

BAB I

PENDAHULUAN UMUM

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara berkembang yang membutuhkan berbagai macam enzim setiap tahunnya. Pada sektor industri, konsumsi enzim diperkirakan mencapai 2.500 ton dengan nilai impor sekitar dua ratus miliar rupiah pada tahun 2017 dan kebutuhan ini diproyeksikan terus bertumbuh dengan laju pertumbuhan rata-rata 5 hingga 7 persen per tahun (Astriany et al., 2022). Hampir 99 persen dari enzim ini diimpor dari luar negeri, terutama dari China, India, Jepang, dan beberapa negara Eropa (Febriana, 2023). Pemerintah Indonesia telah mengembangkan unit produksi enzim sendiri untuk mengurangi ketergantungan pada impor tersebut. Salah satu unit produksi ini terletak di Gresik, yang dikembangkan oleh BPPT (Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi) dan PT Petrosida Gresik. Fasilitas ini diharapkan dapat memproduksi sekitar 200 ton enzim per tahun sehingga dapat membantu menekan biaya impor (Setyorini, 2017). Akan tetapi, produksi tersebut diperkirakan hanya memenuhi sekitar 10 % dari kebutuhan enzim nasional. Keberhasilan produksi enzim dalam negeri sangat bergantung pada pemahaman sifat biokimia dan kondisi optimal kerja enzim.

Salah satu enzim yang penting di sektor industri adalah amilase (Gupta et al., 2003). Kebutuhan terhadap enzim ini mencapai sekitar 25-30 % dari konsumsi pasar enzim dunia (Aminin et al., 2022). Amilase berfungsi menghidrolisis ikatan glikosidik dalam polisakarida amilum menjadi gula sederhana seperti glukosa dan termasuk dalam golongan enzim hidrolase (Singh et al., 2019). Enzim ini termasuk dalam golongan enzim ekstraseluler dan diklasifikasikan menjadi tiga bagian yaitu α -amilase, β -amilase, dan γ -amilase (Joshi et al., 2021).

Amilase dapat diisolasi dari berbagai sumber biologis seperti tanaman, hewan, maupun mikroorganisme. Beberapa penelitian telah mengeksplorasi amilase dari sumber tanaman, seperti penelitian oleh Pratantie et al. (2021) yang melaporkan enzim amilase diperoleh langsung dari jaringan tanaman kecambah kacang tunggak. Meskipun demikian, sejumlah penelitian menunjukkan bahwa bakteri merupakan sumber utama enzim amilase karena memiliki laju pertumbuhan yang cepat, mudah diproduksi dalam skala besar, serta memiliki stabilitas tinggi terhadap suhu dan pH (Anbu et al., 2017). Keunggulan ini menjadikan bakteri lebih diminati untuk produksi enzim amilase dalam skala industri. Beragam penelitian telah melaporkan isolasi bakteri penghasil amilase dari berbagai sumber lingkungan, antara lain dari sampel

ikh et al., 2023), sedimen tambak udang Vannamei (Novitasari tanah (Yassin et al., 2021), daun kenikir (Istia'nah et al., 2020), *esculenta* L. (Wulandari & Purwaningsih, 2019).

Amilase dapat diisolasi dari berbagai lingkungan, termasuk suhu ekstrem. Suhu merupakan salah satu parameter penting bakteri, dan setiap bakteri memiliki karakteristik bertahan hidup pada suhu yang berbeda. Berdasarkan suhu pertumbuhan, bakteri



dikategorikan menjadi empat kelompok diantaranya psikrofil, mesofil, termofil dan hipertermofil (Mohammad et al., 2017). Bakteri termofilik merupakan mikroba yang tahan dan mampu beradaptasi terhadap tempat dengan temperatur yang tinggi (Yildiz, 2024). Bakteri ini memiliki sejumlah keunggulan dibandingkan bakteri mesofilik, seperti pertumbuhan cepat, risiko kontaminasi yang rendah, dan kemampuan untuk menghasilkan enzim yang kuat dan termotabil yang cocok untuk proses industri (Vavitsas et al., 2022). Umumnya bakteri termofilik ditemukan di lingkungan seperti sumber air panas, kawasan geotermal, dan tumpukan kompos (Indriati & Megahati, 2023; Ortega-Villar et al., 2024).

Sumber air panas menjadi salah satu habitat alami bakteri termofilik. Kehadiran bakteri di habitat tersebut disebabkan kemampuan bakteri untuk bertahan dalam kondisi panas yang tinggi, yang bisa jadi tidak sesuai bagi banyak bentuk kehidupan lainnya (Indriati & Megahati, 2023). Selain suhu tinggi, kandungan mineral yang beragam dan pH yang sering kali ekstrem menjadi kondisi ideal bagi bakteri termofilik untuk berkembang. Ciri yang menarik dari sumber air panas adalah keutuhan ekosistem, yaitu keanekaragaman organisme dan stabilitas molekul komponen biokimia (Baltaci et al., 2017). Sumber air panas ini tersebar luas di Indonesia, yang menjadikannya potensial sebagai tempat hidup bakteri termofilik (Nuritasari et al., 2017). Beberapa sumber air panas di Indonesia diantaranya sumber air panas Way Panas Kalianda Lampung Selatan (Mahestri et al., 2021), Sapan Sungai Aro Padang (Vestimarta & Irdawati, 2024), sumber air panas Kawah Kamojang (Ratu et al., 2022), sumber air panas Bora Sulawesi Utara (Gazali & Suwatika, 2018), sumber air panas Pincara Masamba (Kasi et al., 2020), sumber air panas Sulili Pinrang (Natsir et al., 2010), sumber air panas Bumi Pencong Gowa (Lolo et al., 2020) dan sumber air panas lainnya yang tersebar di penjuru Indonesia.

Keberadaan sumber air panas yang tersebar di Indonesia tidak hanya berfungsi sebagai objek wisata bagi masyarakat, tetapi juga menjadi lokasi yang potensial dalam eksplorasi bakteri termofilik. Isolasi bakteri dari sumber air panas sering kali menghasilkan spesies baru dengan kemampuan enzimatik yang unik. Hal ini menjadikan sumber air panas sebagai sumber alami untuk menemukan mikroorganisme yang berpotensi dikembangkan untuk aplikasi bioteknologi, khususnya dalam pengembangan enzim industri. Keberagaman bakteri termofilik yang ditemukan di berbagai sumber air panas menunjukkan bahwa lingkungan ini merupakan ekosistem yang kaya akan mikroorganisme dengan potensi aplikasi yang luas. Beberapa bakteri yang berhasil dari habitat tersebut telah menunjukkan kemampuan dalam menghasilkan enzim, salah satu diantaranya Fazal et al. (2022) yang berhasil mengisolasi dan mengarakterisasi *Anoxybacillus flavithermus* strain A7



s Poring, Sabah, Malaysia, yang mampu menghasilkan enzim I dengan aktivitas optimum pada suhu 60 °C. Hasil penelitian ini bahwa bakteri termofilik dari sumber air panas memiliki i penghasil enzim yang stabil pada suhu tinggi, sehingga sangat likasi industri.

asilkan oleh bakteri termofilik tersebut memiliki karakteristik ang mampu beradaptasi pada suhu ekstrem memiliki potensi

besar dalam berbagai aplikasi industri karena stabilitasnya yang tinggi pada rentang pH yang luas serta kemampuannya beroperasi pada suhu tinggi, yang sering dibutuhkan dalam kondisi industri. Enzim yang diisolasi dari mikroorganisme termostabil, seperti psikrofil dan termofil, dianggap sebagai sumber daya biologis yang bernilai dan menjadi fokus penelitian untuk pengembangan aplikasi bioteknologi (Ullah et al., 2021). Salah satu enzim termostabil yang paling banyak digunakan dan diinginkan dalam industri adalah amilase. Enzim ini mampu mempercepat reaksi pada suhu tinggi, memberikan sejumlah keuntungan seperti peningkatan kelarutan substrat dan pengurangan risiko kontaminasi mikroba selama proses produksi (Bouaita et al., 2024).

Pemahaman terhadap kondisi kerja optimum enzim amilase termostabil sangat penting dalam memaksimalkan potensinya untuk industri. Kerja enzim dipengaruhi oleh kondisi optimumnya yang dapat ditentukan melalui karakterisasi enzim. Karakterisasi enzim mengacu pada identifikasi faktor yang mempengaruhi kerja enzim seperti suhu, pH, waktu inkubasi, konsentrasi substrat, dan konsentrasi enzim. Kondisi optimum tersebut mengakibatkan aktivitas kerja enzim yang meningkat. Namun demikian, meskipun beberapa mikroorganisme dapat menghasilkan amilase, sangat sulit untuk menemukan strain yang paling cocok untuk produksi enzim ini (Suriya et al., 2016). Oleh karena itu, eksplorasi mikroorganisme terus dilakukan dari tahun ke tahun.

Pemahaman mendalam tentang isolasi, karakterisasi dan pemurnian enzim amilase sangat dibutuhkan, terutama karena kontribusi enzim amilase ini dalam berbagai bidang, seperti industri makanan, farmasi, tekstil, bioteknologi bahkan dalam kehidupan sehari-hari. Kesadaran akan pentingnya enzim ini telah mendorong pengembangan teknologi yang lebih inovatif, dengan fokus pada peningkatan efisiensi proses produksi, kualitas produk dan keberlanjutan lingkungan. Selain itu, pengembangan penelitian tentang enzim amilase menjadi sangat penting untuk membuka wawasan baru dan memperluas pemahaman terkait sumber-sumber mikroorganisme penghasil amilase, proses isolasinya, karakterisasi hingga pemurniannya.

Peran utama dari enzim amilase adalah kemampuannya dalam proses hidrolisis amilum menjadi gula seperti dekstrin. Potensi enzim amilase dalam produksi dekstrin sangat besar, mengingat kemampuannya untuk mengoptimalkan konversi bahan baku yang mengandung amilum menjadi produk bernilai tinggi secara efisien dan ramah lingkungan. Bahan baku ini banyak bersumber dari limbah agroindustri. Martins et al. (2022) mendeskripsikan limbah agroindustri menimbulkan dampak terhadap lingkungan, dan penggunaan teknologi serta material baru muncul sebagai



dimainkan dampak tersebut. Salah satu bahan yang berpotensi yang mengandung pati adalah biji alpukat (*Persea americana*) pati yang cukup tinggi pada biji alpukat memungkinkan biji sebagai salah satu sumber pati alternatif, dengan nilai kemurnian pati serta kandungan protein dan energi metabolis tepung biji alpukat dibandingkan dengan jagung (Rahmiati et al., 2020). Sukma et al. (2019) menyatakan pati pada biji alpukat sebesar 23%. Martins et al. (2022)

menemukan rendemen pati yang berhasil diisolasi dari biji alpukat sebesar 19,54 %. Keberadaan kandungan pati pada biji alpukat memungkinkan pengolahan lebih lanjut menjadi dekstrin.

Dekstrin termasuk salah satu turunan pati yang diperoleh melalui serangkaian proses hidrolisis secara parsial (Satmah & Hardi, 2021). Dekstrin memiliki berat molekul rendah yang secara struktural dicirikan oleh unit glukosa (D) yang dihubungkan oleh ikatan glikosidik α -(1 $\rightarrow$ 4) atau α -(1 $\rightarrow$ 6) (Umoren & Eduok, 2016). Penelitian terkait dekstrin telah dilakukan, Prasetyo et al., (2018) berhasil memperoleh dekstrin dari pati kacang merah dengan menggunakan metode enzimatik. Dekstrin yang diperoleh memenuhi persyaratan warna, derajat kehalusan, kadar abu, kadar air dan nilai dekstrosa ekivalen berdasarkan pada SNI No. 01-2593 tahun 1992. Nuryawan et al. (2020) menemukan bahwa dekstrin dapat diperoleh dari biji durian dan digunakan sebagai perekat pada kayu. Rizqianti et al. (2021) memanfaatkan dekstrin sebagai bahan pengisi (*filler*) pada susu kambing bubuk. Penelitian yang dilakukan Ente et al. (2022) menyimpulkan bahwa dekstrin digunakan sebagai bahan tambahan pada produk minuman serbuk *effervescent* kulit buah naga memberikan pengaruh pada kadar air, aktivitas antioksidan, pH, kelarutan serta warna. Dekstrin memiliki banyak manfaat, terutama pada sektor industri khususnya industri pangan dan farmasi. Degradasi pati menjadi dekstrin dengan nilai ekonomis yang lebih tinggi ini dapat dilakukan secara enzimatik.

Upaya terus dilakukan untuk mengisolasi, mengarakterisasi, dan mengoptimalkan enzim amilase agar lebih sesuai untuk berbagai aplikasi industri termasuk produksi dekstrin. Dengan kemampuan untuk bertahan pada suhu tinggi, enzim amilase ini memberikan keunggulan kompetitif dalam proses-proses industri yang memerlukan kondisi ekstrem. Pengembangan teknologi enzim dan pemanfaatan limbah agroindustri ini sejalan dengan upaya pencapaian *Sustainable Development Goals* (SDGs), khususnya SDG 9 (Industri, Inovasi, dan Infrastruktur), SDG 12 (Konsumsi dan Produksi yang Bertanggung Jawab), dan SDG 13 (Penanganan Perubahan Iklim) melalui penggunaan proses enzimatik yang lebih ramah lingkungan.

Salah satu pendekatan yang dapat dilakukan untuk mendapatkan enzim termostabil adalah mengeksplorasi sumber bakteri termofilik dari lingkungan alami yang belum banyak diteliti, seperti sumber air panas Wae Pellae, Sinjai dalam pemanfaatan keanekaragaman hayati secara berkelanjutan. Sebagai bagian dari upaya tersebut, penelitian ini berfokus pada eksplorasi sumber daya alam yang belum dikaji, khususnya sumber air panas Wae Pellae di Kabupaten Sinjai. Berdasarkan hasil pengukuran di lapangan diperoleh suhu pada lokasi tersebut



disini menjadi lingkungan yang ideal bagi pertumbuhan bakteri juga memiliki nilai budaya bagi masyarakat sekitar, di mana membawa sajian tradisi yang mengandung pati. Keberadaan adat ini dapat berperan sebagai sumber nutrisi bagi bakteri juga meningkatkan potensi isolasi bakteri penghasil enzim studi awal pada lokasi sumber air panas tersebut, maka dalam

penelitian ini dilakukan kajian potensi enzim amilase dari bakteri termofilik sebagai solusi dalam degradasi pati limbah biji alpukat (*Persea americana* Mill.).

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian adalah

1. spesies isolat bakteri termofilik apa sebagai penghasil enzim amilase yang diisolasi dari sumber air panas Wae Pellae, Sinjai?
2. bagaimana karakteristik enzim amilase dari isolat bakteri terpilih dan berapa nilai aktivitas yang dihasilkan?
3. bagaimana proses pemurnian enzim amilase dari isolat bakteri terpilih dan peningkatan aktivitas spesifiknya?
4. bagaimana potensi enzim amilase dari isolat bakteri terpilih dalam degradasi pati dari limbah biji alpukat menjadi dekstrin?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian adalah

1. mengisolasi bakteri termofilik sebagai penghasil enzim amilase dari sumber air panas Wae Pellae, Sinjai dan mengidentifikasi spesiesnya
2. menganalisis karakteristik enzim amilase dari isolat bakteri terpilih dan mengevaluasi nilai aktivitasnya
3. memurnikan enzim amilase dari isolat bakteri terpilih melalui teknik fraksinasi dan dialisis, serta mengevaluasi peningkatan aktivitas spesifiknya
4. mengaplikasikan enzim amilase dari isolat bakteri terpilih dalam degradasi pati limbah biji alpukat menjadi dekstrin dan mengevaluasi efektivitasnya.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian adalah

1. memberikan informasi ilmiah mengenai keanekaragaman bakteri penghasil enzim amilase dari sumber air panas Wae Pellae, Sinjai, meliputi identifikasi spesies dan karakteristik biokimia enzim yang dihasilkan
2. menghasilkan isolat bakteri yang telah teridentifikasi yang dapat dikembangkan sebagai sumber enzim amilase untuk aplikasi industri
3. memberikan solusi alternatif dalam pemanfaatan limbah agroindustri biji alpukat menjadi produk dekstrin bernilai ekonomis melalui degradasi secara enzimatik
4. mendukung pengembangan enzim lokal untuk mengurangi ketergantungan impor enzim dari luar negeri sesuai dengan SDGs 9, 12, dan 13.



Penelitian

akan studi eksperimen yang bertujuan mengeksplorasi enzim amilolitik termofilik yang diisolasi dari sumber air panas Wae Pellae, Sinjai, serta mengkaji pemanfaatannya dalam proses degradasi pati menjadi dekstrin. Tesis ini disusun ke dalam enam bab yang saling

berkaitan, dengan setiap bab menguraikan tahapan penelitian secara sistematis, mulai dari proses isolasi dan identifikasi bakteri hingga aplikasi enzim amilase pada hidrolisis pati. Ruang lingkup masing-masing Bab dapat dijelaskan sebagai berikut:

1. Bab I : Membahas tentang latar belakang penelitian, rumusan masalah, tujuan penelitian, manfaat penelitian, ruang lingkup penelitian, kebaruan, kerangka konsep, dan landasan teori.
2. Bab II : Membahas tentang isolasi dan identifikasi bakteri amilolitik dari sumber air panas Wae Pellae
3. Bab III : Membahas tentang purifikasi parsial dan karakterisasi enzim amilase dari *C. erzurumensis*
4. Bab IV : Membahas tentang degradasi pati limbah biji alpukat menjadi dekstrin secara enzimatik
5. Bab V : Menyajikan analisis menyeluruh yang mengintegrasikan hasil penelitian dari Bab II, III, dan IV
6. Bab VI : Menyimpulkan hasil utama penelitian secara ringkas dan sistematis serta memberikan saran untuk pengembangan penelitian lanjutan.

1.6 Kebaruan Penelitian

Kebaruan dalam penelitian adalah

1. sumber isolat baru, penelitian ini mengeksplorasi sumber air panas Wae Pellae, Sinjai, sebagai ekosistem ekstrem yang belum banyak diteliti secara mendalam sebagai sumber potensial isolat bakteri penghasil enzim amilase termotabil
2. isolat bakteri, diperoleh isolat *Calidifontibacillus erzurumensis* ATF2IV8 yang pertama kali dilaporkan berasal dari sumber air panas Wae Pellae
3. karakterisasi, enzim amilase dengan bobot molekul 53 kDa dikarakterisasi secara menyeluruh meliputi suhu dan pH optimum, stabilitas, pengaruh ion logam, serta kinetika enzim, yang menunjukkan potensi tinggi untuk aplikasi industri pada kondisi ekstrem
4. aplikasi bioteknologi berkelanjutan, pemanfaatan pati limbah biji alpukat untuk produksi dekstrin secara enzimatik merupakan pendekatan baru, karena sebagian besar penelitian sebelumnya memanfaatkan pati tersebut untuk aplikasi lain seperti pembuatan biofilm, sirup glukosa, dan bahan pangan.

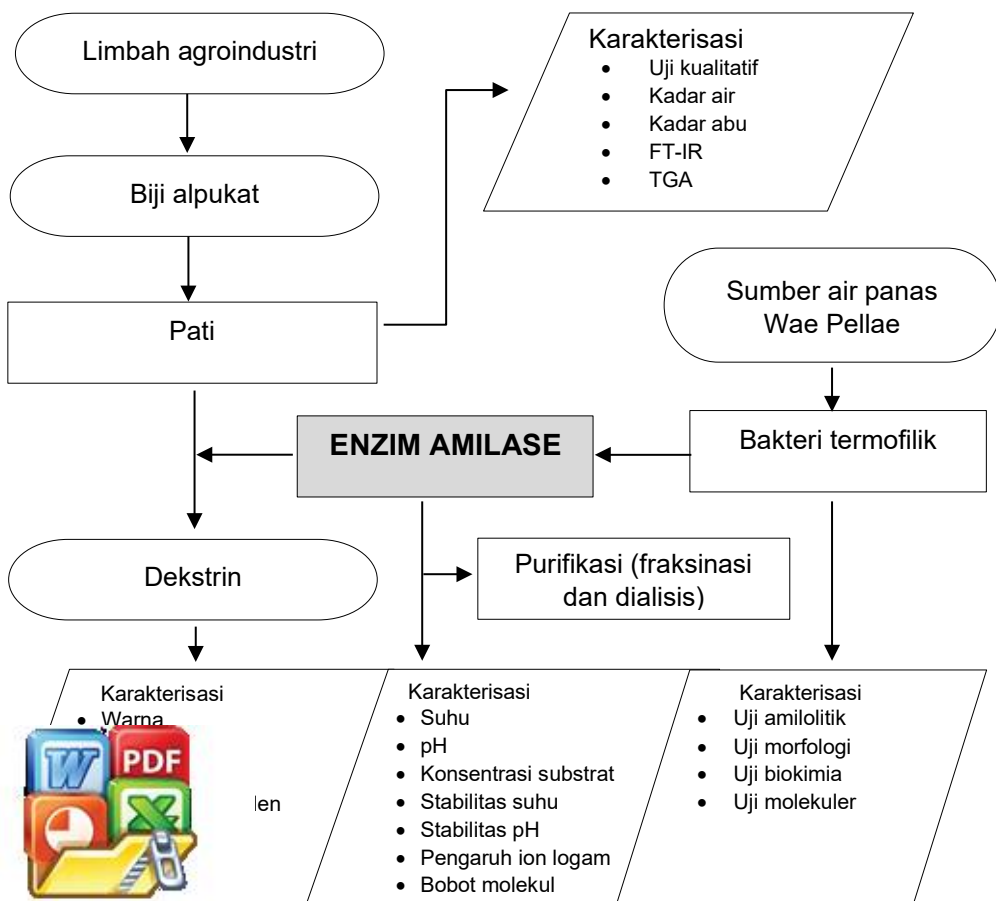
1.7 Kerangka Konseptual

Limbah agroindustri sering kali tidak dimanfaatkan secara optimal dan berpotensi besar jika dibuang begitu saja ke lingkungan. Limbah ini sering mengandung bahan yang bermanfaat seperti pati pada biji alpukat. Biji alpukat memiliki jumlah yang signifikan, sekitar 15-20% (23). Pati ini dapat diolah menjadi produk yang memiliki nilai tinggi seperti dekstrin. Dekstrin memiliki kegunaan pada industri tekstil. Dekstrin yang dihasilkan dari degradasi pati biji alpukat bermanfaat bagi lingkungan dan peningkatan nilai ekonomi.



Salah satu metode yang efektif dalam degradasi pati menjadi dekstrin melalui proses enzimatik dengan memanfaatkan enzim amilase. Enzim ini bekerja dengan cara memecah ikatan glikosidik pada molekul pati, menghasilkan molekul yang lebih sederhana seperti dekstrin dan maltosa. Akan tetapi, salah satu kendala adalah sumber enzim amilase. Sejauh ini, penggunaan amilase masih memiliki ketergantungan pada impor. Sehingga, eksplorasi sumber enzim lokal menjadi sangat penting demi mengurangi ketergantungan impor tersebut.

Sumber air panas merupakan habitat bagi bakteri termofilik yang mampu menghasilkan enzim termostabil, termasuk amilase. Enzim amilase yang dihasilkan oleh bakteri termofilik sangat efisien karena mampu bekerja pada suhu tinggi, sehingga mempercepat proses hidrolisis dan meningkatkan efisiensi produksi dekstrin. Sumber air panas Wae Pellae yang terletak di Kabupaten Sinjai merupakan lokasi potensial yang belum dieksplorasi untuk isolasi bakteri termofilik penghasil enzim amilase. Eksplorasi ini dapat menghasilkan enzim amilase dengan stabilitas termal tinggi yang sesuai untuk aplikasi dalam degradasi pati.



Gambar 1.1. Diagram alir kerangka pikir

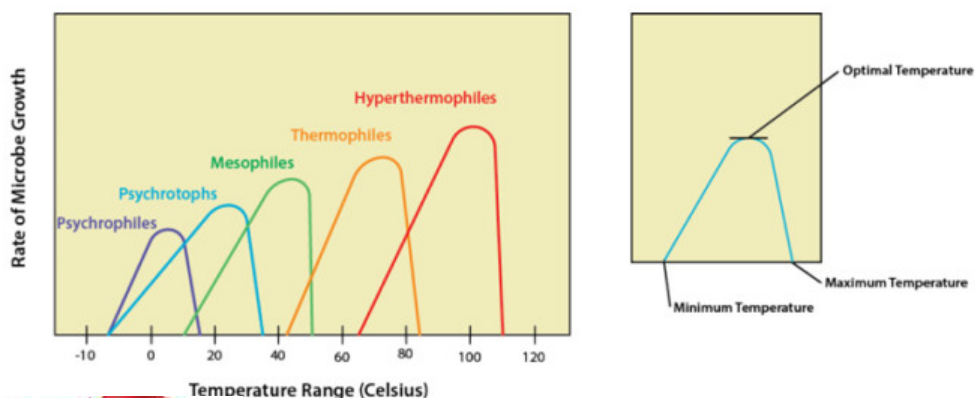
Pemanfaatan bakteri termofilik sebagai penghasil enzim amilase pada degradasi pati biji alpukat menjadi dekstrin merupakan solusi berkelanjutan dalam pengelolaan limbah agroindustri. Hal ini tidak hanya mengurangi dampak lingkungan akibat limbah, tetapi juga menghasilkan produk bernilai tambah. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengarakterisasi enzim amilase dari bakteri termofilik yang ditemukan di sumber air panas Wae Pellae Sinjai, serta mengaplikasikannya dalam degradasi pati biji alpukat menjadi dekstrin. Diharapkan hasil penelitian ini dapat memberikan kontribusi signifikan dalam pengembangan teknologi pengolahan limbah biji alpukat yang ramah lingkungan dan berkelanjutan, serta mendorong pemanfaatan sumber daya mikroorganisme lokal untuk aplikasi industri. Alur dari kerangka konseptual ini disajikan pada Gambar 1.1.

1.8 Landasan Teori

1.8.1 Tinjauan tentang bakteri termofilik

Suhu merupakan salah satu faktor lingkungan yang sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan dan metabolisme mikroorganisme. Setiap bakteri memiliki rentang suhu tertentu yang memungkinkan proses fisiologisnya berlangsung secara optimal. Berdasarkan kisaran suhu pertumbuhannya, bakteri dapat dikelompokkan menjadi empat kategori, yaitu (Alghazali & Eljamay, 2024)

1. psikrofil, tumbuh optimal pada suhu sekitar $-5-20^{\circ}\text{C}$,
2. mesofil memiliki suhu antara $15-45^{\circ}\text{C}$,
3. termofil, mampu tumbuh pada suhu tinggi dengan kisaran $45-80^{\circ}\text{C}$,
4. hipertermofil merupakan mikroorganisme ekstrem yang tumbuh optimal pada suhu di atas 80°C .



mengelompokkan mikroorganisme berdasarkan rentang suhu

kan hubungan antara laju pertumbuhan mikroba dan rentang
ya. Kurva pertumbuhan memperlihatkan adanya titik suhu
dan maksimum yang berbeda untuk setiap kelompok bakteri.
meningkat hingga mencapai suhu optimum, kemudian menurun

tajam setelah melewati batas maksimum akibat denaturasi protein dan kerusakan struktur sel (Keenleyside, 2019).

Bakteri termofilik menempati posisi penting di antara kelompok mikroorganisme tersebut karena kemampuannya untuk bertahan dan beraktivitas pada suhu tinggi. Umumnya, bakteri ini ditemukan pada lingkungan ekstrem seperti sumber air panas, tanah vulkanik, dan kompos yang sedang mengalami proses dekomposisi (Indriati & Megahati, 2023; Ortega-Villar et al., 2024). Berbagai penelitian telah berhasil mengisolasi bakteri termofilik dari sumber air panas di berbagai wilayah dunia. Hasil-hasil tersebut menunjukkan keragaman genus dan aktivitas enzimatis yang tinggi, seperti ditunjukkan pada Tabel 1.1.

Tabel 1.1. Studi isolasi bakteri dari berbagai sumber air panas

Sumber air panas	Hasil	Sumber pustaka
Sumber air panas Hidalgo, Mexico	18 strain bakteri dengan genus <i>Anoxybacillus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Anerunibacillus</i> , <i>Paenibacillus</i> , and <i>Deinococcus</i>	(Ortega-Villar et al., 2024)
Sumber air panas Yordania	10 isolat bakteri; 9 strain diidentifikasi <i>Bacillus licheniformis</i> dan 1 strain spesies <i>Thermomonas hydrothermalis</i>	(Mohammad et al., 2017)
Sumber air panas Bayanan, Sragen, Jawa Tengah, Indonesia	20 isolat amilolitik dan 8 isolat proteolitik	(Santosa & Setiyaningrum, 2024)
Sumber air panas Kawah Kamojang, Garut, Indonesia	2 isolat bakteri yakni <i>Geobacillus sp.</i> dan <i>Geobacillus thermoleovorans</i> strain CCB-US3-UF5	(Ratu et al., 2022)
Sumber air panas Likupang, Sulawesi Utara, Indonesia	12 isolat bakteri amilolitik dengan spesies <i>Bacillus caldotenax</i> (2 isolat), <i>Bacillus sp.</i> (1 isolat) dan isolat lainnya <i>Geobacillus thermoleovorans</i>	(Ginting et al., 2021)
Sumber air panas Rianiate Samosir, Sumatera Utara, Indonesia	12 isolat bakteri amilolitik Indeks amilolitik tertinggi merupakan genus <i>Bacillus</i>	(Silaban et al., 2021)
	30 isolat bakteri, 10 termasuk bakteri amilolitik	(Arfah et al., 2014)
	6 isolat bakteri amilolitik	(Natsir et al., 2014)

Bakteri termofilik memiliki kemampuan untuk mempertahankan aktivitas biologis di bawah kondisi termal ekstrem. Adaptasi fisiologis dan biokimia memungkinkan bakteri termofilik mempertahankan stabilitas enzim dan struktur seluler pada suhu tinggi, sehingga menjadikannya sumber potensial bagi berbagai enzim termostabil yang bernilai industri, termasuk amilase (Yildiz, 2024; Alghazali & Eljamay, 2024). Enzim-enzim yang dihasilkan oleh bakteri termofilik memiliki stabilitas tinggi terhadap suhu dan pH ekstrem, sehingga banyak dimanfaatkan dalam bioteknologi, industri pangan, bioetanol, dan pengolahan limbah.

1.8.2 Tinjauan tentang enzim amilase

Enzim merupakan molekul protein yang berfungsi sebagai katalisator dalam berbagai reaksi biokimia yang terjadi dalam sel-sel makhluk hidup, memiliki spesifisitas tertentu terhadap substratnya dan bekerja dalam kondisi lingkungan yang optimal (Ullah et al., 2021). Enzim bekerja dengan mempercepat reaksi dengan menurunkan energi aktivasi tanpa mengalami perubahan secara permanen dalam proses tersebut (Berg et al., 2002). Struktur enzim terdiri dari beberapa bagian, termasuk situs aktif tempat substrat berikatan, serta domain yang berperan dalam stabilisasi struktur dan interaksi dengan kofaktor atau koenzim (Nelson & Cox, 2004).

Amilase merupakan enzim yang mengkatalisis hidrolisis ikatan glikosidik dalam molekul pati dan polisakarida terkait. Amilase dibagi menjadi beberapa jenis berdasarkan mekanisme kerja dan substrat spesifik yang dipecahnya. Klasifikasi utama dari amilase meliputi α -amilase, β -amilase, dan γ -amilase, dengan masing-masing memiliki karakteristik dan fungsi unik. Berikut ini adalah klasifikasi utama amilase:

1. α -Amilase (EC 3.2.1.1)

α -Amilase adalah enzim endoglikosidase yang menghidrolisis ikatan alfa-1,4-glikosidik dalam polisakarida seperti pati, menghasilkan oligosakarida yang lebih kecil. Enzim ini bekerja dengan cara menyerang ikatan dalam rantai glukosa, sehingga disebut sebagai endoamilase. Aktivitas α -amilase optimal pada pH netral hingga sedikit basa dan suhu moderat. α -Amilase ditemukan secara luas di alam, termasuk dalam mikroorganisme (bakteri dan fungi), tanaman, dan hewan. Pada manusia, enzim ini diproduksi oleh kelenjar ludah dan pankreas (van der Maarel et al., 2002).

2. β -Amilase (EC 3.2.1.2)

β -Amilase adalah enzim eksoglikosidase yang menghidrolisis ikatan dari ujung non-reduksi dari rantai polisakarida, melepaskan unit glukosa. Karena enzim ini bekerja dari ujung rantai, disebut sebagai eksoamilase berperan penting dalam proses pematangan buah dan biji. β -Amilase umumnya ditemukan dalam tanaman, terutama biji berkecambah, serta dalam beberapa mikroorganisme. Enzim ini juga ditemukan pada hewan.



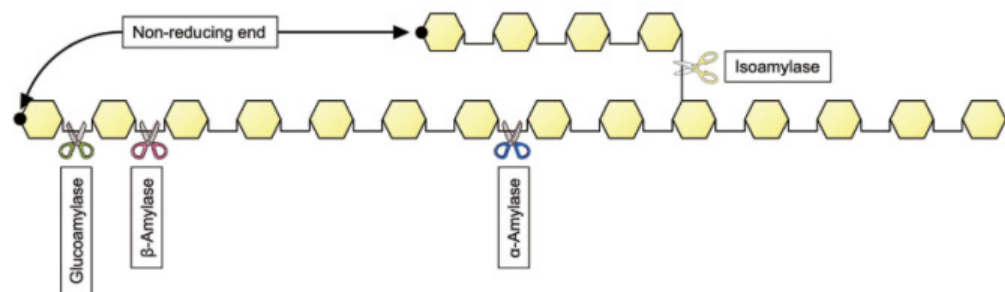
3. γ -Amilase (Glukoamilase, EC 3.2.1.3)

γ -Amilase, atau glukoamilase, adalah enzim yang menghidrolisis ikatan alfa-1,4-glikosidik dan, dalam beberapa kasus, ikatan alfa-1,6-glikosidik di ujung non-reduksi dari rantai polisakarida, menghasilkan glukosa. Enzim ini bekerja secara eksoglikolitik, memotong unit glukosa satu per satu dari ujung rantai. γ -Amilase ditemukan dalam berbagai mikroorganisme, terutama fungi dan bakteri. Enzim ini juga digunakan dalam industri untuk memproduksi glukosa dari pati (Sauer et al., 2000).

4. Isoamilase (EC 3.2.1.68)

Isoamilase adalah enzim yang menghidrolisis ikatan alfa-1,6-glikosidik dalam amilopektin, menghasilkan molekul yang lebih sederhana seperti amilosa dan oligosakarida. Isoamilase berbeda dari debranching enzyme lainnya karena tidak menghidrolisis ikatan alfa-1,4-glikosidik. Isoamilase ditemukan dalam berbagai mikroorganisme dan tanaman. Enzim ini penting dalam modifikasi pati dalam proses industri (Putri & Nakagawa, 2020).

Berbagai jenis amilase memiliki mekanisme kerja yang berbeda tergantung pada posisi dan tipe ikatan yang dihidrolisis. α -Amilase bekerja secara endo-enzimatik dengan memutus ikatan α -1,4-glikosidik di bagian dalam rantai, sedangkan β -amilase dan glukoamilase berperan sebagai ekso-enzim yang memotong unit glukosa atau maltosa dari ujung non-reduksi. Selain itu, isoamilase berfungsi untuk memutus ikatan percabangan α -1,6-glikosidik pada struktur amilopektin, sehingga menghasilkan fragmen linear yang lebih mudah dihidrolisis oleh amilase lainnya. Gambar 1.3 menggambarkan secara skematis perbedaan titik kerja enzim-enzim amilolitik tersebut terhadap rantai polisakarida.



pemecahan α -amilase, β -Amilase, γ -Amilase dan isoamilase & Nakagawa, 2020).

ngenai mekanisme kerja berbagai jenis amilase ini menjadi a karakterisasi enzim amilase dari sumber bakteri. Bakteri ni genus menghasilkan enzim amilase dengan karakteristik yang g pada habitat asal dan adaptasi fisiologisnya. Hasil penelitian

terkait isolasi enzim amilase dari bakteri amilolitik dan karakteristiknya (indeks amilolitik, pH, suhu, konsentrasi substrat, dan kofaktor) disajikan pada Tabel 1.2.

Tabel 1.2. Karakteristik enzim amilase dari isolat bakteri amilolitik

Isolat	Indeks amilolitik	Karakteristik				Aktivitas	Sumber pustaka
		pH	Suhu	[Substrat]	Kofaktor		
Isolat GKE 02	2,30	-	-	-	-	67,87 U/mL	(Yildiz, 2024)
<i>Bacillus cereus</i> SM22***	-	6	50 °C	1,0 %	Na ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ ,	46,60 U/mL	(Evurani et al., 2022)
<i>Geobacillus</i> dYTae-14**	-	8	55 °C	-	-	2143,54 U/mg	(Aminin et al., 2022)
<i>Bacillus megaterium</i> *	2,35	5	55 °C	1,5 %	-	1,279 U/mL	(Istia'nah et al., 2020)
<i>Panninobacter phragmatetus</i> strain Nat1*	-	-	60 °C	1,0 %	-	267,28 U/mL	(Frima et al., 2020)
IsolatBR 001*	1,44	7	30 °C	1,0 %	-	308,45 U/mg	(Gazali & Suwatika, 2018)
<i>Bacillus</i> sp. RSII-1b*	5,60 cm	6	55 °C	2,0 %	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , Co ²⁺	0,165 U/mL	(Arfah et al., 2015)

*crude enzim; **hasil dialisis; ***hasil kromatografi gel

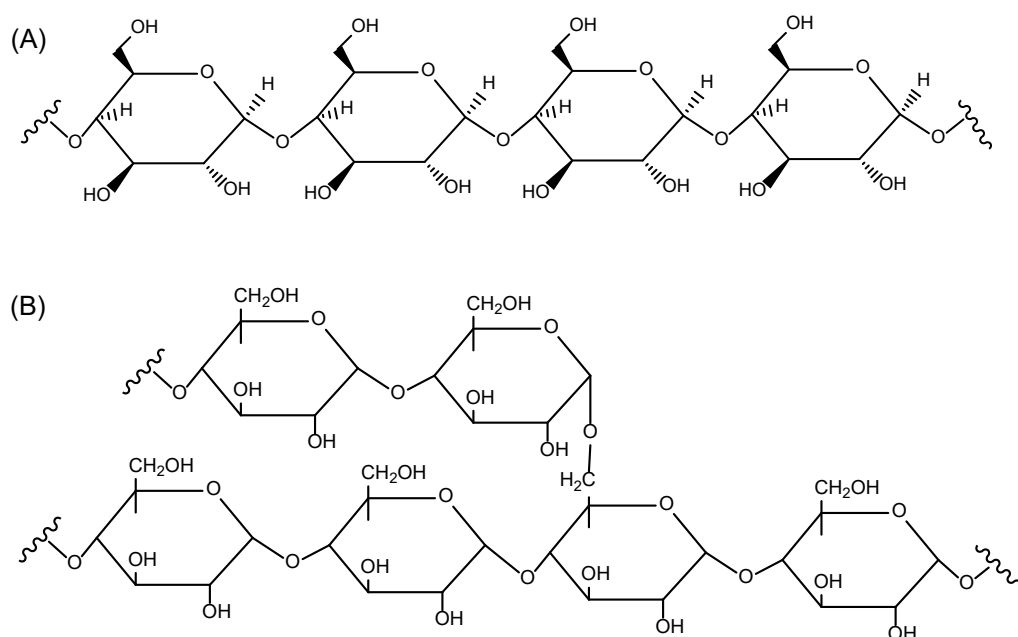
1.8.3 Tinjauan tentang pati

Amilum, atau yang lebih dikenal dengan nama pati, adalah polisakarida kompleks yang berfungsi sebagai bentuk penyimpanan energi utama pada tanaman. Amilum disusun oleh rantai panjang glukosa yang terikat bersama melalui ikatan glikosidik. Terdapat dua jenis molekul utama dalam amilum, yaitu amilosa dan amilopektin. Amilosa terdiri dari rantai lurus glukosa dengan ikatan alfa-1,4-glikosidik, sedangkan amilopektin memiliki struktur bercabang dengan tambahan ikatan alfa-1,6-glikosidik (Nakagawa, 2020).



Amilopektin adalah dua komponen utama yang menyusun amilum, yaitu amilosa dan amilopektin. Amilosa adalah polisakarida yang terdiri dari molekul glukosa, tetapi memiliki struktur rantai lurus. Molekul ini terdiri dari unit glukosa yang terikat melalui ikatan alfa-1,4-glikosidik. Struktur linier amilosa memungkinkan amilosa membentuk heliks, yang memberikan sifat tertentu seperti kemampuan

membentuk gel saat dipanaskan dalam air. Amilosa biasanya menyusun sekitar 20-30% dari total pati dalam banyak tanaman. Struktur rantai lurus amilosa juga membuatnya kurang larut dalam air dibandingkan dengan amilopektin, yang lebih bercabang (Rashwan et al., 2024). Amilopektin adalah polisakarida bercabang dengan struktur yang lebih kompleks dibandingkan dengan amilosa. Molekul ini terdiri dari rantai utama unit glukosa yang dihubungkan oleh ikatan alfa-1,4-glikosidik, serta cabang-cabang yang terhubung melalui ikatan alfa-1,6-glikosidik. Cabang-cabang ini terjadi setiap 24-30 unit glukosa. Amilopektin menyusun sekitar 70-80% dari total pati dalam tanaman. Struktur bercabang ini membuat amilopektin lebih larut dalam air dan lebih mudah dicerna oleh enzim amilase. Amilopektin memberikan sifat lengket dan viskositas yang tinggi pada larutan pati, yang penting dalam aplikasi kuliner dan industri (Buleon et al., 1998)



Gambar 1.4. Struktur (A) amilosa dan (B) amilopektin (Putri & Nakagawa, 2020)

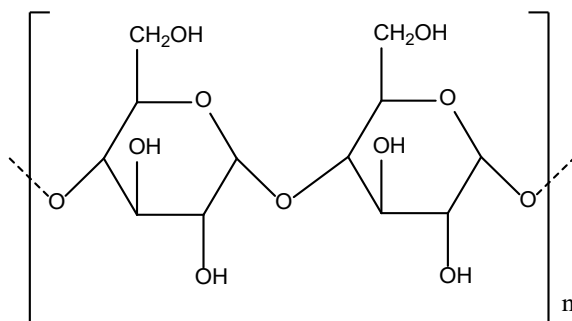
Perbedaan struktur antara amilosa dan amilopektin juga mempengaruhi sifat fisikokimia dari pati secara keseluruhan. Pati dengan kandungan amilosa yang tinggi cenderung lebih kaku dan membentuk gel yang kuat, sementara pati dengan amilopektin yang tinggi lebih viskos dan fleksibel. Kombinasi ini memiliki berbagai aplikasi dalam industri makanan, tekstil, dan lain-lain (Putri et al., 2022).



itemukan dalam biji-bijian seperti padi, jagung, dan gandum, serta dalam umbi-umbian seperti kentang dan singkong. Dalam tanaman, pati disimpan dalam organel yang disebut amiloplas. Selama proses fotosintesis, glukosa

yang dihasilkan akan diubah menjadi pati untuk disimpan dan digunakan saat tanaman membutuhkan energi.

Proses hidrolisis pati terjadi ketika tubuh mengonsumsi makanan yang mengandung pati. Enzim amilase dalam air liur dan pankreas memecah molekul pati menjadi maltosa dan glukosa, yang kemudian dapat diserap oleh tubuh (Nielsen et al., 2024). Hidrolisis pati yang tidak sempurna juga dapat menghasilkan dekstrin, suatu oligosakarida yang lebih pendek daripada pati asli. Struktur dekstrin ditunjukkan pada Gambar 1.5.



Gambar 1.5. Struktur dekstrin (Meriatna, 2013)

Pati memiliki berbagai aplikasi dalam industri, termasuk sebagai bahan pengental dalam makanan, bahan baku dalam produksi etanol, dan dalam industri farmasi sebagai eksipien tablet. Dalam industri makanan, pati sering dimodifikasi untuk meningkatkan sifat fungsionalnya, seperti peningkatan stabilitas dan kemampuan mengentalkan. Modifikasi ini dapat dilakukan melalui berbagai proses kimia, fisik, atau enzimatis (He et al., 2023). Selain itu, pati juga digunakan dalam industri tekstil dan kertas. Dalam industri tekstil, pati berfungsi sebagai bahan untuk melapisi benang agar lebih kuat dan mudah ditenun. Sementara itu, dalam industri kertas, pati digunakan sebagai bahan pelapis untuk meningkatkan kekuatan dan ketahanan kertas terhadap air.

Secara keseluruhan, pati merupakan molekul yang sangat penting baik dalam konteks biologis maupun industri. Sebagai sumber energi utama dalam tanaman dan sebagai bahan baku yang serbaguna dalam berbagai aplikasi industri, pati memainkan peran yang signifikan dalam kehidupan sehari-hari dan berbagai sektor ekonomi.

1.8.4 Tinjauan tentang tanaman alpukat



Persea americana) adalah pohon buah yang berasal dari Amerika. Pohon ini dapat tumbuh hingga mencapai ketinggian 20 meter. hijau, dan mengkilap dengan bentuk oval atau lonjong. Bunga jingga kekuningan dan mekar dalam kelompok. Buah alpukat bulat dengan kulit tebal yang berwarna hijau hingga cokelat

kehitaman saat matang. Daging buahnya lembut dan berwarna hijau muda dengan biji besar di tengahnya.

Tanaman alpukat tumbuh subur di daerah tropis seperti Indonesia dan memiliki berbagai jenis alpukat yang berbeda-beda di setiap wilayah. Buah alpukat merupakan salah satu buah yang sangat digemari oleh masyarakat dikarenakan rasa buah yang enak serta kaya akan vitamin. Kandungan gizi yang dimiliki oleh buah alpukat cukup tinggi sehingga baik untuk kesehatan. Kandungan minyak atau lemak pada buah alpukat sebesar 5-25% tergantung dengan varietasnya (Pohan et al., 2025).

Taksonomi dari tanaman alpukat sebagai berikut:

Kingdom (kerajaan)	: Plantae
Subkingdom (subkerajaan)	: Tracheobionta
Superdivision (superdivisi)	: Spermatophyta
Division (divisi)	: Magnoliophyta
Class (kelas)	: Magnoliopsida
Subclass (subkelas)	: Magnoliidae
Order (ordo)	: Laurales
Family (famili)	: Lauraceae
Genus (genus)	: <i>Persea</i>
Species (spesies)	: <i>Persea americana</i>

Sumber: Napitupulu et al., 2008

Buah alpukat (*Persea americana* Mill.) umumnya memiliki bentuk bulat hingga oval dengan ukuran dan berat yang bervariasi antar varietas. Berdasarkan hasil penelitian terhadap empat varietas alpukat, diketahui bahwa berat buah berkisar antara 123,0 g hingga 253,9 g, dengan panjang buah sekitar 77,9–107,9 mm dan lebar 56,4–68,0 mm. Sementara itu, berat biji alpukat berkisar antara 20,7 g hingga 39,5 g dengan lebar biji 26,5–31,9 mm dan panjang biji 31,9–51,3 mm (Çelik et al., 2023). Kulit buahnya berwarna hijau dengan bintik halus, sedangkan daging buah yang telah matang memiliki tekstur lunak dan berwarna hijau kekuningan. Biji alpukat berukuran cukup besar, menempati bagian tengah buah, dan memiliki warna putih kecokelatan.

Daging buah mewakili 65-75% dari total berat buah. Isinya sangat bervariasi untuk kultivar yang berbeda. Biji alpukat (*Persea americana* Mill.) diketahui mengandung beragam senyawa nutrisi yang bernilai gizi tinggi dan berpotensi sebagai sumber bioaktif alami. Kandungan nutrisi pada daging buah dan biji alpukat disajikan pada Tabel 1.3. Biji alpukat juga mengandung berbagai senyawa bioaktif seperti fenolik, flavonoid, fitosterol, dan terpenoid yang berperan sebagai antioksidan dan

angar et al., 2022). Keberagaman komponen ini menunjukkan bahwa alpukat bukan hanya produk samping, tetapi juga memiliki nilai nutrisi dan dapat dikembangkan untuk aplikasi pangan dan kesehatan. Selain itu, metabolit sekundernya, biji alpukat juga memiliki kadar pati yang tinggi. Salah satu komponen utama penyusunnya. Kehadiran pati



bersama metabolit sekunder tersebut dapat memengaruhi sifat fisikokimia dan karakteristik fungsional biji alpukat.

Tabel 1.3. Kandungan nutrisi daging dan biji alpukat

Komponen	Daging Buah Alpukat (per 100 g bagian yang dapat dimakan)	Biji Alpukat
Kadar air (%)	65–86 g	13,09 %
Protein (%)	1–4 g	2,64–23 %
Lemak (%)	5,8–23 g (terutama lemak tak jenuh tunggal)	–
Karbohidrat (%)	3,4–5,7 g	64.9 %
Serat kasar (%)	–	2.87 %
Abu (%)	–	3.82 %
Energi (kJ/100 g)	600–800 kJ	–
Besi (mg/100 g)	0,8–1,0 g	0,31 mg/100 g
Kalsium (mg/100 g)	–	0,82 mg/100 g
Fosfor (mg/100 g)	–	0,09 mg/100 g
Kalium (mg/100 g)	–	4,16 mg/100 g
Natrium (mg/100 g)	–	1,41 mg/100 g
Tembaga (mg/100 g)	–	0,98 mg/100 g
Seng (mg/100 g)	–	0,18 mg/100 g
Vitamin A	75–135 IU	9,10 mg/100 g
Vitamin B kompleks	1,5–3,2 mg	–
Tiamin (B1)	–	0,33 mg/100 g
Riboflavin (B2)	–	0,29 mg/100 g
Niasin (B3)	–	0,06 mg/100 g
Asam askorbat (C)	–	97,8 mg/100 g
Vitamin E	–	0,12 mg/100 g
Asam lemak	didominasi lemak tak jenuh tunggal	
Asam palmitat	–	7,10 µg/g
Asam oleat	–	5,32 µg/g
Asam linoleat	–	4,06 µg/g
Asam stearat	–	5,06 µg/g
Asam miristat	–	2,49 µg/g
Turunan asam lemak	–	32,28 µg/g
Asam lemak tak jenuh ganda	–	24,26 µg/g
Asam lemak jenuh	–	4,26 µg/g
Asam lemak tak jenuh	–	10,12 µg/g

2; Bangar et al., 2022



1.9 Hipotesis Penelitian

Hipotesa dari penelitian adalah

1. bakteri termofilik penghasil enzim amilase dapat diisolasi dari sumber air panas Wae Pella, Sinjai dan teridentifikasi hingga tingkat spesies melalui uji biokimia dan molekuler.
2. enzim amilase dari bakteri termofilik memiliki karakteristik spesifik dan nilai aktivitas.
3. pemurnian enzim amilase dari isolat bakteri terpilih dengan teknik fraksinasi dan dialisis meningkatkan aktivitas spesifik enzim dibandingkan enzim ekstrak kasar
4. enzim amilase dari bakteri efektif dalam mendegradasi pati dari limbah biji alpukat menjadi dekstrin dengan karakteristik sesuai standar industri.



BAB II

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI AMILOLITIK DARI SUMBER AIR PANAS WAE PELLAE

2.1 Abstrak

Latar belakang, sumber air panas merupakan salah satu ekosistem sumber mikroorganisme termofilik dengan kemampuan menghasilkan enzim stabil pada suhu tinggi. Enzim-enzim ini menarik perhatian karena dapat diaplikasikan pada berbagai proses industri yang membutuhkan kondisi ekstrem, salah satunya adalah amilase. Amilase berperan penting dalam hidrolisis pati menjadi gula sederhana yang bernilai tinggi dalam berbagai industri. **Tujuan** penelitian ini adalah mengisolasi dan mengarakterisasi bakteri amilolitik dari sumber air panas Wae Pellae, Sinjai, Sulawesi Selatan, untuk mengetahui potensi enzim yang dihasilkan. **Metode**, penelitian diawali dengan mengisolasi bakteri dari sumber air panas Wae Pellae, menggunakan substrat pati standar pada suhu inkubasi 40 °C, kemudian dilakukan skrining aktivitas amilolitik. Karakterisasi morfologi dan biokimia, serta identifikasi secara molekuler menggunakan analisis gen 16S rRNA. **Hasil** penelitian menunjukkan empat isolat bakteri termofilik yang memiliki aktivitas amilolitik yaitu isolat ATF2IC, ATF2II, ATF2IV4, dan ATF2IV8. Dua isolat dengan zona bening terluas ditunjukkan oleh isolat ATF2IC dan ATF2IV8. Kedua isolat tersebut dilakukan identifikasi molekuler dengan analisis gen 16S rRNA. Hasil sekuensing menunjukkan bahwa isolat ATF2IC memiliki kekerabatan dekat dengan *Bacillus albus*, sedangkan isolat ATF2IV8 teridentifikasi sebagai *Calidifontibacillus erzurumensis*. **Kesimpulan**, penelitian ini membuktikan bahwa sumber air panas Wae Pellae mengandung bakteri termofilik yang berpotensi sebagai penghasil enzim amilase, khususnya dari genus *Bacillus* dan *Calidifontibacillus*. Temuan ini membuka peluang baru dalam eksplorasi enzim termostabil yang bermanfaat bagi aplikasi industri.

Kata kunci: *Bacillus albus*; bakteri termofilik; *Calidifontibacillus erzurumensis*; enzim amilase; sumber air panas Wae Pellae

2.2 Pendahuluan

Enzim amilase merupakan salah satu enzim penting yang berperan besar baik dalam sistem pencernaan maupun dalam berbagai aplikasi industri. Di dalam tubuh manusia, khususnya di rongga mulut, amilase terdapat dalam air liur sebagai α -amilase (otvalin). yang memecah pati menjadi molekul yang lebih kecil seperti dan maltosa (Ahsan, 2021). Selain peran fisiologisnya, enzim tikan dalam berbagai sektor industri seperti makanan, tekstil, an deterjen, karena kemampuannya menghidrolisis pati menjadi (et al., 2021). Semua jenis amilase termasuk dalam kelompok lase yang secara spesifik memutus ikatan α -1,4-glikosidik pada & Baek, 2023).



Amilase dapat diperoleh dari berbagai sumber, seperti tumbuhan, hewan, dan mikroorganisme. Penelitian oleh Pratantie et al., (2021) melaporkan produksi amilase yang berasal langsung dari tanaman, yaitu kecambah kacang tunggak. Namun, sebagian besar penelitian berfokus pada bakteri penghasil amilase yang diisolasi dari berbagai lingkungan alami. Bakteri-bakteri tersebut telah ditemukan pada tanah pertanian (Shoaib et al., 2023), larva kumbang sagu (Baharuddin et al., 2022), serta berbagai jenis tanah lainnya (Yassin et al., 2021; Abd-Elsalam & Nagia, 2024). Lingkungan tersebut terbukti menjadi habitat potensial bagi bakteri yang mampu menghasilkan enzim amilase dengan aktivitas tinggi.

Amilase yang dihasilkan oleh bakteri memiliki sejumlah keunggulan dibandingkan sumber lain, antara lain laju pertumbuhan yang cepat, kemudahan produksi skala besar, serta stabilitas enzim yang tinggi, khususnya pada suhu tinggi (Far et al., 2020). Produksi amilase menyumbang 30% pasar enzim dunia dan terus mengalami peningkatan (Shad et al., 2023). Selain itu, berbagai mikroorganisme telah diidentifikasi dan dipilih sebagai sumber potensial amilase karena ketersediaannya, waktu fermentasi yang singkat, kemudahan dalam proses peremajaan, kemampuan mensekresikan protein secara ekstraseluler, hasil yang tinggi, serta tingkat keamanan dalam penanganan (Sawant et al., 2025). Seiring meningkatnya kebutuhan industri terhadap enzim dengan aktivitas tinggi dan stabilitas yang baik, perhatian penelitian banyak diarahkan pada mikroorganisme sebagai penghasil utama amilase.

Di antara sumber mikroba, amilase yang diekstrak dari bakteri dan jamur telah mendominasi berbagai aplikasi dalam bioteknologi (Gillet et al., 2024; Mehta et al., 2022), termasuk *Bacillus* sp., (Yildiz, 2024; Budiharjo et al., 2024), *Thermomonas hydrothermalis*, *Geobacillus* sp., (Widiana et al., 2022; Yildiz, 2024), *Escherichia coli* (Hassan, 2018), *Bacillus megaterium* (Shofiyah et al., 2020), *Bacillus amyloliquefaciens* (Budiharjo et al., 2024), *Bacillus licheniformis* (Budiharjo et al., 2024), *Aspergillus niger* (Tizhe & Jáafar, 2021), *Aspergillus oryzae* (Li et al., 2023), *Penicillium amapaense* sp. nov. (da Silva et al., 2023), dan *Penicillium labradorum* (da Silva et al., 2023). Termotabilitas merupakan salah satu karakteristik amilase yang diinginkan untuk mendukung berbagai aplikasi industri (Jaiswal & Jaiswal, 2024). Oleh karena itu, organisme termofilik menjadi perhatian utama sebagai sumber enzim termotabil baru. Bakteri termofilik, khususnya genus *Bacillus* telah banyak dilaporkan sebagai sumber amilase termotabil yang layak secara ekonomi (Kikani & Singh, 2022).

Lingkungan ekstrem, seperti sumber air panas, merupakan habitat yang kaya akan mikroorganisme termofilik yang berpotensi menghasilkan enzim termotabil (Seth, 2024). Sejumlah penelitian sebelumnya telah berhasil mengisolasi bakteri



ri sumber air panas di berbagai negara, seperti India (Shukla & sia (Ardhi et al., 2020; Rosda et al., 2021), Malaysia (Fazal et al., 2023), serta di beberapa lokasi lainnya (Sharif et al., I., 2022). Temuan-temuan tersebut menunjukkan bahwa ofilik dari lingkungan alami dapat menjadi kandidat penghasil ng menjanjikan untuk bioteknologi industri. Namun demikian, keragaman dan potensi bakteri termofilik penghasil amilase dari

sumber air panas Wae Pellae, Sinjai, Indonesia, masih sangat terbatas. Berdasarkan hal ini, penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri termofilik dari sumber air panas Wae Pellae sebagai langkah awal dalam mengeksplorasi potensi bakteri lokal sebagai sumber enzim amilase termostabil yang berpotensi untuk aplikasi industri berbasis enzim.

2.3 Metode Penelitian

2.3.1 Waktu dan lokasi penelitian

Penelitian ini mulai dilaksanakan pada bulan Februari 2025 hingga bulan Juni 2025. Lokasi penelitian berlangsung di beberapa laboratorium di antaranya Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Sains (LPPS) Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin, Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar, Laboratorium Riset Biologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar, dan *Apical Scientific SDN, BHD. Laboratory and Warehouse*, Selangor Malaysia. Sampel berupa sumber air panas diperoleh dari sumber air panas Wae Pellae Dusun Pao Desa Kampala Kabupaten Sinjai Sulawesi Selatan. Lokasi spesifik berada pada titik koordinat $5^{\circ}08'35.3''S 120^{\circ}12'07.9''E$. Peta lokasi dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1. Peta lokasi pengambilan sampel penelitian



akan pada penelitian ini terdiri dari wadah sampel tahan panas, peralatan non gelas, jarum inokulasi steril, bunsen burner, tabung, pH meter, *coller box*, neraca analitik Kern, neraca analitik Ohaus, mikropipet Watson, *vortex mixer* Velp Arc, *laminar air* listrik Maspion, inkubator Heraeus, autoklaf Gea, mikrowave Sharp, kulkas Sharp, mikroskop Yazumi, *shaker waterbath*

Thermoscientific, GeneAmp PCR System Applied Biosystem model 9700, Gel Doc XR Documentation System Bio-Rad, ABI PRISM 3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA), perangkat lunak BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), database NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), perangkat lunak bioedit dan MEGA11.

2.3.3 Bahan penelitian

Penelitian ini menggunakan bahan yang terdiri dari sampel air panas dari sumber air panas Wae Pellae Sinjai (koordinat 5°08'35.3"S 120°12'07.9"E), akuades steril, alkohol 70%, tip mikropipet, amilum Pudak, amilum Merck, nutrisi agar Merck, natrium klorida fisiologis 0,9 % PT Widatra Bhakti, natrium klorida Merck, kalsium klorida Merck, kalium dihidrogen posfat Merck, magnesium sulfat Merck, akuades Waterone Onemed, akuabides Ikapharmido, iodum Merck, kalium iodida Merck, minyak imersi untuk pembesaran 100x, kristal violet, lugol, safranin, etanol 95%, media *triple sugar iron agar*, media *sulfide indole mortality*, reagen kovac indol, media *methyl red-voges proskauer*, media *voges proskauer*, kalium hidroksida (Merck), alfa-naftol, indikator *methyl red*, media *simmon citrate*, hidrogen peroksida, *nutrien broth* (Merck), media urea agar, glukosa, laktosa, sukrosa, mannitol, *fenol red*, Geneaid Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit (buffer Ga, buffer GB, buffer GD, buffer PW, buffer TE), enzim lisozim, proteinase K, ddH₂O, 1xMytaq HS Red Mix, Primer Forward 63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3'), Primer Reverse 1387R (5'-GGGGGTGTGTACAAGGC-3'), agarosa, TAE Buffer (Tris-Acetate-EDTA), etidium bromida, dan DNA ladder/marker.

2.4 Prosedur Kerja

2.4.1 Pengambilan sampel air panas

Pengambilan sampel air panas dari sumber air panas Wae Pellae Dusun Pao Desa Kampala Kabupaten Sinjai Sulawesi Selatan pada titik koordinat 5°08'35.3"S120°12'07.9"E. Sampel air panas dimasukkan dalam wadah steril dan tahan panas untuk menjaga kestabilan suhu. Pengukuran suhu dan pH dilakukan di lokasi pengambilan sampel (Silaban et al., 2021).

2.4.2 Isolasi bakteri termofilik

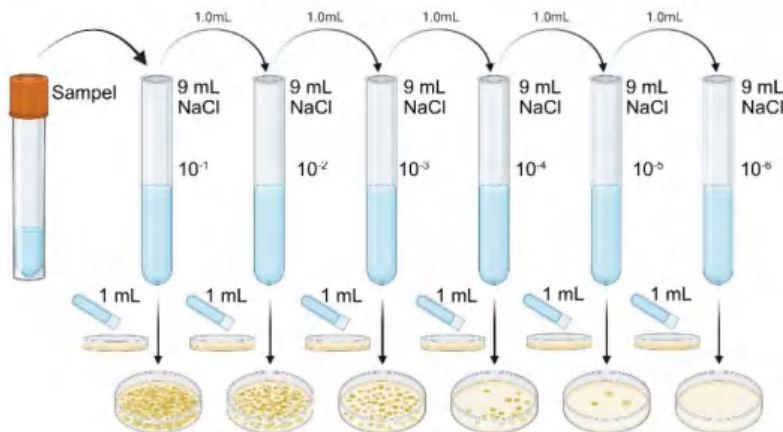
Sampel air panas sebanyak 1,0 mL diencerkan dengan natrium klorida 0,9 % hingga 10 mL, campuran dikocok dengan vortex mixer sehingga diperoleh pengenceran 10⁻¹. Larutan yang diperoleh diambil lagi sebanyak 1 mL dari seri pengenceran 10⁻¹ dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL larutan fisiologis, kocok hingga



diperoleh pengenceran 10⁻², demikian seterusnya sampai masing-masing 1000 µL dari setiap pengenceran yang dibuat media agar pati steril dengan metode agar tuang. Inkubasi di 40 °C selama 1 x 24 jam (Wahyudi et al., 2014). Ilustrasi isolasi bakteri ditunjukkan pada Gambar 2.2.

Media agar selektif amilolitik. Media agar dibuat dengan mencampurkan nutrisi agar 2,75 g; amilum 1,00 g;

KH_2PO_4 0,01 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g; NaCl 0,05 g; dan CaCl_2 0,015 g dilarutkan dengan akuades hingga volume akhir 100 mL dengan pH 7. Media dibebaskan dari kontaminan dengan sterilisasi fisik dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit, suhu 121°C , dan tekanan 2 atm (Wulandari & Purwaningsih, 2019; Baharuddin et al., 2022). Media yang telah disterilkan dituangkan ke dalam cawan petri steril, kemudian diinokulasikan 1 ose bakteri. Setelah itu, cawan petri diinkubasi pada suhu 40°C selama 1 x 24 jam.



Gambar 2.2. Serial dilusi bakteri (Created in <https://BioRender.com>)

2.4.3 Karakterisasi bakteri

Tahapan karakterisasi bakteri terdiri dari uji amilolitik, uji karakterisasi morfologi, pengecatan Gram, uji biokimia, dan identifikasi biomolekuler.

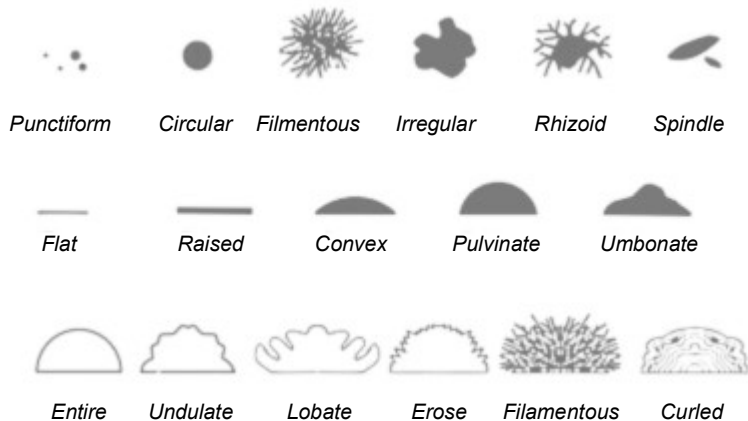
Uji amilolitik. Isolat murni bakteri amilolitik diambil sebanyak 1 ose lalu diinokulasikan pada media agar steril yang mengandung pati 1%. Media diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 40°C . Isolat bakteri yang tumbuh ditetesi larutan iodium bila terdapat zona bening di sekeliling koloni diasumsikan sebagai isolat bakteri amilolitik penghasil enzim amilase karena dapat menghidrolisis pati di sekeliling koloni (Silitonga et al., 2019).

Uji karakterisasi morfologi. Karakterisasi yang dilakukan terdiri dari karakterisasi morfologi berupa bentuk sel, warna koloni, tepian, elevasi koloni



Warna koloni (pigmentasi) berupa putih, kuning, merah, ungu, bentuk koloni meliputi *punctiform* (titik-titik kecil), *circular* (bulat), *filamentous* (serabut menyerupai benang), *irregular* (tidak beraturan), dan pertumbuhannya menyebar), dan *spindle*. Elevasi koloni (bentuk koloni) dapat terukur, nyaris rata pada seluruh permukaan), *raised* (lihat, namun rata pada seluruh permukaan), *convex* (bentuk koloni rata), *pulvinate* (berbentuk sangat cembung), dan *umbonate*

(bentuk cembung di bagian tengah lebih menonjol). Tepi koloni (margin) terdiri atas *entire* (tepi rata), *undulate* (tepi bergelombang), *lobate* (tepi berlekuk), *erose* (tepi bergerigi), *filamentous* (tepi dengan bentuk filamen), dan *curled* (tepi melingkar) (Harley & Prescott, 2002). Karakteristik koloni bakteri ditunjukkan pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3. Karakteristik koloni bakteri pada media agar (Harley & Prescott, 2002)

Pengecatan Gram. Isolat bakteri diambil sebanyak 1 ose kemudian diletakkan pada kaca preparat dan dibiarkan beberapa menit hingga kering sehingga apusan siap. Apusan difiksasi dengan melewatkannya di atas api sebanyak tiga kali. Kristal violet ditetaskan pada apusan dan diamkan selama 60 detik lalu dibilas dengan akuades. Selanjutnya, apusan ditetaskan lugol dan didiamkan selama 60 detik, lalu dibilas dengan akuades. Larutan dekolonisasi (etanol) ditetaskan pada apusan dan didiamkan selama 30 detik, lalu dibilas dengan akuades. Larutan safranin ditetaskan pada apusan dan diamkan selama 60 detik, selanjutnya dibilas dengan akuades. Kemudian, apusan didiamkan hingga kering dan diamati pada mikroskop dengan perbesaran 40 x dan 100 x (Wulandari & Purwaningsih, 2019).

Uji biokimia. Isolat bakteri hasil isolasi dari sumber air panas Wae Pellae diuji secara biokimia untuk mengetahui karakteristik fisiologinya. Sejumlah uji diferensial dilakukan, meliputi *triple sugar iron agar* (TSIA), *sulfide indole motility* (SIM), *methyl red-voges proskauer* (MRVP), uji sitrat, urease, fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa, sukrosa, dan manitol), serta uji katalase.

Uji triple sugar iron agar (TSIA). Media TSIA digunakan untuk menilai kemampuan



mentasi glukosa, laktosa, dan sukrosa, serta mendeteksi lrogen sulfida. Isolat bakteri diambil dari stok kultur sebanyak diinokulasikan dengan metode tusuk pada bagian tengah media gian dasar media TSIA dalam tabung reaksi. Tabung diinkubasi selama 1 x 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya da dasar dan permukaan tabung dari warna merah menjadi

kuning, adanya pembentukan gas, serta endapan hitam (produksi H_2S). Pembentukan gas terjadi di dasar media yang ditandai dengan adanya ruang kosong (Sahrani, 2023).

Uji sulfide-indole-motility (SIM). Isolat bakteri diambil dari stok kultur murni sebanyak satu ose kemudian diinokulasikan secara tusukan lurus ke dalam tabung yang berisi media SIM semi-solid. Tabung berisi inokulum diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37 °C. Setelah inkubasi, hasil uji diamati dengan tahapan sebagai berikut:

- 1) Uji H_2S (sulfida): terbentuknya endapan hitam pada medium menunjukkan hasil positif, sedangkan media tetap bening atau pucat menandakan hasil negatif.
- 2) Uji motilitas: pertumbuhan menyebar keluar dari garis inokulasi menandakan isolat bersifat motil, sedangkan pertumbuhan terbatas pada garis inokulasi menunjukkan isolat non-motil.
- 3) Uji indol: sebanyak 3-5 tetes reagen Kovac ditambahkan ke dalam tabung. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya cincin merah pada lapisan atas media, sedangkan hasil negatif ditandai dengan warna kuning atau tidak terjadi perubahan warna (Ortega-Villar et al., 2024).

Uji methyl red-Voges-Proskauer (MR-VP). Isolat bakteri sebanyak 1 ose diinokulasikan ke dalam MR-VP broth sebanyak 5 mL dan diinkubasi 24-48 jam pada 37 °C. Setelah inkubasi, kultur dibagi menjadi 2 pengujian:

- 1) Uji MR (*methyl red*)
Sebanyak 1 mL kultur dipindahkan ke tabung reaksi baru, kemudian ditambahkan 3–5 tetes larutan indikator *methyl red*. Perubahan warna merah menunjukkan hasil positif, sedangkan warna tetap kuning-oranye menunjukkan hasil negatif.
- 2) Uji VP (Voges-Proskauer)
Sebanyak 1 mL kultur lainnya dipindahkan ke tabung reaksi baru, lalu ditambahkan 0,6 mL larutan α -naftol dan 0,2 mL larutan KOH 40%, kemudian tabung dikocok perlahan. Terbentuknya warna merah muda hingga merah dalam 15–30 menit menunjukkan hasil positif, sedangkan tidak ada perubahan warna berarti negatif (McDevitt, 2009).

Uji sitrat. Isolat bakteri sebanyak 1 ose diinokulasikan pada permukaan media (SCA) pada tabung reaksi. Tabung reaksi diinkubasi selama 24-48 jam pada 37 °C. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna jadi warna biru dan hasil negatif ditandai dengan terbentuknya gelembung gas terjadi perubahan warna pada media. Perubahan warna biru menunjukkan kemampuan menggunakan sitrat sebagai sumber karbon (Sahrani, 2024).



Uji urease. Isolat bakteri diambil dari kultur stok menggunakan 1 ose steril, kemudian diinokulasikan pada media urea agar dengan cara menggores pada permukaan miring media. Tabung yang berisi inokulum diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24-48 jam. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna media dari kuning-oranye menjadi merah muda/ungu akibat peningkatan pH yang disebabkan oleh produksi amonia dari pemecahan urea oleh enzim urease. Sementara itu, hasil negatif ditunjukkan dengan tidak adanya perubahan warna pada media (Kantari & Ariyanti, 2024).

Uji katalase. Isolat bakteri diambil dari stok kultur sebanyak 1 ose menggunakan ose lurus steril. Kemudian isolat bakteri dicelupkan ke dalam tabung reaksi kecil yang berisi larutan H₂O₂ 3%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya gelembung gas akibat pelepasan oksigen, sedangkan hasil negatif ditandai dengan tidak adanya gelembung (Ullah et al., 2021 dimodifikasi).

Uji fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa, sukrosa, mannitol). Isolat bakteri diambil dari kultur stok masing-masing sebanyak 1 ose, kemudian diinokulasikan pada media fermentasi karbohidrat yang mengandung 1% substrat gula (glukosa, laktosa, sukrosa, atau mannitol), indikator pH fenol red, serta tabung Durham dalam posisi terbalik untuk mendeteksi gas. Media yang telah diinokulasi diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24-48 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna media dari merah menjadi kuning yang menandakan adanya produksi asam, sedangkan hasil negatif ditandai dengan tidak adanya perubahan warna. Kehadiran gelembung di dalam tabung Durham menunjukkan produksi gas (Reiner, 2012).

Identifikasi molekular. Identifikasi secara molekuler menggunakan metode PCR 16S rRNA, sampel bakteri amilolitik diremajakan pada media NB terlebih dahulu. Kemudian proses isolasi DNA bakteri amilolitik, selanjutnya diuji dengan elektroforesis horizontal untuk melihat keberadaan dari DNA total bakteri. Setelah pita DNA diperoleh, dilakukan proses PCR. Pada proses ini diperoleh hasil amplifikasi dari gen 16S rRNA yang dilanjutkan pada proses sekuensing. Hasil sekuensing diolah dan dibandingkan dengan data Genbank menggunakan program *nucleotide Blast*

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome (Wulandari & Purwaningsih, 2019). Analisis filogenetik dari rangkaian 16S rRNA yang diperoleh dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak MEGA 11 (Ortega-Villar et al., 2024). Tahapan identifikasi molekuler dengan metode PCR terdiri dari ekstraksi DNA, amplifikasi DNA bakteri, PCR, sekuensing dan analisis hasil sekuensing.



Tahap awal ekstraksi DNA dilakukan mengikuti panduan yang terdapat pada kit Presto™ Mini gDNA Bacteria. Sampel bakteri terlebih dahulu diambil dengan memindahkan koloni Gram positif sebanyak 1×10⁹ sel ke tabung sentrifus bervolume 1,5 ml. Pemisahan sel dari medium

dilakukan melalui sentrifugasi selama satu menit pada laju 13.900 rpm, diikuti pembuangan cairan supernatan. Pelet yang diperoleh didispersikan dengan 200 μ L buffer lisis sel GA (buffer untuk bakteri gram positif) dan ditambahkan 200 μ L enzim lisozim, dihomogenkan dengan vortex. Inkubasi dilakukan pada temperatur 37 °C dengan durasi 30 menit, diselingi pembalikan tabung setiap interval 10 menit. Selanjutnya, proteinase K ditambahkan dalam volume 20 μ L dan dicampur rata dengan vortex. Penambahan buffer GB dilakukan sebanyak 200 μ L ke dalam sampel dan dihomogenkan. Pemanasan sampel pada suhu 70 °C selama 10 menit diperlukan untuk mencapai homogenitas sempurna, dengan pembalikan tabung dilakukan tiap 3 menit. Pada tahap akhir lisis, etanol dengan konsentrasi 96-100 % ditambahkan sebanyak 200 μ L dan divortex selama 15 detik untuk memperoleh campuran yang merata (Geneaid, 2017).

Purifikasi DNA. Campuran hasil lisis dipindahkan ke spin column CB3 dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 30 detik. Filtrat yang terkumpul dibuang, kemudian spin column dikembalikan ke tabung pengumpul. Proses pencucian pertama menggunakan 500 μ L buffer GD yang dimasukkan ke spin column CB3, diikuti sentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik. Filtrat dibuang dan spin column CB3 dikembalikan ke tabung. Pencucian kedua dilakukan dengan menambahkan buffer PW sebanyak 600 μ L ke dalam spin column CB3, lalu disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 30 detik. Setelah membuang filtrat, spin column CB3 dikembalikan ke tabung pengumpul. Untuk mengeringkan membran secara menyeluruh, sentrifugasi tambahan dilakukan pada 12.000 rpm selama 2 menit. Spin column CB3 kemudian dipindahkan ke microtube steril 1,5 mL. Buffer TE sebanyak 50-200 μ L dipipet ke dalam spin column, diinkubasi pada suhu ruang (15-25 °C) selama 2-5 menit, kemudian disentrifugasi 2 menit pada 12.000 rpm. DNA ekstrak terkumpul dalam microtube sebagai supernatan (Geneaid, 2017).

Amplifikasi DNA menggunakan PCR. Amplifikasi dilakukan terhadap sampel DNA hasil ekstraksi. Pembuatan campuran reaksi PCR meliputi penambahan komponen-komponen berikut: 8 μ L 1xMytaq HS Red Mix, 1 μ L primer Forward 63F dengan sekuens 5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3', 1 μ L primer Reverse 1387R dengan sekuens 5'-GGGGGGTGTGTACAAGGC-3', dan 2 μ L ddH₂O. Setelah 12 μ L campuran reaksi dimasukkan ke tabung reaksi, 3 μ L ekstrak DNA ditambahkan ke dalamnya. Homogenisasi campuran dilakukan dengan vortex, kemudian tabung dipindahkan ke mesin PCR untuk menjalani 35 siklus amplifikasi dengan program *thermal cycling* sebagai berikut: tahap pre-denaturasi pada temperatur 95 °C selama 5 menit, tahap denaturasi pada 95 °C selama 1 menit, tahap annealing pada 55 °C dengan durasi 1 menit, tahap ekstensi pada 72 °C selama 1 menit, dan *post-extending* pada 72 °C selama 10 menit (Rakaz et al., 2021 dimodifikasi).

Analisa PCR. Gel agarosa dengan konsentrasi 1,5 % disiapkan dengan 1,5 gram serbuk agarosa dengan 100 mL larutan TAE Buffer. Campuran kemudian dipanaskan menggunakan microwave hingga mendidih. Setelah itu, etidium bromida ditambahkan



sebanyak 8 μ L ke dalam larutan gel. Larutan gel didinginkan pada suhu ruangan, kemudian dituang ke dalam cetakan elektroforesis yang telah dilengkapi sisir gel (*comb*) dengan 17 sumur.

Produk hasil amplifikasi PCR sebanyak 5 μ L dimasukkan ke masing-masing sumur pada gel agarosa 1,5 % yang sudah terendam dalam tangki berisi larutan TAE Buffer. Elektroforesis kemudian dioperasikan dengan tegangan tetap 100 volt selama durasi 50 menit. Setelah proses elektroforesis selesai, gel diangkat dan dilakukan visualisasi di bawah paparan sinar UV. Interpretasi hasil dinyatakan positif apabila terbentuk pita DNA yang sejalan atau memiliki ukuran yang mendekati marker DNA pada posisi 1500 bp, sedangkan hasil negatif ditunjukkan dengan tidak terbentuknya pita pada gel (Rakaz et al., 2021 dimodifikasi).

Sekuensing gen 16S rRNA. Sampel produk PCR yang menunjukkan hasil positif berdasarkan visualisasi elektroforesis selanjutnya dikirim untuk dilakukan sekuensing DNA. Proses sekuensing dilakukan oleh penyedia jasa laboratorium menggunakan metode Sanger sequencing untuk menentukan urutan nukleotida secara akurat dengan instrumen ABI PRISM 3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Metode Sanger sequencing merupakan teknik penentuan urutan DNA yang berdasarkan pada prinsip terminasi rantai menggunakan dideoksinukleotida (ddNTPs) berlabel fluoresen. Proses ini meliputi tahapan purifikasi produk PCR, reaksi cycle sequencing dengan BigDye Terminator, purifikasi kembali produk sequencing, dan pembacaan urutan nukleotida menggunakan sekuenser otomatis melalui elektroforesis kapiler yang mendeteksi sinyal fluoresen dari setiap basa nukleotida.

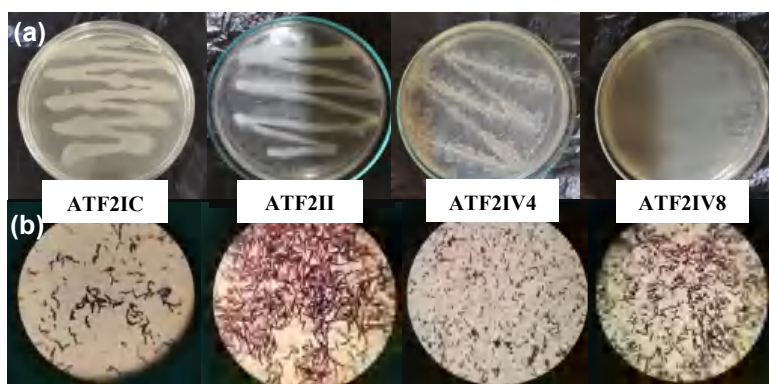
Analisis urutan 16S rRNA untuk identifikasi bakteri. Analisis terhadap hasil sekuensing dilakukan menggunakan perangkat BLAST/*Basic Alignment Search Tools* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) untuk membandingkan urutan nukleotida hasil sekuensing dengan database yang tersimpan di platform NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Platform ini dimanfaatkan untuk menemukan homologi sekuens nukleotida dengan data yang tersimpan dalam database. Pohon filogenetik dibangun berdasarkan urutan 16S rRNA menggunakan perangkat lunak MEGA11 (Rakaz et al., 2021).

2.5 Hasil dan Pembahasan

2.5.1 Karakteristik morfologi dan biokimia isolat bakteri

Sebanyak empat isolat bakteri berhasil diisolasi dari sampel sumber air panas Wae Ude ATF2IC, ATF2II, ATF2IV4, dan ATF2IV8 (Gambar 2.4).





Gambar 2.4. Isolat dari sumber air panas Wae Pella; a) Hasil goresan isolat bakteri; b) hasil pewarnaan Gram pada isolat

Walaupun terdapat variasi bentuk koloni (tidak beraturan, rizoid), elevasi (meninggi, cembung, umbonasi), pinggir (bergelombang, erose, utuh), dan warna koloni, ciri-ciri tersebut masih dalam kisaran morfologi koloni yang umum ditemukan pada anggota genus *Bacillus*, terutama *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, dan kerabatnya, yang sering menunjukkan koloni tidak beraturan dan permukaan koloni bervariasi. Variasi warna koloni (kuning muda, putih susu, bening) juga umum terjadi pada berbagai spesies *Bacillus*, bergantung pada kondisi media dan suhu inkubasi. Keempat isolat bakteri menunjukkan kesamaan ciri morfologi, baik dari segi bentuk sel maupun hasil pewarnaan Gram (Tabel 2.1). Seluruh isolat yang diperoleh dari sumber air panas tersebut tergolong bakteri Gram positif berbentuk batang. Warna ungu pada sel bakteri merupakan ciri khas pewarnaan Gram positif karena tebalnya lapisan peptidoglikan pada dinding sel yang mempertahankan pewarna kristal violet setelah proses pencucian dengan alkohol. Morfologi batang menunjukkan bakteri mempunyai bentuk silinder memanjang, hal ini banyak ditemukan pada genus *Bacillus* dan beberapa genera termofilik lainnya.

Tabel 2.1. Karakteristik morfologi bakteri dari sumber air panas Wae Pella.

Isolates	Colony shape	Elevation	Margin	Color	Cell shape	Gram
ATF2IC	Irregular	Raised	Undulate	Light yellow	Basil	+
ATF2II	Rhizoid	Undulate	Erose	Milky white	Basil	+
ATF2IV4	Irregular	Convex	Entire	Clear	Basil	+
ATF2IV8	Irregular	Umbonate	Undulate	Milky white	Basil	+



roleh pada penelitian (Aanniz et al., 2015) yang melaporkan dari sumber air panas Maroko sebagian besar merupakan batang Gram positif yang termasuk dalam genus *Bacillus*. Seperti sumber air panas banyak dihuni oleh bakteri termofilik

Gram positif karena kemampuannya membentuk endospora yang tahan terhadap suhu tinggi dan kondisi ekstrem lainnya (Mong et al., 2022). Mohammad et al. (2017) melaporkan bahwa sebagian besar isolat bakteri yang diidentifikasi dari sumber air panas di Yordania termasuk dalam genus *Bacillus*, menunjukkan dominasi bakteri Gram positif termofilik di lingkungan bersuhu tinggi. Bakteri gram positif berbentuk batang, terutama dari genus *Bacillus*, diketahui memiliki kemampuan beradaptasi yang tinggi terhadap lingkungan yang ditandai dengan suhu tinggi, tekanan osmotik, dan kelangkaan nutrisi (Azeem et al., 2023). Genus ini juga dikenal menghasilkan berbagai enzim ekstraseluler, seperti amilase, protease, dan lipase, yang aktif pada suhu tinggi sehingga menjadi target potensial dalam industri bioteknologi. Kehadiran isolat batang Gram positif dari sumber air panas pada penelitian ini memperkuat dugaan bahwa mikroba yang berasal dari genus *Bacillus* atau genera termofilik lainnya mempunyai potensi signifikan sebagai penghasil enzim termostabil.

Uji biokimia dilakukan untuk memperkuat identifikasi awal. Semua isolat menunjukkan reaksi positif terhadap uji katalase, MRVP, glukosa, dan laktosa (Tabel 2.2).

Tabel 2.2. Karakteristik biokimia bakteri dari sumber air panas Wae Pella

Codes	TSIA				SIM			MRVP		CIT	UR	G	L	S	M	CAT	MAS
	Slant	Butt	H ₂ S	Gas	Indole	MOT	H ₂ S	MR	VP								
IC	K	A	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+
II	K	A	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+
IV4	K	A	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
IV8	K	A	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-

Legend: K – alkaline, A – acid, MOT – motility test, CIT – citrate test, UR – urease test, G – glucose test, L – lactose test, S – sucrose test, M – mannitol fermentation test, CAT – catalase test, a sign (+) shows that there is activity, a sign (-) shows no activity

Berdasarkan hasil uji biokimia yang dilakukan, keempat isolat bakteri yang diperoleh dari sumber air panas tersebut menunjukkan sifat fenotipik yang seragam sehingga awal teridentifikasi sebagai anggota genus *Bacillus*. Uji TSIA menunjukkan reaksi permukaan basa (merah) dan dasar asam (kuning) tanpa produksi gas atau H₂S, menunjukkan bahwa isolat dapat memfermentasi glukosa tetapi tidak dapat memfermentasi sukrosa. Hasilnya diperkuat oleh temuan uji karbohidrat terpisah, yang menunjukkan bahwa isolat tersebut dapat memfermentasi glukosa dan laktosa, tetapi tidak dapat memfermentasi sukrosa. Hasil uji SIM negatif terhadap produksi H₂S, indol, dan motilitas, sementara itu uji MR dan VP yang keduanya positif menunjukkan bahwa isolat tersebut menghasilkan asam kuat dan asetoin. Uji

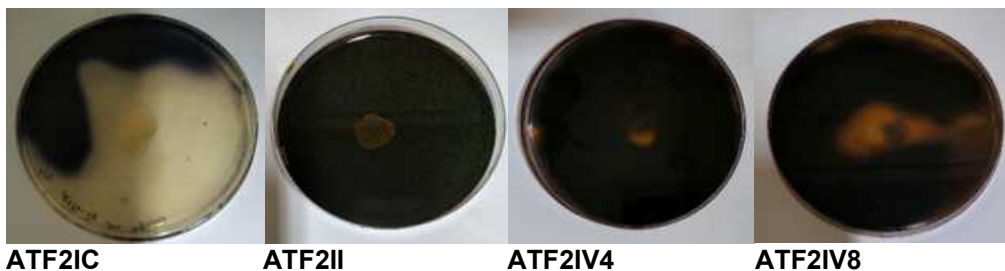


menunjukkan kemampuan isolat dalam menghasilkan enzim untuk menguraikan hidrogen peroksida. Isolat ini berasal dari sumber air panas, menunjukkan toleransi terhadap suhu tinggi, dan ditemukan pada anggota genus *Bacillus*. Hasil ini didukung oleh penelitian sebelumnya (Mong et al., 2022; Mohammad et al., 2017), yang melaporkan bahwa mayoritas isolat dari sumber air panas termasuk dalam genus *Bacillus*, semakin mendukung temuan ini.

Temuan ini juga diperkuat oleh penelitian Sharif et al. (2023) yang menjelaskan isolat dari lingkungan termal umumnya menunjukkan reaksi biokimia yang serupa dan dikelompokkan ke dalam genus *Bacillus*. Seluruh isolat kemudian diuji kemampuannya dalam mendegradasi pati dengan melihat zona bening yang terbentuk.

2.5.2 Aktivitas amilolitik

Setiap isolat menunjukkan adanya zona bening di sekitar koloni pada media pati setelah penambahan larutan iodium, yang menandakan adanya aktivitas enzim amilase. Zona bening tersebut terbentuk akibat proses hidrolisis pati oleh enzim amilase yang diekskresikan secara ekstraseluler. Isolat ATF2IC menunjukkan diameter zona bening paling besar dibandingkan isolat lainnya (Gambar 2.5).



Gambar 2.5. Kemampuan amilolitik isolat sumber air panas Wae Pellae

Penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Silaban et al. (2021) yang melaporkan bahwa bakteri termofilik dari sumber air panas Rianiate Samosir, Indonesia menunjukkan aktivitas amilase ditandai oleh pembentukan zona bening yang luas pada medium pati. Zona bening mengindikasikan kemampuan hidrolisis pati yang lebih efektif, mencerminkan sekresi enzim amilase dalam jumlah besar. Temuan ini juga diperkuat oleh Budiharjo et al. (2024), yang meneliti bakteri termofilik dari sumber air panas Nglimut, Gonoharjo, Jawa Tengah, dan menemukan dua isolat potensial, yaitu TS14 dan TS15. Isolat TS14 memiliki indeks amilase sebesar 2,38 pada 40 °C dan diidentifikasi secara molekuler sebagai *Bacillus amyloliquefaciens*, sedangkan TS15 memiliki aktivitas selulase tertinggi dan diidentifikasi sebagai *Bacillus licheniformis*. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa seleksi berdasarkan zona bening pada uji kualitatif pati merupakan tahap penting dalam mengidentifikasi bakteri penghasil enzim termofilik potensial untuk aplikasi industri.



tersebut, isolat ATF2IC dan ATF2IV8 dipilih untuk dianalisis p produksi dan karakterisasi enzim amilase. Isolat ATF2IC dan na menghasilkan zona bening yang paling besar sehingga puan amilolitik yang lebih tinggi dibandingkan isolat lainnya. minkan degradasi pati oleh enzim amilase yang disekresikan Memilih isolat terbaik untuk pengujian lebih lanjut adalah

pendekatan umum dalam studi eksplorasi mikroba penghasil enzim untuk memfokuskan sumber daya dan analisis pada kandidat yang paling potensial.

2.5.3 Identifikasi molekuler bakteri penghasil amilase

Amplifikasi gen 16S rRNA berhasil dilakukan menggunakan teknik PCR dengan primer universal 63F dan 1387R. Produk PCR kemudian dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa 0,8 % dan divisualisasikan di bawah sinar UV setelah diwarnai dengan etidium bromida. Hasil elektroforesis menunjukkan pita DNA tunggal yang jelas dengan kisaran ukuran kurang lebih 1500 pasangan basa (bp), sesuai dengan ukuran target gen 16S rRNA bakteri.

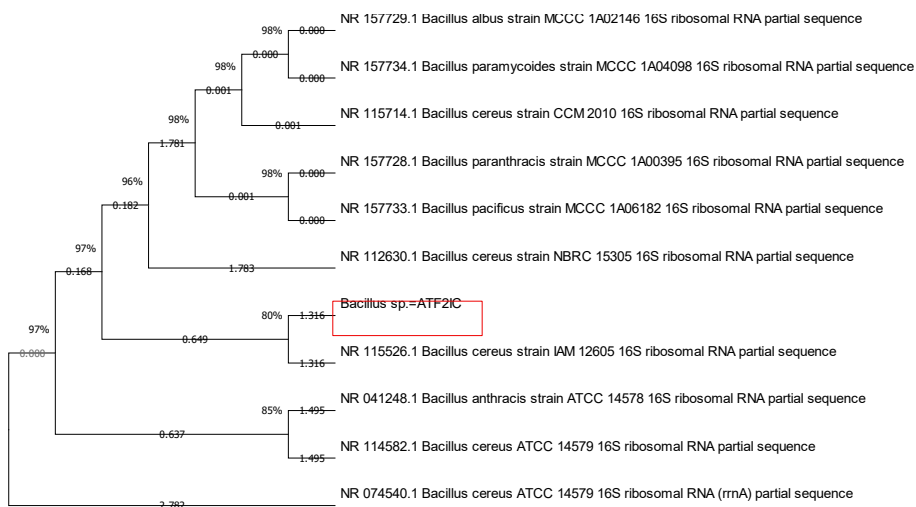
Gambar 2.6. Amplifikasi gen 16S rRNA dari isolat ATF2IC (19) dan AtF2IV8 (20)

Hasil elektroforesis (Gambar 2.6) menunjukkan bahwa amplifikasi DNA target terjadi secara spesifik dan efisien yang ditunjukkan dengan adanya pita DNA tunggal dengan ukuran yang sesuai. Besar kecilnya produk PCR yang diperoleh sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa gen 16S rRNA berukuran kurang lebih 1.500 bp. Keberhasilan amplifikasi ini menunjukkan bahwa primer yang digunakan mempunyai spesifisitas yang tinggi terhadap sekuens konservatif gen 16S rRNA. Produk amplifikasi ini kemudian dapat digunakan untuk analisis sekuensing untuk mengidentifikasi spesies bakteri berdasarkan kesamaan urutan nukleotida dengan database genetik. Setelah diperoleh sekuensnya, dicocokkan menggunakan BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool for*



... database NCBI GenBank untuk mengidentifikasi kedekatan spesies yang terdokumentasi. Berdasarkan hasil analisis ada Lampiran 3.1.2, hasil pencocokan menunjukkan bahwa mempunyai kemiripan tertinggi dengan *Bacillus albus* strain dengan persentase identitas sebesar 96,41 %, query cover ai E sebesar 0,0 yang menunjukkan bahwa kecocokan tersebut ara statistik.

Pohon filogenetik yang dihasilkan menggunakan metode UPGMA dengan model *Maximum Composite Likelihood* menunjukkan bahwa isolat ATF2IC mengelompok kuat (nilai bootstrap $\geq 90\%$) dengan anggota kelompok *Bacillus albus* (Gambar 2.7). Kelompok ini mencakup beberapa spesies yang berkerabat dekat yang seringkali sulit dibedakan hanya berdasarkan gen 16S rRNA. Dukungan bootstrap yang tinggi (95–99 %) yang diamati dalam cluster ini memberikan tingkat kepercayaan yang kuat untuk kesimpulan hubungan evolusi. Hasil ini menunjukkan bahwa ATF2IC kemungkinan besar berafiliasi dengan *Bacillus albus*. Studi ini menyoroti kegunaan analisis gen 16S rRNA dalam mengidentifikasi dan mengklasifikasikan bakteri dalam genus *Bacillus*. Studi ini menunjukkan bahwa *Bacillus* merupakan salah satu genus yang dapat bertahan dan berkembang di lingkungan panas bumi dan berpotensi menghasilkan enzim termostabil, seperti amilase.



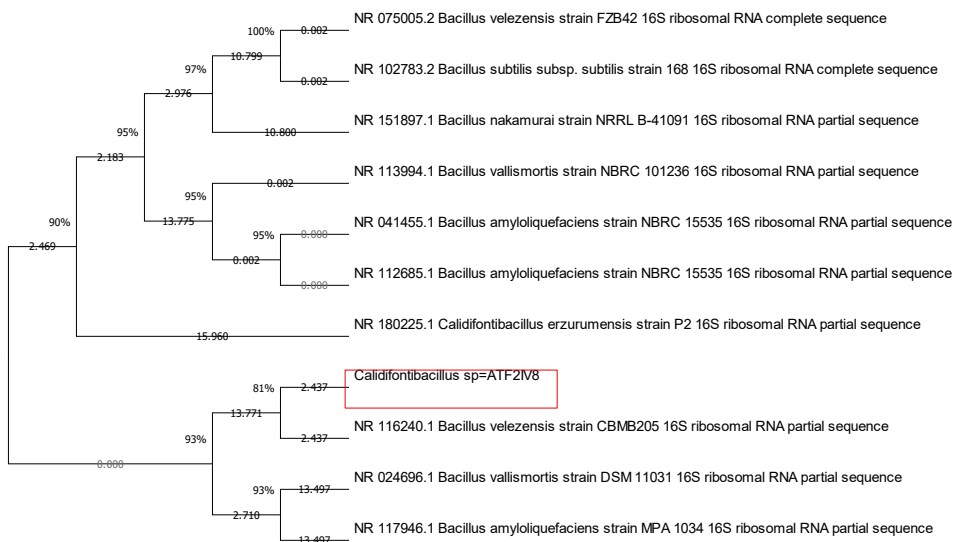
Gambar 2.7. Pohon filogenetik isolat ATF2IC

Beberapa penelitian sebelumnya juga melaporkan dominasi genus *Bacillus* di lingkungan termofilik, khususnya di sumber air panas. Meseret et al., (2024) mengisolasi beberapa strain dari sumber air panas Ethiopia, termasuk *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Paenibacillus thiaminolyticus*, *Paenibacillus dendritiformis*, dan *Brevibacillus borstelensis*. Jenis yang paling dominan (66,7 %) adalah *B. licheniformis*. Ulucay et al., (2022) juga mendapatkan lima spesies berbeda (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus* sp., *Bacillus subtilis*, *Geobacillus kaustophilus*, dan *Bacillus* sp.) dari sumber air panas Anatolia di Turki. Abdollahi et al., (2023) mengisolasi dua strain dari Sumber Air Panas Gavmesh Goli di Lapangan, Iran, salah satunya adalah *Bacillus altitudinis*. Ardhi et al., (2023) mengisolasi *Bacillus licheniformis* dari sumber air panas Bukit Gadang, Indonesia; Fandi et al., (2024) juga memperoleh *Bacillus* spp. dari sumber air panas di Indonesia. Arfah et al., (2015) menemukan *Bacillus* sp. RSAll-1b



dari sumber air panas Lejja Sulawesi Selatan di Indonesia. Keberadaan genus ini secara konsisten dikaitkan dengan kemampuannya membentuk endospora dan bertahan hidup dalam kondisi ekstrem, seperti suhu tinggi dan tingkat pH yang bervariasi. Dengan demikian, hasil tersebut semakin memperkuat anggapan bahwa sumber daya mikroba dari lingkungan ekstrem di Indonesia, khususnya genus *Bacillus*, mempunyai potensi besar untuk dikembangkan sebagai sumber enzim industri yang bernilai tinggi.

Isolat tertinggi lainnya adalah isolat ATF2IV8. Isolat ini memiliki kemiripan tertinggi dengan *Calidifontibacillus erzurumensis* strain P2, dengan persentase identitas sebesar 94,85 % (Lampiran 3.2.2). Analisis filogenetik menggunakan gen 16S rRNA yang dilakukan dengan metode yang sama pada software MEGA 11 ditunjukkan pada Gambar 2.8. Identitas sekuens tinggi hasil BLAST dan topologi pohon filogenetik yang konsisten menegaskan bahwa isolat ATF2IV8 merupakan anggota genus *Calidifontibacillus*. Genus ini diketahui merupakan kelompok bakteri termofilik yang berpotensi menghasilkan berbagai enzim hidrolitik, salah satunya amilase.



Gambar 2.8. Pohon filogenetik isolat ATF2IV8

Genus *Calidifontibacillus* dikenal sebagai sekelompok bakteri termofilik yang biasanya berasal dari ekosistem sumber air panas dan berkerabat dengan keluarga *Bacillus*. Genus ini pertama kali ditetapkan melalui penemuan isolat sumber air panas Ilica – Erzurum dan sejak itu telah menjadi kelompok *Bacillus* sensu lato (mentransfer *Bacillus azotoformans* ke *Calidifontibacillus*) (Adiguzel et al., 2020). Sumber data kultur untuk konfirmasi sifat termofilik *C. erzurumensis* P2^T dan asal usulnya sesuai dengan temuan pada penelitian ini di sumber air panas



Wae Pellae (BacDive – The Bacterial Diversity Metadatabase, 2025). Relevan dengan penelitian ini, anggota *Calidifontibacillus* dilaporkan dapat menghasilkan enzim hidrolitik (termasuk amilase), sehingga berpotensi menjadi produsen biokatalis yang stabil pada suhu tinggi.

Laporan terbaru mengenai komunitas mikroba tanah/rhizosfer telah mengidentifikasi *C. erzurumensis* sebagai penghasil amilase, selulase, dan protease, sehingga memperkuat potensinya untuk proses industri bersuhu tinggi (Samal et al., 2020). Selain itu, penelitian terbaru terhadap kerabat dekat *Bacillales* telah menunjukkan optimalisasi produksi dan karakterisasi amilase termostabil untuk aplikasi makanan/bioproses (Kholikov et al., 2025; Hossain et al., 2024; Harirchi et al., 2022). Hal ini menempatkan *Calidifontibacillus* sebagai penghasil enzim termostabil saat ini. Temuan ini menegaskan potensi isolat ATF2IV8 sebagai sumber amilase termostabil yang layak diteliti lebih lanjut untuk aplikasi pada proses bersuhu/pH ekstrem.

2.6 Kesimpulan

Penelitian ini menunjukkan bahwa sumber air panas Wae Pellae, Sinjai Sulawesi Selatan merupakan habitat alami bakteri termofilik. Empat isolat berhasil diisolasi dan terbukti memiliki kemampuan menghasilkan amilase, dengan dua isolat unggulan yang teridentifikasi sebagai *Bacillus albus* dan *Calidifontibacillus erzurumensis*. Temuan ini mengonfirmasi potensi mikroorganisme lokal sebagai sumber enzim termostabil yang mendukung pemanfaatan industri di bidang pangan, bioteknologi, dan bioenergi.

Daftar Pustaka

Aanniz, T., Ouadghiri, M., Melloul, M., Swings, J., Elfahime, E., Ibijbjen, J., et al., 2015. Thermophilic bacteria in Moroccan hot springs, salt marshes and desert soils. *Brazilian Journal of Microbiology* 46(2): 443-453.
<https://doi.org/10.1590/S1517-838246220140219>

Abd-Elsalam, I. S., & Nagia, F. A., 2024. Novel bacterial isolate for amylase production, characterization and application on textile using saffron natural dye. *Egyptian Journal of Chemistry* 67(5): 435-440.
<https://doi.org/10.21608/EJCHEM.2023.227955.8405>

Abdollahi, P., Maryam, G., & and Babaeekhou, L., 2021. Isolation and characterization of thermophilic bacteria from Gavmesh Goli Hot Spring in Sabalan Geothermal Field, Iran: *Thermomonas hydrothermalis* and *Bacillus altitudinis* isolates as a potential source of thermostable protease. *Journal of Microbiology* 38(1): 87-95.
<https://doi.org/10.1080/01490451.2020.1812774>



Baltaci, M. O., Akbulut, S., Albayrak, S., & Omeroglu, M. A., 2021. Phylogenetic and 16S rDNA-based classification of *Calidifontibacillus erzurumensis* gen. nov. isolated from a hot spring in Turkey, with reclassification of *Bacillus calidifontis* as *Calidifontibacillus azotoformans* comb. nov. and *Bacillus calidifontis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 71(1): 1-10.

Microbiology 70(12): 6418-6427. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004549>

Ahsan, H., 2021. The significance of teaching human biochemistry to dental students. International Journal of Medical Biochemistry 4(2): 136-142. <https://doi.org/10.14744/ijmb.2021.61687>

Ardhi, A., Sidauruk, A. N., Suraya, N., Pratiwi, N. W., Pato, U., & Saryono., 2020. Molecular identification of amylase-producing thermophilic bacteria isolated from Bukit Gadang Hot Spring, West Sumatra, Indonesia. Biodiversitas 21(3): 994-1000. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210319>

Arfah, R. A., Ahmad, A., Djide, M. N., Anis, M., & Zakir, M., 2015. Production, optimization and characterization of amylase enzyme isolated from termofil bacteria *Bacillus* sp RSAll-1b from Lejja Hot Spring South Sulawesi. American Journal of Biomedical and Life Sciences 3(6): 115-119. <https://doi.org/10.11648/j.ajbls.20150306.13>

Azeem, M., Javed, S., & Zahoor, A. F., 2023. *Bacillus* species as potential plant growth promoting *Rhizobacteria* for drought stress resilience. Russian Journal of Plant Physiology 70(4): 1-16. <https://doi.org/10.1134/S1021443723600538>

BacDive-The Bacterial Diversity Metadatabase., 2025. *Calidifontibacillus erzurumensis* P2-strain 159996. <https://bacdive.dsmz.de/strain/159996>

Baharuddin, M., Alfina, N., Febryanti, A., Azis, F., & Wahyuningsih, W., 2022. Karakterisasi enzim amilase isolat bakteri R2M larva kumbang sagu dari Luwu Utara. Chimica et Natura Acta 10(2): 81-87. <https://doi.org/10.24198/cna.v10.n2.37334>

Budiharjo, A., Wulandari, D., Shabrina, J., Mawarni, R. A., & Reyna, A., 2024. Bioprospecting and molecular identification of amylase and cellulase producing thermophilic bacteria from sediment of Nglimut Hot Springs, Kendal Regency. Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology 9(3): 1-13. <https://doi.org/10.22146/jtbb.86756>

da Silva, I. J. S., Sousa, T. F., de Queiroz, C. A., dos Santos Castro, G., Caniato, F. F., de Medeiros, L. S., et al., 2023. *Penicillium amapaense* sp. nov., section Exilicaulis, and new records of *Penicillium labradorum* in Brazil isolated from Amazon River sediments with potential applications in agriculture and biotechnology. Mycological Progress 22(4): 1-5. <https://doi.org/10.1007/s11557-023-01868-7>

Fandi, K., Massadeh, M., & Tawaha, A., 2024. Diversity of bioactive metabolites produced by thermophilic *Bacillus* strains isolated from Jordanian Hot Springs. Jordan Journal of Biological Sciences 17(2): 335-345. <https://doi.org/10.54319/ijbs/170214>



., Khosroushahi, A. Y., & Dilmaghani, A., 2020. Microbial alpha-
lacton: progress, challenges and perspectives. Advanced
Bulletin 10(3): 350-358. <https://doi.org/10.34172/apb.2020.043>

2023. Physiological characteristics, amylase properties and

- metagenomic analyses of bacterial and fungal communities from Ikogosi Warm Springs. University of Ibadan, Nigeria. <http://hdl.handle.net/123456789/2149>
- Fazal, B. Z., Budiman, C., Amin, Z., & Ling, C. M. W. V., 2022. Screening, isolation, and characterization of amylase-producing bacteria from Poring Hot Spring Sabah, Malaysia. *Biodiversitas* 23(6): 2807-2815.
<https://doi.org/10.13057/biodiv/d230604>
- Geneaid. 2017. Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit. In *Geneaid Biotech Ltd.* (Ver. 02.10, Vol. 004). Geneaid Biotech Ltd.
- Gillet, S. A., Murillo Nascimento, S., Elck Almeida, C., Erik Galvão Paranhos, da S., Pedro, dos S. M., et al., 2024. Utilization of peach-palm waste for cost-effective amylase production by *Trichoderma stromaticum*: Stability and industrial potential. *Mycology* 15(4): 690-701.
<https://doi.org/10.1080/21501203.2023.2276728>
- Harirchi, S., Sar, T., Ramezani, M., Aliyu, H., Etemadifar, Z., Nojourni, S. A., et al., 2022. Bacillales: from taxonomy to biotechnological and industrial perspectives. *Microorganisms* 10(12): 1-46.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10122355>
- Harley, J. P., & Prescott, L. M., 2002. *Laboratory Exercises in Microbiology* (Fifth). The McGraw-Hill, New York.
- Hassan, B. A., Alsalami, N. Y., & Jebor, M. A., 2018. Amylase production, purification and characterization from *Escherichia coli*. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 10(7): 1691-1696.
<https://doi.org/10.26452/IJRPS.V9ISPL1.1297>
- Hossain, K. M., Khan, U., Mahbubur Rahman, S. M., & Khan, M. S., 2024. Potential antimicrobial and fruit juice clarification activity of amylase enzyme from *Bacillus* strains. *Biotechnology Reports* 44(2024): 1-10.
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2024.e00861>
- Jaiswal, N., & Jaiswal, P., 2024. Thermostable α -amylases and laccases: paving the way for sustainable industrial applications. *Processes* 12(1341): 1-25.
<https://doi.org/10.3390/pr12071341>
- Kantari, W. W., & Ariyanti, D., 2024. Karakterisasi biokimia kandidat bakteri endofit dari alga hijau (*Ulva lactuca*) sebagai bioprospeksi agen pengendalian hayati. *Journal of Life Science and Technology* 2(2): 63-73.
<https://jurnal.uts.ac.id/index.php/biomaras/article/view/4721>
- Kashtoh, H., & Baek, K., 2023. New insights into the latest advancement in α -amylase from *Bacillus* sp. origin with anti-diabetic effects. *Plants* 12(16): 1-28.
<https://doi.org/10.3390/plants12162944>
- Khan, S. P., 2022. Amylases from thermophilic bacteria: structure and function. *Microorganisms* 13(1757): 1-14.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms13081757>



- and function relationship. *Critical Reviews in Biotechnology* 43(4): 325-341. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1940089>
- Li, Q., Lu, J., Liu, J., Li, J., Zhang, G., Du, G., et al., 2023. High-throughput droplet microfluidics screening and genome sequencing analysis for improved amylase-producing *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts* 16(1): 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13068-023-02437-6>
- McDevitt, S., 2009. Methyl red and Voges-Proskauer test protocols. American Society for Microbiology 1-9. <https://asm.org/getmedia/40946f85-9357-4563-aa8a-994427efa825/methyl-red-and-voges-proskauer-test-protocols.pdf>
- Mehta, R., Singh, P., Singh, A. K., Kim, S. W., Kumari, A., & Mehta, P. K., 2022. An overview on microbial α -amylase and recent biotechnological developments. *Current Biotechnology* 111(1): 11-26. <https://doi.org/10.2174/2211550111666220328141044>
- Meseret, G., Genet, A., Ketema, B., & Piet, C., 2024. Screening and characterization of thermostable enzyme-producing bacteria from selected hot springs of Ethiopia. *Microbiology Spectrum* 12(3): 1-14. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03710-23>
- Mohammad, B. T., Daghistani, H. I. Al, Jaouani, A., Abdel-latif, S., & Kennes, C., 2017. Isolation and characterization of thermophilic bacteria from Jordanian hot springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* isolates as potential producers of thermostable enzymes. *International Journal of Microbiology* 2017(1): 1-12. <https://doi.org/10.1155/2017/6943952>
- Mong, T. K., Van, L. T. T., Phong, N. V., & Tri, N. H., 2022. Isolation and molecular identification of obligate thermophiles from Hot Springs in Ba Ria–Vung Tau and Khanh Hoa Provinces, Vietnam. *Vietnam Journal of Biotechnology* 20(2): 379-386. <https://doi.org/10.15625/1811-4989/15863>
- Ortega-Villar, R., Escalante, A., Astudillo-Melgar, F., Lizárraga-Mendiola, L., Vázquez-Rodríguez, G. A., Hidalgo-Lara, M. E., et al., 2024. Isolation and characterization of thermophilic bacteria from a hot spring in the State of Hidalgo, Mexico, and geochemical analysis of the thermal water. *Microorganisms* 12(1066): 1-22. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12061066>
- Patil, A. G., Khan, K., Aishwarya, S., Padyana, S., Huchegowda, R., Reddy, K. R., et al., 2021. Fungal amylases and their industrial applications. In A. M. Abdel-Azeem, A. N. Yadav, N. Yadav, & M. Sharma (Eds.), *Industrially Important Fungi for Sustainable Development: Bioprospecting for Biomolecules* 407–434. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-85603-8_11
- toro, V. P., & Dwiloka, B., 2021. Isolasi Enzim Amilase dari ang Tunggak (*Vigna unguiculata*). *Jurnal Ilmiah Teknosains* <https://doi.org/10.26877/jitek.v7i1/mei.8359>
- sien, M. O., & Ibrahim, H. M., 2021. Isolation, extraction, molecular characterization for thermostable α -amylase from



locally isolated *Bacillus* species in Sudan. *Biochemistry Research International* 2021(1): 1-8. <https://doi.org/10.1155/2021/6670380>

Reiner, K., 2012. *Carbohydrate fermentation protocol*. American Society for Microbiology 1-10.

<https://asm.org/asm/media/protocol-images/carbohydrate-fermentation-protocol.pdf?ext=.pdf>

Rosda, D. H., Fachrial, E., Harmileni, Nugroho, T. T., & Saryono., 2021. Enzyme identification of thermophilic bacteria from geothermal hot spring in Simbolon Village, North Sumatera, Indonesia. 2nd International Conference on Innovative Technology and Science 2021: Forging A Smart Technological World 2732(1): 60-65. <https://doi.org/10.1063/5.0134295>

Sahrani., 2023. Isolasi dan karakterisasi enzim amilase dari bakteri simbiosis larva kumbang tanduk (*Oryctes rhinoceros* L.) serta aplikasinya dalam menghidrolisis pati umbi talas (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) menjadi maltodekstrin. Tesis. Universitas Hasanuddin, Makassar.

Samal, S., Singh, D., Kharwar, R. N., & Upadhaya, R. S., 2020. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria and identify their potentiality to manage wilt disease of pigeonpea inciting by *Fusarium udum*. *SSRN* 5(2): 1-7.

<https://doi.org/10.2139/ssrn.4768642>

Sawant, S. S., Park, H., Sim, E., Kim, H., & Choi, H., 2025. Microbial fermentation in food: impact on functional properties and nutritional enhancement - A review of recent developments. *Fermentation* 11(15): 1-29.

<https://doi.org/10.3390/fermentation11010015>

Seth, A. 2024. Thermophilic microbial enzymes from hot springs and their role in bioprocessing In book: *Handbook of Aquatic Microbiology*.

<https://doi.org/10.1201/9781003408543-21>

Shad, M., Hussain, N., Usman, M., Akhtar, M. W., & Sajjad, M., 2023. Applications, exploration of computational approaches to predict the structural features and recent trends in α -amylase production for industrial. *Biotechnology and Bioengineering* 120(8): 2092-2116. <https://doi.org/10.1002/bit.28504>

Sharif, S., Shah, A. H., Fariq, A., Jannat, S., Rasheed, S., & Yasmin, A., 2023. Optimization of amylase production using response surface methodology from newly isolated thermophilic bacteria. *Heliyon* 9(1): 1-12.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e12901>

Shoib, A., Shehla, H., Sheikh, H., & Hassan, M., 2023. Screening, isolation and enzyme kinetics of bacterial amylase collected from *Rhizosphere* soil. *Journal Environment* 2(1): 23-28.

<https://doi.org/10.58921/jse.02.01.032>



ni, D., Widya, N., Sarian, F. D., Puspasari, F., Radjasa, O. K., ation, expression, and characterization of raw starch degrading a marine lake *Bacillus megaterium* NL3. *Heliyon* 6(12): 1-7.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05796>

- Shukla, R. J., & Singh, S. P., 2023. Purification and characterization of an amylase from a newly isolated *Geobacillus thermoleovorans* TTIO4 from the Hot Spring of Tuwa-Timba. *Starch-Stärke* 75(9010): 1-5.
<https://doi.org/10.1002/star.202200254>
- Silaban, S., Sihotang, N. I. Y., & Gurning, K., 2021. Isolation and characterization of thermophilic bacteria as amylase enzyme produced by Hots Spring in Rianiate Samosir, Indonesia. *Rasayan Journal of Chemistry* 14(2): 967-973.
<https://doi.org/10.31788/RJC.2021.1426296>
- Silitonga, L. R., Nursyirwani, & Effendi, I., 2019. Isolation, identification and sensitivity of amilolitic bacteria from mangrove ecosystem sediment in Purnama Marine Station Dumai on the pathogenic bacteria. *Asian Journal of Aquatic Sciences* 2(3): 257-266.
<https://www.neliti.com/publications/296112/isolation-identification-and-sensitivity-of-amilolitic-bacteria-from-mangrove-ec>
- Tizhe, D. T., & Jáafar, J. N., 2021. Process parameters optimization for amylase production through rice bran bioconversion by *Aspergillus niger*. *African Journal of Biological Sciences (South Africa)* 31(3): 41-47.
<https://doi.org/10.33472/AFJBS.3.3.2021.41-47>
- Ullah, I., Khan, M. S., Khan, S. S., Ahmad, W., Zheng, L., Shah, S. U. A., et al., 2021. Identification and characterization of thermophilic amylase producing bacterial isolates from the Brick Kiln Soil. *Saudi Journal of Biological Sciences* 28(1): 970-979. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.017>
- Ulucay, O., Gormez, A., & Ozic, C., 2022. Identification, characterization and hydrolase producing performance of thermophilic bacteria: geothermal hot springs in the Eastern and Southeastern Anatolia Regions of Turkey. *Antonie van Leeuwenhoek* 115(2): 253-270.
<https://doi.org/10.1007/s10482-021-01678-5>
- Wahyudi, P., Rachmania, R. A., Ramdhan, M., Sari, N., Zahratunnisa, N., Hardi, D., et al., Isolasi bakteri amilolitik dan optimasi kondisi fermentasi untuk produksi enzim amilase. *Farmasains* 2(3):1-8.
- Widiana, D. R., Phon, S., Ningrum, A., & Witasari, L. D., 2022. Purification and characterization of thermostable alpha-amylase from *Geobacillus* sp. DS3 from Sikidang Crater, Central Java, Indonesia. *Indonesian Journal of Biotechnology* 27(4): 212–218. <https://doi.org/10.22146/ijbiotech.71643>
- Wulandari, D., & Purwaningsih, D., 2019. Identifikasi dan karakterisasi bakteri amilolitik pada umbi *Colocasia esculenta* L. secara morfologi, biokimia, dan molekuler. *Bioteknologi & Biosains Indonesia* 6(2): 247-258.
<https://doi.org/10.29122/jbbi.v6i2.3084>



. M., & Indracanti, M., 2021. Screening and characterization of nylase-producing bacteria isolated from soil samples of Afdera, and molecular detection of amylase-coding gene. *International biology* 2021(1): 1-14. <https://doi.org/10.1155/2021/5592885>

Yildiz, S. Y., 2024. Exploring the hot springs of Golan: A source of thermophilic bacteria and enzymes with industrial promise. Microbiol 81(101):1-5.
<https://doi.org/10.1007/s00284-024-03617-9>



Optimized using
trial version
www.balesio.com