

PENENTUAN AKTIVITAS AMILASE KASAR TERMOFIL *Bacillus subtilis* ISOLAT KAWAH GUNUNG DARAJAT GARUT, JAWA BARAT

Fitriani, A., Supriyanti, F.M.T., dan Heryanto, T.E.

Jurusan Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia, Jl. Dr. Setiabudhi No.229 Bandung 40154, Indonesia
E-mail: anyfitriani@yahoo.com

ABSTRAK

Aplikasi amilase dalam dunia industri sangat luas, sehingga tingkat kebutuhan amilase sangat tinggi terutama amilase yang memiliki sifat termofil. Enzim tersebut banyak digunakan dalam industri, seperti industri tekstil, pangan dan deterjen. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi produksi dan aktivitas amilase secara optimum dari *Bacillus subtilis* yang berasal dari Kawah Gunung Darajat Garut, Jawa Barat. Pengujian produksi enzim dilakukan pada variasi suhu yang berbeda. Hasil menunjukkan dari kedua isolat *Bacillus subtilis* diketahui bahwa enzim amilase diproduksi pada suhu 40 °C. Pada panjang gelombang (λ) 600 nm, nilai absorbansi isolat Z sebesar 0,781 dan isolat AC sebesar 0,72. Sedangkan penentuan aktivitas amilase dilakukan melalui variasi suhu dan pH menggunakan metode DNS. Hasil uji aktivitas enzim amilase yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis*, Isolat Z menunjukkan aktivitas enzim optimum pada suhu 45°C, sedangkan Isolat AC pada suhu 55°C. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim memperlihatkan bahwa pada pH 7 merupakan pH optimum pada kedua isolat. Aktivitas enzim untuk Isolat Z dan AC masing-masing 57,346 U/mL dan 51,914 U/mL. Hasil pengujian aktivitas amilase tersebut menunjukkan bahwa aktivitas amilase isolat Z lebih besar dari pada isolat AC.

Kata kunci: *Bacillus subtilis*; amilase; aktivitas enzim

ABSTRACT

The amylase's applications in industrial world are very wide, so the level of required amylase is very high especially amylase which has thermophilic ability. This study aims to determine the optimum conditions of production and the activities of amylase from *Bacillus subtilis* which is taken from the crater of Darajat Mountain Garut, West Java. The results showed that these two isolates produced amylase optimally at 40°C with absorbance values of isolate Z 0.781 and isolate AC of 0.72 at wave length (λ) 600 nm. While the enzyme activity assays performed on different temperatures and pHs were tested through the DNS method. The results of amylase activities, showed that amylase enzymes which is produced by isolates Z has the highest enzyme activity at 45°C, whereas isolates AC showed the highest enzyme activity at 55°C. The influence of pH to enzyme activities showed that at pH 7 is the optimum pH for both isolates. The value of each enzyme activity 57.346 U/mL for Isolate Z and 51.914 U/mL for isolate AC. Although the two isolates are same species, but the results showed they have different amylase enzyme activity where amylase activity of isolate Z is higher than isolate AC.

Key words: *Bacillus subtilis*, amylase, enzyme's activity

PENDAHULUAN

Enzim merupakan protein yang berfungsi sebagai biokatalis yang bekerja secara efisien dan spesifik (Singleton, 2006). Enzim amilase merupakan enzim yang digunakan dalam pengolahan industri pati, yang berfungsi untuk menghidrolisis polisakarida menjadi gula sederhana (Akpan dan Adelaja, 2003). Kebutuhan amilase di dunia sangat tinggi, pada tahun 2004 penjualannya mencapai sekitar US \$2 milyar. Enzim amilase dari mikroba umumnya dapat memenuhi permintaan industri karena memiliki berbagai kelebihan diantaranya efektivitas biaya, hemat ruangan dan waktu yang dibutuhkan untuk produksi, kemudahan proses modifikasi serta optimalisasinya (Aiyer, 2005). Saat ini amilase yang bersumber dari mikroorganisme termofilik dan hipertermofilik banyak digunakan dalam bidang industri, yang menggunakan suhu tinggi dalam prosesnya. Hal ini terjadi karena enzim yang berasal dari mikroorganisme tersebut memiliki termostabilitas dan aktivitas yang tetap optimal pada suhu yang tinggi (Vieille dan Zeikus, 2001).

Bakteri termofilik merupakan bakteri yang tumbuh pada suhu di atas suhu maksimum sebagian besar bakteri. Pada beberapa bakteri termofil dapat tumbuh pada suhu di atas 50°C. Bahkan beberapa mampu hidup pada suhu 80°C, meskipun yang paling melimpah tumbuhnya pada suhu 60-70°C. Organisme ini telah ditemukan di mata air panas di mana kondisi suhu mendukung perkembangan mereka (Bergey, 1919).

Bacillus subtilis merupakan spesies bakteri yang sangat beragam dan mampu tumbuh di berbagai jenis lingkungan, memiliki bentuk sel batang, bakteri gram positif, dapat membentuk endospora dan dapat tumbuh di rentang temperatur mesofilik (Earl *et al.*, 2008). Salah satu tempat beradanya *B. subtilis* ini adalah di lingkungan dengan suhu tinggi, sehingga jenis *B. subtilis* tersebut tergolong bakteri mesofilik seperti yang diperoleh oleh Utari *et al.*, (2011) yang menemukan *B. subtilis* Gunung Darajat Garut, Jawa Barat dimana isolat tersebut memiliki kemampuan amilolitik, dengan indeks amilolitik tertinggi sebesar 0,68 cm.

Enzim amilase memiliki aplikasi untuk skala yang sangat luas mulai dari industri tekstil, konversi pati untuk gula sirup, produksi Cyclodextrins untuk industri farmasi (Aiyer, 2005). Selain penggunaannya dalam *saccharification* pati, mereka juga menemukan potensi aplikasi dalam sejumlah proses industri seperti makanan, kue, pembuatan bir, tekstil deterjen, dan industri kertas (Pandey *et al.*, 2000).

Berdasarkan kemampuannya dalam menghidrolisis pati dan berbagai keuntungan dari aplikasi yang dapat diberikannya maka enzim amilase tersebut harus diketahui aktivitasnya. Faktor-faktor yang memengaruhi aktivitas enzim adalah suhu dan pH. Suhu memiliki hubungan yang kuat antara aktivitas dan stabilitas enzim, karena enzim sangat sensitif terhadap perubahan suhu (Illaneus, 2008). Banyak penelitian yang dilakukan untuk mencari dan mendapatkan informasi tentang bakteri termofil penghasil enzim amilase. Penelitian yang dilakukan oleh Al-Qodah *et al.*, (2006) yang berhasil mengidentifikasi dan menghasilkan α -amilase dari *Bacillus sphaericus* yang berasal dari sumber air panas di Jordania. Isolat ini menghasilkan enzim dengan kondisi optimum pH 7 dengan suhu 50°C. Hassan *et al.*, (2011) yang melakukan penelitian serupa terhadap bakteri *Bacillus* yang berasal dari sumber air panas Karachi Pakistan, dengan memiliki kondisi optimum untuk menghasilkan enzim α -amilase yaitu pada suhu 80 °C dengan pH 5. Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui suhu optimum produksi amilase dari *B. subtilis* serta mengetahui aktivitas amilase, sehingga diharapkan dapat mengetahui suhu inkubasi enzim optimum serta pH buffer reaksi optimum.

BAHAN DAN METODE

Pembuatan Stok Kultur

Stok kultur disiapkan dari tiap isolat bakteri yang tumbuh di kultur pemurnian sebelumnya, dalam bentuk media miring pada media Luria Bertani (LB). Kultur diinkubasi selama 24 jam pada suhu 50°C. Isolat yang akan digunakan adalah *B. subtilis*, dimana terdiri dari dua isolat yaitu isolat Z dan AC.

Pengamatan Morfologi

Bakteri yang telah diinkubasi selama 24 jam diinokulasikan dengan metode *strike-plate* ke medium LB pada cawan petri. Adapun ciri morfologi bakteri merujuk kepada Capuccino dan Sherman (2005).

Pembuatan Larutan Standar Glukosa

Larutan standar glukosa tersebut dibuat dengan membuat larutan-larutan glukosa pada berbagai konsentrasi mulai dari 50-300 $\mu\text{g/mL}$. Setiap konsentrasi larutan glukosa diambil 1 mL dan ditambahkan 1,5 mL larutan DNS, divortex, kemudian dididihkan selama 5 menit. Campuran didinginkan dengan air mengalir selama 15 menit, ditambah akuabides sebanyak 20 mL, divortex. Campuran lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Dari tiap hasil absorbansi masing-masing larutan glukosa dengan konsentrasi yang berbeda tersebut dibuat garis regresi yang menunjukkan hubungan linier antara absorbansi dan kadar glukosa. Aktivitas enzim amilase yang akan diuji diplotkan ke kurva standar glukosa agar dapat diketahui berapa konsentrasi glukosa yang diperoleh dari hasil hidrolisis (Miller, 1959).

Pengaruh Suhu Inkubasi terhadap Produksi Amilase dari Isolat

Satu ose kultur berumur 1 hari dimasukkan ke dalam media. Media tersebut terbuat dari 2,55 g/L tepung beras, 8,4 g/L yeast ekstrak, 8,1 g/L NaCl, lalu semuanya dicampur kemudian diambil 25 mL. Media yang mengandung kultur bakteri diinkubasi pada suhu yang bervariasi yaitu pada suhu ruang, 30°C-90°C selama 48 jam dengan kecepatan 150 rpm lalu diukur kekeruhannya, menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm, setiap perlakuan dilakukan replikasi masing-masing sebanyak tiga kali (Sumrin *et al.*, 2011).

Ekstraksi Enzim Kultur Cair Bakteri

Setelah diinkubasi selama 48 jam, kultur cair bakteri disentrifuge selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Supernatan yang mengandung ekstrak dari enzim amilase kasar diambil untuk di uji aktivitasnya (Sumrin *et al.*, 2011).

Pengaruh Suhu Inkubasi Terhadap Aktivitas Amilase Kasar

Pengujian aktivitas amilase menggunakan metode DNS (Miller, 1959). 1 mL filtrat amilase kasar hasil sentrifugasi (supernatan) dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan larutan pati 1g/100 mL yang dilarutkan dalam buffer sitrat posfat pH 7 lalu diambil sebanyak 1 mL. Larutan pati dan enzim tersebut diinkubasi pada *waterbath* dengan suhu yang bervariasi mulai suhu 35°C-75°C selama 10 menit. Pada tabung blanko ditambahkan larutan pati 1g/100 mL dalam buffer sitrat fosfat, pH 7 lalu diambil sebanyak 1 mL, kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu yang bervariasi sama dengan sampel enzim, hanya saja tidak ditambahkan enzim seperti yang dilakukan pada perlakuan. Untuk menghentikan reaksi setelah 10 menit, ke dalam tiap tabung uji ditambahkan 2 ml reagen DNS. Tabung dipanaskan hingga mendidih selama 5 menit, didinginkan dengan air mengalir selama 15 menit dan ditambahkan akuabides sebanyak 20 mL. Tiap larutan dalam tabung uji kemudian dideterminasi intensitas warnanya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Nilai absorbansinya diplotkan dengan kurva standar glukosa yang dibuat sebelumnya. Tiap sampel pengujian aktifitas enzim dibuat ulangannya sebanyak tiga kali (Ajayi *et al.*, 2007, Miller, 1959).

Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Amilase Kasar

Sebanyak 1 mL ekstrak amilase kasar hasil sentrifugasi dimasukkan ke dalam tabung uji, lalu ditambahkan 1% larutan pati yang sudah dilarutkan dalam buffer sitrat posfat dengan variasi pH 5, 6, 7, 8 dan 9 sebanyak 1 mL, tiap sampel diinkubasi pada *waterbath* dengan menggunakan suhu optimum dari hasil sebelumnya selama 10 menit, tahapan berikutnya sama dengan tahapan pada pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim sebelumnya. Pada tabung

blanko ditambahkan juga larutan pati 1g/100 mL dalam buffer sitrat fosfat, dengan variasi pH yang sama dengan perlakuan lalu diambil sebanyak 1 mL, kemudian diinkubasi pada suhu yang bervariasi sama dengan sampel enzimnya yang aktif selama 10 menit, hanya saja tidak ditambahkan enzim seperti pada perlakuan (Miller, 1959).

Pengukuran Aktivitas Amilase Kasar dari *Bacillus subtilis*

Aktivitas amilase ditentukan melalui metode DNS dengan menggunakan pati beras sebagai substrat. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai banyaknya μmol glukosa yang dihasilkan dari hidrolisa pati oleh 1 mL ekstrak kasar amilase selama masa inkubasi. Untuk melihat besarnya satu unit aktifitas enzim tersebut digunakan rumus:

$$di\ mana: AE = \frac{Mg \times 100}{BMg \times MI}$$

AE = Aktifitas enzim (Unit/mL filtrat enzim).

MG = Miligram glukosa yang dihasilkan dari reaksi hidrolisa pati.

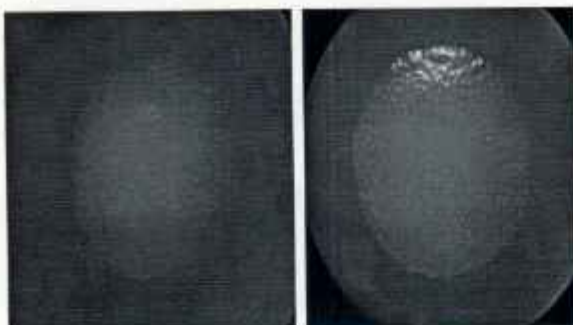
BMg = Mr Glukosa = 180

MI = Masa Inkubasi = 10 menit (Kombong, 2004)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan morfologi

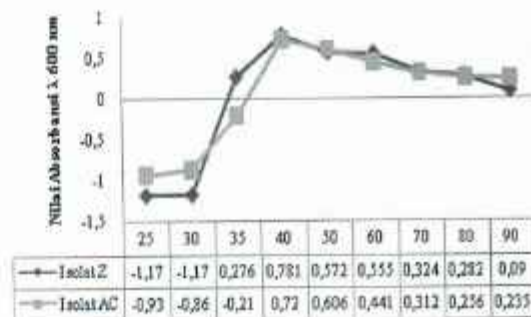
Pengamatan morfologi dilakukan untuk mengetahui bentuk morfologi kedua isolat. Kedua isolat tersebut memiliki kriteria bentuk koloni bulat, warna koloni putih, tepian koloni berombak dan kepekatan transparan. Berdasarkan pengamatan tersebut, hanya satu kriteria yang berbeda dari kedua isolat yaitu elevasi, dimana pada isolat Z memiliki elevasi cembung sedangkan isolat AC memiliki elevasi seperti tombol (*umbonate*) (Gambar 1).



Gambar 1. Bentuk morfologi isolat Z (1) dan isolat AC (2)

Pengaruh suhu inkubasi terhadap produksi amilase dari isolat

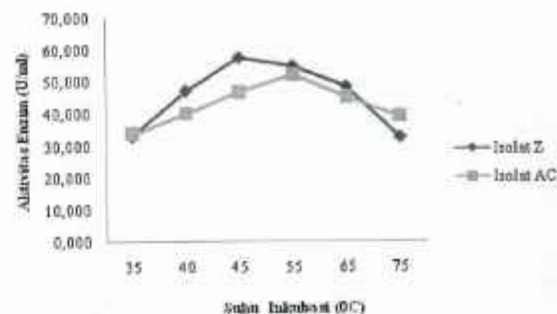
Suhu optimum untuk memproduksi enzim baik isolat Z maupun AC terdapat pada suhu 40°C. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh (Gibson dan Gordon, 1974 dalam Drofftner & Yamamoto, 1985) yang menyatakan bahwa *Bacillus subtilis* dapat hidup di rentang suhu 5°C hingga 55°C. Pada suhu setelah 40°C terlihat produksi menurun meskipun hingga pada suhu 90°C produksi enzim tidak serendah pada suhu ruang (25 °C) (Gambar 2).



Gambar 2. Pengaruh suhu inkubasi terhadap produksi amilase

Pengaruh Suhu Inkubasi terhadap Aktivitas Amilase Kasar

Berdasarkan penelitian diperoleh nilai konsentrasi glukosa hasil hidrolisis secara enzimatik, dapat dilihat adanya aktivitas amilase kasar isolat Z optimal pada suhu 45°C dengan nilai konsentrasi glukosa tertinggi yaitu sebesar 1.032,221 $\mu\text{g/mL}$ dan aktivitas enzim sebesar 57,346 U/mL. Pada isolat AC, enzim amilase bekerja optimum pada suhu 55°C dengan nilai konsentrasi glukosa tertinggi yakni sebesar 934,444 $\mu\text{g/mL}$ dan aktivitas enzim sebesar 51,913 U/mL (Tabel 1). Kedua jenis enzim tersebut juga memiliki kemampuan untuk tetap melakukan aktivitas katalitiknya sampai suhu 75°C, walaupun aktivitas tersebut mengalami penurunan. Hal tersebut dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim

Tabel 1. Pengaruh suhu inkubasi terhadap aktivitas amilase kasar *bacillus subtilis*

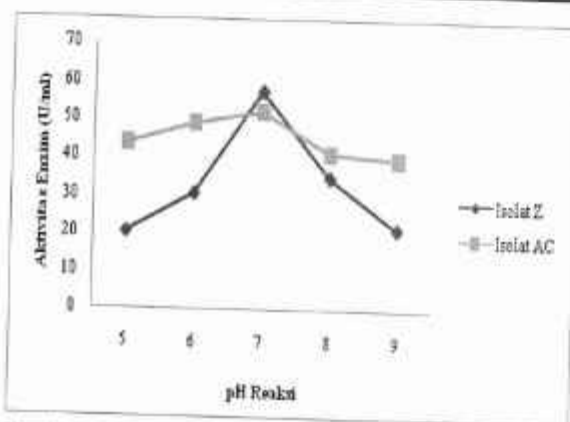
Jenis Isolat	Suhu Inkubasi (°C)	Konsentrasi Glukosa ($\mu\text{g/mL}$)	Aktivitas Enzim Unit/mL	Notasi $\alpha = 0,05$
Z	35	593,333	32,963	a
	40	846,667	47,037	ab
	45	1.032,221	57,346	b
	55	983,333	54,630	b
	65	867,778	48,210	b
	75	583,333	32,408	a
	AC	35	604,444	33,580
40		717,778	39,877	ab
45		836,667	46,482	ab
55		934,444	51,913	b
65		807,778	44,877	ab
75		700,000	38,889	ab

Pengaruh pH terhadap aktivitas amilase kasar

Berdasarkan penelitian yang dilakukan terhadap aktivitas amilase kasar dari ekstrak amilase yang diperoleh. Aktivitas amilase kasar isolat Z dan AC optimal pada pH 7. Isolat Z optimal pada pH 7 dengan nilai konsentrasi glukosa tertinggi yaitu sebesar 1.032,221 µg/mL dan aktivitas enzim sebesar 57,346 U/mL. Sedangkan pada isolat Z pada isolat AC menunjukkan nilai konsentrasi glukosa tertinggi yakni sebesar 934,444 µg/mL dan aktivitas enzim sebesar 51,914 U/mL (Tabel 2). Pengaruh pH terhadap aktivitas amilase kasar kedua isolat tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.

Tabel 2. Pengaruh pH terhadap aktivitas amilase kasar *Bacillus subtilis*

Jenis Isolat	pH	Konsentrasi Glukosa (µg/mL)	Aktivitas Enzim Unit/mL	Notasi $\alpha = 0,05$
Z	5	362,222	20,124	a
	6	546,667	30,37	a
	7	1.032,221	57,346	b
	8	625,556	34,753	a
	9	383,333	21,296	a
AC	5	785,556	43,642	b
	6	877,778	48,765	c
	7	934,444	51,914	d
	8	741,111	41,173	a
	9	715,556	39,753	a



Gambar 4. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim

Isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *B. subtilis* yang berasal dari kawah Gunung Darajat Garut, dimana isolat ini merupakan hasil isolasi dari air kawah (Utari *et al.*, 2011) yang telah diidentifikasi dengan melakukan uji fisiologi, biokimia dan hasil *sequencing* melalui gen 16s rRNA. Kriteria morfologi yang ditemukan berbeda dengan hasil pengamatan yang dilakukan oleh Dwipayana dan Aryesyadi (2009) dimana *B. subtilis* yang berasal dari lumpur memiliki bentuk koloni rhizoid, tepian koloni rhizoid, elevasi koloni timbul dan penampakan koloni tersebut kusam. Sedangkan berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Matsushita *et al.*, (2005) menunjukkan koloni *B. subtilis* dari tanah memiliki karakteristik morfologi elevasi datar, bentuk tidak

teratur, dengan tepian lobate, begitupun hasil yang ditemukan oleh Branda *et al.*, (2001). Perbedaan tersebut kemungkinan disebabkan oleh habitat bakteri yang berbeda dan perbedaan medium pertumbuhan yang digunakan sehingga memunculkan fenotip yang berbeda pula. Karakteristik fenotip bakteri tidak bersifat statis, sehingga memungkinkan suatu bakteri dengan jenis yang sama menunjukkan fenotip yang berbeda satu sama lain (Ochman *et al.*, 2005; Matsushita *et al.*, 2005). Beberapa studi telah menunjukkan bahwa karakteristik morfologi dalam koloni sangat bervariasi tergantung pada strain yang digunakan. Selain itu sangat mungkin adanya variasi kandungan gen serta perbedaan dalam regulasi sehingga dapat menjelaskan perbedaan fenotipe (Matsushita *et al.*, 2005).

Produksi enzim suatu mikroba sangat bergantung pada pertumbuhan bakteri itu sendiri. Dimana bakteri memerlukan enzim untuk kehidupannya, enzim diperlukan untuk metabolisme mikroorganisme tersebut. Hal ini menunjukkan suatu hubungan, dimana faktor yang mempengaruhi produksi enzim pada mikroba beberapa sama dengan faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroba tersebut, diantaranya: suhu, lama inkubasi, pH awal, jumlah inokulum dan faktor yang berpengaruh lainnya (Pandey *et al.*, 2000). Suhu optimum produksi enzim baik isolat Z maupun AC terdapat pada suhu 40°C. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh (Gibson dan Gordon, 1974 dalam Droffner dan Yamamoto, 1985) yang menyatakan bahwa *B. subtilis* dapat hidup di rentang suhu 5°C hingga 55°C. Pada suhu setelah 40°C terlihat produksi menurun meskipun hingga pada suhu 90°C produksi enzim tidak serendah pada suhu 25°C. Dari sekian banyak proses metabolisme yang dilakukan, yang menjadi sentral metabolisme adalah metabolisme glukosa. Substrat yang akan diubah pada metabolisme glukosa tersebut salah satunya adalah pati. Untuk memecah pati menjadi glukosa sedikitnya memerlukan 3 enzim, yaitu α -amilase, β -amilase dan β -glukosidase. α -amilase akan memecah ikatan α -1,4 menghasilkan glukosa, maltosa dan dekstrin. β -amilase akan memecah pati dari ujung nonreduksi menjadi β -maltosa dan dekstrin. Sedangkan β -glukosidase akan memecah ikatan β -1,6 pada rantai cabang dan dekstrin menjadi glukosa (Purwoko, 2009; Supriyanti dan Poedjiadi, 2007).

Pada Isolat Z aktivitas amilase optimum pada suhu 45°C. Hal ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Demirkan (2010) yang menunjukkan suhu aktivitas amilase optimal pada suhu 45°C dari amilase yang berasal dari *B. subtilis* dan turunan mutannya memiliki nilai aktivitas amilase sebesar 100 U/mL. Sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Asad *et al.*, (2011) menunjukkan nilai aktivitas amilase dari *Bacillus sp* sebesar 3,5 U/mL pada suhu yang sama. Sedangkan pada isolat AC aktivitas amilase tertinggi pada suhu 55°C. Hasil berbeda ditunjukkan pada penelitian yang dilakukan oleh Sarikaya dan Gurgun, (1999) yang melakukan pengujian terhadap *B. subtilis* yang menunjukkan aktivitas amilase optimum pada suhu 55°C memiliki nilai aktivitas amilase sebesar 13.600 U/mL.

Sedangkan penelitian lainnya yang dilakukan oleh Mamo dan Gessese, (1999) yang menunjukkan nilai aktivitas enzim terbesar 5.100 U/mL pada suhu 55°C yang berasal dari *B. subtilis*. Nilai aktivitas amilase tersebut lebih besar dari nilai aktivitas amilase *B. subtilis* yang digunakan dalam penelitian ini, selain dikarenakan perbedaan kemampuan hidrolisisnya. Pengaruh suhu terhadap aktivitas produksi amilase berhubungan dengan pertumbuhan organisme. Rentang suhu yang besar (35-80 °C) merupakan suhu optimum untuk pertumbuhan dan produksi α -amilase pada bakteri (Burhan *et al.*, 2003).

Mikroorganisme termofil dapat menghasilkan enzim yang tetap memiliki aktivitas pada suhu yang tinggi melebihi enzim dari mikroorganisme lainnya. Hal tersebut dikarenakan yang pertama mikroorganisme termofil itu sendiri memiliki protein yang tahan terhadap denaturasi dan proteolisis (Kumar dan Nussinov, 2001). Protein ini dikenal dengan nama *Chaperonins* yang dapat membantu mikroorganisma termofil mengembalikan fungsi aktivitas enzimnya bila terdenaturasi oleh suhu yang tinggi (Macario dan Macario, 2002). Kelebihan lainnya, mikroorganisme termofil memiliki komponen utama dari dinding selnya adalah pseudomurein (pseudopeptidoglikan), polisakarida yang tersulfonisasi dan glikoprotein (Kim dan Gadd, 2008). Pada dinding selnya juga terdapat ikatan eter pada tetraeter lipidnya sehingga tidak mudah dirusak oleh pemanasan suhu tinggi (Purwoko, 2009). Selain itu mikroorganisma termofil memiliki suatu struktur DNA yang disebut *Reverse DNA Gyrase* yang dapat menghasilkan suatu bentuk superkoil yang bermuatan positif sehingga DNA memiliki titik leleh yang lebih tinggi dari pada titik leleh DNA pada mikroorganisma non termofil. Perangkat genetik tersebut menyangkut komposisi asam amino arginin dan tirosin yang meningkat pada protein enzimnya, jumlah ikatan hidrogen dan *salt bridge* yang meningkat pada struktur protein enzimnya dan struktur konformasi α -helix dari protein enzim (Kumar dan Nussinov, 2001).

Kondisi pH optimum pada aktivitas amilase kasar dari kedua isolat pada pH 7 didukung oleh Asgher *et al.*, (2006) yang melakukan penelitian serupa terhadap species yang sama yaitu *Bacillus subtilis* yang memiliki kondisi pH optimum 7 dengan nilai aktivitas enzim sebesar 72 U/mL. Aktivitas optimum pada pH 7 juga pernah ditemukan pada amilase dari isolat *Bacillus amyloliquefaciens* dengan nilai aktivitas enzim 5.035 U/mL (Bessler *et al.*, 2003), serta *Bacillus licheniformis* yang menunjukkan nilai aktivitas enzim sebesar 114,5 U/mL (Haq *et al.*, 2009). Hasil penelitian serupa juga ditunjukkan oleh Shafaat *et al.*, (2011) yang meneliti aktivitas amilase pada *B. subtilis* yang menunjukkan nilai aktivitas enzim sebesar 119 U/mL, sedangkan hasil penelitian Vaseekaran *et al.*, (2010) menunjukkan nilai aktivitas amilase sebesar 238 U/mL pada *Bacillus licheniformis*. Perbedaan perolehan nilai aktivitas enzim tersebut selain dikarenakan adanya perbedaan kemampuan dalam menghidrolisis, juga karena perbedaan metode sehingga hasil yang diperoleh berbeda.

Jika dibandingkan dengan tempat hidup alami dari

isolat Kawah Gunung Darajat ini terdapat keunikan dimana pH aktivitas enzim tersebut sangat berbeda dengan pH tempat hidupnya yaitu sebesar $2,3 \pm 0,7$ (Utari, 2011). Hal ini terjadi karena pada prokariota memiliki sistem homeostatis pH, sehingga meskipun nilai pH ekstrasel (pH lingkungan) bervariasi, tetapi pH intrasel akan tetap berada (6-9). Stabilitas nilai pH intrasel sangat menguntungkan karena aktivitas metabolisme tidak terganggu (Purwoko, 2009). Namun seperti protein pada umumnya, struktur ion enzim tergantung pada lingkungannya, karena enzim sendiri memiliki muatan baik itu positif, negatif atau ganda (*zwitter ion*). Dengan demikian perubahan pH lingkungan akan berpengaruh terhadap aktivitas bagian aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim substrat. Selain itu pH tinggi atau rendah dapat menyebabkan terjadinya denaturasi dan hal tersebut mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim (Supriyanti dan Poedjadi, 2007). Secara keseluruhan enzim amilase kasar kedua isolat masih dapat melakukan aktivitas katalitiknya dari pH 5-9. Hal ini dikarenakan mikroorganisma termofil umumnya memiliki kelengkapan sel yang lebih baik agar dapat hidup lebih adaptif terhadap perubahan pH lingkungan. Kelengkapan sel ini terutama ditemukan pada muatan ion yang tinggi yang terdapat pada membran sel yang berhubungan dengan kemampuan untuk mengembangkan daya adaptif dalam menghadapi peningkatan pH lingkungan yang ekstrim (Ulukanli dan Digrak, 2001).

SIMPULAN

Enzim amilase dari kedua isolat *Bacillus subtilis* diproduksi optimum pada suhu 40°C. Pada panjang gelombang (λ) 600 nm, nilai absorbansi isolat Z sebesar 0,781 dan isolat AC sebesar 0,720. Hasil uji aktivitas enzim amilase yang dihasilkan oleh *B. subtilis* Isolat Z menunjukkan aktivitas enzim pada suhu 45°C, sedangkan Isolat AC menunjukkan aktivitas enzim pada suhu 55°C. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim memperlihatkan bahwa pada pH 7 merupakan pH optimum pada kedua isolat. Aktivitas enzim untuk Isolat Z dan AC masing-masing 57,346 U/mL dan 51,914 U/mL. Hasil pengujian aktivitas amilase tersebut menunjukkan bahwa aktivitas amilase isolat Z lebih besar dari pada isolat AC.

DAFTAR PUSTAKA

- Aiyer, P.V. 2005. Amylases and Their Applications. *African Journal of Biotechnology*, 4:125-1529.
- Ajayi., Olajide, A., Fagade & Ezakiel, O. 2007. Heat Activation and Stability of Amylases from *Bacillus species*. *African Journal of Biotechnology*, 6:1181-1184.
- Akan, I. & Adelaja, F.A. 2003. Production and Stabilization of Amylase Preparations from Rice Bran Solid Medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20:47-50.

- Asgher, M., Asad, M.J., Rahman, S.U & Legge, R.L. 2006. A Thermostable α -amylase from a Moderately Thermophilic *Bacillus subtilis* Strain for Starch Processing. *Journal of Food Engineering*, 79:950-955.
- Al-Qodah, Z., Daghestani, H., Geopel, Ph & Lafi, W. 2006. Determination of Kinetic Parameters of α -Amylase Producing Thermophile *Bacillus sphaericus*. *African Journal of Biotechnology*, 6(6):699-706.
- Asad, W., Asif, M & Rasool, S.A. 2011. Extracellular Enzyme Production by Indigenous Thermophilic Bacteria: Partial Purification and Characterization of α -Amylase by *Bacillus sp.* WA21. *Park J. Biol*, 43(2):1045-1052.
- Bergey, D.H. 1919. Thermophilic Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 4(4):301.
- Bessler, C., Schmitt, J., Maurer, K.H & Schmid, R.D. 2003. Directed Evolution of a Bacterial α -amylase: Toward Enhanced pH-performance and Higher Specific Activity. *Protein Science*, 12:161-214.
- Branda, S.S., Pastor, J.E.G., Yehuda, S.B., Losick, R & Kolter, R. 2001. Fruiting Body Formation by *Bacillus subtilis*. *PNAS*, 98:11621-11626.
- Burhan, A., Nisa, U., Gokhan, C., Omer, C., Ashabil, A & Osman, G. 2003. Enzymatic Properties of a Novel Thermostable, Thermophilic, Alkaline and Chelator Resistant Amylase from an Alkaliphilic *Bacillus sp.* Isolate ANT-6, 38:1397-1403.
- Cappuccino, J. G., Sherman, N. 1987. *Microbiology: A laboratory manual*. California: The Benjamin Cummings Publishing company, Inc.
- Demirkan, E. 2010. Production, Purification and Characterization of α -amylase by *Bacillus subtilis* and It's Mutant Derivates. *Turk J. Biol*, 35:705-712.
- Droffler & Yamamoto. 1985. Isolation of Thermophilic Mutants of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* and Transformation of the Thermophilic Trait to Mesophilic Strains. *Journal of General Microbiology*, 131:2789-2794.
- Dwipayana & Ariesyady, H.D. 2009. Identifikasi Keberagaman Bakteri Pada Lumpur Hasil Pengolahan Limbah Cat dengan Teknik Konvensional. ITB.
- Earl, A.M., Losick, R & Kolter, R. 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, 16:6.
- Haq, I.U., Ali, S., Saleem, A & Javed, M.M. 2009. Mutagenesis of *Bacillus licheniformis* Through Ethyl Methanesulfonate for Alpha Amylase Production. *Pak. J. Bot*, 41(3):1489-1498.
- Hassan, S.A., Ali, S.A., Abbasi, A & Kamal, M. 2011. Purification and Biochemical Characterization of a Ca^{2+} - independent, Thermostable and Acidophilic α -Amylase from *Bacillus sp.* RM16. *African Journal of Biotechnology*, 10(32):6082-6089.
- Illanews, A. 2008. *Enzyme Biocatalysis Principle and Applications*. Springer Science + Business Media B.V.
- Kim, B.H. & Gadd, G.M. 2008. *Bacterial Physiology and Metabolism*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Kumar, S. & Nussinov, R. 2001. How do Thermophilic Protein Deal with Heat. *Cellular and Molecular Life Science*, 58:1216-1233.
- Macario, A.J.L. & Macario, E.C. 2002. Sick Chaperones and Ageing: A Perspective. *Ageing Research Reviews*, 1:295-311.
- Mamo, G & Gessese, A. 1999. Effect of Cultivation Conditions on Growth and α -Amylase Production by A Thermophilic *Bacillus sp.* *Letters in Applied Microbiology*, 28:61-65.
- Matsushita, M., Hiramatsu, F., Kobayashi, N., Ozawa, T., Yamazaki, Y & Matsuyama, T. 2005. Colony Formation in Bacteria: Ekperiments and Modelling. *Biofilms*, 1:305-317.
- Miller, G.L. 1959 Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem*, 31:426-428.
- Ochman, H., Lerat, E & Daubin, V. 2005. Examining Bacterial Species Under The Specter of Gene Transfer and Exchange. *PNAS*, 102(1):6595-6599.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D & Mohan, R. 2000. Advance In microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem*, 31:135-152.
- Purwoko, T. 2009. *Fisiologi Mikroba*. Jakarta: PT. Bumi Aksara.
- Sarikaya, E & Gurgun, V. 1999. Increase of The α -Amylase Yield by Some *Bacillus Strains*. *Turk J. Biol*, 24:299-308.
- Shafaat, S., Akram, M & Rehman, A. 2011. Isolation and Characterization of A Thermostable α -Amylase from *Bacillus subtilis*. *African Journal of Microbiology Research*, 5(20): 3334-3338.

- Singleton, P. & Diana, S. 2006. Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, Third Edition. United Kingdom: John Wiley & Sons.
- Sumrin, A., Ahmad, W., Ijaz, B., Sarwar, M.T., Gull, S., Kausar, H., Shahid, I., Jahan, S., Hussain, M & Riazuddin, S. 2011. Purification and Medium Optimization of α -amylase from *Bacillus subtilis* 168. African Journal of Biotechnology, 2119-2129.
- Supriyanti, F.M.T & Poedjiadi, A. 2007. Dasar-dasar Biokimia. Jakarta : Penerbit Universitas Indonesia (UI-Press).
- Utari, I.B., Fitriani A, & Kusnadi 2011. Identifikasi Bakteri Termofilik Amilolitik dari Mata Air Panas Ciengang dan Gunung Darajat, Garut. Seminar Nasional Jurusan Pendidikan Biologi UPI, Bandung, Juli 1-2.
- Ulukanli, Z & Digrak, M. 2001. Alkaliphilic Microorganisms and Habitats. Turk J Biol, 26:181-191.
- Vaseekaran, S., Balakumar, S & Arasatnam, V. 2010. Isolation and Identification of A Bacterial Strain Producing Thermostable α -Amylase. Tropical Agricultural Research, 22(1):1-11.
- Vieille, C & Zeikus, J. 2001. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses and Molecular Mechanisms for Thermostability. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 65(1):1-43