkk., 2010).

Habitat bakteri termofilik dapat ditemukan pada lingkungan yang memiliki suhu yang tinggi seperti sumber air panas, tanah yang selalu terkena sinar matahari dan tanah yang mengalami fermentasi kompos (Purwani., dkk, 2002; Danial, 2010; Ginting, 2010). Keberadaan bakteri pada suhu yang tinggi menyebabkan bakteri termofil mampu memproduksi enzim yang stabil. Dalam aplikasinya, kestabilan enzim dari bakteri termofilik merupakan enzim yang sangat potensial dalam menggeser laju reaksi. Sebagaimana Pakpahan (2009) menyebutkan bahwa peningkatan suhu reaksi di atas 10°C suhu minimum suatu mikroba akan menggeser kecepatan reaksi sebesar dua kali lipat. Dengan meningkatnya suhu akan menghambat mikroba lain untuk hidup sehingga kontaminasi terhadap mikroba lain dapat ditekan. Sutiamiharja (2008) juga menyebutkan pemakaian enzim yang termostabil dapat menghemat biaya produksi karena enzim ini memiliki waktu simpan yang lebih lama dan aktivitas yang tetap optimal pada suhu tinggi. Ginting (2009) menyatakan bahwa salah satu enzim yang dapat diproduksi dari bakteri termofilik adalah amilase.

Amilase merupakan salah satu enzim yang berperan dalam meghidrolisis pati atau amilum menjadi gula yang lebih sederhana seperti fruktosa, dekstrin, maltosa dan glukosa. Hidrolisis amilum atau pati menyebabkan terjadinya perubahan warna pada medium menjadi biru setelah ditambahkan iodine atau lugol (Poedjadi, 1994).

Amilase disebut juga dengan enzim amilolitik, merupakan enzim yang bekerja sebagai katalis dalam reaksi pemecah pati (amilum) dengan melibatkan bantuan air atau disebut reaksi hidrolisis. Menurut Pudjowono (1997) amilase merupakan enzim ekstraseluler yang diproduksi di dalam sel, kemudian dikeluarkan dari sel ke substrat disekelilingnya. Enzim-enzim ekstraseluler pada umumnya bersifat terinduksi, dan produksinya akan meningkat jika ada substrat yang sesuai di sekelilingnya.

Amilase dibedakan atas tiga kelompok diantaranya:

1. Alfa-amilase

Alfa-amilase mengkatalisis hidrolisis ikatan 1,4 pati menghasilkan maltosa, glukosa, dan dekstrin. Enzim ini memecah ikatan pada bagian dalam substrat, sehingga disebut juga dengan endoamilase. (Masriani,1999). Enzim ini digunakan secara luas dalam industri makanan, deterjen, dan kertas .

2. Beta-amilase

Beta-amilase mengkatalisis hidrolisis ikatan 1,4 pati menghasilkan dekstrin dan maltosa. Beta-amilase merupakan enzim yang menghidrolisis unit-unit gula dari ujung pati, sehingga enzim ini juga disebut dengan eksoamilase. Enzim ini juga banyak dimanfaatkan pada industri makanan dan kertas. .

3. Glukosaamilase

Glukosaamilase memecah ikatan pati menjadi glukosa. Secara komersial diproduksi dari *Aspergillus sp* dan *Rhizopus sp*. Glukosaamilase digunakan dalam produksi sirup glukosa yang saat ini telah dimanfaatkan dalam berbagai industri makanan seperti industri permen, biskuit, dan minuman ringan (Ermaiza, 2009).

Berdasarkan temperatur pertumbuhannya, Brock (1997) telah melaporkan beberapa genus bakteri yang bersifat termofilik, diantaranya Cyanobacteria yang hidup pada pertumbuhan bertemperatur 55-70°C, Bakteri Ungu (45-60°C), Bakteri Hijau (44-73°C), Cyanobacteria (55-70°C), Bakteri Ungu (45-60°C) Bakteri Hijau (44-73°C), Bacillus (55-70°C), Clostridium (55-75°C), Thiobacillus (50-60°C), Spirochaeta (54°C), dan Bakteri aerob gram negatif (37-55 °C).

Bakteri termofilik sebagai penghasil amilase berupaya dieksplorasi. Beberapa bakteri seperti *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus amyloliquifaciens*, *Pseudomonas sp*, dan *Clostridium sp* diketahui mampu memproduksi amilase. (Uhling, 1998 dalam Sarah, dkk., 2000; LIPI, 1999; Meili, 2008; Anonymous 2009, a). Berbagai penelitian yang berusaha mencari dan melakukan isolasi terhadap bakteri termofilik diantaranya dilakukan oleh Sustiharmiharja (2008) yang telah memperoleh 20 isolat yang mampu menghasilkan amilase dengan suhu inkubasi 65°C. Himanshu (2009) juga telah melakukan isolasi bakteri termofilik dari mendapatkan bakteri termofilik amilase pada suhu 54°C dari sumber air panas Tabalo India. Sianturi (2008) mendapatkan 16 isolat termofilik amilase pada sumber air panas Penen Sibiru-biru Sumatera Utara pada suhu inkubasi 65°C. Ginting (2009) juga telah mendapatkan 8 isolat termofilik penghasil amilase dari sumber air panas di Desa Semangat Gunung, Sumatera Utara yang juga pada suhu inkubasi 65°C. Panuju (2003) juga berhasil mengisolasi bakteri termofilik amilase dari sumber air panas Cimanggu dan Ciwidey di Bandung. Isolat tersebut diisolasi pada suhu inkubasi 70° C dengan pengaturan pH media 7 dan mendapatkan 69 isolat yang mampu menghasilkan amilase.

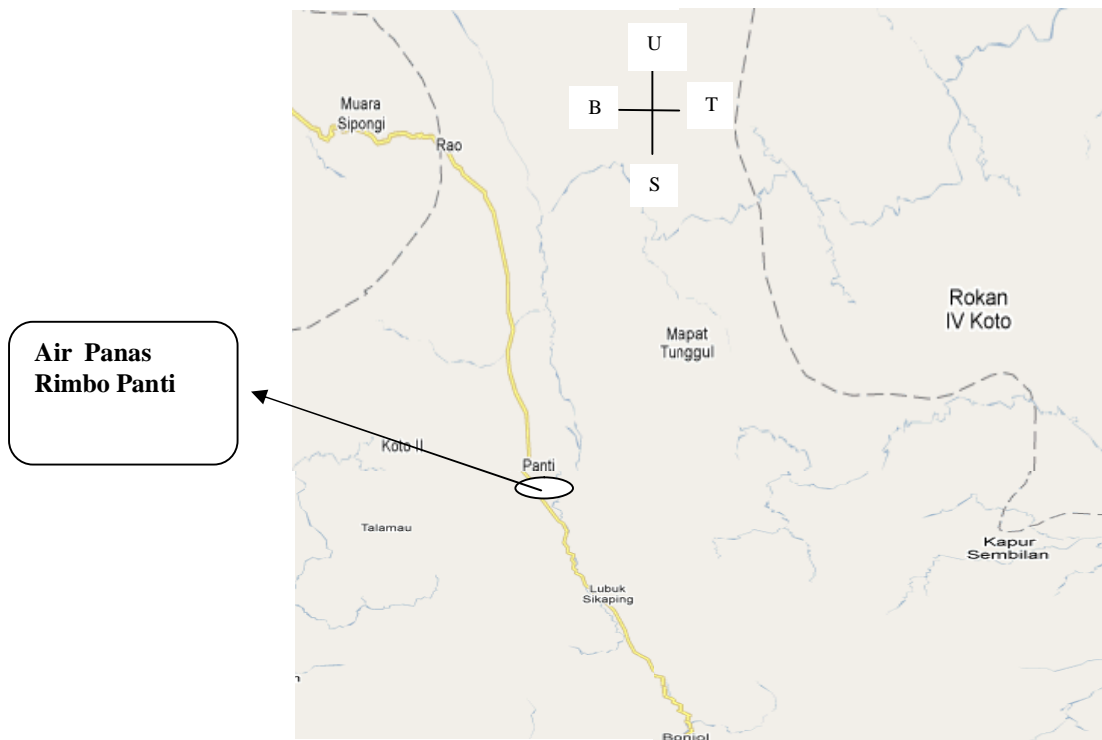
B. Sumber Air Panas Rimbo Panti Pasaman

Di alam, lingkungan dengan suhu yang tinggi terdapat di area panas bumi dan berhubungan dengan kegiatan tektonik seperti sumber air panas, daerah solfatarik, kawah gunung berapi dan hidrotermal laut dalam (Madigan., *et al*, 2000). Sumber air panas terjadi karena adanya aktivitas gunung merapi. Aktivitas ini disebabkan adanya aliran magma dari perut bumi, yang bersentuhan dengan aliran air atau sungai di bawah tanah. Air tanah yang merembes hingga kedalaman 300 m dipanasi oleh magma (Brock, 1987). Pengembangan panas mendorong air ke permukaan, sehingga terbentuk habitat sebagai sumber air panas.

Sebaran sumber air panas hampir merata di seluruh dunia, namun ada wilayah-wilayah tertentu dimana sumber air panas itu terkonsentrasi seperti di Jepang, Amerika Serikat Bagian Barat, Selandia Baru, Islandia, Indonesia dan Afrika Selatan (Madigan *et al.*, 2000). Indonesia merupakan salah satu area yang memiliki banyak lokasi tektonik aktif di dunia dengan lebih dari 70 gunung api aktif dan banyak lokasi geotermal. Sebagaimana yang dinyatakan oleh Prayitno., dkk (1996) bahwa sumber air panas merupakan habitat bagi mikroorganisme terutama bakteri termofilik. Suhu ini dapat dijadikan sebagai lingkungan tempat kehidupan mikroorganisme yang tahan panas.

Berbagai penelitian yang telah berhasil mengisolasi bakteri termofilik pada sumber air panas, diantaranya Gusmaniar, dkk (2009) mendapatkan isolat termofilik dari beberapa sumber air panas Sumatera Barat (Tandikek, Arara, dan Sangir) dalam menghasilkan Fitase. Hafiz (2011) juga telah mendapatkan isolat termofilik yang mampu menghasilkan protease dari sumber air panas Kerinci. Thamrin (2001) yang mendapatkan bakteri termofilik pada sumber air panas Rimbo Panti Pasaman dalam menghasilkan protease dan diketahui tumbuh optimal pada suhu 65°C, pH 8.

Sumber Air Panas Rimbo Panti Pasaman merupakan salah satu sumber air panas berada di kecamatan Panti kabupaten Pasaman Propinsi Sumatera Barat. Sebagai salah satu tempat wisata, Air panas Rimbo Panti memiliki beberapa situs kolam air panas yang bersuhu antara 60°C - 94°C bahkan ada yang mencapai 100°C. Sumber air panas Rimbo Panti berpotensi memiliki bakteri yang tahan pada suhu tinggi. Beberapa penelitian berhasil mengisolasi bakteri termofilik dari air panas ini seperti dilakukan oleh Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lanjut terhadap keanekaragaman hayati bakteri termofiliknya yang mampu menghasilkan enzim termostabil. Adapun lokasi sumber air panas Rimbo Panti, Pasaman dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Peta Lokasi Pantian, Pasaman

C. Isolasi Bakteri

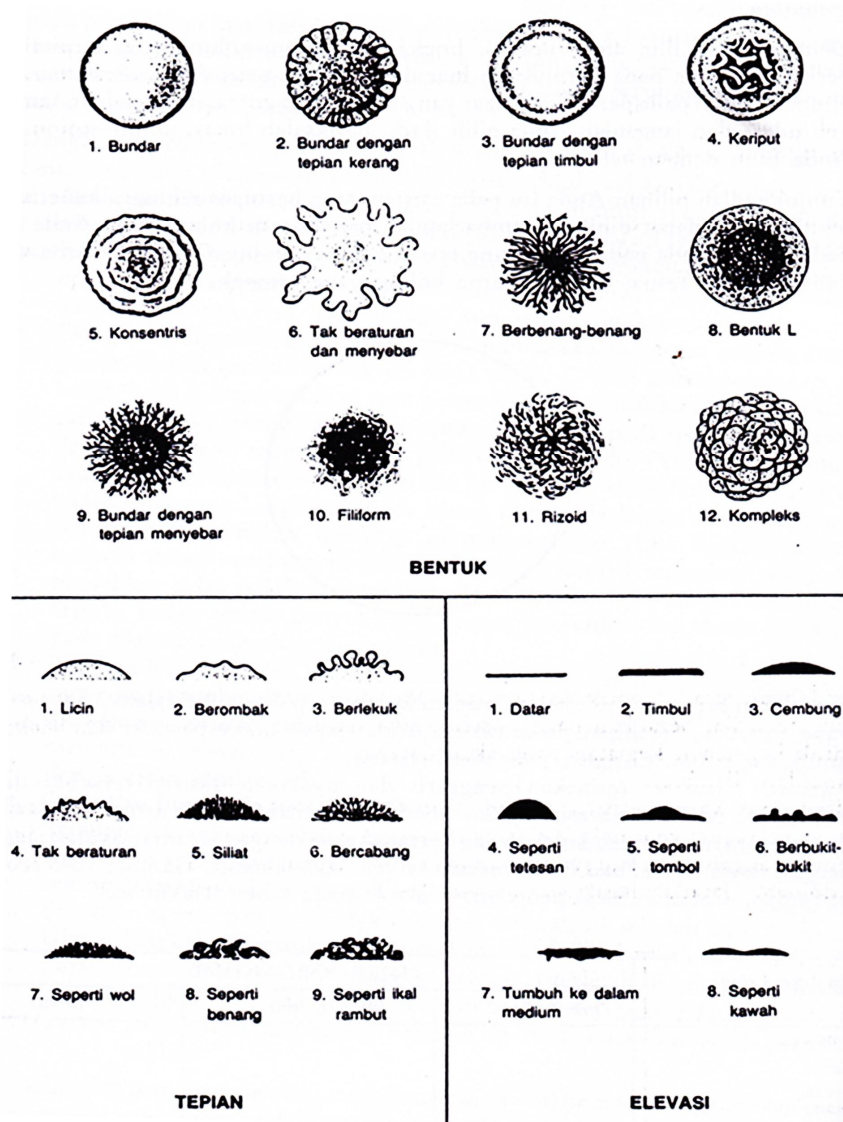
Bakteri merupakan organisme prokariota yang banyak tersebar di lingkungan. Secara alami bakteri hidup berasosiasi dengan jenis lainnya, sehingga dalam sekelompok bakteri yang berada pada habitat yang sama memiliki jenis yang berbeda-beda sehingga perlu dilakukan teknik khusus dalam memisahkan kultur campuran untuk mendapatkan kultur murni. Teknik ini dinamakan dengan isolasi. Isolasi memungkinkan didapatkannya kultur biakan murni bakteri yang hanya terdiri dari satu spesies saja (Pelczar, dkk., 1988).

Dalam mengisolasi bakteri dikenal beberapa cara yaitu:

- a. Pengenceran yaitu dengan mengambil kira-kira 1ml sampel dari suatu suspensi ke dalam suatu tabung tersendiri yang berisi akuades steril 9ml untuk diencerkan. Ini dilakukan beberapa kali dengan tetap mengambil suspensi sampel pada tabung sebelumnya kedalam akuades steril yang sama banyaknya, hingga nantinya akan didapatkan satu koloni sebagai biakan murni,
- b. Penuangan yaitu dengan mengambil sedikit suspensi sampel bakteri untuk disebar di dalam sebuah medium. Cara ini dapat dilakukan berkali kali hingga didapatkan koloni bakteri sebagai biakan murni (Anonymous 2009, b).

Anonymous (2009, b) menyatakan apabila bakteri yang didapatkan dari teknik ini masih berupa populasi campuran, untuk mendapatkan koloni bakteri murni dari populasi campuran dilakukan melalui proses pemurnian dengan menggoreskan suspensi bakteri yang akan diisolasi pada lempengan agar sebagai

media pertumbuhannya. Goresan suspensi ini akan tumbuh menjadi satu koloni bakteri. Hadioetomo (1993) menyatakan bahwa morfologi koloni yang tumbuh dapat dibedakan berdasarkan tepi koloni, elevasi koloni, warna koloni, dan struktur dalamnya sebagaimana terlihat pada gambar 2:



Gambar 2. Morfologi Koloni Bakteri (Hadioetomo, 1993)

BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian deskriptif dengan menggunakan beberapa tahap yaitu isolasi bakteri termofilik dari sumber air panas Rimbo Panti Pasaman dan selanjutnya dilakukan uji aktivitas terhadap isolat yang memiliki kemampuan menghasilkan amilase berdasarkan terbentuknya zona bening disekitar koloni isolat setelah ditetesi dengan larutan iodin.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan dari bulan Maret sampai Juni tahun 2011. Sampel air yang diduga mengandung bakteri termofilik amilase diambil dari sumber air panas Rimbo Panti Pasaman, Sumatera Barat. Selanjutnya dilakukan isolasi terhadap isolat termofilik yang mampu menghasilkan amilase di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Negeri Padang.

C. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah botol steril, cawan petri, tabung reaksi, *freezer*, inkubator, sentrifus, Erlenmeyer, gelas ukur, batang pengaduk, kompor listrik, beker glass, *Laminar Air Flow*, vortex, pipet tetes, jarum ose, termometer, pH universal, termos air panas, timbangan analitik, *Autoclave*, mikro pipet, *grill glass*, lampu spritus, aluminium foil, kain kasa, dan mikroskop.

Bahan yang dipakai diantaranya: sampel air dari air panas Rimbo Panti Pasaman, akuades, alkohol, spritus, ekstrak yeast, NaCl, tepung agar, Nutrien Agar, tepung beras Rose Brand sebagai sumber pati, bacto pepton, larutan iodin, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, dan agar.

D. Prosedur Penelitian

1. Persiapan penelitian

1.1 Sterilisasi

Semua alat yang terbuat dari kaca dicuci bersih dan dikeringkan. Setelah itu dibungkus dengan kertas koran. Sterilisasi alat dan medium dilakukan dengan *Autoclave* pada suhu $121^\circ C$ dan tekanan 15 psi. Sterilisasi alat bertujuan untuk tidak terjadi kontaminasi dari alat-alat yang digunakan pada penelitian.

1.2 Pembuatan media

Media bakteri yang digunakan adalah media NA, media agar selektif amilolitik dan media agar pati. Media NA dibuat dengan menimbang sebanyak 22 g NA dan 20 g agar kedalam 750 ml aquades. Bahan tersebut dimasukkan kedalam Erlenmeyer 1000ml dan ditutup dengan kapas dan aluminium foil.

Media agar selektif amilolitik dibuat dengan cara menimbang ekstrak khamir sebanyak 5 g, pati sebanyak 10 g, pepton sebanyak 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 0,5 g, NaCl sebanyak 0,5 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 0,15 g, dan agar sebanyak 20 g. Untuk media agar pati dibuat dengan dengan menimbang 7,5 g pati dan agar 20 g. Bahan tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan aquades sampai volume 750 ml. Kemudian dipanaskan sampai mendidih dan ditutup rapat dengan kapas dan aluminium foil. Sterilisasi di dalam *Autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi selama 15 menit (Ginting, 2009).

2. Pelaksanaan penelitian

2.1 Pengambilan sampel isolat

Pengambilan sampel isolat dilakukan menggunakan metode Ginting (2009). Sampel isolat yang diduga mengandung bakteri termofilik diambil berupa air panas dari sumber air panas Rimbo Panti, Pasaman. Sebelum sampel diambil, terlebih dahulu dilakukan pengamatan mengenai kondisi sumber air panas berupa pH dan suhu air. Sampel air diambil sebanyak 100 ml dengan kedalaman ± 10 cm dan dimasukkan kedalam botol steril. Selanjutnya botol ditutup dengan rapat dan diberi label, kemudian dimasukkan kedalam termos air untuk mempertahankan suhu. Sampel kemudian dibawa ke laboratorium Mikrobiologi Universitas Negeri Padang dan segera dilakukan isolasi.

2.2 Isolasi bakteri

Sampel dalam botol dikocok agar homogen, kemudian diambil 1 ml, ditetaskan kedalam cawan petri yang berisi Media NA yang masih cair, selanjutnya cawan petri digoyang-goyang agar suspensi rata dalam medium. Setelah membeku diinkubasi pada suhu tumbuh 52°C selama 24-48 jam, sehingga ada terlihat koloni-koloni bakteri yang tumbuh. Koloni-koloni bakteri yang tumbuh pada Media NA diinokulasikan kembali ke cawan petri steril yang berisi Media NA secara penggoresan dengan metode kuadran, selanjutnya diinkubasi pada suhu 52°C selama 24-48 jam sampai terlihat koloni-koloni tunggal yang tumbuh. Masing-masing sampel dibuat pengulangan sebanyak 2 kali (duplo). Isolat murni yang tumbuh dikarakterisasi melalui pengamatan mikroskopis berupa bentuk koloni, warna koloni, tepi koloni dan elevasi koloni (Ginting, 2009).

2.3 Pengujian aktivitas amilase

Pengujian aktivitas amilase dari dari isolat termofilik dilakukan mengikuti metode Ginting (2009). Sebelumnya isolat termofilik ditumbuhkan pada media bakteri selektif amilolitik selama 24 jam. Kemudian isolat yang tumbuh diujikan dalam bentuk suspensi. Suspensi dibuat dengan cara mengambil 1-2 ose isolat biakan bakteri yang telah berumur 1 hari ke dalam tabung reaksi steril yang telah berisi larutan NaCl fisiologis 0,85%. Campuran dihomogenkan dengan vortex, kekeruhan campuran dibandingkan dengan kekeruhan Larutan Mac Farland skala 1

yang setara dengan $3 \cdot 10^8$ CFU/ml. Sebanyak 0,1 ml suspensi bakteri dipipet diatas kertas cakram pada media agar pati. Kultur diinkubasi selama 72 jam pada suhu 50°C. Isolat bakteri yang tumbuh ditetesi dengan larutan iodin untuk menyeleksi bakteri yang menghasilkan amilase. Isolat yang menghasilkan amilase ditunjukkan dengan adanya zona bening disekitar koloni bakteri. Diameter zona bening bakteri yang terbentuk diukur dengan menggunakan jangka sorong.

3. Pengamatan

Pengamatan yang dilakukan terhadap penelitian ini adalah:

1. Menghitung jumlah isolat bakteri yang didapatkan dari sampel air panas Rimbo Panti Pasaman,
2. Mengukur zona bening yang terbentuk disekitar isolat setelah penetesan iodin sebagai indikator bahwa isolat memproduksi amilase.

E. Teknik Analisis Data

Data hasil pengamatan dianalisis secara deskriptif dengan memperhatikan morfologi koloni isolat serta pengukuran zona bening yang terbentuk setelah penetesan iodin.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari penelitian yang telah dilakukan mengenai isolasi bakteri termofilik penghasil amilase dari sumber air panas Rimbo Panti Pasaman diperoleh hasil sebagai berikut:

A. Isolat Bakteri Termofilik

Hasil penelitian ini, telah didapatkan sebanyak 27 isolat koloni bakteri pada sumber air panas Rimbo Panti Pasaman. Sumber air panas ini memiliki rentangan suhu 60⁰C sampai suhu 85⁰C dengan pH berkisar 6-7, tidak berwarna, berbau belerang, masih banyak pepohonan, memiliki hutan primer sehingga substrat yang diperlukan oleh mikroba yang berada disana cukup banyak. Belerang sebagai salah satu senyawa anorganik yang dimanfaatkan oleh bakteri termofilik. Bakteri akan memanfaatkan senyawa anorganik seperti: H₂O, H₂, atau H₂S sebagai donor elektron untuk mereduksi CO₂ menjadi komponen karbon untuk sumber energi.

Berbagai penelitian juga telah mendapatkan isolat bakteri termofilik dari beberapa sumber air panas, diantaranya: Nurhalimadjah (2008) telah mengisolasi 25 isolat koloni termofilik dari sumber air panas Gurukinayan Sumatera Utara, sedangkan Panuju (2003) juga telah memperoleh 18 isolat bakteri termofilik dari sumber air panas Cimanggu dan Ciwidey, Bandung.

Sebagai lingkungan yang memiliki suhu yang tinggi, air panas menjadi salah satu tempat hidup bagi mikroorganisme. Hal ini juga sesuai dengan pendapat Prayitno, dkk (1996) yang menyebutkan bahwa salah satu habitat bakteri termofilik berada pada sumber air panas. Suhu lingkungan yang sesuai untuk kehidupannya memiliki mikroba yang bervariasi dan tahan terhadap panas yang tinggi. Ketahanan mikroba pada suhu yang tinggi disebabkan karena bakteri termofilik memiliki struktur protein yang berbeda dari mikroba mesofil sehingga mampu bertahan pada suhu yang ekstrim. Keberadaan komponen biotik mampu mendukung pertumbuhan mikroorganisme termofilik. Dimawan dkk., (2000) melaporkan bahwa dedaunan yang gugur, ranting dahan, biji rerumputan, serbuk sari, dan bangkai serangga yang terdapat disekitar sumber air panas merupakan bahan organik yang dapat dimanfaatkan oleh mikroorganisme yang hidup dalam sumber air panas tersebut.

Jumlah isolat termofilik yang terisolasi dapat dilihat pada tabel 2 dibawah ini:

Tabel 2. Jumlah Isolat Bakteri Termofilik pada Sumber Air Panas Rimbo Panti Pasaman

Lokasi	Jumlah Isolat
Kolam I	2 isolat
Kolam II	2 isolat
Kolam III	6 isolat
Kolam IV	14 isolat
Kolam V	3 isolat
Jumlah	27 isolat

Pada tabel 2 terlihat bahwa setiap kolam air panas berpotensi memiliki bakteri termofil, dan kolam IV memiliki isolat yang terbanyak. Berbeda dengan kolam I, II, III, dan V suhu alaminya > 80°C didapatkan jumlah bakteri yang lebih sedikit. Hal ini menunjukkan bahwa suhu lingkungan mempengaruhi pertumbuhan bakteri termofilik. Suhu 62°C yang berada pada kolam IV merupakan kondisi yang baik atau optimum untuk kehidupan bakteri termofilik. Kondisi yang optimum akan mempengaruhi pertumbuhan sel mikroorganisme. Jadi, semakin optimum kondisi lingkungan maka semakin banyak jumlah isolat mikroorganisme yang mampu hidup dilingkungan yang sama. Sebagaimana diungkapkan oleh Burhan., *et al* (2003) dalam Ginting (2009) yang menyatakan bahwa pengaruh suhu lingkungan berhubungan dengan pertumbuhan mikroorganisme. Lestari (2000) mengungkapkan bahwa suhu optimum bagi bakteri termofilik berada pada temperatur 55-70°C. Sustimihardja telah melakukan isolasi bakteri termofilik pada lingkungan air panas Penen Sibiru-biru Sumatera Utara dan memperoleh 12 isolat termofilik yang hidup dengan suhu 55° C dan 5 isolat yang hidup pada suhu 47°C. Lebih lanjut lagi Dirnawan., dkk (2000) juga telah mengisolasi 18 isolat termofil dari Gunung Pancar Bogor yang memiliki suhu 70°C.

Dari 27 isolat koloni ini memperlihatkan morfologi koloni yang berbeda. Berdasarkan morfologi isolat yang didapat, koloni isolat dibedakan sesuai bentuk koloni, warna koloni, tepi koloni dan elevasi koloni, dapat dilihat pada Tabel 3.

B. Aktivitas Bakteri Termofilik Penghasil Amilase

Dari hasil isolasi terhadap 27 isolat bakteri termofilik yang terdapat pada sumber air pans Rimbo Panti Pasaman, didapatkan 17 isolat yang mampu menghasilkan amilase berdasarkan terbentuknya zona bening disekeliling isolat. Hasil pengukuran diameter zona bening isolat menggunakan jangka sorong, disajikan pada tabel 4.

Tabel 3. Morfologi Koloni Isolat Termofilik pada Sumber Air Panas Rimbo Panti Pasaman.

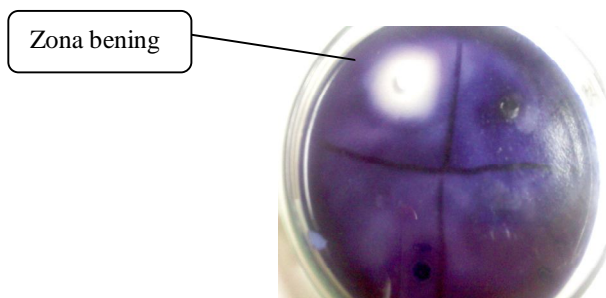
Lokasi	Kode Isolat	Bentuk Koloni	Warna	Tepi	Elevasi
Kolam I	HMI ₁	Bundar dengan tepian timbul	Krem	licin	Datar
	HMI ₂	Tidak beraturan dan menyebar	Putih	Tidak beraturan	Datar
Kolam II	HMI ₁	Tidak beraturan dan menyebar	Krem	bercabang	Datar
	HMI ₂	Bundar	Putih	berombak	Seperti kawah
Kolam III	HMI ₁	Tidak beraturan dan menyebar	putih	licin	datar
	HMI ₂	Tidak beraturan dan menyebar	krem	Tidak beraturan	Timbul
	HMI ₃	Tidak beraturan dan menyebar	krem	bercabang	Seperti tetesan
	HMI ₄	Bundar dengan tepian karang	krem	bercabang	Datar
	HMI ₅	Tidak beraturan dan menyebar	krem	licin	timbul
	HMI ₆	Tidak beraturan dan menyebar	putih	bercabang	Datar

Kolam IV	HMIV ₁	Tidak beraturan dan menyebar	Putih	bercabang	Seperti kawah
	HMIV ₂	Tidak beraturan dan menyebar	Putih	siliat	datar
	HMIV ₃	Tidak beraturan dan menyebar	krem	licin	Datar
	HMIV ₄	Tidak beraturan dan menyebar	Putih	Seperti ikal rambut	Datar
	HMIV ₅	Tidak beraturan dan menyebar	krem	Tidak beraturan	timbul
	HMIV ₆	Tidak beraturan dan menyebar	krem	Tidak beraturan	Datar
	HMIV ₇	Bundar	krem	licin	Datar
	HMIV ₈	Tidak beraturan dan menyebar	krem	berlekuk	Datar
	HMIV ₉	bundar	krem	licin	datar
	HMIV ₁₀	Rhizoid	putih	Seperti benang	Timbul
	HMIV ₁₁	bundar	krem	Tidak beraturan	Timbul
	HMIV ₁₂	Berbenang-benang	putih	bercabang	Datar
	HMIV ₁₃	Bundar	putih	licin	Timbul
	HMIV ₁₄	Bundar	krem	bercabang	Timbul
Kolam V	HMV ₁	Rhizoid	putih	siliat	Datar
	HMV ₂	Tidak beraturan dan menyebar	krem	berlekuk	Timbul
	HMV ₃	Tidak beraturan dan menyebar	krem	berombak	Timbul

Tabel 4. Diameter Zona Bening Bakteri Termofilik Penghasil Amilase

Kode Isolat	Diameter Zona Bening (mm)
HMIV ₁₂	28,1
HMIV ₂	24,1
HMIII ₂	23,9
HMV ₄	23,1
HMIII ₁	22,22
HMII ₁	22,1
HMI ₁	22,01
HMV ₂	20,2
HMIV ₁₃	20,1
HMV ₁	19,1
HMIII ₃	18,1
HMIV ₄	17,5
HMIV ₆	17,00
HMIV ₃	16,9
HMIV ₅	13,5
HMIII ₆	11,1
HMIV ₁	10,1

Sedangkan pembentukan zona bening dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Zona Bening yang dibentuk oleh Isolat Bakteri Termofilik Penghasil Amilase

Uji aktivitas didasarkan pada kemampuan enzim dalam mendegradasi pati. Dari gambar 4 dan tabel 4 terlihat bahwa isolat yang dianggap positif sebagai penghasil amilase menunjukkan bahwa isolat mampu membentuk zona bening setelah dilakukan penetesan iodin pada medium agar pati. Daerah di luar zona bening terlihat berwarna biru tua setelah diberi larutan iodin. Terbentuknya warna biru tua akibat adanya reaksi antara larutan iodin dengan pati yang tidak dihidrolisis. Zona bening tidak ikut terwarnai oleh larutan iodin karena pada zona tersebut pati sudah terhidrolisis menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti disakarida atau monosakarida. Amilase dikeluarkan oleh bakteri menghidrolisis senyawa kompleks polisakarida pati yang ada di lingkungan luar sel menjadi senyawa yang lebih sederhana. Hal ini juga diperkuat oleh pernyataan Masriani (1999) bahwa amilase merupakan enzim ekstraseluler yang dihasilkan dari dalam sel, dan dikeluarkan ke media fermentasi. Diluar sel, enzim ini mendegradasi polimer polisakarida menjadi senyawa yang mudah larut sehingga mampu diserap oleh dinding sel sebagai energi dalam melangsungkan kehidupannya. Dalam hal ini, pati dimanfaatkan sebagai sumber carbon untuk sumber energi bagi bakteri termofilik, dan hasil perombakan pati akibat aktivitas amilase ditandai dengan terbentuknya zona bening disekeliling bakteri termofilik.

Berdasarkan tabel, terlihat bahwa isolat memiliki kemampuan amilolitik yang berbeda. Diameter zona bening yang dibentuk oleh bakteri termofilik berkisar antara 10,1 – 28,1 mm. Diameter zona bening terbesar dihasilkan oleh isolat HMIV₁₂, sedangkan isolat terendah dihasilkan oleh isolat HMIV₁. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas enzim yang dihasilkan sangat dipengaruhi oleh suhu lingkungan dan jenis isolat mikroba itu sendiri. HMIV₁₂ yang berada pada kolam IV disebabkan dari sumber air panas dengan suhu 62°C. Suhu tersebut merupakan suhu yang optimum untuk menghasilkan enzim amilase dalam jumlah yang lebih banyak. Sebagaimana yang dilakukan oleh Ginting (2009) telah mendapatkan tiga isolat bakteri amilolitik dengan diameter zona bening terbesar dihasilkan oleh isolat SG3 (52,56 mm) pada suhu 60°C. Berbeda dengan HMIV₁ yang mengeksresikan enzim yang lebih sedikit, hal ini dimungkinkan bahwa jenis isolat tersebut hanya memiliki kemampuan dalam memproduksi amilase yang sedikit. Hal ini juga disebabkan karena HMIV₁ yang

ditemukan pada kolam IV mempunyai isolat terbanyak terbanyak memungkinkan ditemukannya jenis isolat yang memiliki aktivitas amilase yang rendah.

Penelitian terhadap aktivitas amilase dari isolat termofilik air panas juga dilakukan oleh Sianturi (2008), dan telah berhasil mengisolasi 22 isolat termofilik dengan 16 isolat yang menunjukkan aktivitas amilolitik. Diameter zona bening terbesar dihasilkan oleh PN9 (31,58mm) dengan tahap isolasi inkubasi pada suhu 65°C, Sustiharmihardja (2008) juga telah berhasil mengisolasi 20 isolat termofilik amilolitik dengan diameter zona bening terbesar dihasilkan oleh GK4 (35, 20 mm) pada tahap isolasi inkubasi pada suhu 65°C.

\

BAB V

KESIMPULAN

A. Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Sebanyak 27 isolat bakteri termofilik telah diperoleh dari sumber air panas Rimbo Panti Pasaman.
2. Aktivitas amilase telah ditemukan pada 17 isolat bakteri termofilik dan aktivitas amilase tertinggi dimiliki isolat HMIV₁₂ dengan diameter zona bening sebesar 28,1 mm.

B. Saran

1. Disarankan untuk melakukan penelitian lanjutan tentang isolasi amilase dari isolat termofilik sumber air panas Rimbo Panti Pasaman.
2. Penelitian lanjutan dengan menggunakan medium cair untuk pertumbuhan mikroba, serta optimasi terhadap faktor fisik (suhu, pH, kelembaban)

DAFTAR PUSTAKA

- Annonymous a. 2009. Enzim Amilase. (Online),
<http://wacukamboi.blogspot.com/2009/05/enzim-amilase.html>. Diakses tanggal 20 Januari 2011
- _____ b. 2009. Morfologi Mikroba. (Online),
<http://ekmon-saurus.blogspot.com/2008/11/bab-5-morfologi-mikroba.html>.
Diakses tanggal 15 Desember 2010
- Brock. 1997. *Microbiology*. Eight Edition: Prentice Hall, International Inc
- Danial, A. 2008. Isolation Of Starch Degrading Microorganism From Local Hot Spring. *Thesis*: Universiti Malaysia Pahang
- Dimawan, H. Suwanto, A. Purwaria, T. 2000. Eksplorasi Bakteri Termofil Penghasil Enzim Hidrolitik Ekstraseluler dari Sumber Air Panas Gunung Pancar. Catatan Penelitian. *Jurnal Hayati*. Vol. 7 (2). Hal: 52-55
- Ermaiza. 2009. Pengaruh Dua Jenis Polisakarida dalam Biji Alpukat (*Persea americana mill*) Terhadap Kandungan Sirup Glukosa melalui Proses Hidrolisis dengan HCl 3%. *Skripsi*. Departemen Kimia : USU Medan
- Ginting, L, E. 2008. Indeks Aminolitik dan Karakter Morfologi Bakteri Termofilik dari Perairan Pantai Moinit Sulawesi Utara. *Pacific Journal*. Vol 1 (3): 274-276
- Ginting, Y. 2009. Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Amilase Termofil Kasar dari Sumber Air Panas Semangat Gunung Sumatera Utara. *Tesis*: USU Medan
- Gusmaniar, N., Abdullah, S, M.Y. 2009. *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Enzim Fitase dari Sumber Air Panas Sumatera Barat*. Artikel Penelitian Fundamental: Unand Padang
- Hadioetomo, R. S. 1993. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama
- Hafidz, M. 2001. Isolasi dan Optimasi Bakteri Termofilik Penghasil Protease dari Sumber Air Panas Kerinci. *Tesis*: Unand Padang
- Junaidi, M, H. 2008. *Deteksi dan Produksi Amilase*. Universitas Brawijaya: Malang
- Lestari, P. 2000. Eksplorasi Enzim Termostabil dari Mikrob Termofil. *Jurnal Hayati*. Vol. 7 (1): 21-2
- LIPI. 1999. *Produksi Amilase*. LIPI: Lembaga Penelitian dan Pengembangan Mikrobiologi Bogor
- Madigan, T. M., Brock. 2000. *Biology of Microorganism*. Sixth edition, Prentice Hall, International Inc
- Masriani, R. 1999. Identifikasi Amilase dari Isolat Bakteri Lokal Mi110 dan DKWS dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis (KL T). *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor
- Meili, H. 2008. Produksi dan Karakterisasi Enzim Amilase dari *Bacillus amyloliquifaciens* Fukumoto pada Substrat Tapioka. *Tesis*: Pasca Sarjana Unand.
- Muharni. 2009. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Kitinase dari Sumber Air Panas Danau Ranau Sumatera Selatan. *Jurnal Penelitian Sains*. Vol 9 (1): 12-15

- Himanshu, S. M and Chandi, R. 2009. Extracellular Enzymatic Activity of Bacterial Strains Isolated from a Local Hotspring Tarabalo, Nayagarh District, Orissa, India. *The Internet Journal of Microbiology*. 2010. Vol 7 (2). Hal: 1-6
- Kusnandar, F., Hariyadi, P., dan Wulandari, N. 2010. Aspek Mikrobiologi Makanan Kaleng. (Online), <http://caripdf.com/download/index.php?name=ciri%20%bakteri%20%termofilik&file=www.unhas.ac.id/gdln/dirpan.pengalengan/Topik.6.Modul/Sub-topik%206-1%20%Karakteristik%20mikroba>. Diakses tanggal 8 mei 2010
- Pangastuti, A. Wahjuningrum, D. Suwanto, A. 2002. Isolasi, Karakterisasi, dan Kloning Gen Penyandi Alfa-Amilase Bakteri Halofil Moderat asal Bledug Kuwu. *Jurnal Hayati* . Vol. 9 (1):10-14
- Pakpahan, R. 2009. Isolasi Bakteri Termofilik dan Uji Aktivitas Protease dari Sumber Air Panas Sipoholon Tapanuli Sumatera Utara. *Tesis*. USU Medan
- Panuju, S. 2008. Isolasi dan Pemilahan Mikroba Termofilik Penghasil Hidrolase. Skripsi. Fakultas Teknik IPB: IPB Bogor
- Pelczar, M., J. Chan, E.S. 1988. *Element of Microbiology*. Terjemahan Hardiutomo, S.R, Teja, I. 2005. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI Press
- Poedjadi, A. 1994. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: UI Press.
- Prayitno N.R, dkk. 1996. *Pengembangan Teknologi Bioproses untuk Produksi Enzim, Pestisida Alami dan Kultur Mikroalga (TU 01.6333): Pengkajian Enzim Inulinase/ Isoamilase Skala Laboratorium*.
- Prescot, M. Harley, John .P. Klein, D. 1993. *Microbiology*. Second edition: Wm. C. Brown Publisher United States America.
- Pujuwono, M. dkk., 1997. Karakter Enzim Amilase dari Beberapa Strain Bakteri Indegenous Indonesia. *Prosiding Seminar Teknologi Pangan*: IPB Bogor.
- Purwani, E.Y. Toharisman, Khasanah E, 2002. Studi Pendahuluan Kitinase Ekstraseluler yang dihasilkan dari Isolat Bakteri Asal Manado. *Jurnal Teknologi Pangan*. Vol 13 (2): 111-117.
- Sarah, Putra, R S, Putro, S, H . 2009. Isolasi α -Amilase Termotabil dari Bakteri Termofilik *Bacillus stearothermophilus*. *Prosiding Seminar Kimia 2009/2010*.
- Setiasih, S. Wahyuntari, B. Trismilah. Dewi. 2006. Karakterisasi Enzim Alfa- Amilase Ekstrasel dari Isolat Bakteri Termofil SW2. *Jurnal Kimia Indonesia*. Vol. 1(1): 22-27
- Shirly , K. Mangunwardoyo, W. Dethrian , D. 2006. Uji Aktifitas Enzim Xilase Intraseluler dan Ekstraseluler Bakteri Endofitik Tanaman *Brucea Javanica*. L. Merr. *Jurnal Ilmu Farmasi Indonesia*. Vol. 4 (2). Hal:51-56
- Sianturi, D. C. 2008. Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Amilase Termofil Kasar dari Sumber Air Panas Penen Sibiru-biru Sumatera Utara. *Tesis*: USU Medan
- Sutimiharja, N. 2008. Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Amilase Termofil Kasar dari Sumber Air Panas Gurukinayan Karo Sumatera Utara. *Tesis*: USU Medan
- Thamrin, E. 2001. Kloning Hidrolase dari Sumber Air Panas Rimbo Panti Sumatera Barat. Thesis: Insitut Pertanian Bogor
- Wirawan, S, K. Rismijana, J. Hidayat, T. 2008. Aplikasi alfa – amilase dan Selulase pada Proses Deinking Kertas Bekas Campuran. *Majalah Ilmiah LIPI*. Vol 1 (43): 1-18