

## Seleksi dan Karakterisasi Bakteri Halotoleran Penghasil Enzim Amilase Dari Produk Fermentasi Ikan-Inasua

### Selection and Characterization of Halotolerant Bacteria that produce Amylase Enzyme from Fish-Inasua Fermented Food

KARINA EKU DWINANDA GUNAWAN, JEPRI AGUNG PRIYANTO, NISA RACHMANIA MUBARIK\*

*Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680*

Diterima 24 Juni 2023/Diterima dalam Bentuk Revisi 14 Agustus 2023/Disetujui 18 Agustus 2023

Fish-inasua fermented food is a potential source to obtain halotolerant bacteria-producing amylase. Previously, four bacterial isolates such as IG12, IG6, IG66, and IG31, isolated from this food, have been reported to be able to produce protease and lipase enzyme, but their potential as amylase enzyme producers have not been studied. This study aims to characterize and test the potential of halotolerant bacteria isolated from this food in producing amylase enzymes. Based on Gram staining, four bacterial isolates were Gram-positive. The qualitative test of amylase on NA medium with the addition of 1% starch showed four bacteria were able to produce amylase in NaCl (0 to 5%)-containing medium. IG66 isolate was the most potential isolate because it had the highest enzyme activity in a medium with 5% NaCl concentration, which was 0.095 U/ml. The amylase activity was produced maximum at the 8<sup>th</sup> hour, which is the early stationary phase. Its maximum activity in the 5% NaCl-containing medium was at the 10<sup>th</sup> hour. In addition, amylase produced by IG66 isolate reached optimum activity at a temperature of 50°C and pH 7. This study concluded that IG66 isolate was the most potential halotolerant isolate that could be developed as an amylase-producing agent.

Key words: amylase activity, hydrolytic enzymes, NaCl concentration

#### PENDAHULUAN

Bakteri halotoleran dikenal sebagai bakteri tahan garam yaitu bakteri yang tidak membutuhkan garam (NaCl) secara mutlak dan mampu tumbuh dengan ada atau tidak ada garam yang tinggi. Berbeda dengan bakteri yang tidak tahan garam, yaitu tidak dapat tumbuh pada lingkungan dengan konsentrasi NaCl lebih dari 2% (0,34 M NaCl), bakteri halotoleran memiliki kemampuan untuk tumbuh pada konsentrasi NaCl lebih dari 2%. Meskipun demikian, bakteri halotoleran lebih menyukai pertumbuhan pada lingkungan tanpa NaCl (Larsen 1986; Rahman *et al.* 2017). Berdasarkan kebutuhan kadar garam optimal untuk pertumbuhannya, bakteri diklasifikasikan menjadi tiga tipe, yaitu *slightly halotolerant*, bakteri yang dapat tumbuh pada konsentrasi NaCl 2-5% (0,34-0,85 M NaCl), *moderate tolerant*, bakteri yang dapat tumbuh pada konsentrasi NaCl 5-20% (0,85-3,4 M NaCl), dan *extreme halophiles*, bakteri yang

tumbuh pada konsentrasi NaCl 20-30 % (3,4-5,1 M NaCl) (Dutta dan Bandopadhyay 2022).

Bakteri halotoleran memiliki mekanisme yang unik untuk menghadapi kondisi lingkungan yang mencekam pada konsentrasi NaCl yang tinggi. Bakteri tersebut mampu mempertahankan tingkat konsentrasi ion yang rendah dengan mensintesis zat terlarut yang kompatibel untuk menyeimbangkan tingkat osmotik sitoplasma dengan lingkungan luar (Roberts 2005). Mekanisme tersebut memungkinkan bakteri halotoleran menghasilkan berbagai metabolit yang dapat dimanfaatkan dalam bidang bioteknologi, misal pigmen bacterioruberin, karotenoid sebagai agen protektif untuk mencegah kerusakan oksidatif, dan aneka enzim, seperti: amilase, protease, kitinase, DNase, lipase dan esterase (Oliveira *et al.* 2015; Dutta dan Bandopadhyay 2022).

Enzim hidrolitik yang dihasilkan oleh bakteri halotoleran dan halofilik memiliki sifat stabilitas yang tinggi yang dibutuhkan untuk berbagai proses industri (Warden *et al.* 2015). Salah satu proses industri yang memanfaatkan bakteri halotoleran ialah produksi ektoin oleh *Halomonas elongata* (Waditee-Sirisattha

\*Penulis korespondensi:

E-mail: nrachmania@apps.ipb.ac.id

*et al.* 2016). Beberapa peneliti telah melaporkan bahwa bakteri halofilik dan halotoleran dapat menghasilkan enzim hidrolitik, misalnya bakteri *Tetragenococcus halophilus* dari fermentasi saus ikan mampu menghasilkan enzim protease (Udomil *et al.* 2010), *Bacillus licheniformis* dari asinan kulit domba dapat menghasilkan enzim protease, lipase, amilase dan kaseinase, *Chromohalobacter japonicus* dari asinan kulit domba mampu menghasilkan enzim protease (Caglayan *et al.* 2017), serta *Halomonas* sp. Y2 dari *black liquor* mampu menghasilkan enzim CMCCase, xilanase, protease, amilase dan pullulanase (Yang *et al.* 2010). Penelitian sebelumnya telah dilaporkan bahwa isolat bakteri asal fermentasi ikan-inasua berpotensi menghasilkan enzim protease, yaitu IG31 dan IG12 (Amaliah 2017; Yandi 2017) dan enzim lipase yaitu isolat bakteri IG6 dan IG66 (Anggriani *et al.* 2019), namun hingga saat ini belum diketahui potensinya sebagai penghasil enzim amilase.

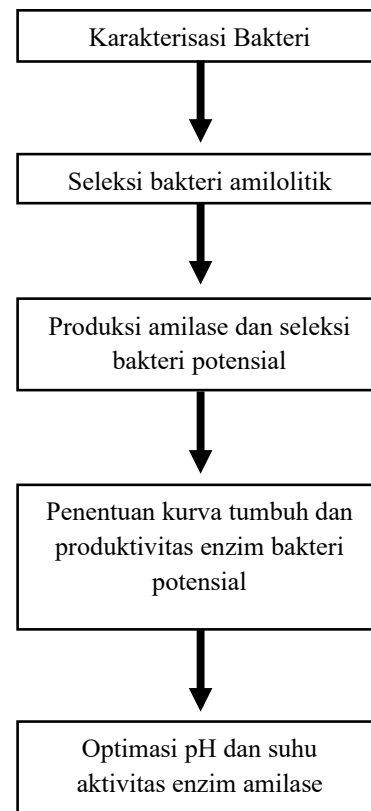
Enzim amilase umum digunakan pada industri pengolahan pati, khususnya untuk membantu proses hidrolisis pati (Souza dan Magalhaes 2010). Enzim amilase yang dihasilkan *B. licheniformis* terbukti dapat digunakan pada hidrolisis suspensi pati, yaitu tahap awal pembuatan etanol (Sanchez dan Cardona 2008). Pencarian isolat bakteri halotoleran penghasil amilase sangat diperlukan untuk membantu katalisis proses kimiawi di bidang industri. Oleh karena itu, seleksi dan karakterisasi empat isolat bakteri dari fermentasi ikan-inasua sebagai penghasil amilase perlu dilakukan. Penelitian ini bertujuan melakukan seleksi dan karakterisasi bakteri halotoleran penghasil amilase dari produk fermentasi ikan-inasua.

## BAHAN DAN METODE

Tahapan dari penelitian ini terdiri atas peremajaan isolat bakteri, karakterisasi bakteri, seleksi bakteri penghasil enzim amilase, produksi enzim amilase ekstrak kasar dan seleksi isolat bakteri potensial penghasil enzim amilase, penentuan kurva tumbuh dan produktivitas enzim amilase dari bakteri potensial, dan optimasi suhu dan pH dari aktivitas enzim amilase (Gambar 1).

**Alat dan Bahan.** Alat yang digunakan dalam penelitian ini ialah *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC), *sentrifuse*, spektrofotometer GENESYS 20, mikroskop cahaya, autoklaf, mikropipet, vortex, shaker, dan alat-alat gelas. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini ialah isolat bakteri IG12, IG6, IG31 dan IG66 yang merupakan hasil isolasi dari produk fermentasi ikan-inasua (Amaliah 2017).

**Waktu dan Tempat Penelitian.** Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret 2021 hingga Juni 2021 di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi,



Gambar 1. Diagram alur penelitian

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.

### Peremajaan dan Karakterisasi Isolat Bakteri.

Isolat bakteri IG12, IG31, IG6 dan IG66 yang berasal dari ampul ditumbuhkan pada media Nutrient Agar (NB) selama 24 jam pada suhu ruang ( $\pm 27^{\circ}\text{C}$ ). Morfologi bakteri seperti warna, bentuk, tepian dan elevasi koloni hasil gores kuadran diamati demikian pula bentuk sel bakteri, penataan sel, dan reaksinya terhadap pewarnaan Gram.

### Seleksi Bakteri Penghasil Enzim Amilase.

Seleksi bakteri penghasil amilase dilakukan secara kualitatif. Metode ini dilakukan untuk menentukan indeks amilolitik keempat isolat bakteri. Isolat bakteri diambil menggunakan sedotan steril sebagai cetakan untuk kemudian ditumbuhkan pada media seleksi yaitu media *Nutrient Agar* (NA) yang telah ditambahkan pati 1%, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang ( $\pm 27^{\circ}\text{C}$ ) (Arya 2018). Larutan iodine selanjutnya diteteskan pada permukaan media seleksi. Isolat bakteri penghasil enzim amilase selanjutnya ditumbuhkan pada media seleksi NA yang mengandung berbagai konsentrasi NaCl, yaitu: 3%, 15%, dan 30%. Indeks Amilolitik (IA) diukur dengan persamaan berikut:

$$IA = \frac{\text{diameter zona bening (cm)} - \text{diamater koloni (cm)}}{\text{diameter koloni (cm)}}$$

### **Produksi Enzim Amilase Ekstrak Kasar.**

Sebanyak 2 ose isolat bakteri penghasil enzim amilase pada media NA diinokulasikan ke dalam media *Nutrient Broth* (NB) yang telah ditambahkan pati 1% dengan konsentrasi NaCl 0% dan 5%, kemudian diinkubasi pada suhu ruang ( $\pm 27^{\circ}\text{C}$ ) selama 24 jam pada *shaker*. Prosedur ini bertujuan untuk melihat aktivitas enzim amilase yang dihasilkan oleh bakteri pada konsentrasi NaCl 0% dan 5%. Kultur bakteri selanjutnya disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 5.000 rpm untuk mendapatkan ekstrak kasar enzim amilase. Supernatan yang terbentuk selanjutnya digunakan untuk tahap pengukuran aktivitas amilase kasar (Arya 2018).

### **Pengukuran Aktivitas Amilase Ekstrak**

**Kasar.** Pengukuran aktivitas enzim amilase kasar dilakukan dengan metode Bernfeld (Kriger *et al.* 2020). Sebanyak 0,5 ml pati terlarut 1% dalam bufer Tris-HCl 0,05 M pH 7, direaksikan dengan 0,5 ml enzim amilase ekstrak kasar, lalu diinkubasi selama 20 menit pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ . Larutan ditambahkan DNS (asam 3,5-dinitro salisilat) dan ditempatkan pada air mendidih selama 5 menit. Blanko disiapkan dengan mengganti enzim amilase ekstrak kasar dengan akuades. Kontrol disiapkan dengan menambahkan enzim setelah penambahan DNS. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 550 nm. Larutan maltosa digunakan sebagai standar dengan konsentrasi maltosa 100-1.000 ppm, dengan selang 100 ppm. Satu unit aktivitas enzim amilase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk menghasilkan 1  $\mu\text{mol}$  gula pereduksi berupa maltosa per menit pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ .

### **Perhitungan Sel Bakteri Penghasil Enzim**

**Amilase Terpilih.** Perhitungan jumlah sel bakteri dilakukan dengan metode *Total Plate Count* (TPC) dan turbiditas sel (Amaliah 2017). Sebanyak 2 ose isolat bakteri terpilih diambil dan ditumbuhkan pada media *Nutrient Broth* (NB) dengan konsentrasi NaCl 0% (tanpa NaCl) dan 5%. Media diinkubasi dalam *shaker* selama 8 jam pada suhu ruang ( $\pm 27^{\circ}\text{C}$ ). Sebanyak 3 ml kultur (1:1), masing-masing diencerkan ke dalam 3 ml media NB steril dengan konsentrasi NaCl 0% dan 5%, dengan perbandingan 1:2, 1:4, 1:8 dan 1:16. Setiap pengenceran diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer GENESYS 20. Pengenceran serial dilakukan hingga  $10^{-7}$  dengan garam fisiologis dilakukan untuk menghitung jumlah sel bakteri dengan metode *total plate count* (TPC). TPC dilakukan pada dua media yang berbeda, yaitu media NA dengan konsentrasi NaCl 0 dan NaCl 5%. Kedua kurva standar bakteri dibuat berdasarkan hubungan antara OD terkoreksi dengan jumlah sel/ml.

### **Pembuatan Kurva Tumbuh dan Produksi Enzim Amilase Ekstrak Kasar.**

Sebanyak 2 ose isolat terpilih yang memiliki aktivitas enzim amilase tertinggi, ditumbuhkan pada 30 ml media NB yang telah ditambah pati terlarut 1% sebagai media kultivasi, kemudian diinkubasi selama 12 jam pada suhu ruang ( $\pm 27^{\circ}\text{C}$ ) di atas *shaker*. Inokulum sebanyak 0,3 ml dimasukkan ke dalam media NB yang telah ditambahkan pati 1% sebagai media produksi. Kultur kemudian diinkubasi selama 12 jam pada *shaker*. Setiap 2 jam selama 12 jam kultur diambil sebanyak 1 ml untuk uji turbiditas sel dan 1 ml untuk uji aktivitas enzim amilase ekstrak kasar. Uji turbiditas sel dilakukan dengan cara mengukur absorbansi kultur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm.

### **Uji Pengaruh Suhu dan pH terhadap Aktivitas**

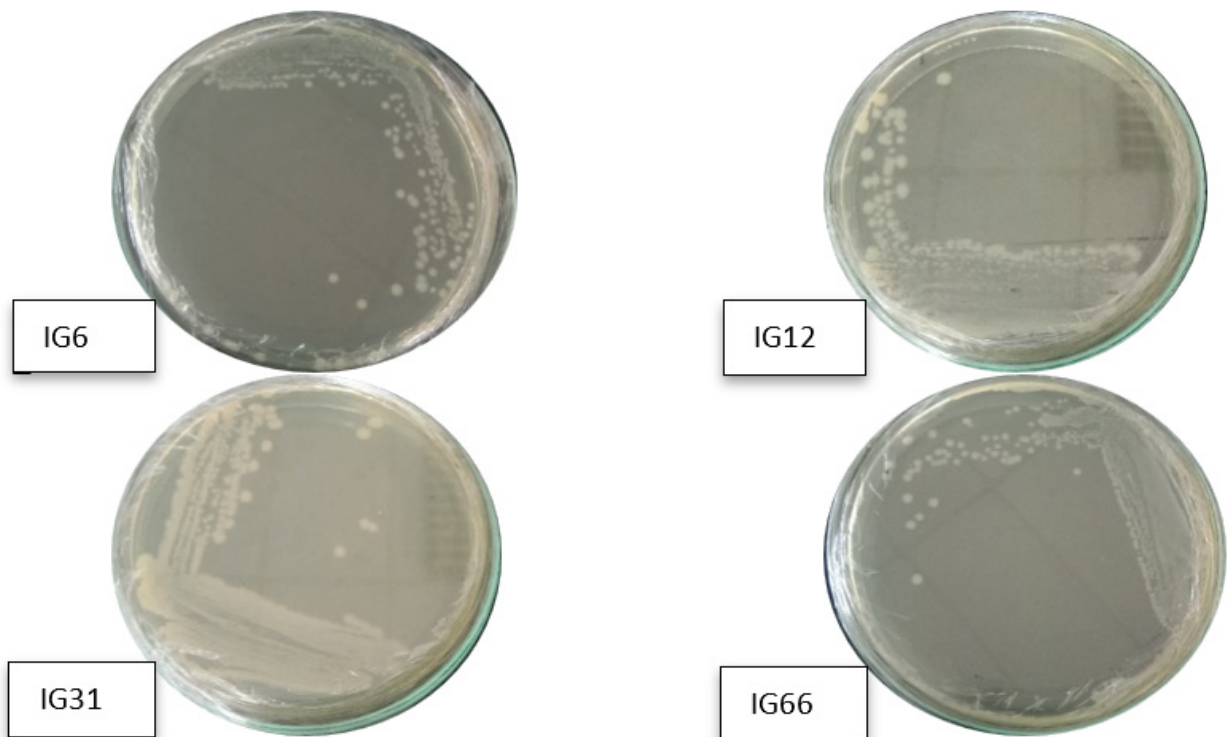
**Enzim.** Pengaruh suhu terhadap enzim amilase ekstrak kasar diuji dengan cara mengukur aktivitas amilase pada suhu 10, 27, 37, 50, dan  $90^{\circ}\text{C}$  selama 20 menit. Pengaruh pH diuji dengan menggunakan 0,1M bufer fosfat untuk pH 5 dan 6, 0,05M bufer Tris-HCl untuk pH 7, 8 dan 9.

**Analisis Data.** Data yang telah diperoleh kemudian dianalisis secara deskriptif, yaitu dengan menyajikan dan membandingkannya dengan literatur.

## **HASIL**

**Karakteristik Morfologi Bakteri.** Morfologi koloni dari isolat bakteri IG12, IG31, IG6, dan IG66 memiliki ciri morfologi yang mirip, yaitu berbentuk bulat, berwarna putih, dengan elevasi cembung dan tepian berlekuk (Gambar 2). Namun, perbedaan antara keempat isolat bakteri ini terdapat pada morfologi sel, khususnya pada penataan selnya (Tabel 1). Hasil pewarnaan gram menunjukkan bahwa keempat isolat merupakan bakteri gram positif dengan bentuk batang atau basil dengan penataan sel yang berbeda. Isolat bakteri IG6 dan IG12 berpasangan, sedangkan isolat bakteri IG66 dan IG31 membentuk rantai (Gambar 3).

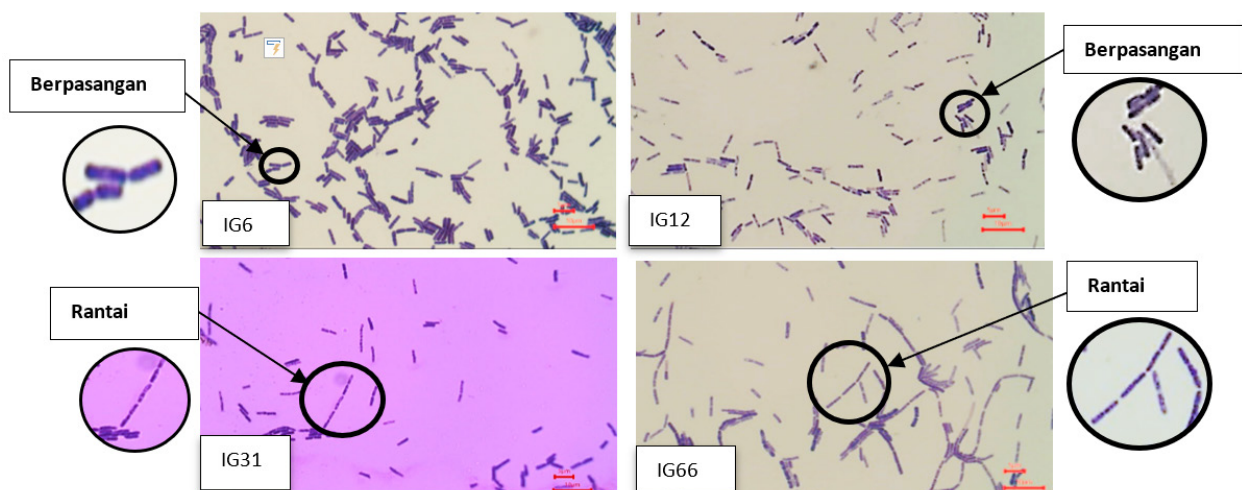
**Aktivitas Enzim Amilase.** Keempat isolat bakteri memiliki kemampuan untuk menghasilkan enzim amilase. Hal ini ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekeliling koloni bakteri pada media seleksi, yaitu media Nutrient Agar (NA) yang telah ditambahkan pati 1% (Gambar 4). Selain memiliki kemampuan menghasilkan enzim amilase, keempat isolat bakteri juga memiliki toleransi terhadap NaCl. Berdasarkan perhitungan indeks amilolitik pada setiap konsentrasi NaCl, keempat isolat bakteri dapat menghasilkan enzim amilase pada konsentrasi NaCl 0%, 3%, dan 5% (Tabel 2).



Gambar 2. Morfologi koloni isolat bakteri setelah inkubasi selama 24 jam pada suhu ruang ( $\pm 27^{\circ}\text{C}$ ) pada media NA

Tabel 1. Karakter morfologi koloni dan sel bakteri

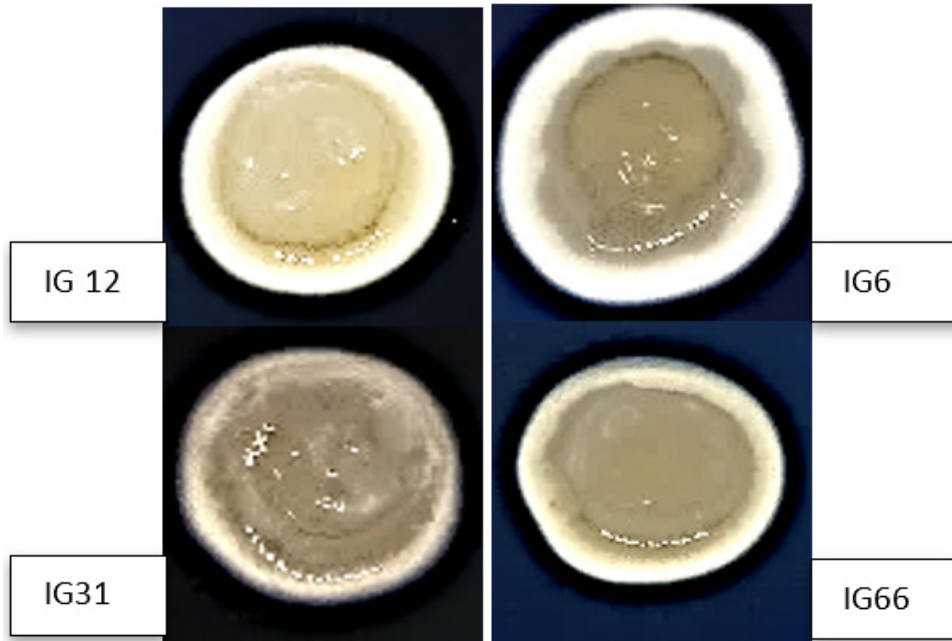
Kode isolat	Morfologi koloni				Morfologi sel	
	Warna	Bentuk	Elevasi	Tepian	Penataan sel	Reaksi gram sel
IG12	Putih	Bulat	Cembung	Berlekuk	berpasangan	Positif
IG31	Putih	Bulat	Cembung	Berlekuk	rantai	Positif
IG6	Putih	Bulat	Cembung	Berlekuk	berpasangan	Positif
IG66	Putih	Bulat	Cembung	Berlekuk	rantai	Positif



Gambar 3. Morfologi sel isolat bakteri dan reaksinya terhadap pewarnaan gram yang diamati menggunakan optilab dengan perbesaran 1.000 x

Isolat IG12, IG31 dan IG6 mengalami penurunan indeks amilolitik seiring dengan peningkatan konsentrasi NaCl pada media. Isolat bakteri IG66 mengalami peningkatan indeks amilolitik pada konsentrasi NaCl 3% dan NaCl 5%. Peningkatan indeks amilolitik ini mengindikasikan adanya peningkatan aktivitas enzim amilase (Tabel 2).

Aktivitas enzim amilase isolat bakteri IG31, IG12, dan IG6 pada konsentrasi NaCl 5% lebih kecil dibandingkan dengan aktivitas enzim amilasena pada konsentrasi NaCl 0%. Aktivitas enzim amilase isolat bakteri IG66 pada konsentrasi NaCl 5% lebih besar dibandingkan dengan aktivitas enzim amilase pada konsentrasi NaCl 0% (Tabel 3). Hal ini sejalan



Gambar 4. Zona bening pada media seleksi tanpa NaCl setelah 24 jam diinkubasi pada suhu ruang ( $\pm 27^{\circ}\text{C}$ )

Tabel 2. Indeks amilolitik empat isolat bakteri pada berbagai konsentrasi NaCl

Kode isolat	Indeks amilolitik pada berbagai konsentrasi NaCl				
	0%	3%	5%	10%	15%
IG12	0,53	0,13	0,07	-	-
IG31	0,30	0,10	0,17	-	-
IG6	0,59	0,21	0,11	-	-
IG66	0,49	0,20	0,23	-	-

-: Tidak ada pertumbuhan bakteri dan tidak ada aktivitas hidrolisis

dengan hasil pengujian indeks amilolitik yang dilakukan sebelumnya.

**Kurva Pertumbuhan dan Produktivitas Enzim Amilase Bakteri Isolat IG66.** Hasil pengukuran kurva pertumbuhan dan aktivitas enzim amilase isolat bakteri IG66 pada media tanpa NaCl yang dilakukan setiap 2 jam selama 12 jam, menunjukkan bahwa terdapat tiga fase pertumbuhan bakteri yang teramati, yaitu fase lag, fase eksponensial, dan fase stasioner. Aktivitas enzim tertinggi pada jam ke-8 pertumbuhan dan memasuki fase stasioner (Gambar 5).

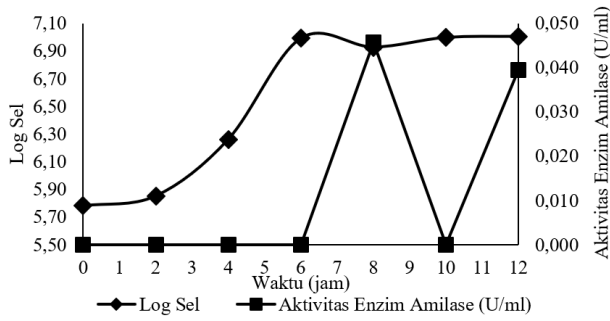
Kurva pertumbuhan dari isolat bakteri IG66 yang ditumbuhkan pada media dengan konsentrasi NaCl 5% menunjukkan bahwa bakteri belum mencapai fase stasioner. Fase pertumbuhan bakteri yang teramati ialah fase eksponensial. Aktivitas enzim amilase mulai terlihat sejak jam ke-0, dan mencapai maksimum pada jam ke-10 saat fase eksponensial (Gambar 6).

Tabel 3. Aktivitas enzim amilase pada konsentrasi NaCl 0% dan 5%

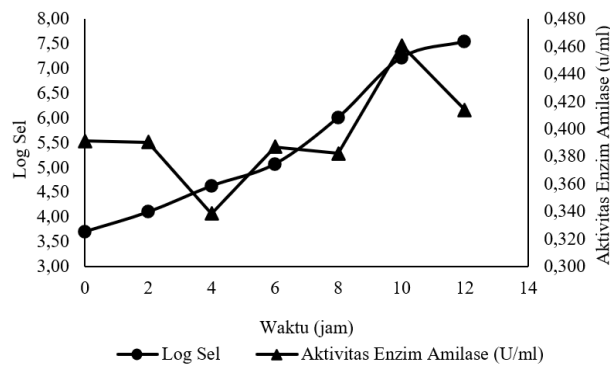
Konsentrasi NaCl (%)	Kode isolat	Aktivitas enzim amilase (U/ml)
0	IG31	0,058
	IG12	0,084
	IG66	0,048
	IG6	0,099
5	IG31	0,044
	IG12	0,037
	IG66	0,095
	IG6	0,051

**Kondisi Optimum Aktivitas Amilase Isolat IG66.**

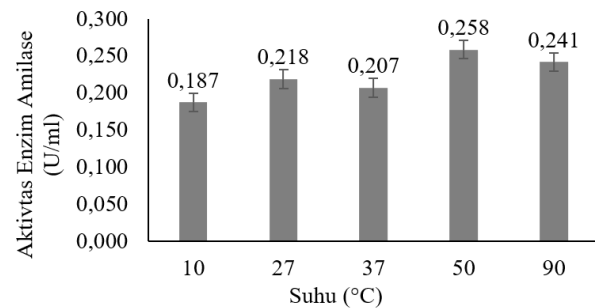
Karakterisasi aktivitas enzim amilase dilakukan untuk mengetahui kondisi suhu dan pH optimum dari aktivitas enzim amilase yang dihasilkan isolat IG66. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa suhu optimum dari aktivitas enzim amilase yang dihasilkan isolat bakteri IG66 berkisar antara 10-90°C, dengan aktivitas enzim maksimum pada suhu 50°C (Gambar 7). Aktivitas enzim amilase yang dihasilkan oleh isolat bakteri cukup stabil pada pH 5, 6, 7, dan 9, namun mengalami penurunan aktivitas enzim yang cukup signifikan pada pH 8. Kondisi pH optimum dari aktivitas enzim amilase yang diproduksi oleh isolat bakteri IG66 ialah pH 7 (Gambar 8).



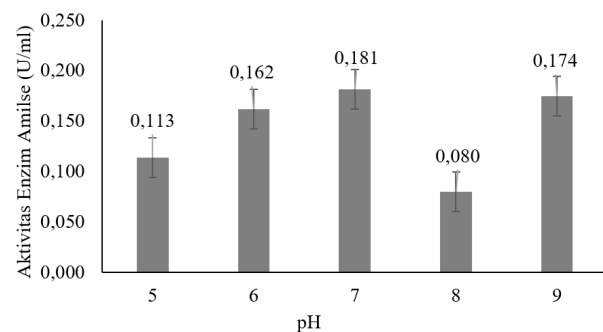
Gambar 5. Kurva pertumbuhan dan produktivitas enzim amilase isolat bakteri IG66 pada media tanpa penambahan NaCl



Gambar 6. Kurva pertumbuhan dan produktivitas enzim amilase isolat bakteri IG66 pada media dengan penambahan NaCl 5%



Gambar 7. Aktivitas enzim amilase dari isolat IG66 yang dihasilkan dari media produksi tanpa penambahan NaCl pada berbagai suhu



Gambar 8. Aktivitas enzim amilase dari isolat IG66 yang dihasilkan dari media produksi tanpa penambahan NaCl pada berbagai pH

## PEMBAHASAN

Sebanyak empat isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian ini memiliki morfologi koloni dan sel yang beragam. Hal ini mengindikasikan bahwa keempat isolat tersebut diduga merupakan galur bakteri yang berbeda. Sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Anggriani *et al.* (2019), berdasarkan analisis gen 16S rRNA isolat IG6 dan IG12 masing-masing memiliki kesamaan dengan *Bacillus paramycoides* dan *Bacillus kochii*. Identifikasi secara molekuler perlu dilakukan pada penelitian selanjutnya untuk mengetahui identitas dari isolat bakteri IG66 dan IG12.

Hasil penapisan menunjukkan bahwa keempat isolat bakteri memiliki kemampuan untuk menghasilkan enzim amilase pada konsentrasi NaCl 0% hingga 5%. Isolat bakteri IG66 memiliki aktivitas enzim amilase lebih besar pada konsentrasi NaCl 5% dibandingkan dengan aktivitas enzim amilase pada konsentrasi NaCl 0%. Hal ini menunjukkan bahwa enzim yang diproduksi isolat IG66 memiliki ketahanan pada kadar NaCl 5%. Organisme yang sangat toleran terhadap garam memiliki enzim dengan permukaan yang bermuatan negatif, aksesibilitas pelarut yang rendah, serta menunjukkan peran kandungan ion natrium dalam meningkatkan stabilitas enzim halotoleran (Warden *et al.* 2015). Dengan demikian, kelarutan dan aktivitas enzim halotoleran akan meningkat kestabilannya pada keadaan salinitas yang lebih tinggi.

Kurva pertumbuhan isolat bakteri IG66 pada media tanpa NaCl menunjukkan bahwa aktivitas enzim amilase mulai teramati pada jam ke-8, yaitu pada fase stasioner. Pertumbuhan bakteri ini pada media yang mengandung NaCl 5%, menunjukkan produksi amilase dari awal pertumbuhan yang diduga karena pengaruh inokulum yang dikondisikan pada media yang sama yang mengandung NaCl 5%. Aktivitas amilase cenderung mengalami peningkatan pada fase eksponensial, dan aktivitas amilase tertinggi dicapai pada awal fase stasioner. Sesuai dengan penelitian sebelumnya, aktivitas enzim amilase yang dihasilkan oleh bakteri halofil dimulai pada fase eksponensial dan mencapai maksimum pada fase stasioner (Kumar *et al.* 2016). Hasil penelitian Sahoo *et al.* (2016) menunjukkan bahwa aktivitas enzim amilase *Bacillus* sp. MRS6 telah terdeteksi pada jam ke-12 yaitu awal fase eksponensial dan mencapai maksimum sekitar jam ke-42 pada fase stasioner.

Hasil pengukuran kurva produktivitas enzim amilase isolat IG66 menunjukkan peningkatan aktivitas enzim amilase pada media dengan konsentrasi NaCl



5% dibandingkan dengan aktivitas enzim pada media tanpa NaCl. Berbeda dengan ketiga isolat lainnya yang mengalami penurunan aktivitas amilase pada media yang mengandung NaCl 5% dibandingkan tanpa NaCl (Tabel 3). Penelitian yang dilakukan oleh Ashwini *et al.* (2011), menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi NaCl hingga 4,5% pada media produksi akan meningkatkan aktivitas enzim amilase dari bakteri *Bacillus* sp. marini. Produksi enzim oleh bakteri sangat bergantung pada spesies, nutrisi, dan kondisi lingkungannya. Umumnya, enzim amilase mencapai produksi optimum pada fase stasioner (Li dan Yu 2011). Hal ini dapat disebabkan ketersediaan kadar glukosa pada media sebelum fase stasioner masih tinggi yang akan menurunkan aktivitas enzim amilase (Coronado *et al.* 2000).

Aktivitas enzim amilase yang dihasilkan oleh isolat bakteri IG66 memiliki rentang pH yang cukup luas. Enzim amilase yang dihasilkan dapat aktif pada pH 5-9, namun mencapai optimum pada pH 7. Bakteri *Bacillus* sp. memiliki aktivitas enzim optimum pada pH 7-10 (Behal *et al.* 2006). Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa aktivitas enzim amilase dari isolat bakteri IG66 memiliki rentang suhu yang luas. Salah satu bakteri yang memiliki aktivitas amilase pada rentang suhu yang luas ialah *B. cereus*. Berdasarkan penelitian sebelumnya, *Bacillus cereus* masih dapat mempertahankan aktivitas enzim amilase pada suhu 10°C (Vester *et al.* 2014). Enzim amilase yang dihasilkan isolat bakteri IG66 terdeteksi pada suhu 10°C hingga 90°C, dengan aktivitas enzim amilase optimum pada suhu 50°C. *Bacillus cereus* juga memiliki aktivitas enzim amilase optimum pada suhu 50°C (Kalaiarasi dan Parvatham 2013). Hal ini merupakan karakteristik yang unik yang dimiliki oleh *Bacillus* sp, yaitu tumbuh optimum pada suhu mesofilik, sedangkan aktivitas enzim aktif dan stabil pada kondisi termofilik, antara suhu 50-70°C (Saxena dan Singh 2011). Isolat bakteri IG66 diduga termasuk ke dalam bakteri *Bacillus* sp., namun untuk menentukan identitas dari bakteri ini perlu dilakukan identifikasi secara molekuler.

Simpulan dari hasil penelitian ini ialah dari empat isolat bakteri yang diuji, isolat bakteri IG66 merupakan bakteri halotoleran yang tahan pada kadar NaCl hingga 5%, tergolong slightly halotolerant. Isolat bakteri IG66 merupakan bakteri Gram positif, berbentuk batang dengan penataan menyerupai rantai. Isolat IG66 menghasilkan enzim amilase maksimum pada jam ke-8, yaitu pada fase stasioner. Enzim amilase yang dihasilkan isolat bakteri IG66 memiliki aktivitas enzim optimum pada suhu 50°C. Identifikasi molekuler perlu dilakukan untuk mengetahui identitas dari isolat bakteri IG66.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amaliah P. 2017. Isolasi dan seleksi bakteri proteolitik halotoleran dari inasua dan karakterisasi aktivitas proteasenya [Skripsi]. Bogor, Indonesia: Institut Pertanian Bogor.
- Anggriani L, Budiarti S, Mubarik NR. 2019. Lipase-producing ability of bacteria from inasua (fish fermented product) from Central Moluccas, Indonesia. *Biodiversitas* 21:622-628. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210226>
- Arya HS. 2018. Seleksi dan karakterisasi amilase dari bakteri halotoleran asal produk fermentasi ikan-inasua [Skripsi]. Bogor, Indonesia: Insitut Pertanian Bogor.
- Ashwini K, Kumar G, Karthik L, Rao BKV. 2011. Optimization, production and partial purification of extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. marini. *Archives of Applied Science Research* 3: 33-42.
- Behal A, Singh J, Sharma MK, Puri P, Batra N. 2006. Characterization of alkaline  $\alpha$ - amylase from *Bacillus* sp. AB 04. *IJAB* 8:80-83.
- Caglayan P, Birbir M, Sanchez-Porro C, Ventosa A. 2017. Screening of industrially important enzymes produced by moderately halophilic bacteria isolated from salted sheep skins of diverse origin. *Journal of the American Leather Chemist Association* 112:207-216.
- Coronado M, Vargas C, Hofemeister J, Ventosa A, Nieto JJ. 2000. Production and biochemical characterization of an  $\alpha$ -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. *FEMS Microbiology Letters* 18367-71. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb08935.x>
- Dutta B, Bandopadhyay R. 2022. Biotechnological potentials of halophilic microorganisms and their impact on mankind. *Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci* 11:1-16. <https://doi.org/10.1186/s43088-022-00252-w>
- Kalaiarasi K, Parvatham R. 2013. Optimization of process parameters for  $\alpha$ -amylase production under solid-state fermentation by *Bacillus cereus* MTCC 10202. *African Journal of Microbiology Research* 7:5166-5177. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.1655>
- Kruger O, Budenkova E, Babich O, Suhih S, Patyukov N, Masyutin Y, Dolganuk V, Chupakhin E. 2020. The process of producing bioethanol from delignified cellulose isolated from plants of the *Miscanthus* genus. *Bioengineering* 7: 61-71. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7020061>
- Kumar S, Grewal J, Sadaf A, Hemamalini R, Khare SK. 2016. Halophiles as a source of polyextremophilic  $\alpha$ -amylase for industrial application. *AIMS Microbiology* 2: 1-26. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2016.1.1>
- Larsen H. 1986. Halophilic and halotolerant microorganism-an overview and historical perspective. *FEMS Microbiology: Review* 2:3 - 7. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1986.tb01835.x>
- Li Xi, Yu H. 2011. Extracellular production of beta-amylase by a halophilic isolate, *Halobacillus* sp. LY9. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 38:1837-1843. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-0972-1>
- Oliveira LCG, Ramos PL, Marem A, Kondo MY, Rocha RCS, Bertolini T, Silveira MAV, Cruz JBD, Vasconcelos SPD, Juliano L, Okamoto DN. 2015. Halotolerant bacteria in the Sao Paulo zoo composting process and their hydrolases bioproducts. *Brazilian Journal of Microbiology* 46:347-354. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246220130316>
- Rahman SS, Siddique R, Tabassum N. 2017. Isolation and identification of halotolerant soil bacteria from coastal Patenga area. *BMC Research Notes* 10:1-6. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2855-7>
- Roberts MF. 2005. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline systems* 1:1-30. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-1-5>

- Sahoo S, Roy S, Maiti S. 2016. A high salt stable  $\alpha$ -amylase by *Bacillus* sp. MRS6 isolated from municipal solid waste; purification, characterization and solid state fermentation. *Enzyme Engineering* 5:1-8.
- Sanchez OJ, Cardona CA. 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology* 99:5270-5295. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.013>
- Saxena R, Singh R. 2011. Amylase production by solid-state fermentation of agro-industrial waste using *Bacillus* sp. *Brazilian journal of Microbiology* 42:1334-1342. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000400014>
- Souza PMD, Magalhaes PDOE. 2010. Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry - a review. *Brazilian Journal of Microbiology* 41:850-861. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004>
- Udomil N, Rodtong S, Tanasupwat S, Yongsawatdigul J. 2010. Proteinase-producing halophilic lactic acid bacteria isolated from fish sauce fermentation and their ability to produce volatile compounds. *International Journal of Food Microbiology* 141:186-194. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.05.016>
- Vester JK, Glaring MA, Stougaard MA, Stougaard P. 2014. An exceptionally cold-adapted alpha-amylase from metagenomic library of a cold and alkaline environment. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99:717-727. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5931-0>
- Waditee-Sirisattha R, Kageyama H, Takabe T. 2016. Halophilic microorganism resources and their application in industrial and environmental biotechnology. *AIMS Microbiology* 2:42-54. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2016.1.42>
- Warden AC, Williams M, Peat MS, Seabrook SA, Newman J, Dojchinov G, Haritos VS. 2015. Rational engineering of a mesohalophilic carbonic anhydrase to an extreme halotolerant biocatalyst. *Nature Communication* 6:1-10. <https://doi.org/10.1038/ncomms10278>
- Yandi D. 2017. Seleksi bakteri proteolitik dari inasua dan karakterisasi aktivitas proteasenya [Skripsi]. Bogor, Indonesia: Institut Pertanian Bogor.
- Yang C, Wang Z, Li Y, Niu Y, Du M, He X, Ma C, Tang H, Xu P. 2010. Metabolic versatility of halotolerant and alkaliphilic stains of *Halomonas* isolated from alkaline black liquor. *Bioresource Technology* 101:6778-6784. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.108>