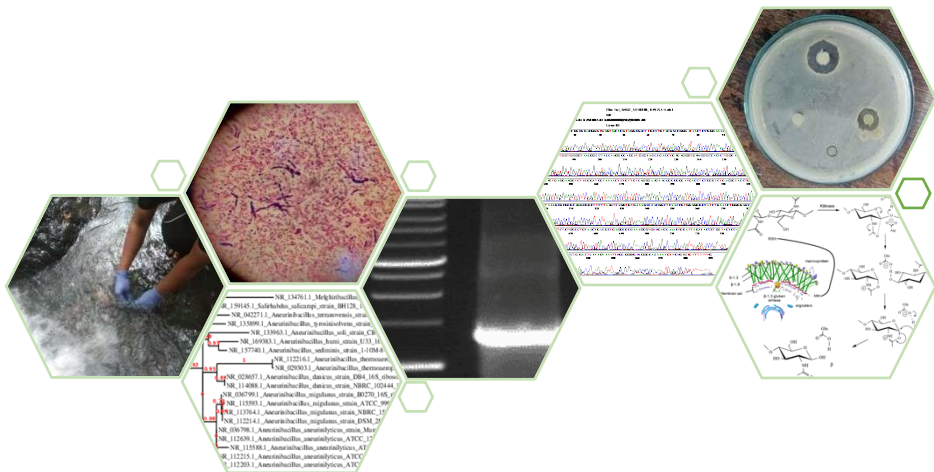


**OPTIMASI PRODUKSI KITINASE DARI ISOLAT BAKTERI
TERMOFILIK *Aneurinibacillus Thermoaerophilus* STRAIN DSM
10154 SEBAGAI PENDEGRADASI KITIN PADA DINDING SEL
JAMUR *Ganoderma* sp.**

**OPTIMIZATION PRODUCTION OF CHITINASE FROM ISOLATES
OF THERMOPHILIC BACTERIA *Aneurinibacillus
thermoaerophilus* DSM 10154 STRAIN AS A DEGRADER OF
CHITIN ON THE CELL WALL OF THE FUNGUS *Ganoderma* sp.**



**WAHYUDIN RAUF
H01222007**



**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**OPTIMASI PRODUKSI KITINASE DARI ISOLAT BAKTERI
TERMOFILIK *Aneurinibacillus Thermoaerophilus* STRAIN DSM
10154 SEBAGAI PENDEGRADASI KITIN PADA DINDING SEL
JAMUR *Ganoderma* sp.**

WAHYUDIN RAUF

H012222007



**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**OPTIMASI PRODUKSI KITINASE DARI ISOLAT BAKTERI TERMOFILIK
Aneurinibacillus Thermoaerophilus STRAIN DSM 10154 SEBAGAI
PENDEGRADASI KITIN PADA DINDING SEL JAMUR *Ganoderma* sp.**

Tesis
sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Kimia

Disusun dan diajukan oleh

WAHYUDIN RAUF
H012222007

kepada

**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

TESIS

OPTIMASI PRODUKSI KITINASE DARI ISOLAT BAKTERI
TERMOFILIK *Aneurinibacillus Thermoaerophilus* STRAIN DSM
10154 SEBAGAI PENDEGRADASI KITIN PADA DINDING SEL
JAMUR *Ganoderma* sp.

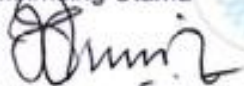
WAHYUDIN RAUF
H012222007

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Magister pada
tanggal 19 Agustus 2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat
kelulusan

pada

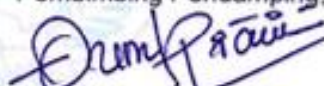
Program Studi Magister Kimia
Departemen Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Hasanuddin
Makassar
Mengesahkan,

Pembimbing Utama



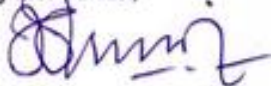
Prof. Dr. Hasnah Natsir, M.Si
NIP. 194908271976021001

Pembimbing Pendamping,



Dr. Nur Umriani Permatasari, M.Si
NIP. 198112092006042003

Ketua Program Studi
Magister Kimia,



Prof. Dr. Hasnah Natsir, M.Si
NIP. 196203201987112001

Dekan Fakultas MIPA
Universitas Hasanuddin,



Dr. Eng. Amiruddin, M.Si
NIP. 197205151997021002

**PERNYATAAN KEASLIAN TESIS
DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA**

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul "**OPTIMASI PRODUKSI KITINASE DARI ISOLAT BAKTERI TERMOFILIK *Aneurinibacillus Thermoaerophilus* STRAIN DSM 10154 SEBAGAI PENDEGRADASI KITIN PADA DINDING SEL JAMUR *Ganoderma* sp.**" adalah benar karya saya dengan arahan dari tim pembimbing Prof. Dr Hasnah Natsir, M.Si sebagai Pembimbing Utama dan Dr. Nur Umriani Permatasari, M.Si sebagai Pembimbing Pendamping. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka tesis ini. Sebagian dari isi tesis ini akan dipublikasikan di Jurnal Biodiversitas ISSN:1412-033XE-ISSN:2085-4722 sebagai artikel dengan judul "*Isolation and Identification of Thermophilic Bacteria Producing Chitinase from Lejja Hot Spring Water, Soppeng Regency, South Sulawesi*". Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku. Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 16 Juli 2024



Wahyudin Rauf
NIM H012222007

UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrohmanirrohim, segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah S.W.T karena berkat rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini dengan judul "OPTIMASI PRODUKSI KITINASE DARI ISOLAT BAKTERI TERMOFILIK *Aneurinibacillus Thermoaerophilus* STRAIN DSM 10154 SEBAGAI PENDEGRADASI KITIN PADA DINDING SEL JAMUR *Ganoderma* sp.". Shalatawat serta salam semoga tetap tercurah kepada junjungan Nabi Muhammad S.A.W, manusia terbaik sepanjang masa, yang telah menjadi guru terbaik dan menjadi suri tauladan bagi umat Islam di seluruh dunia.

Penelitian yang saya lakukan ini dapat terlaksana dengan sukses dan tesis ini dapat terampungkan atas bimbingan, diskusi dan arahan **Prof. Dr. Hasnah Natsir, M.Si** sebagai ketua penasehat dan **Dr. Nur Umriani Permatasari, M.Si** sebagai anggota tim penasehat. Terima kasih dan penghargaan penulis sampaikan kepada tim penasehat yang sudah menjadi sebagai orangtua penulis di kampus dan senantiasa meluangkan waktu, tenaga, bahkan materi dan pikirannya dalam membimbing dan memberi masukan yang sangat baik selama perkuliahan berlangsung. Tak lupa pula penulis menghaturkan permohonan maaf yang sebesar-besarnya atas semua kesalahan yang tidak disengaja yang pernah dilakukan penulis hingga tesis ini terselesaikan.

Kepada kedua orangtua tercinta, ayahanda **Abd. Rauf** dan Ibunda tercinta di surga **almh. Naisa** terima kasih banyak untuk setiap semangat, motivasi, kerja keras, kasih sayang dan do'a yang tiada hentinya diberikan kepada penulis. Semoga Allah senantiasa memberikan rahmat berupa kasih sayang, keteguhan hati di atas agama Allah. Terima kasih juga kepada saudara-saudara kandung penulis **Abd. Halim, Kasmawati, Rahman Rauf, Rumail Rauf** yang selalu memberikan motivasi yang dijadikan sebagai penyemangat bagi penulis dalam mengerjakan tugas akhir ini.

Penulis juga tak lupa mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ayahanda **Dr. Eng Amiruddin**, selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin beserta semua staf pegawai
2. Ibu dan Bapak Dosen sebagai tim penguji **Prof. Dr. Nunuk Hariani Soekamto, M.S., Prof. Dr. Abd. Wahid Wahab, M.Sc., dan Prof. Dr. Paulina taba, M.Phill**
3. Kepala Laboratorium Biokimia, Departemen Kimia, FMIPA UNHAS Ibu **Dr. Rugayyah A. Arafah, M.Si** dan laboran
4. Seluruh staf pegawai lingkup fakultas dan terkhusus kakak **Risky Mahira** (kiki) sebagai admin program studi magister kimia

5. Semua rekan kerja peneliti (**Nano, Anita, Eka, Abbas dan Beska**) yang telah berjuang bersama dan mengeluh bersama hingga terselesaikannya penelitian ini.
6. Semua teman-teman seperjuangan Kimia 2017 dan Alifatik 2017
7. Seluruh anggota Tim Titanium Qalem (**Eka, Akifa, Besse, Mirna, Yuli, Asti, Abel, Sahrul** serta se-marga wahyu "**Wahyuti** dan **Wahyuni**" kadang-kadang juga **Wahyuli** dijerumuskan) yang merupakan teman-teman seperjuangan di Magister Kimia
8. Teman-teman di Kampung Ce'de' (**Dugong, Baria, Indah, Raya (Sahir), Fitri, Eba, Kindong, Jali, Andar, Firman, Om Madong, Tanta Semma** dan seluruh teman-teman yang belum bisa saya sebut satu per satu

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dan kesalahan dalam penyusunan tesis ini, oleh karena itu saran dan kritik yang bersifat membangun sangat penulis harapkan. Semoga tulisan ini dapat memberikan manfaat bagi penulis dan pembaca tulisan ini. Aamiin.

Penulis

Makassar, 16 Agustus 2024

2024

ABSTRAK

WAHYUDIN RAUF. **OPTIMASI PRODUKSI KITINASE DARI ISOLAT BAKTERI TERMOFILIK *Aneurinibacillus Thermoaerophilus* STRAIN DSM 10154 SEBAGAI PENDEGRADASI KITIN PADA DINDING SEL JAMUR *Ganoderma* sp.** (Dibimbing oleh HASNAH NATSIR, NUR UMRIANI PERMATASARI).

Enzim adalah protein penting dalam aktivitas biologis yang berperan sebagai katalisator, mempercepat reaksi kimia tanpa habis dalam prosesnya. Dalam pertanian, enzim meningkatkan ketersediaan nutrisi dan dekomposisi bahan organik, meningkatkan kesuburan tanah dan produktivitas tanaman. Bioteknologi terus mengembangkan penggunaan enzim dari mikroorganismenya. Misalnya, kitinase digunakan dalam industri pengolahan limbah untuk menguraikan kitin dari limbah udang dan kepiting. Penelitian ini bertujuan menentukan aktivitas kitinase dan karakteristik bakteri termofilik *Aneurinibacillus thermoaerophilus* Strain DSM 10154, serta memproduksi, memurnikan, dan menentukan kondisi optimal aktivitas kitinase (pH, suhu, substrat, ion logam) untuk menguraikan kitin pada dinding sel jamur *Ganoderma* sp. Tahapannya meliputi isolasi dan karakterisasi bakteri penghasil kitinase, produksi dan pemurnian kitinase, serta aplikasi kitinase. Identifikasi bakteri dengan analisis gen 16S rRNA menunjukkan isolat K.W.R.4.1 memiliki kemiripan 98.57% dengan *Aneurinibacillus thermoaerophilus* Strain DSM 10154. Bakteri ini optimal memproduksi kitinase pada 48 jam inkubasi dengan aktivitas tertinggi 0.1670 U/mL. Kitinase ini optimal pada pH 6, suhu 45°C, dan substrat 1%, stabil pada pH 6-7 dan suhu 45-50°C. Ion logam seperti Na⁺, K⁺, Zn²⁺, Ba²⁺, Mg²⁺ dan Co²⁺ pada konsentrasi 10 mM dapat meningkatkan aktivitas enzim, sementara ion Ca²⁺ pada konsentrasi 1-50 mM bertindak sebagai inhibitor enzim. Proses pemurnian menggunakan fraksinasi amonium sulfat dan dialisis. Fraksinasi dengan konsentrasi amonium sulfat 40-60% meningkatkan aktivitas spesifik kitinase menjadi 0.1175 U/mg dan kemurnian 3.21 kali lipat. Dialisis meningkatkan aktivitas spesifik menjadi 0.1231 U/mg dan kemurnian 3.37 kali lipat, kitinase yang diperoleh dapat mendegradasi kitin pada dinding sel jamur *Ganoderma* sp.

Kata kunci: *kitinase; bakteri kitinolitik; bakteri termofilik; fraksinasi; dialisis*

ABSTRACT

WAHYUDIN RAUF. OPTIMIZATION PRODUCTION OF CHITINASE FROM ISOLATES OF THERMOPHILIC BACTERIA *Aneurinibacillus thermoaerophilus* DSM 10154 STRAIN AS A DEGRADER OF CHITIN ON THE CELL WALL OF THE FUNGUS *Ganoderma* sp. (Supervised by HASNAH NATSIR, NUR UMRIANI PERMATASARI).

Enzymes are important proteins in biological activities that act as catalysts, speeding up chemical reactions without being used up in the process. In agriculture, enzymes increase nutrient availability and decomposition of organic matter, increasing soil fertility and plant productivity. Biotechnology continues to develop the use of enzymes from microorganisms. For example, chitinase is used in the waste processing industry to decompose chitin from shrimp and crab waste. This research aims to determine the chitinase activity and characteristics of the thermophilic bacterium *Aneurinibacillus thermoaerophilus* Strain DSM 10154, as well as produce, report, and determine the optimal conditions for chitinase activity (pH, temperature, substrate, metal ions) to decompose chitin in the cell walls of the fungus *Ganoderma* sp. The stages include isolation and characterization of chitinase-producing bacteria, chitinase production and purification, and chitinase application. Creation of bacteria using 16S rRNA gene analysis showed that isolate K.W.R.4.1 had 98.57% similarity to *Aneurinibacillus thermoaerophilus* Strain DSM 10154. This bacterium optimally produced chitinase at 48 hours of incubation with the highest activity of 0.1670 U/mL. Chitinase is optimal at pH 6, temperature 45°C, and 1% substrate, stable at pH 6-7 and temperature 45-50°C. Metal ions such as Na⁺, K⁺, Zn²⁺, Ba²⁺, Mg²⁺, and Co²⁺ at a concentration of 10 mM can increase enzyme activity, while Ca²⁺ ions at 1-50 mM concentration are not enzyme inhibitors. The purification process uses ammonium sulfate fractionation and dialysis. Fractionation with ammonium sulfate concentration of 40-60% increased the specific activity of chitinase to 0.1175 U/mg and the purity 3.21 times. Dialysis increased the specific activity to 0.1231 U/mg and the purity to 3.37-fold, the chitinase obtained could degrade chitin in the cell walls of the fungus *Ganoderma* sp.

Keywords: *chitinase; chitinolytic bacteria; thermophilic bacteria; fractionation; dialysis*

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMBUNG	i
HALAMAN PENGANTAR	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA	iv
UCAPAN TERIMA KASIH	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xiv
BAB I PENDAHULUAN UMUM	1
1.1 Latar Belakang	5
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Manfaat Penelitian	6
BAB II ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PENGHASIL KITINASE SECARA MAKROSKOPIS, MIKROSKOPIS SERTA UJI BIOKIMIA	7
2.1 Abstrak	7
2.2 Pendahuluan	7
2.3 Metode	9
2.3.1 Bahan dan alat penelitian	9
2.3.2 Pembuatan substrat koloidal kitin	9
2.3.3 Pembuatan media	9
2.3.4 Peremajaan bakteri	10
2.3.5 Karakterisasi Bakteri Penghasil Kitinase Secara Makroskopis dengan Pewarnaan Gram & Uji Biokimia (Nurikhsanti et al., 2024; Idris et al., 2023)	10
2.4 Hasil	11
2.5 Kesimpulan	16
2.6 Daftar pustaka	17
BAB III ANALISIS MOLECULAR ASSAY GEN 16s RNA BAKTERI KITINOLITIK ISOLAT K.W.R.4.1	20
3.1 Abstrak	20
3.2 Pendahuluan	20
3.3 Metode	22
3.3.1 Bahan dan alat penelitian	22
3.3.2 Karakterisasi Bakteri Penghasil Kitinase Secara Molekuler Menggunakan Gen 16S rRNA (Permatasari, 2019)	22
3.4 Hasil karakterisasi bakteri dengan PCR dan sekuensing 16s RNA	23
3.5 Kesimpulan	28
3.6 Daftar pustaka	28
BAB IV PENENTUAN WAKTU OPTIMUM PRODUKSI DAN KARAKTERISASI KITINASE <i>Aneurinibacillus Thermoaerophilus</i> SRAIN DSM	31
4.1 Abstrak	31
4.2 Pendahuluan	31

4.2.1 Sifat-sifat umum enzim	32
4.3 Metode penelitian.....	35
4.3.1 Produksi ekstrak kasar kitinase (Natsir, 2000 dan Sarni et al., 2015)	35
4.3.2 Pengaruh perubahan pH, suhu, konsentrasi substrat dan penambahan ion logam terhadap aktivitas enzim dan stabilitasnya terhadap pH dan suhu optimum	35
4.3.3 Pengukuran Aktivitas Enzim Kitinase	37
4.4 Hasil Produksi Kitinase <i>A. thermoaerophilus</i> K.W.R 4-1	38
4.4.1 Penentuan kondisi optimum produksi kitinase <i>A. Thermoaerophilus</i> strain DSM isolat K.W.R 4-1	38
4.4.2 Karakterisasi kitinase dari <i>A. thermoaerophilus</i> Strain DSM isolat K.W.R 4-1	40
4.5 Kesimpulan	49
4.6 Daftar Pustaka	49
BAB V PEMURNIAN DAN APLIKASI KITINASE SEBAGAI PENGHIDROLISIS KITIN PADA DINDING SEL JAMUR.....	54
5.1 Abstrak	54
5.2 Pendahuluan	54
5.3 Metode	58
5.3.1 Fraksinasi Amonium Sulfat (Natsir, 2000)	58
5.3.2 Dialisis (Natsir, 2000).....	59
5.3.3 Hidrolisis Kitin Pada Dinding Sel Jamur <i>Ganoderma</i> sp.	59
5.4 Hasil	59
5.4.1 Fraksinasi amonium sulfat kitinase <i>A. thermoaerophilus</i> strain DSM 10154 isolat K.W.R. 4-1	59
5.4.2 Hasil dialisis	60
5.4.3 Hidrolisis Kitin Pada Dinding Sel Jamur	62
5.5 Kesimpulan	65
5.6 Daftar pustaka.....	65
BAB VI PEMBAHASAN UMUM	69
6.1 Isolasi dan karakterisasi bakteri penghasil kitinase secara makroskopis, mikroskopis serta uji biokimia.....	69
6.2 Analisis molecular assay GEN 16S RNA bakteri kitinolitik isolat K.W.R.4.1.....	70
6.3 Penentuan waktu optimum produksi dan karakterisasi kitinase <i>A. thermoaerophilus</i> strain DSM.....	71
6.3.1 Penentuan waktu optimum produksi kitinase dari <i>A. thermoaerophilus</i> strain DSM 10514 isolat K.W.R 4-1	71
6.3.2 Karakterisasi kitinase dari <i>A. thermoaerophilus</i> Strain DSM isolat K.W.R 4.1	73
6.4 Pemurnian dan aplikasi kitinase sebagai penghidrolisis kitin pada dinding sel jamur.....	77
BAB VII KESIMPULAN UMUM	79
DAFTAR PUSTAKA	80

DAFTAR GAMBAR

Nomor Gambar	Halaman
2.1 Identifikasi bakteri K.W.R.4.1 penghasil kitinase	14
2.2 Hasil uji pewarnaan gram	15
3.1 Hasil PCR isolat K.W.R.4.1 menggunakan primer 16S rRNA (M = 1 kb plus)	24
3.2 Pohon filogenetik isolat K.W.R.4.1 yang diperoleh dari database NCBI BLASTN (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)	26
3.3 Kromatogram sequencing 16s RNA isolat K.W.R.4.1 Software BioEdit.....	26
3.4 <i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> strain DSM 10154 16S ribosomal RNA, sekuensing parsial total skor 1234 dengan persentasi identitas kemiripan 98.57%.....	27
4.1 Spesifisitas reaksi dan substrat (Koolman, 2005)	32
4.2 Grafik kurva pertumbuhan dan aktivitas kitinase <i>A. thermoaerophilus</i> strain DSM isolat K.W.R.4.1 384.3 Grafik hubungan antara kadar protein aktivitas spesifik kitinase dari <i>A. thermoaerophilus</i> Strain DSM isolat K.W.R.4.1	38
4.3 Grafik hubungan antara kadar protein dan aktivitas spesifik kitinase dari <i>A. thermoaerophilus</i> Strain DSM isolate K.W.R.4.1	39
4.4 Pengaruh pH terhadap aktivitas kitinase dari <i>A. thermoaerophilus</i> Strain DSM 10154 isolat K.W.R. 4-1 pada kondisi (45°C; 30 menit; substrat 1%)	40
4.5 Pengaruh perubahan suhu optimum terhadap aktivitas kitinase dari <i>A. thermoaerophilus</i> Strain DSM 10154 isolat K.W.R. 4-1 pada kondisi (pH 6; 30 menit; substrat 1%)	42
4.6 Penentuan konsentrasi substrat optimum terhadap aktivitas kitinase dari <i>A. thermoaerophilus</i> Strain DSM 10154 isolat K.W.R. 4-1 pada kondisi (pH 6; suhu 45°C; 30 menit)	44
4.7 Diagram hubungan penambahan ion logam terhadap aktitas relatif kitinase dari <i>A. thermoaerophilus</i> Strain DSM 10154 isolat K.W.R. 4-1 dengan kondisi konsentrasi berbeda: 1 mM, 10 mM dan 50 mM	45
4.8 Stabilitas kitinase <i>A. thermoaerophilus</i> pH 6 & 7 pada kondisi: suhu 45°C, [S] 1%	47
4.9 Stabilitas kitinase <i>A. thermoaerophilus</i> pH 6 & 7 pada kondisi:suhu 45°C, [S] 1%	48
5.1 Skema umum fraksinasi amonium sulfat tingkat kejenuhan (0-100%)	55
5.2 Tahapan dialisis enzim	55
5.3 Struktur amonium sulfat	56
5.4 Dialisis (Nurhayati, et al., 2012)	57
5.5 Struktur dinding sel jamur (Gubbins & Anaissie, 2009).	58
5.6 Pengaruh fraksinasi amonium sulfat terhadap fraksinasi dari <i>A. thermoaerophilus</i> Strain DSM 10154 isolat K.W.R. 4-1	60
5.7 Uji bioaktivitas dalm menghidrolisis kitin pada dinding sel jamur <i>Ganoderma</i> sp. [1] kitinase hasil dialisis/pemurnian; [2] kontrol positif/fungsida komersial; [3] kontrol negatif/BSA; [4] ekstrak kasar kitinase	63
5.8 Mekanisme reaksi hidrolisis kitinase terhadap substrat kitin	64

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor Lampiran	Halaman
1. Diagram alir penelitian	89
2. Prosedur kerja	90
3. Table fraksinasi ammonium sulfat	97
4. Data.....	98
5. rRNA_type strain.....	106
6. Dokumentasi penelitian.....	120

DAFTAR TABEL

Nomor Tabel	Halaman
2.1 Hasil isolasi bakteri termofilik dari beberapa sumber	8
2.2 Pengukuran indeks kitinolitik isolat bakteri	14
2.3 Hasil uji biokimia isolat K.W.R.4.1	15
2.4 Beberapa hasil penelitian.....	16
5.1 Pola tingkat kemurnian kitinase dari <i>A. thermoaerophilus</i> Strain DSM 10154	61
5.2 Bioaktivitas kitinase dari <i>A. thermoaerophilus</i> Strain DSM 10154 isolat K.W.R.4.1	63

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

Lambang/singkatan	Arti/penjelasan
[S]	substrat
NA	nutrien agar
λ	lamda
β	beta
U/mL	unit per mililiter
U/mg	unit per miligram
μ	mikro
BSA	bovine serum albumin
MR-VP	Methyl Red Voges-Proskauer
PCR	Polymerase Chain Reaction
NCBI	National Center of Biotechnology Information
RNA	ribo nucleic acid
DNA	deoxyribonucleic acid
rRNA	ribosome-ribonucleic acid
BLAST	Basic Local Alignment Sequence Tool

BAB I

PENDAHULUAN UMUM

1.1 Latar Belakang

Pertanian adalah sektor vital dalam menyediakan pangan bagi populasi dunia yang terus bertambah. Namun, tantangan dalam menjaga produktivitas pertanian yang berkelanjutan semakin kompleks, terutama karena serangan hama dan penyakit yang dapat mengurangi hasil panen secara signifikan. Salah satu solusi yang telah digunakan selama beberapa dekade untuk mengendalikan hama dan penyakit di pertanian adalah penggunaan fungisida (Harsanto, 2020). Fungisida adalah senyawa kimia yang dirancang untuk menghentikan atau mematikan pertumbuhan jamur patogen yang merusak tanaman. Meskipun fungisida dapat memberikan perlindungan yang efektif terhadap infeksi jamur, penggunaan berlebihan dan tidak bijak dari senyawa-senyawanya telah menimbulkan beberapa masalah (Djojsumarto, 2020).

Penggunaan fungisida yang tidak terkendali dapat menyebabkan beberapa dampak negatif yang signifikan. Pertama, penggunaan yang berlebihan dapat menyebabkan perkembangan resistensi pada patogen target, yang membuat jamur menjadi lebih sulit dikendalikan di masa depan. Kedua, residu kimia dari fungisida dapat mencemari lingkungan, termasuk tanah dan air, yang pada akhirnya dapat mempengaruhi kesehatan manusia dan ekosistem. Pencemaran ini dapat mengganggu keseimbangan ekologi dengan membunuh organisme non-target yang berguna seperti serangga penyerbuk dan mikroorganisme tanah yang berperan penting dalam kesuburan tanah.

Selain itu, ada juga kekhawatiran mengenai dampak kesehatan jangka panjang dari paparan fungisida bagi pekerja pertanian dan konsumen. Pekerja pertanian yang terpapar fungisida secara langsung selama proses penyemprotan dapat mengalami masalah kesehatan seperti iritasi kulit, gangguan pernapasan, dan bahkan risiko kanker jika paparan terjadi dalam jangka waktu lama. Konsumen yang mengonsumsi produk pertanian yang terkontaminasi residu fungisida juga dapat menghadapi risiko kesehatan, meskipun biasanya dalam kadar yang lebih rendah dibandingkan dengan pekerja pertanian.

Alternatif yang lebih berkelanjutan dalam pengelolaan penyakit tanaman mulai banyak dikembangkan untuk mengurangi ketergantungan pada fungisida kimia. Salah satunya adalah penggunaan metode pengendalian hayati, yang melibatkan penggunaan organisme hidup seperti bakteri atau jamur antagonis untuk melawan patogen tanaman. Metode ini tidak hanya ramah lingkungan, tetapi juga dapat mengurangi risiko pengembangan resistensi pada patogen. Selain itu, praktik pertanian terpadu seperti rotasi tanaman, penggunaan varietas tahan penyakit, dan peningkatan kesehatan tanah melalui pengomposan dan penambahan bahan organik juga menjadi bagian dari strategi yang efektif dalam pengelolaan penyakit tanaman secara berkelanjutan.

Fungisida sudah banyak digunakan sebagai agen perlindungan tanaman agar terhindar dari jamur patogen, hingga perlu dilakukan pendekatan lebih lanjut dalam mengatasi tantangan dalam pertanian modern. Dengan menerapkan praktik-praktik pertanian berkelanjutan, kita dapat meningkatkan produktivitas pertanian tanpa merusak lingkungan dan kesehatan manusia (Harsanto, 2020; Djojsumarto, 2020).

Penggunaan berlebihan fungisida dapat menyebabkan dampak negatif terhadap lingkungan dan kesehatan manusia (Wicaksono, 2022). Dampak utama dalam penggunaan fungisida kimia berlebihan yaitu terjadinya pencemaran air dan tanah, resistensi hama terhadap fungisida, serta kerusakan pada organisme non-target seperti serangga yang bermanfaat dan mikroorganisme tanah. Pencemaran air akibat run-off fungisida dari lahan pertanian dapat mengakibatkan kualitas air yang buruk, membahayakan flora dan fauna akuatik, serta menurunkan keanekaragaman hayati. Selain itu, akumulasi residu fungisida di dalam tanah dapat mengganggu keseimbangan mikroba tanah yang esensial untuk kesuburan tanah dan kesehatan tanaman, sehingga berdampak negatif pada produktivitas pertanian dalam jangka panjang. Resistensi hama terhadap fungisida juga menjadi masalah serius karena penggunaan berulang dan dalam dosis tinggi mendorong seleksi alami, menghasilkan populasi hama yang lebih sulit dikendalikan dan membutuhkan dosis yang semakin besar atau penggunaan bahan kimia yang lebih kuat, yang pada gilirannya memperparah masalah lingkungan.

Oleh karena itu, pengembangan alternatif yang lebih ramah lingkungan dan berkelanjutan untuk mengendalikan hama dan penyakit di pertanian menjadi semakin penting (Askari, 2021). Pendekatan seperti pengelolaan hama terpadu (PHT) yang mengkombinasikan berbagai metode pengendalian hama, baik kimiawi maupun enzimatik, untuk meminimalkan dampak negatif terhadap lingkungan dan kesehatan manusia menjadi semakin relevan. Salah satu alternatif yang menarik adalah penggunaan biopestisida, yang merupakan senyawa-senyawa yang berasal dari organisme hidup atau hasil dari proses bioteknologi yang dapat digunakan untuk mengendalikan hama dan penyakit tanaman (Dalimunte dan Rachmawan, 2017). Biopestisida menawarkan berbagai keuntungan, termasuk spesifisitas yang tinggi terhadap target hama, sehingga mengurangi risiko terhadap organisme non-target, serta biodegradabilitas yang baik, yang berarti mereka tidak meninggalkan residu berbahaya di lingkungan. Selain itu, penggunaan biopestisida dapat membantu mengurangi perkembangan resistensi hama, karena mekanisme kerja mereka yang sering kali lebih kompleks dan beragam dibandingkan fungisida sintesis, sehingga sulit bagi hama untuk mengembangkan resistensi.

Pengembangan dan penerapan biopestisida juga mendorong inovasi dalam pertanian berkelanjutan, termasuk penelitian tentang mikroorganisme yang bermanfaat seperti bakteri dan jamur yang dapat berfungsi sebagai agen pengendali hama biologis. Ini membuka peluang baru bagi pendekatan yang lebih holistik dalam manajemen pertanian, di mana kesehatan ekosistem secara keseluruhan diprioritaskan. Selain itu, biopestisida dapat diintegrasikan dengan teknik pertanian organik dan praktik agrikultural yang regeneratif, yang bertujuan untuk memulihkan kesehatan tanah, meningkatkan biodiversitas, dan mengurangi ketergantungan pada

input kimia. Dengan demikian, adopsi biopestisida tidak hanya membantu dalam mengendalikan hama dan penyakit tanaman secara efektif tetapi juga berkontribusi terhadap keberlanjutan ekosistem pertanian secara keseluruhan.

Salah satu penerapan ilmu bioteknologi yang terus berkembang adalah pemanfaatan enzim yang berasal dari mikroorganisme (Purkan et al., 2016). Secara umum, enzim sering digunakan dalam proses produksi, seperti di bidang industri pangan, farmasi, pertanian, dan bidang kimia lainnya (Haedar et al., 2017). Dalam bidang industri, enzim digunakan untuk mempercepat proses fermentasi, pemecahan molekul kompleks menjadi sederhana, dan meningkatkan efisiensi dalam pengolahan limbah. Misalnya, enzim kitinase digunakan dalam industri pengolahan limbah untuk menguraikan kitin dalam limbah udang dan kepiting, menjadikannya lebih mudah diolah.

Penggunaan enzim dalam proses produksi dapat meningkatkan efisiensi yang kemudian meningkatkan jumlah produksi (Marina, 2008). Efisiensi ini tercapai karena enzim dapat bekerja sangat spesifik dibandingkan dengan proses kimiawi konvensional, yang seringkali membutuhkan suhu dan tekanan tinggi serta bahan kimia berbahaya. Hal ini tidak hanya mengurangi biaya energi dan bahan baku, tetapi juga meminimalkan dampak lingkungan dari proses produksi.

Enzim merupakan kelompok protein yang memiliki peran penting dalam aktivitas biologis (Rachmawaty dan Madihah, 2013). Mereka bertindak sebagai katalisator biologis yang mempercepat reaksi kimia tanpa ikut habis dalam proses tersebut. Sifat ini membuat enzim sangat berharga dalam berbagai aplikasi industri. Dalam pertanian, enzim digunakan untuk meningkatkan ketersediaan nutrisi dalam tanah dan mempercepat dekomposisi bahan organik, yang pada akhirnya meningkatkan kesuburan tanah dan produktivitas tanaman. Penggunaan enzim seperti fitase membantu dalam pemecahan asam fitat dalam pakan ternak, meningkatkan ketersediaan fosfor bagi hewan dan mengurangi pencemaran lingkungan akibat ekskresi fosfor berlebih.

Selain itu, kemajuan dalam teknologi rekayasa genetika telah memungkinkan modifikasi dan optimalisasi enzim untuk aplikasi spesifik. Melalui teknik ini, enzim dapat disesuaikan untuk bekerja lebih efisien dalam kondisi ekstrem, seperti pH yang sangat tinggi atau rendah, dan suhu yang sangat tinggi atau rendah, yang biasanya tidak sesuai untuk enzim alami. Modifikasi ini juga dapat meningkatkan stabilitas enzim, memperpanjang umur simpannya, dan meningkatkan aktivitasnya terhadap substrat tertentu. Inovasi ini membuka peluang baru bagi industri untuk meningkatkan proses produksinya secara berkelanjutan dan ekonomis.

Di bidang kimia, enzim juga berperan penting dalam biokatalisis, dimana reaksi kimia dikendalikan oleh enzim untuk menghasilkan produk yang lebih ramah lingkungan dan berkelanjutan. Penggunaan enzim dalam biokatalisis mengurangi kebutuhan akan pelarut organik berbahaya dan kondisi reaksi yang keras, mengurangi jejak karbon industri kimia. Enzim seperti oksidase dan dehidrogenase digunakan dalam produksi bahan kimia halus dan intermediat yang digunakan dalam berbagai produk konsumen, dari bahan pembersih hingga kosmetik.

Aplikasi enzimatik saat ini pada bidang industri pangan dan pertanian menjadi sasaran utama karena memberi banyak keuntungan sebagai bahan tambahan yang alami dan mengurangi kerusakan pada lingkungan (Sarah dan Putro, 2009). Enzim-enzim yang digunakan dalam industri pangan, misalnya, dapat meningkatkan efisiensi proses produksi, memperbaiki tekstur, rasa, dan umur simpan produk tanpa perlu menggunakan bahan kimia sintetis yang berpotensi berbahaya bagi kesehatan manusia dan lingkungan. Di sektor pertanian, enzim digunakan dalam berbagai aplikasi seperti pengolahan tanah, pengolahan limbah, dan produksi pupuk organik. Pemanfaatan enzim dalam bidang tersebut digunakan karena memiliki kemampuan sebagai pendegradasi yang dikenal sebagai biodegradasi (Rachmawaty dan Madihah, 2013). Biodegradasi adalah proses alami di mana mikroorganisme, melalui enzim yang mereka hasilkan, memecah bahan organik kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana dan tidak berbahaya.

Enzim berfungsi sebagai katalisator yang dapat mengatur reaksi tertentu sehingga dalam keadaan normal tidak terjadi penyimpangan pada hasil reaksi. Katalisis enzimatik memungkinkan reaksi kimia berlangsung lebih cepat dan efisien pada suhu dan tekanan yang lebih rendah dibandingkan dengan katalisis non-enzimatik, yang sering kali memerlukan kondisi ekstrem. Hal ini tidak hanya mengurangi konsumsi energi tetapi juga meminimalkan pembentukan produk sampingan yang tidak diinginkan, sehingga lebih ramah lingkungan. Dalam biodegradasi, enzim dari mikroorganisme berperan untuk memecah molekul-molekul besar polimer yang ada di alam dan menjadi produk yang dapat dimanfaatkan (Purkan et al., 2016). Proses ini sangat penting dalam pengelolaan limbah organik dan biokonversi material, di mana enzim seperti lipase, protease, dan selulase digunakan untuk menguraikan lemak, protein, dan selulosa menjadi komponen-komponen yang lebih sederhana yang dapat digunakan kembali sebagai bahan baku atau dikomposkan menjadi pupuk.

Di bidang pertanian, enzim memainkan peran penting dalam proses seperti kompos dan bioremediasi. Dalam pembuatan kompos, enzim membantu mempercepat dekomposisi bahan organik sehingga menghasilkan kompos yang kaya nutrisi dalam waktu yang lebih singkat. Dalam bioremediasi, enzim digunakan untuk membersihkan tanah dan air yang terkontaminasi oleh polutan organik dengan menguraikan polutan tersebut menjadi senyawa yang kurang berbahaya atau tidak berbahaya.

Salah satu polimer yang keberadaannya melimpah di alam adalah kitin, dimana secara umum enzim yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi kitin adalah enzim yang tergolong sebagai kitinolitik seperti enzim kitinase (Natsir et al., 2012). Kitin merupakan biopolimer dari β -1,4-N-asetil-D-glukosamin (Chen et al., 2010). Penelitian tentang kitin dan turunannya telah banyak dikembangkan, seperti oligomer kitin, N-asetil-D-glukosamin dan kitosan, karena produk-produk tersebut telah banyak dimanfaatkan untuk keperluan biomedis, farmasi dan pertanian (Purwani et al., 2002). Oligomer kitin berfungsi untuk meningkatkan sistem imunitas tubuh, bersifat antibakteri dan antijamur, juga dapat meningkatkan daya tahan tanaman (Hardi et al., 2017). Sementara monomer kitin dalam bentuk N-asetil-D-glukosamin

dimanfaatkan sebagai suplemen, obat pengontrol kadar gula darah dan memiliki efek antiinflamasi (Herdyastuti et al., 2009). Hidrolisis kitin dapat diproduksi secara kimiawi maupun enzimatik (Chen et al., 2010).

Degradasi kitin secara enzimatik memiliki keunggulan dibandingkan secara kimiawi karena metode yang digunakan sederhana, cepat dan proses pemotongan ikatan glikosidik yang lebih spesifik untuk menghasilkan senyawa-senyawa turunan kitin (Hardi et al., 2017). Enzim yang umum digunakan dan spesifik pada hidrolisis kitin adalah enzim kitinase yang berasal dari mikroorganisme termofilik.

Beberapa hasil penelitian yang terkait dengan enzim kitinase yang diproduksi dari bakteri termofilik juga dilaporkan oleh Natsir (2010) bahwa *Bacillus licheniformis* HSA3-1a dari mata air panas sulili di Pinrang, Sulawesi Selatan dapat mengekspresikan kitinase pada kondisi optimum dengan konsentrasi koloidal kitin sebesar 0,5 %: pH 7,0 ; suhu 55 °C dan waktu fermentasi 72 jam. Hasil penelitian yang dilaporkan oleh Hardi et al. (2016) dengan isolat bakteri termofilik B1211 asal air panas Bora dengan kondisi optimum dalam produksi kitinase terdapat pada pH 7 dengan aktivitas 0,62 U/mL dengan suhu 50 °C dengan aktivitas tertinggi 0,71 U/mL dan konsentrasi substrat 0,2 % dengan aktivitas 0,71 U/mL. Haedar et al., (2017) berhasil memproduksi dan mengkarakterisasi enzim kitinase dari bakteri kitinolitik asal kerang *Anadara garanosa*, waktu optimum produksi kitinase berada pada 120 jam dengan aktivitas 2,683 U/mL, pH optimumnya terdapat di angka 6,0 sedangkan untuk suhu optimumnya berada di suhu 35 °C.

Penggunaan kitinase telah dilaporkan oleh beberapa peneliti antara lain: Katatny et al. (2000) menggunakan kitinase dan 1,3-glukanase dari *Trichoderma harzianum* sebagai agensia fungisida dalam pengendalian jamur *Sclerotium rolfsii*; sedangkan Harjono dan Widyastuti (2001) menggunakan endo-kitinase murni dari *Trichoderma reesei* sebagai fungisida dalam menghambat perkecambahan spora jamur patogen *Ganoderma philippii*; Natsir et al (2012) melakukan produksi enzim kitinase dari *B. licheniformis* HSA3-1a dan menghidrolisis dinding sel jamur *Ganoderma* sp. Salah satu jenis jamur yang perlu mendapatkan perhatian khusus dalam konteks ini adalah *Ganoderma* sp. Beberapa spesies dalam genus *Ganoderma* dapat menjadi hama dalam berbagai cara. Beberapa di antaranya adalah patogen tumbuhan yang menyebabkan penyakit pada tanaman, sementara yang lain dapat merusak kayu di hutan atau bahkan merusak bahan makanan seperti buah-buahan dan sayuran yang disimpan. Berdasarkan informasi pada latar belakang, maka dilakukan optimasi produksi, karakterisasi dan aplikasi kitinase dari bakteri termofilik *Aneurinibacillus thermoaerophilus* Strain DSM 10154 sebagai pendegradasi kitin pada dinding sel jamur *Ganoderma* sp.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah

1. bagaimana aktivitas kitinase dan karakteristik bakteri termofilik dari *Aneurinibacillus thermoaerophilus* Strain DSM 10154?

2. bagaimana proses produksi kitinase dari isolat bakteri termofilik *Aneurinibacillus thermoaerophilus* Strain DSM 10154?
3. Bagaimana karakterisasi dan purifikasi kitinase dari isolat bakteri termofilik *Aneurinibacillus thermoaerophilus* Strain DSM 10154?
4. bagaimana aktivitas kitinase dari bakteri termofilik *Aneurinibacillus thermoaerophilus* Strain DSM 10154 dalam mendegradasi kitin pada dinding sel jamur *Ganoderma* sp.?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk

1. menentukan aktivitas kitinase dan karakteristik bakteri termofilik dari *Aneurinibacillus thermoaerophilus* Strain DSM 10154
2. produksi kitinase dari isolat bakteri termofilik *Aneurinibacillus thermoaerophilus* Strain DSM 10154
3. menentukan karakteristik dan purifikasi kitinase dari isolat bakteri termofilik *Aneurinibacillus thermoaerophilus* Strain DSM 10154
4. menentukan aktivitas kitinase dari bakteri termofilik *Aneurinibacillus thermoaerophilus* Strain DSM 10154 dalam mendegradasi kitin pada dinding sel jamur *Ganoderma* sp.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dalam pengembangan ilmu pengetahuan, terutama memberikan informasi ilmiah mengenai bakteri termofilik yang dapat diisolasi dari sumber air panas Lejja, Kabupaten Soppeng, Sulawesi Selatan sebagai penghasil kitinase dan karakteristiknya. Pada penelitian ini juga telah dibuktikan bahwa kitinase yang diperoleh memiliki kemampuan dalam menghidrolisis kitin pada dinding sel jamur *Ganoderma* sp. Sehingga dapat dijadikan sebagai acuan/landasan dalam pengembangan biopestida sebagai pengganti pestisida kimia yang ramah lingkungan.

BAB II

ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PENGHASIL KITINASE SECARA MAKROSKOPIS, MIKROSKOPIS SERTA UJI BIOKIMIA

2.1 Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri termofilik dari sumber air panas Lejja, Kabupaten Soppeng, Sulawesi Selatan. Metode isolasi dilakukan dengan menumbuhkan sampel pada media Nutrien Agar (NA) dan menginkubasinya pada suhu berbeda (55°C, 50°C, 45°C, dan 40°C). Hasil inkubasi menunjukkan pertumbuhan optimal pada suhu 45°C, khususnya isolat K.W.R.2 dan K.W.R.4. Isolat ini kemudian dimurnikan dan diinkubasi ulang untuk memperoleh isolat tunggal. Selanjutnya, isolat dipindahkan ke media selektif koloidal kitin dan diinkubasi kembali. Isolat K.W.R.4.1 menunjukkan aktivitas kitinase tertinggi dengan indeks kitinolitik 1,67, yang menunjukkan potensi enzimatik dalam mendegradasi kitin. Analisis mikroskopis dan uji biokimia mengidentifikasi isolat K.W.R.4.1 sebagai bakteri gram positif dari genus *Bacillus*, yang memiliki kemampuan menghasilkan enzim kitinase. Identifikasi ini dilakukan berdasarkan pewarnaan Gram dan serangkaian uji biokimia, termasuk uji MR-VP, sitrat, NaCl 6,5%, dan fermentasi arabinosa. Penelitian ini mengungkap potensi *Bacillus* sp. dalam aplikasi bioteknologi, terutama dalam produksi enzim industri dan pengolahan limbah kitin.

2.2 Pendahuluan

Bakteri termofilik merupakan mikroorganisme yang dapat hidup pada suhu 45-88 °C (Ogura et al., 2024; Zhang et al., 2024). Mikroba termofilik yang tumbuh pada kisaran suhu 45-88°C memiliki kemampuan untuk mengekspresikan enzim termostabil (Arfah et al., 2014). Salah satu faktor yang menyebabkan mikroorganisme termofilik mampu bertahan hidup dan berkembang biak pada suhu ekstrim tinggi karena kandungan proteinnya yang sangat stabil terhadap panas sehingga dapat berfungsi secara optimal pada suhu tersebut (Natsir, 2010). Bakteri termofilik didefinisikan sebagai organisme yang hidup pada suhu di atas 45°C. Pentingnya melakukan dalam mengisolasi dan mengkarakterisasi mikroorganisme ini telah memunculkan pengetahuan baru selama beberapa dewasa ini. Minat para ilmuwan terhadap organisme termofilik semakin tinggi terutama dipicu dengan adanya penemuan bakteri-bakteri yang dapat hidup pada suhu titik didih air atau bahkan lebih tinggi (Lestari, 2000).

Bakteri termofilik isolat lokal dari berbagai mata air panas di Indonesia telah berhasil diisolasi, dikarakterisasi dan di uji potensi enzimatik yang dimilikinya. Mikroorganisme yang berhasil diisolasi di Indonesia antara lain bakteri termofil sumber mata air panas di Pacet (yang menemukan 8 genus bakteri antara lain *Thermus* sp., *Acetogenium* sp., *Bacillus* sp., *Thermotrix* sp., *Thermodesulfo bacterium* sp., *Thermomicrobium* sp., *Pseudomonas* sp., *Sulfobacillus* sp., dan beberapa hasil penelitian tentang isolasi mikroorganisme termofilik penghasil enzim terlihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Hasil isolasi bakteri termofilik dari beberapa sumber

Peneliti	Kondisi suhu, pH, substrat [s] optimum	Mikroba, Lokasi
Irianto, 2006	Tidak dilakukan produksi enzim	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus stearoformis</i> dan <i>Bacillus coagulans</i> dari Sumber Air Panas Lejja, Kab. Soppeng, Sulawesi Selatan
Natsir et al., 2010	60 °C, pH 7, [S] 0.3%	<i>Bacillus licheniformis</i> HSA3-1a dari Sumber Air Panas Sulili, Sulawesi Selatan, penghasil kitinase
Natsir et al., 2012	55 °C, pH 7, [S] 0.5%	<i>B. licheniformis</i> HSA3-1a penghasil enzim kitinase
Arfah et al., 2014	60 °C, pH 6, [S] 1%	Isolat RSAll-1B dan RSAll-4B <i>Bacillus</i> sp dari Sumber air panas Lejja, Kab. Soppeng, Sulawesi Selatan, penghasil amilase
Asnawi et al., 2014	45 °C, pH 7	Isolat LS3B dan LS4B dari sumber air panas Lemo Susu Kab. Pinrang, penghasil lipase
Mahmudah et al., 2016	Tidak dilakukan karakterisasi enzim	<i>Pseudomonas</i> sp dari Sumber air panas Lejja, Kab. Soppeng, Sulawesi Selatan
Hardi et al., 2016	60 °C, pH 7, [S] 1%	Bakteri termofilik B1211 dari Sumber air panas Bora, Kab. Sigi, Sulawesi Tengah, penghasil kitinase

Wilayah di Indonesia khususnya di bagian timur, terdapat sumber mata air panas yang berada di kawasan hutan dan berbukit tepatnya Desa Bulu, Kecamatan Marioriawa, Kabupaten Soppeng. Beberapa peneliti sebelumnya (Arfah et al., 2016) mengemukakan bahwa sumber air panas Lejja, Kabupaten Soppeng memiliki suhu berkisar antara 45 °C sampai dengan 65 °C dengan pH 7,0 sedangkan menurut (Mahmudah et al., 2016), suhu pada sumber air panas tersebut mencapai 60 °C dengan mengandung sulfur 1,5%, dengan kondisi lingkungan seperti ini diduga memungkinkan adanya aktivitas mikroorganisme yang berpotensi menghasilkan enzim termostabil.

Penelitian mengenai bakteri termofilik yang bersumber dari air panas Lejja, Kabupaten Soppeng, telah dilakukan oleh Irianto (2006), yang berhasil mengidentifikasi 3 genus bakteri penghasil enzim protease yaitu *Bacillus licheniformis*, *Baciullus stearoformis*, dan *Bacillus coagulans*, sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Arfah et al., (2016) juga berhasil mengisolasi bakteri yang berasal dari sumber air panas Lejja yang mampu mengekspresikan enzim termostabil yaitu enzim amilase. Bakteri termofilik golongan kitinolitik merupakan

jenis mikroba yang menarik untuk diisolasi dan dimanfaatkan sebagai penghasil kitinase karena mampu menghidrolisis kitin jamur penyebab penyakit tanaman (Suryadi et al., 2013).

Berdasarkan uraian diatas maka pada penelitian ini akan dikaji terkait dengan isolasi dan karakterisasi bakteri termofilik secara makroskopis, mikroskopis dan uji biokimia.

2.3 Metode

2.3.1 Bahan dan alat penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi kitin, HCl pekat, aquades, NaOH, ekstrak yeast, NaCl, bakto agar, pepton, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , koloidal kitin, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Methyl Red, ethanol, α -naphtol, KOH, Simmons Citrate Agar, MRS broth, glukosa, dan manitol. Semua bahan ini digunakan dalam berbagai tahap proses pembuatan substrat koloidal kitin, pembuatan media nutrisi agar untuk peremajaan bakteri, pembuatan media selektif, medium inokulum, dan medium produksi, serta dalam berbagai uji biokimia untuk karakterisasi bakteri.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini mencakup stirer untuk homogenisasi, lemari pendingin untuk inkubasi, glass wool untuk penyaringan, sentrifuga untuk pemisahan cairan dan bahan padat, autoclave untuk sterilisasi, cawan petri steril untuk penampungan media, erlenmeyer steril untuk penyiapan inokulum, shaker untuk inkubasi biakan, tabung reaksi untuk uji biokimia, inkubator untuk pertumbuhan bakteri, dan alat ukur pH untuk memastikan pH larutan. Semua alat ini bekerja secara sinergis untuk mendukung berbagai tahap dalam penelitian, mulai dari pembuatan substrat dan media hingga karakterisasi bakteri penghasil kitinase.

2.3.2 Pembuatan substrat koloidal kitin (Natsir, 2000)

Koloid kitin dibuat dengan komposisi 5 gram kitin ditambah 80 mL HCl pekat dan dihomogenkan dengan menggunakan stirer kemudian diinkubasi di dalam lemari pendingin selama 24 jam, kemudian disaring menggunakan glass wool, filtrat ditambah aquades 200 ml yang sudah didinginkan dengan suhu 4°C selama 24 jam, selanjutnya disaring dengan *glass wool*. Filtrat dinetralkan dengan NaOH 12 N sampai pH 7. Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 7.500 rpm selama 15 menit.

2.3.3 Pembuatan media

Pembuatan Media Nutrien Agar/Peremajaan (Natsir, 2000 dan Rahayu, 2014)

Media Nutrien Agar dibuat dengan komposisi ekstrak yeast 0,5%, NaCl 1%, bakto agar 1,5%, pepton 1% dilarutkan dalam akuades dan dipanaskan, lalu disterilkan dengan autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 15-20 psi, didinginkan kemudian dituang pada cawan petri steril.

Pembuatan Media Selektif (Natsir, 2000 dan Natsir et al., 2010)

Media selektif dibuat dengan komposisi ekstrak yeast 0,1%, NaCl 0,1%, bakto agar 2%, pepton 0,1%, KH_2PO_4 0,01%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01%, CaCl_2 0,01%, koloidal kitin 1% dilarutkan dalam akuades dan dipanaskan. Selanjutnya disterilkan dengan autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 15-20 psi, didinginkan kemudian dituang pada cawan petri steril.

Pembuatan dan Penyiapan Inokulum (Natsir, 2000)

Medium inokulum dibuat dengan komposisi ekstrak yeast 0,5%, pepton 0,1%, CaCl_2 0,01%, KH_2PO_4 0,01%, NaCl 0,1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01% dan koloidal kitin 1%, dilarutkan dalam akuades, dipanaskan sampai larut lalu disterilkan dalam autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 15-20 psi. Didinginkan kemudian dituang ke dalam erlenmeyer steril. Kemudian bakteri yang telah ditumbuhkan diinokulasikan 2 hingga 3 ose ke dalam medium inokulum yang telah disiapkan. Kemudian biakan tersebut dimasukkan ke dalam shaker pada kondisi 45°C , dengan kecepatan 180 rpm selama 24 jam untuk masuk dalam medium produksi.

Pembuatan Medium Produksi (Natsir et al., 2002)

Medium produksi dibuat dengan komposisi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,7%, ekstrak yeast 0,05%, bakto pepton 0,1%, NaCl 0,1%, K_2HPO_4 0,01%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01%, CaCl_2 0,01%, koloidal kitin 0,5% dilarutkan dengan akuades lalu dikocok dan disterilkan dengan autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 15-20 psi.

2.3.4 Peremajaan bakteri (Natsir et al., 2002)

Isolat bakteri penghasil kitinase kode isolat K.W.R yang berasal dari sumber air panas Lejja, Kabupaten Soppeng, Sulawesi Selatan, sebanyak 2-3 ose ditumbuhkan pada media agar dan diinkubasi pada suhu 45°C selama 48 jam.

2.3.5 Karakterisasi bakteri penghasil kitinase secara makroskopis dengan pewarnaan gram & uji biokimia (Nurikhsanti et al., 2024; Idris et al., 2023)

Karakterisasi bakteri penghasil kitinase secara makroskopis dilakukan dengan mengamati bentuk koloni isolat dilihat dari atas, permukaan koloni dilihat dari samping, tepi koloni dilihat dari atas, dan zona bening yang terbentuk.

MR-VP (Methyl Red Voges-Proskauer)

Uji MR untuk mengetahui kemampuan bakteri menghasilkan asam dari fermentasi glukosa. Sedangkan uji VP untuk mengetahui kemampuan bakteri menghasilkan produk akhir yang netral yaitu achetylmethylcarbinol dan fermentasi glukosa. Pembuatan reagen MR yaitu Methyl Red 0.1 gram dilarutkan pada ethanol

95% 300 mL lalu ditambahkan akuades sampai 500 mL. Reagen VP1 yaitu a-naphtol 5 gram dalam ethanol 100 mL. Reagen VP2, yaitu KOH 40 gram ditambahkan akuades sampai 100 mL. Hasil pengamatan pada uji MR jika berubah warna menjadi merah maka hasilnya (+) dan jika tidak berubah warna maka (-). Pada uji VP yang diberi reagen VP1 hingga cairannya berwarna putih susu kemudian ditambahkan reagen VP2 sampai warna kembali semula. Hasil (+) jika apabila dikocok berwarna merah dan hasil (-) jika tidak berubah warna.

Uji Simmons Agar (SCA)

Uji sitrat bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri tumbuh menggunakan sumber karbon dari sitrat. Pembuatan media sitrat dilakukan dengan melarutkan 2,3 gram sitrat kedalam 100 mL akuades lalu aduk hingga homogen. Autoclave pada suhu 121 °C dan tekanan 1 atm selama 15 menit lalu tuangkan pada tabung reaksi saat suhu 50 °C, kemudian tunggu hingga mengeras. Hasil menunjukkan (+) bila bakteri ditanamkan pada media agar dan media berubah menjadi warna biru dan hasil (-) jika tidak berubah warna.

Uji Pertumbuhan Pada Konsentrasi Garam 6,5 %

Uji pada pertumbuhan pada konsentrasi garam dilakukan dengan cara satu ose kultur bakteri dimasukkan kedalam MRS broth yang tersuplementasi NaCl masing-masing berkonsentrasi 4 % dan 6,5 %, lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Kekeuruhan menunjukkan adanya pertumbuhan.

Uji Glukosa

Cara pembuatan media glukosa adalah larutkan Phenol Red Broth Base 1,5 gram ditambahkan dengan glukosa 1 gram ke dalam akuades 100 mL. Hasil (+) jika warna merah menjadi kuning, dan reaksi menunjukkan (-) jika tidak berubah warna.

Uji Manitol

Cara pembuatan media manitol adalah larutkan Phenol Red Broth Base dan manitol 1 gram ke dalam 100 mL akuades. Hasil (+) jika warna merah menjadi kuning, dan (-) jika tidak berubah warna.

2.4 Hasil

Isolasi bakteri termofilik diperoleh dari sumber air panas Lejja, Kabupaten Soppeng, Sulawesi Selatan. Bakteri ini diisolasi dari air panas Lejja dan ditumbuhkan dalam media beberapa kali untuk memperoleh isolat murni. Proses isolasi ini penting untuk memastikan bahwa bakteri yang didapat adalah spesifik dan murni, tanpa kontaminasi dari mikroorganismen lain. Pengambilan sampel dilakukan dari empat titik

dengan karakteristik yang berbeda-beda, yang membantu dalam memahami variasi kondisi lingkungan tempat bakteri ini hidup.

Titik pertama (K.W.R.1) memiliki karakteristik suhu 57°C dengan pH 8. Suhu yang tinggi pada titik ini menunjukkan bahwa bakteri yang ada di sini mampu bertahan dalam kondisi yang cukup ekstrim. pH 8 yang netral-alkalin juga menunjukkan bahwa bakteri ini mungkin memiliki adaptasi khusus untuk hidup dalam kondisi pH tersebut. Titik kedua (K.W.R.2) memiliki karakteristik suhu 50°C dengan pH 8. Penurunan suhu di titik ini dibandingkan dengan titik pertama dapat memberikan informasi tentang variasi mikrohabitat dalam sumber air panas Lejja, dimana mungkin ada perbedaan dalam komunitas mikroba yang tumbuh pada suhu yang sedikit lebih rendah.

Titik ketiga (K.W.R.3) memiliki suhu 47°C dengan pH 8. Suhu yang lebih rendah dibandingkan dengan titik-titik sebelumnya menunjukkan gradien suhu yang terjadi di sumber air panas ini, yang bisa jadi akibat jarak dari sumber panas utama atau pencampuran dengan air yang lebih dingin. Titik keempat (K.W.R.4) memiliki suhu 45°C dan pH 8. Perbedaan suhu yang semakin rendah di titik ini menunjukkan adanya penurunan suhu yang bertahap sepanjang aliran air panas.

Menurut Ntarmouchant et al. (2020), perbedaan suhu pada sumber air panas tersebut terjadi karena adanya peningkatan suhu air saat bergerak masuk ke dalam batuan dan berbenturan dengan batuan panas. Hal ini menunjukkan bahwa sumber panas utama terletak di bawah permukaan, dan saat air panas bergerak melalui retakan atau celah dalam batuan, ia bertambah panas karena kontak dengan batuan panas tersebut (Yan et al., 2024; Damer dan Damer, 2024). Penelitian ini penting karena memberikan wawasan tentang dinamika termal dan kimiawi dalam ekosistem sumber air panas (Choudhary et al., 2024), serta bagaimana organisme seperti bakteri termofilik beradaptasi dengan kondisi ekstrem tersebut. Bakteri termofilik sendiri memiliki banyak aplikasi potensial, termasuk dalam bioteknologi dan industri, karena enzim-enzim yang stabil dan aktif pada suhu tinggi (Dadwal et al., 2021; Kumari et al., 2021).

Isolasi bakteri termofilik dari sumber air panas Lejja diawali dengan menggunakan media Nutrien Agar (NA) yang mengandung komponen nutrisi penting untuk pertumbuhan bakteri (Natsir et al., 2010). Media NA merupakan media umum yang sering digunakan dalam mikrobiologi untuk menumbuhkan berbagai jenis bakteri karena kandungan nutrisinya yang lengkap, sehingga dapat mendukung pertumbuhan bakteri secara optimal. Pada penelitian ini, media NA diinkubasi selama 3x24 jam dengan berbagai suhu, yaitu 55°C, 50°C, 45°C, dan 40°C, untuk mengidentifikasi suhu optimal bagi pertumbuhan bakteri termofilik yang diisolasi dari air panas Lejja.

Setelah periode inkubasi, hasil observasi menunjukkan bahwa bakteri yang tumbuh dengan baik berada pada kondisi suhu 45°C, terutama pada isolat K.W.R.2 dan K.W.R.4. Hal ini mengindikasikan bahwa bakteri termofilik dari sumber air panas Lejja memiliki suhu pertumbuhan optimal pada sekitar 45°C. Isolat K.W.R.2 dan K.W.R.4 kemudian dipilih untuk dimurnikan kembali, yang merupakan langkah penting dalam mendapatkan isolat tunggal yang bebas dari kontaminasi bakteri lain.

Proses pemurnian dilakukan dengan menginokulasikan isolat K.W.R.2 dan K.W.R.4 ke dalam media NA yang baru, kemudian diinkubasi kembali selama 3x24 jam pada suhu 45°C. Inkubasi ulang ini bertujuan untuk memastikan bahwa hanya bakteri termofilik yang diisolasi yang tumbuh, sehingga didapatkan isolat tunggal yang murni. Langkah pemurnian ini sangat penting karena isolat tunggal memungkinkan studi lebih mendalam mengenai karakteristik dan potensi aplikatif bakteri tersebut tanpa gangguan dari mikroorganisme lain yang mungkin hadir dalam sampel awal.

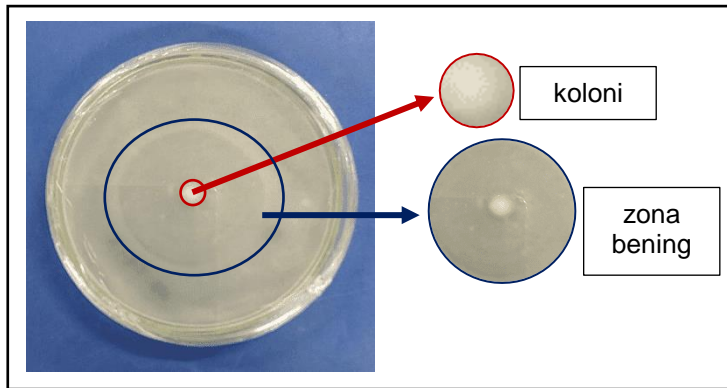
Koloni tunggal yang tumbuh pada media luria agar dipindahkan ke media selektif koloidal kitin dan diamati selama 3x24 jam. Media selektif koloidal kitin ini digunakan karena mengandung kitin sebagai satu-satunya sumber karbon, sehingga hanya bakteri yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi kitin yang dapat tumbuh. Tahap-tahap inkubasi dimulai dari suhu tertinggi, yaitu 55°C, namun tidak menghasilkan pertumbuhan yang optimal pada bakteri. Ini menunjukkan bahwa suhu tersebut mungkin terlalu tinggi bagi enzim kitinase atau bagi kondisi metabolik bakteri untuk bekerja dengan efisien.

Kemudian, inkubasi dilanjutkan pada suhu yang lebih rendah, yaitu 50°C, yang menghasilkan pertumbuhan bakteri yang baik. Namun, pada suhu ini, tidak terlihat adanya zona bening di sekitar koloni bakteri. Zona bening merupakan indikasi adanya aktivitas kitinase, enzim yang memecah kitin menjadi unit-unit yang lebih kecil. Ketiadaan zona bening menunjukkan bahwa meskipun bakteri dapat tumbuh, aktivitas kitinasenya tidak maksimal pada suhu ini.

Inkubasi selanjutnya dilakukan pada suhu 45°C, di mana isolat dengan kode K.W.R.4.1 akan diidentifikasi. Pada suhu ini, isolat K.W.R.4.1 menunjukkan indeks kitinolitik tertinggi, yang menandakan bahwa aktivitas kitinase optimal pada inkubasi selama 48 jam. Indeks kitinolitik ini diperoleh dengan membandingkan diameter zona bening dengan diameter koloni. Zona bening terbentuk karena enzim kitinase yang dihasilkan oleh bakteri mampu memecah substrat koloidal kitin dalam media, menciptakan area transparan di sekitar koloni yang menandakan degradasi kitin, dapat dilihat pada Gambar 2.1.

Tabel 2.2, menunjukkan adanya indeks kitinolitik memberikan ukuran kuantitatif dari kemampuan bakteri untuk memecah kitin. Proses ini melibatkan pengamatan diameter zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri, yang kemudian dibandingkan dengan diameter koloni itu sendiri. Indeks yang lebih tinggi menunjukkan aktivitas kitinolitik yang lebih besar, dan oleh karena itu, kemampuan yang lebih baik dalam mendegradasi kitin.

Variasi pertumbuhan dan terbentuknya zona bening disekitar bakteri diduga disebabkan karena perbedaan pH maupun suhu baik pada kondisi alami maupun kondisi laboratorium saat penelitian berlangsung (Wang et al., 2019; Siliakus et al., 2017). Aktivitas suatu enzim dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti pH, suhu, konsentrasi substrat dan enzim serta adanya aktivator maupun inhibitor (Aransiola et al., 2022; Kuby, 2019).



Gambar 2.1 Identifikasi bakteri K.W.R.4.1 penghasil kitinase

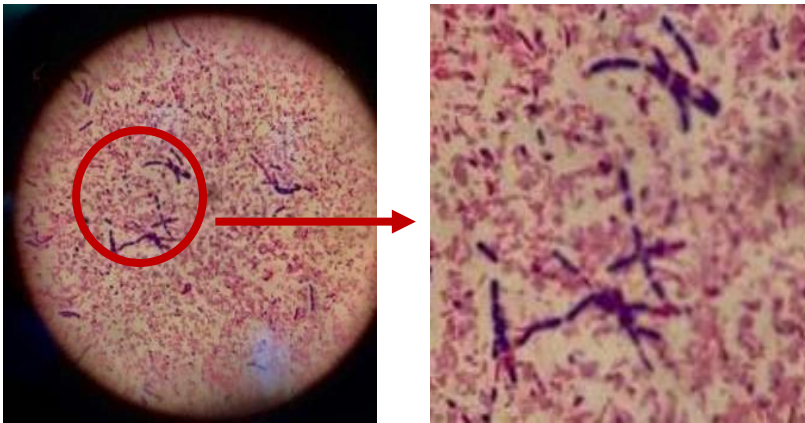
Pengamatan secara mikroskopis dan uji biokimia sederhana dilakukan pada isolat K.W.R.4.1 untuk mengidentifikasi jenis bakteri. Isolat merupakan bakteri gram positif karena bakteri tersebut berwarna biru keunguan setelah diberi larutan lugol (Gambar. 2.2). Tabassum (2022), menjelaskan bahwa warna biru keunguan yang terlihat pada bakteri Gram positif terjadi karena kompleks senyawa warna kristal violet-yodium tetap bertahan bahkan setelah diberikan larutan pemucat (Herrialfian et al., 2021).

Perbedaan warna ini disebabkan oleh perbedaan struktur dinding sel bakteri. Secara umum, bakteri Gram positif memiliki komposisi peptidoglikan yang membentuk senyawa kompleks kristal violet-yodium ribonukleat yang tidak larut dalam aseton alkohol (Vijayakumar et al., 2023). Ini berarti saat diwarnai dengan pewarnaan gram, bakteri Gram positif akan tetap mempertahankan warna ungu-kebiruan. Sebaliknya, bakteri Gram negatif memiliki kandungan lipida yang tinggi pada dinding selnya, sehingga saat diwarnai dengan pewarnaan gram, lapisan lipida ini membuatnya lebih mudah larut dalam aseton alkohol.

Tabel 2.2 Pengukuran indeks kitinolitik isolat bakteri

Kode Isolat	Diameter Koloni (mm)	Diameter Zona Bening	Zona	Indeks Kitinolitik
K.W.R.2.1	0,5	-	-	-
K.W.R.2.2	0,9	1,3	-	1,44
K.W.R.4.1	1,6	2,7	-	1,67
K.W.R.4.2	0,7	-	-	-

Sebaliknya, pada bakteri gram negatif, kompleks tersebut larut setelah diberikan larutan pemucat dan mengambil warna merah dari safranin. Penjelasan ini menggambarkan perbedaan dalam mekanisme pengecatan gram antara bakteri gram positif dan gram negatif, yang didasarkan pada sifat-sifat dinding sel bakteri. Akibatnya, bakteri Gram negatif akan kehilangan warna ungu-kebiruan dan akan diwarnai kembali dengan warna kontras seperti merah muda atau merah. Penjelasan ini menggambarkan dasar dari pewarnaan Gram, yang merupakan metode penting dalam identifikasi bakteri berdasarkan sifat-sifat struktural dinding selnya, hasil penelitian dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Hasil uji pewarnaan gram

Uji biokimia sederhana yang diterapkan pada isolat meliputi pengujian MR-VP (*Methyl Red - Voges Proskauer*), citrate, Simons agar, NaCl 6,5%, dan pengujian gula-gula, termasuk arabinosa seperti yang tertera dalam Tabel 2.3

Tabel 2.3 Hasil uji biokimia isolat K.W.R.4.1

Uji Morfologi	Hasil Uji
Makroskopis	Pertumbuhan menyebar, koloni batang, tepian berombak
Mikroskopis	Gram positif, ada spora pada sel
Uji MR (<i>Methyl Red</i>)	Positif
Uji VP (<i>Voges Proskauer</i>)	Negatif
Uji Sitrat	Negatif
Uji NaCl 6,5 %	Negatif
Uji Arabinosa	Positif

Hasil uji MR menunjukkan hasil positif dengan tidak adanya perubahan warna pada media yang semula merah menjadi kuning, menandakan absennya fermentasi asam campuran yang dapat mengakibatkan penurunan pH media. Sebaliknya, pada uji VP, hasilnya negatif, yang menunjukkan ketiadaan asetonin dalam kultur cair bakteri. Uji ini melibatkan penambahan α -naftol dan KOH ke dalam kaldu VP yang telah diinokulasikan dengan bakteri. Dengan demikian, melalui serangkaian pengujian biokimia, karakteristik biokimia dari isolat dapat diketahui, yang penting untuk memahami kemampuan metabolik dan aktivitas enzim yang dimiliki oleh bakteri tersebut.

Hasil uji sitrat menunjukkan bahwa isolat mengalami perubahan media dari warna hijau menjadi biru, menandakan bahwa bakteri tersebut mampu menggunakan Na-sitrat sebagai sumber karbon. Namun, hasil pengujian tersebut negatif, yang mengindikasikan bahwa isolat tersebut tidak mengandalkan Na-sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon. Pada pengujian NaCl 6,5%, hasil positif dicapai jika terjadi kekeruhan pada media, menandakan bahwa bakteri memiliki kemampuan fisiologis

untuk bertahan pada kondisi tinggi NaCl. Namun, pada isolat K.W.R.4.1, kejernihan atau ketiadaan pertumbuhan pada media menunjukkan hasil negatif.

Uji gula-gula (arabinosa) bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam mengurai karbohidrat. Hasil pengujian arabinosa pada isolat K.W.R.4.1 menunjukkan perubahan warna dari merah menjadi kuning, menandakan kemampuan bakteri untuk mengurai karbohidrat. Identifikasi bakteri dilakukan berdasarkan hasil uji biokimia dan dibandingkan dengan buku petunjuk identifikasi menurut Bergey's (1994) dan Cowan (1974), yang menghasilkan identifikasi bahwa isolat berasal dari genus *Bacillus*. Dengan demikian, hasil-hasil uji tersebut memberikan informasi penting untuk mengidentifikasi bakteri secara spesifik dan mengarahkan peneliti ke arah genus *Bacillus* sp. dan memiliki hasil yang serupa seperti pada beberapa penelitian sebelumnya (Tabel 2.3)

Tabel 2.4 Beberapa hasil penelitian

Peneliti	Hasil identifikasi bakteri	Suhu °C	Enzim yang diekspresikan
Villar et al. 2024	<i>Anoxybacillus, Bacillus, Aneurinibacillus, Paenibacillus</i>	50-55	
Yildiz, 2024	<i>Bacillus, Geobacillus</i>	45–80	amilase, selulase
Luis Felipe Valdez-Nuñez, 2024	<i>Bacillus velezensis, Anoxybacillus species (A. salavatliensis and A. gonensis), Brevibacillus</i>	50	
Lakra dan Sharma, 2024	<i>Bacillus licheniformis</i>	50, 60 dan 70	
Ginting et al., 2023	<i>Bacillus megaterium</i>		
Ulucay et al., 2022	<i>Bacillus licheniformis, Bacillus sp., Bacillus subtilis, Geobacillus kaustophilus</i>	40 dan 85	amylase, cellulase, lipase and protease
Lee et al., 2022	<i>Aeribacillus, Bacillus, Caldibacillus, Geobacillus</i>	50	amilase
Khaled et al., 2022	<i>Bacillus licheniformis</i>	50	protease
Mong et al., 2022	<i>Bacillus</i>	50-80	
Hasil Penelitian ini	<i>Bacillus sp.</i>	45-55	kitinase

2.5 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah bahwa isolasi dan identifikasi bakteri termofilik dari sumber air panas Lejja, Kabupaten Soppeng, Sulawesi Selatan,

berhasil dilakukan dengan menggunakan media Nutrien Agar dan media selektif koloidal kitin. Pertumbuhan bakteri optimal terjadi pada suhu 45°C, dengan isolat K.W.R.2 dan K.W.R.4 yang menunjukkan hasil terbaik. Isolat K.W.R.4.1 terbukti memiliki aktivitas kitinase tertinggi, sebagaimana ditunjukkan oleh indeks kitinolitik 1,67. Analisis mikroskopis mengidentifikasi isolat ini sebagai bakteri Gram positif, sementara uji biokimia lebih lanjut mengkonfirmasi bahwa isolat ini berasal dari genus *Bacillus*. Bakteri *Bacillus* sp. ini memiliki kemampuan metabolik yang signifikan dalam mendegradasi kitin, menunjukkan potensi besar untuk aplikasi bioteknologi, terutama dalam industri pengolahan limbah dan produksi kitinase.

2.6 Daftar pustaka

- Aransiola, SA, Afolabi, F, Joseph, F, & ... (2022). Soil Enzymes: Distribution, Interactions, and Influencing Factors. Agricultural ..., taylorfrancis.com, <https://doi.org/10.1201/9781003313106-15>
- Arfah, R. A., Patong, A. R., Ahmad, A., dan Djide, M. N., 2014. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Termofil Penghasil Amilase dari Sumber Air Panas Lejja Sulawesi Selatan. *Al-Kimia*, 2(2), 36-46.
- Asnawi, I., Natsir, H., dan Hariani, N., 2014. Eksplorasi Mikroba Penghasil Enzim Lipolitik Pada Sumber Air Panas Lemo Susu, Pinrang, Sulawesi Selatan. *Jurnal Sains Dasar*, 2(1): 1-6.
- Choudhary, G, Kumari, S, Anu, K, & Devi, S (2024). Deciphering the microbial communities of alkaline hot spring in Panamik, Ladakh, India using a high-throughput sequencing approach. *Brazilian Journal of Microbiology*, Springer, <https://doi.org/10.1007/s42770-024-01346-6>
- Dadwal, A, Sharma, S, & Satyanarayana, T (2021). Thermostable cellulose saccharifying microbial enzymes: Characteristics, recent advances and biotechnological applications. *International Journal of Biological ...*, Elsevier, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813021016834>
- Damer, B, & Deamer, D (2020). The hot spring hypothesis for an origin of life. *Astrobiology*, liebertpub.com, <https://doi.org/10.1089/ast.2019.2045>
- Firliani, W, Agustien, A, & Febria, FA (2015). Karakterisasi bakteri termofilik penghasil enzim protease netral. *Jurnal Biologi UNAND*, jbioua.fmipa.unand.ac.id, <http://jbioua.fmipa.unand.ac.id/index.php/jbioua/article/view/112>
- Herrialfian, H, Lubis, MMN, Darmawi, D, & ... (2021). 7. Inhibition Activity of Ethanolic Extract of Binahong Leaf (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) on *Staphylococcus aureus* Bacteria. *Jurnal Medika ...*, jurnal.usk.ac.id, <https://jurnal.usk.ac.id/JMV/article/view/9988>
- Idris, SA, Rasak, A, & Ado, MS (2023). Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Kitinolitik Pada Air Payau Menggunakan Media Kitin Dari Tulang Sotong. *JKEMS-Jurnal Kesehatan ...*, rumahjurnal.or.id, <http://rumahjurnal.or.id/index.php/jkems/article/view/406>
- Irianto., 2006. *Mikrobiologi: Menguak Dunia Mikroorganisme*. Universitas Negeri Malang.
- Kuby, SA (2019). A study of enzymes: Enzyme catalyts, kinetics, and substrate binding., taylorfrancis.com, <https://doi.org/10.1201/9780429291579>
- Kumari, M, Padhi, S, Sharma, S, Phukon, LC, Singh, SP, & ... (2021). Biotechnological potential of psychrophilic microorganisms as the source of

- cold-active enzymes in food processing applications. 3 Biotech, Springer, <https://doi.org/10.1007/s13205-021-03008-y>
- Lestari, P. 2000., Eksplorasi Enzim Termotabil dari Mikroba Termofil, Fakultas Biologi, Universitas Jendral Sudirman, Purwokerto
- Mahmudah, R., Baharuddin, M., dan Sappewali, S., 2016. Identifikasi Isolat Bakteri Termofilik dari Sumber Air Panas Lejja Kabupaten Soppeng, Jurnal Al-Kimia, 4(1): 31-42.
- Natsir, H., 2000, Karakterisasi dan Purifikasi Enzim Pendegradasi Kitin dari Mikroba Asidofilik Asal Kawah Kamojang, Tesis, Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor
- Natsir, H., Patong, A. R., Suhartono, M. T., and Ahmad, A., 2010 A. Production and Characterization of Chitinase Enzymes From Sulili Hot Spring In South Sulawesi Bacillus sp. HSA,3-1a, Indoneia Journal Chemistry, 10(2): 256-260.
- Natsir, H., Patong, A. R., Suhartono, M. T., dan Ahmad, A., 2012. Produksi dan Aplikasi Kitinase dari B. Licheniformis HSA3-1a dalam Menghidrolisis Kitin dari Limbah Udang dan Dinding Sel Jamur Ganoderma sp. Laporan Penelitian.
- Ntarmouchant, A, Jeddi, EM, Carvalho, MR, & ... (2024). Thermal springs associated with the Melilla-Fès-Smaala-Oulmès fault (Morocco): The role of fluid geochemistry in identifying a major active geodynamic structure. Applied ..., Elsevier, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0883292724001902>
- Nurikhsanti, M, Zulkifli, L, Rasmi, DAC, & ... (2024). Antagonistic Test of Bacteria Producing Siderophore and Protease Enzymes from The Rhizosfer of Peanut Plants on The Growth of Pathogenic Fungus Colletotrichum Jurnal Biologi ..., [jurnalfkip.unram.ac.id, <http://www.jurnalfkip.unram.ac.id/index.php/JBT/article/view/6459>](http://www.jurnalfkip.unram.ac.id/index.php/JBT/article/view/6459)
- Ogura, H, Okamoto, N, Nakamura, A, Takahashi, H, & ... (2024). Differences in the microbiome composition of the traditional fermented rice beverage Miki from Amami Island. International Journal of ..., Elsevier, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878450X24001045>
- Siliakus, MF, Oost, J van der, & Kengen, SWM (2017). Adaptations of archaeal and bacterial membranes to variations in temperature, pH and pressure. Extremophiles, Springer, <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0939-x>
- Suryadi, Y., Priyanto, T. P., Susilowati, D. N., Samudra, I. M., Yudhistira, N., dan Purwakusumah, E. D., 2013. Isolasi dan Karakterisasi Kitinase Asal Bacillus Cereus 11 UJ, Jurnal Biologi Indonesia, 9(1): 51-62.
- Tabassum, O (2022). Screening of carbapenemases in Acinetobacter species..., dspace.qau.edu.pk, <http://dspace.qau.edu.pk:8080/jspui/handle/123456789/28336>
- Vijayakumar, T, Divya, B, Vasanthi, V, & ... (2023). Diagnostic utility of gram stain for oral smears—A review. Journal of Microscopy ..., [journals.lww.com, https://journals.lww.com/jmcu/_layouts/15/oaks.journals/downloadpdf.aspx?an=02087478-202311030-00002](https://journals.lww.com/jmcu/_layouts/15/oaks.journals/downloadpdf.aspx?an=02087478-202311030-00002)
- Wang, J, Tavakoli, J, & Tang, Y (2019). Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods—A review. Carbohydrate polymers, Elsevier, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861719305041>
- Yan, Y, Zhang, Z, Zhou, X, Wang, G, He, M, Tian, J, & ... (2024). Geochemical characteristics of hot springs in active fault zones within the northern Sichuan-Yunnan block: Geochemical evidence for tectonic activity. Journal of ...,

Elsevier,
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022169424005742>
Zhang, X, Hao, T, Zhang, T, Hu, Y, Lu, R, Li, D, & ... (2024). Towards energy conservation and carbon reduction for wastewater treatment processes: A review of carbon-neutral anaerobic biotechnologies. *Journal of Water ...*, Elsevier,
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214714424002587>