

**Optimasi Enzim α -Amilase dari *Bacillus amyloliquefaciens* O₁ yang Diinduksi Substrat Dedak Padi dan Karboksimetilselulosa
(Optimization of α -Amylase Enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* O₁ which are Induced by Rice Bran and Carboxymethylcellulose)**

Yati Sudaryati Soeka¹⁾, Maman Rahmansyah, & Sulistiani

¹⁾Bidang Mikrobiologi, Puslit Biologi- LIPI, Jl. Raya Bogor Km 46, Cibinong 16911
E-mail : ceuceu_lipi@yahoo.com

Memasukkan: Februari 2015, **Diterima:** Juni 2015

ABSTRACT

Bacterial code O₁ had been isolated from the leaven of fermented cassava. Based on molecular analysis by partial sequences of 16S rDNA and the phylogenetic character interpretation with Neighbor Joining Method, the strain was identified as *Bacillus amyloliquefaciens* O₁. Bacterial enzymatic activity of α -amylase was clarified due to the affect of temperature and pH, and as well as its enzymatic stability to convert 2% soluble starch in 100 ml standard media. Aim of the study was to provide benefit in regard on α -amylase application as crude enzyme extract from the bacteria. In this study, the bacterial strain was being activated to produce α -amylase by modifying substrates containing cassava starch, rice bran (RB), and carboxymethylcellulose (CMC) in five times volumes (500 mL) of the first scale setting in the standard media. The result, reducing sugar as a result of enzymatic activity process increased 40 and 55 times in the modified media containing RB and CMC, respectively after 24 hours incubation. In the next 24 hours observation, enzyme activity in bacterial culture based on the RB media was able to degrade amyllum in the muslin material containing amyllum which was plunged in the media, 1.23 times higher compared to bacterial culture based on the CMC media. Media formula used in the study was able to induce extracellular enzyme activity as well as bacterial culture growth.

Keywords: α -amylase, *Bacillus amyloliquefaciens*, rice bran, carboxymethylcellulose

ABSTRAK

Bakteri dengan kode O₁ berhasil diisolasi dari ragi tape singkong. Berdasar hasil analisis molekuler 16S rDNA serta penetapan karakter filogenetik yang diinterpretasikan melalui metode *Neighbor Joining*, bakteri teridentifikasi sebagai *Bacillus amyloliquefaciens* O₁. Aktivitas enzim α -amilase dari bakteri diklarifikasi berdasar pengaruh temperatur dan pH media, serta tingkat kestabilan enzim tersebut ketika mengkonversi 2 % substrat amilum di dalam 100 ml media standar. Tujuan penelitian adalah untuk mengoptimalkan aktivitas α -amilase yang dihasilkan dari ekstrak enzim kasar dari kultur bakteri tersebut. Pada penelitian ini, kemampuan bakteri diaktivasi untuk memproduksi enzim α -amilase melalui modifikasi pemberian substrat tepung singkong, dedak padi (RB) dan karboksimetilselulosa (CMC) pada volume lima kali (500 mL) lebih besar dari volume media standar. Hasilnya jumlah gula pereduksi hasil aktivitas enzim meningkat masing-masing 40 dan 55 kali pada media hasil modifikasi yang masing-masing mengandung substrat RB dan CMC setelah inkubasi 24 jam. Pada pengamatan berikutnya, aktivitas enzim mampu mendegradasi kandungan amilum yang terdapat pada sampel kain belacu yang diinkubasikan selama 24 jam di dalam kultur media RB sebesar 1,23 kali lebih tinggi dari kultur media yang mengandung CMC. Formula media hasil penelitian ini mampu menginduksi aktivitas enzim ekstraseluler dan juga pertumbuhan kultur bakteri.

Kata Kunci: α -amilase, *Bacillus amyloliquefaciens*, dedak padi, karboksimetilselulosa

PENDAHULUAN

Enzim amilase banyak dibutuhkan pada bidang industri tekstil, hidrolisis pati, pembuatan makanan (bir, roti, sirup, pemanis buatan, industri pakan ternak) produksi etanol, detergen, obat, dan suplemen enzim. Pada proses kerjanya, enzim amilase mempunyai kemampuan memutuskan ikatan glikosida yang terdapat pada amilum. Hasil hidrolisanya berupa molekul-molekul yang lebih sederhana seperti glukosa, maltosa,

dekstrin, dan asam-asam organik lainnya (Palmer & Bonner 2007).

Enzim α -amilase (EC.3.2.11) dikenal juga dengan nama 1,4- α -D-glukanglukanohidrolase dan glukogenase (Bernfeld 1955). Enzim ini bekerja memutus ikatan α -1,4-glikosida pada amilum secara acak terutama pada rantai yang panjang sehingga menghasilkan maltotriosa dan maltosa dari polimer amilosa pada amilum dan menghasilkan glukosa serta sedikit dekstrin dari polimer amilopektin penyusun amilum. Karena

sifatnya yang dapat memutus ikatan glikosida secara acak, enzim ini bekerja lebih cepat dibanding amilase lainnya seperti β -amilase (Polaina & MacCabe 2007).

Enzim α -amilase dapat diperoleh pada berbagai macam sumber mikroba seperti kapang, bakteri, dan khamir atau bahkan dari tumbuhan. Mendapatkan enzim dari mikroba cukup mudah karena mikroba dapat tumbuh cepat dan pada skala produksi mudah diperbanyak (Ferrari *et al.* 1993). Beberapa keuntungan lainnya adalah biaya produksi rendah, kondisi selama produksi dapat dikontrol, dan proses produksi lebih singkat (Burhan *et al.* 2003). Untuk mengeksplorasi perolehan enzim dari sumberdaya mikroba, pada tahap awal umumnya dilakukan melalui optimasi media (Wolfgang 2007). Bakteri dari genus *Bacillus* dikenal sebagai penghasil enzim ekstraseluler, dan pada skala industri bakteri tersebut mampu menghasilkan 20-25 g/l enzim α -amilase (Schallmey *et al.* 2004).

Stabilitas fungsi enzim ditentukan oleh berbagai hal di lingkungannya seperti suhu, pH, faktor tekanan oksidasi, kondisi pelarut dan keberadaan surfaktan. Faktor yang dominan berpengaruh pada kerja enzim adalah temperatur (Vincent *et al.* 2005; Omemum *et al.* 2005). Terdapat dua tipe α -amilase yang dihasilkan oleh bakteri berdasar pola rombak terhadap substrat amilosa, yaitu tipe sakarifikasi dan likuifikasi. Enzim yang dihasilkan *B. amyloliquefaciens* termasuk tipe likuifikasi, yaitu tipe enzim yang memutus sisi rantai karbon molekul pati pada bagian dalam dan menjadi molekul yang lebih sederhana seperti glukosa, maltosa, dekstrin dan oligosakarida yang ditandai dengan penurunan viskositas substrat pati (Cho *et al.* 2000).

Untuk memahami aktivitas enzim α -amilase yang dihasilkan oleh isolat maka pada penelitian ini dilakukan optimasi kerja enzim di dalam mendegradasi substrat amilum. Optimasi dilakukan melalui modifikasi substrat yang berbahan dasar tepung tapioka, dedak padi dan karboksimetilselulosa. Tujuannya adalah untuk memperoleh karakter serta data dasar enzim yang dihasilkan bakteri tersebut melalui modifikasi bahan substrat selaku sumber karbon untuk memperoleh hasil kerja enzim secara optimal.

BAHAN DAN CARA KERJA

Media *nutrient agar* (NA) digunakan untuk menumbuhkan bakteri dengan komposisi terdiri atas *beef extract* 3 g; pepton 5 g; bacto agar 20 g; dipersiapkan dalam satu liter akuades. Media YPSs (*Yeast Pepton Starch soluble*) disiapkan untuk melakukan seleksi bakteri yang menghasilkan enzim dengan komposisi terdiri atas 2 g ekstrak khamir; 5 g pepton; 3 g KH_2PO_4 ; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1000 mL aquadest dan 20 g pati terlarut sebagai sumber karbon. Larutan Lugol (0,1 % I_2 dan 1% KI dilarutkan dengan aquades) digunakan untuk mengetahui aktivitas enzim dari *B. amyloliquefaciens* O₁ yang tumbuh pada media YPSs (Mangunwardoyo *et al.* 1982).

Dua ratus miligram ragi tape dilarutkan ke dalam 100 mL aquadest steril di dalam tabung Erlenmeyer-250 mL dan diaduk sempurna (Sediaan-1). Lakukan pengenceran pada Sediaan-1 (1 mL sampel dari Sediaan-1 ditambah 9 mL aquades steril) di dalam tabung reaksi, dan selanjutnya dilakukan pengenceran secara berseri sehingga mencapai pengenceran akhir pada konsentrasi 10^{-5} (Sediaan-2). Seratus mikroliter Sediaan-2 dituangkan ke permukaan media NA di dalam cawan petri, ratakan dengan spatula dan diinkubasi selama 24 jam sampai terlihat pertumbuhan koloni mikroba di atas permukaan agar. Setiap koloni bakteri yang tumbuh terpisah pada media NA kemudian diinokulasikan pada cawan petri lain yang diisi media YPPs mengandung 2 % amilum. Bakteri yang menghasilkan α -amilase dan tumbuh pada media YPSs ditetapkan dengan menuangkan larutan Lugol sehingga terbentuk zona bening di sekitar bakteri. Bakteri yang memiliki aktivitas α -amilase dijadikan sampel biakan yang kemudian diidentifikasi melalui analisa DNA.

Analisa DNA terhadap sampel biakan dilakukan mengikuti metode *Neighbor Joining* menurut Saito & Nei (1987), kemudian dilanjutkan dengan teknik penandaan MEGA 5.2.2. dari Tamura *et al.* (2011); pada tahap berikutnya dilakukan analisa filogenetik melalui metode *bootstrap* dengan menggunakan seribu replikasi (Efron 1979). Setiap genom DNA bakteri diamplifikasi pada alat PCR terhadap gen 16S rRNA melalui penetapan basa primer

9F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1510R (5'-GGCTACCTTGTACG ACTT-3').

Pengukuran aktifitas α -amilase pada media standar. Starter bakteri dibuat dengan cara menambahkan 10 mL akuades steril ke dalam biakan bakteri pada media padat NA, umur tiga hari inkubasi. Biakan bakteri menjadi tercampur di dalam air, kemudian dipisahkan dari media padat dengan cara disaring. Pada sediaan air yang lolos saringan terkandung 10⁹ CFU/mL bakteri (Sediaan-3).

Untuk pengujian di media standar, sebanyak 5 mL Sediaan-3 diinokulasikan ke dalam media produksi YPSs (95 mL) di dalam Erlenmeyer-300 mL, diinkubasi pada shaker inkubator (suhu 27°C, agitasi 120 rpm). Setiap hari dilakukan pengambilan sampel sebanyak 2 mL untuk diukur aktivitas enzimnya setiap 24 jam, selama masa inkubasi 192 jam. Sampel tadi disentrifugasi pada kecepatan 2270xg selama 5 menit pada suhu 4°C sehingga diperoleh supernatan/filtrat dan endapan. Filtrat merupakan ekstrak enzim kasar untuk keperluan uji aktivitas enzim. Selanjutnya sebanyak 0,5 mL filtrat ditambahkan ke dalam 0,5 mL substrat (2 % pati terlarut) di dalam tabung reaksi-10 mL, sebagai Sediaan-4. Tabung reaksi tersebut selanjutnya ditutup dan diinkubasi pada suhu 40°C selama 10 menit. Produk aktivitas enzim yang terbentuk berupa gula reduksi (glukosa), yang kemudian diukur dengan menggunakan larutan asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS). Setiap unit aktivitas α -amilase setara dengan banyaknya enzim yang dapat menghasilkan gula reduksi sebanyak 1 μ mol per menit di dalam setiap mL larutan (Miller 1959). Pengujian dengan media standar ini dilakukan pula terhadap enzim yang dihasilkan oleh biakan *B. subtilis* A₁ dan *Bacillus* sp.A₆ sebagai pembanding.

Optimasi aktivitas dilakukan pada skala lima kali volume (500 mL substrat) standar dengan memodifikasi substrat menurut cara Haq *et al.* (2010). Pelaksanaannya seperti berikut: 5 mL Sediaan-3 diinokulasikan ke dalam 95 mL YPSs di dalam Erlenmeyer-250 mL, diinkubasi pada shaker inkubator (suhu 27°C, agitasi 120 rpm), sebagai Sediaan-5.

Sebanyak 50 mL Sediaan-5 ditambahkan ke dalam 450 mL media produksi modifikasi

(MPM) di dalam Erlenmeyer-1000 mL. Substrat MPM terdiri dari MPM-1 (komposisi: tepung singkong 25 g; dedak halus 12,50 g; ekstrak taug 25 mL; aquadest 470 mL) dan MPM-2 (komposisi: tepung singkong 25 g; larutan CMC 5 % sebanyak 50 mL; logam Ca dari larutan CaCl₂ 2 % sebanyak 25 mL; aquadest 420 mL). Selanjutnya MPM (1 dan 2) diinkubasi pada suhu 60 °C dengan agitasi 120 rpm selama 24 jam. Sebagai kontrol, substrat MPM (1 dan 2) lainnya hanya diberi 50 mL aquades untuk pengganti 50 mL Sediaan-5.

Setelah diinkubasi selama 24 jam, masing-masing MPM diberi potongan kain mori (kain baru yang masih mengandung lapis amilum) berukuran 2 cm x 2 cm masing-masing sebanyak lima lembar untuk setiap perlakuan, kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam berikutnya. Selisih bobot potongan kain antara yang disimpan di media MPM-perlakuan dengan yang disimpan di MPM-kontrol, merupakan jumlah amilum yang dirombak oleh α -amilase yang terhimpun dalam media MPM.

HASIL

Identifikasi

Hasil identifikasi melalui pengujian aktivitas enzim secara kualitatif pada isolat *B. amyloliquefaciens* O₁ yang tumbuh pada media padat YPSs mengandung pati terlarut menunjukkan adanya aktivitas amilolitik (Gambar 1). Aktivitas ditandai dengan munculnya zona bening di sekitar koloni setelah media dituangi larutan Lugol. Zona bening terbentuk karena aktivitas enzim α -amilase yang menghidrolisis pati terlarut, sehingga larutan pati di sekitar biakan terkonversi menjadi amilosa dan tidak bereaksi dengan larutan Lugol.

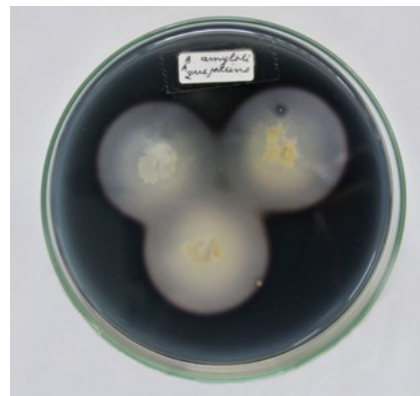
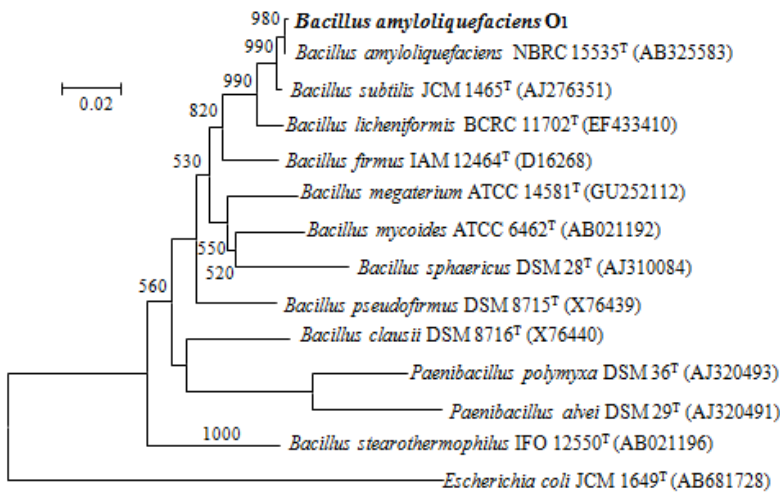
Hasil pengujian enzim α -amilase secara kuantitatif dilakukan menggunakan ekstrak enzim kasar (crude enzyme) dalam merombak substrat amilum. Aktivitas enzim yang ditumbuhkan pada media standar selama inkubasi 192 jam (delapan hari) mengalami fluktuasi. Aktivitas enzim yang optimal terjadi pada inkubasi 48 dan 120 jam. Penurunan aktivitas pasca inkubasi 48 dan 120 jam dapat terjadi karena ada kontra induksi (inhibisi) terhadap enzim oleh beberapa komponen mono dan oligo-

sakarida sebagai produk pecahan amilum akibat kerja α -amilase. Kenaikan aktivitas enzim paska inkubasi 48 jam memiliki asumsi bahwa komponen monosakarida dimanfaatkan oleh bakteri sebagai sumber nutrisi. Akibatnya aktivitas enzim kembali menaik sampai masa inkubasi 120 jam. Pada fase inkubasi selanjutnya terjadi penurunan aktivitas yang dapat disebabkan karena akumulasi produk pada satu sisi, atau terjadi kejenuhan pada sisi lainnya yang terjadi bersamaan dan dapat pula terjadi penyumbatan oleh substrat pada bagian aktif enzim sehingga fungsi katalisnya terhenti. Aktivitas optimal yang terjadi pada masa inkubasi 48 dan 120 jam masing-masing 22,99 dan 22,39 u/mL Setiap

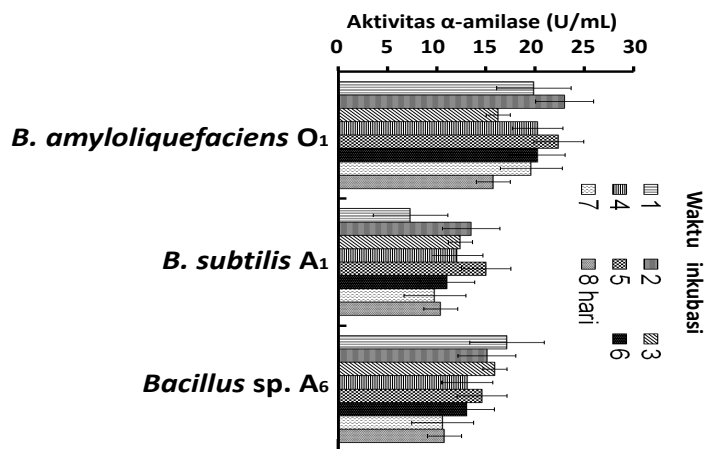
jenis bakteri menghasilkan aktivitas α -amilase yang berbeda. Bakteri *B. amyloliquefaciens* O₁ memiliki aktivitas lebih tinggi dibanding dengan hasil dari *B. subtilis* A₁ dan *Bacillus* sp. A₆ pada pengamatan ini (Gambar 2).

Optimasi α -amilase pada substrat modifikasi

Modifikasi jenis substrat dapat dilakukan dalam meningkatkan produk enzim supaya lebih ekonomis di dalam aplikasinya (Haq *et al.* 2003). Untuk merealisasikan maksud tersebut maka pada penelitian ini digunakan substrak dedak padi. Aktivitas α -amilase dari *B. amyloliquefaciens* O₁ dilakukan pada volume 500 mL substrat dengan penambahan 10 %



Gambar 1. Pewarnaan lugol pada media biakan menghasilkan zona bening sebagai penunjuk aktivitas α -amilase secara kualitatif. Homologi sekuen nukleotida dengan *blast database* memperjelas kekerabatan



Gambar 2. Pengaruh periode inkubasi terhadap aktivitas optimum enzim *B. amyloliquefaciens* dan dibandingkan dengan *Bacillus* lainnya

biakan yang diharapkan menghasilkan enzim ekstraseluler, sedangkan untuk menstimulasi aktivitas enzim lainnya (selulase) dipakai media karboksimetil selulosa (CMC) teknis. Modifikasi substrat menyebabkan efek peningkatan daya aktivitas ekstrak enzim kasar yang ditelaah melalui kemampuannya ketika merombak substrat amilum menjadi gula reduksi. Aktivitas pola rombak pada substrat modifikasi menjadi lebih tinggi dibanding kinerja katalisasi ekstrak enzim pada pola substrat standar laboratorium pada skala 100-mL.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa efek konsentrasi enzim α -amilase pada substrat MPM-1 lebih banyak melepaskan amilum yang melekat pada kain dibandingkan dengan substrat MPM-2 (Tabel 1). Pengamatan terhadap ekstrak enzim kasar pada media justru terjadi lebih aktif pada substrat MPM-2 dan hal tersebut diperkuat dengan data hasil analisis terhadap protein media. Aktivitas ekstrak enzim yang dilakukan pada volume standar laboratorium (100 mL) dan dibandingkan dengan skala 500 mL ternyata dapat meningkat 40 kali bila dibandingkan dengan hasil pengukuran media modifikasi MPM-1 dan meningkat 55 kali pada media MPM-2 (Tabel 2).

PEMBAHASAN

Suhu lingkungan dapat mempengaruhi proses kinetika kerja enzim α -amilase. Efek suhu terhadap besaran aktivitas enzim α -amilase

menjadi informasi dasar atas karakter penting enzim tersebut. Perekayasa dilakukan oleh Verhaert *et al.* (2002) melalui upaya peningkatan efisiensi pengikatan enzim terhadap substratnya. Caranya dengan memodifikasi sifat afinitas enzim pada kondisi lingkungan asam untuk meningkatkan perolehan produk dalam skala industri dengan memanfaatkan bakteri *B. licheniformis*. Penelaahan Ganggadharan *et al.* (2011) dengan penambahan biomassa bakteri *B. amyloliquefaciens* ATCC 23842 sebagai bakteri aerob, aktivitas enzim α -amilase dapat meningkat sejalan dengan kenaikan besaran aerasi yang diberikan. Modifikasi substrat yang dilakukan oleh Zhao *et al.* (2011) dengan menggunakan dedak gandum, ekstrak biji kapas dan tepung amilum serta diperkaya NaCl dan CaCl₂ ternyata dapat meningkatkan aktivitas enzim α -amilase, dimana dedak gandum menghasilkan aktivitas yang terbaik. Performa kerja *B. amyloliquefaciens* P-001 juga telah diteliti oleh Deb *et al.* (2013) atas sifat sintesa enzim terhadap substrat yang diperkaya dengan sumber nitrogen inorganik, dan suhu optimumnya adalah 60 °C. Pengaruh suhu lingkungan yang dikerjakan terhadap *B. amyloliquefaciens* O₁ pada penelitian ini juga menunjukkan aktivitas terbaik pada suhu 60 °C. Demikian pula dengan lingkungan keasaman akan mengganggu kesetimbangan reaksi enzim terhadap substratnya. Aktivitas enzim pada tingkatan pH rendah dibatasi oleh kondisi protonasi sisi rantai asam amino, sedangkan katalisasi pada pH tinggi diperlambat oleh

Tabel 1. Kemampuan daya rombak α -amilase terhadap amilum pada kain mori

Komposisi Media	Degradasi material amilum kain mori (mg/jam) pada ulangan:					Rerata
	1	2	3	4	5	
1. Media (MPM-1) terdiri dari: tepung singkong (25 g); dedak padi (12,5 g); ekstrak tauge (25 mL); aquadest (425 mL); starter (inokulan) di dalam media YPSs cair (45 mL) dan 5 mL suspensi biakan <i>B. amyloliquefaciens</i>	0,22	0,20	0,10	0,23	0,22	0,194 ± 0,06
2. Media (MPM-2) terdiri dari: tepung singkong (25 g); Carboxymethylcellulose (CMC) 5% (50 mL); CaCl ₂ 2% (25 mL); aquadest (375 mL); Starter (inokulan) di dalam media YPSs cair (45 mL) dan 5 mL suspensi biakan <i>B. amyloliquefaciens</i>	0,21	0,14	0,09	0,13	0,22	0,158 ± 0,06

Tabel 2. Optimasi aktivitas enzim α -amilase pada skala 100 mL media standar laboratorium (Media no.1) dan 500 mL media modifikasi (Media no.2 & 3)

Komposisi Media	Aktivitas pada 100 mL media (U/mL)	Aktivitas pada 500 mL media		
		Degradasi material amilum (mg/jam)	Total protein (mg/mL)	Aktivitas enzim (U/mL)
1. Media terdiri dari persentase unsur: ekstrak khamir 0,02; pepton 0,05; KH_2PO_4 0,03; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,001; pati terlarut 0,2; 100 mL aquadest dan 1 mL suspensi biakan <i>B. amyloliquefaciens</i>	22,99	—	—	—
2. Media (MPM-1) terdiri dari: tepung singkong (25 g); dedak padi (12,5 g); ekstrak taugé (25 mL); aquadest (425 mL); starter (inokulan) di dalam media YPSs cair (45 mL) dan 5 mL suspensi biakan <i>B. amyloliquefaciens</i>	—	0,194 ± 0,06	0,0159	918,97
1. Media (MPM-2) terdiri dari: tepung singkong (25 g); Carboxymethylcellulose (CMC) 5% (50 mL); CaCl_2 2% (25 mL); aquadest (375 mL); Starter (inokulan) di dalam media YPSs cair (45 mL) dan 5 mL suspensi biakan <i>B. amyloliquefaciens</i>	—	0,158 ± 0,06	0,0672	1268,15

proses deprotonasi asam (Pingoud *et al.* 2002). Tingkat keasaman yang dapat menjaga keseimbangan proses katalisasi enzim terhadap substrat amilum pada skala laboratorium melalui pengamatan ini cenderung optimal pada kondisi basa.

Kerja enzim α -amilase pada volume kecil di dalam erlenmeyer-100 mL sangat berbeda karakternya ketika dibuat pada skala yang lebih besar volumenya (bioreaktor). Pengamatan enzim pada skala kecil hanya mengantarkan kepada tingkat representasi indikator kinerja enzim yang paling dasar, sedangkan pada skala reaktor lebih ditekankan pada faktor efisiensi proses dan tentunya kalkulasi ekonomi. Penelitian yang dibuat oleh El-Tayeb *et al.* (2007) dengan menggunakan *B. amyloliquefaciens* strain 267CH untuk memperoleh produk enzim yang maksimal digunakan cara modifikasi pemberian sumber amilum secara bertahap pada konsentrasi berbeda, selain didasari dengan pemberian multi protein dan mineral pada media dasarnya. Pemberian berbagai sumber karbon seperti tepung jagung, tepung beras dan

tepung gandum dapat diupayakan untuk mengakumulasi dan meningkatkan daya sintesa enzim α -amilase di dalam substrat (Sexana *et al.* 2007; Deb *et al.* 2013). Pemahaman katakter enzim α -amilase hasil penelitian terhadap *B. amyloliquefaciens* O₁ ini perlu digali lebih jauh untuk pengembangan segi kemanfaatannya.

KESIMPULAN

Pengamatan terhadap aktivitas enzim α -amilase melalui ekstrak enzim kasar yang diperoleh dari biakan *B. amyloliquefaciens* O₁ pada penelitian ini berhasil mengenali karakter dasar aktivitas dasar fungsi katalisasi enzim selama proses inkubasi delapan hari.

Modifikasi substrat dengan pemanfaatan sumber karbon tepung tapioka, dedak padi dan karboksimetilselulosa dengan penambahan volume substrat lima kali lebih besar berhasil meningkatkan aktivitas enzim yang terakumulasi dalam substrat.

Modifikasi substrat hasil penelitian ini menjadi dasar aplikasi α -amilase asal *B. amyloliquefaciens* O₁ lebih lanjut.

DAFTAR PUSTAKA

- Bernfeld, P. 1955. Amylases, alpha and beta. Dalam: Colowick, SP. & NO. Kalpan (eds.) *Methods in Enzymology* 1, p. 149-151.
- Burhan A., U. Nisa, C. Gokhan, C. Omer, A. Ashabil & G. Osman. 2003. Enzymatic properties of a novel thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkalophilic *Bacillus* sp. Isolate ANT-6. *Process Biochem.* 38:1397-1403.
- Cho, HY., YW. Kim & KH. Park. 2000. Molecular characterization of a dimeric intracellular amylase of *B. subtilis*. *Biochemical and Biophysic Acta.* 1478:333-340.
- Deb, P., SA. Talukdar, K. Mohsina, PK. Sarker & SMA. Sayem. 2013. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. *SpringerPlus* 2:154. <http://www.springerplus.com/content/2/1/154>.
- Efron B. 1979. Bootstrap methods: another look at the jackknife. *The annals of Statistics.* 7: 1-26.
- El-Tayeb, O., F. Mohammad, A. Hashem & M. Aboulwafa. 2007. Optimization of the industrial production of bacterial alpha amylase in Egypt. IV. Fermentor production and characterization of the enzyme of two strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *African Journal of Biotechnology.* 7(24):4521-4536.
- Ferrari, F., AS Jarnagin & BF. Schmidt. 1993. Commercial Production of Extracellular Enzymes. Dalam: Sonenheim, AL., JA. Hoch & R. Losick (eds.). *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics.* American Society for Microbiology Press, Washington DC, USA. pp. 917-937.
- Gangadharan, D., KM. Nampoothiri & A. Pandey. 2011. α -Amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens* using agro wastes as feed stock. *Food Technol. Biotechnol.* 49(3):336-340.
- Haq, I., H. Ashraf & J. Iqbal. 2003. Production of alpha amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium. *Bioresour Tecnology.* 87(5):57-61.
- Haq, I., S. Ali, MM. Javed, U. Hameed, A. Saleem, F. Adnan & MA. Qadeer. 2010. Production of alpha amylase from a randomly Induced mutant strain of *Bacillus amyloliquefaciens* and its application as a desizer in textile industry. *Pakistan. Journal of Botany.* 42(1): 473-484.
- Mangunwardoyo, W., M. Takano & I. Shibasaki. 1982. *Preservation and Utilization of a concentrated seed culture for bacterial amylase production.* Annual reports of ICME vol.5, Osaka University, Osaka, Japan.
- Miller, GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analitical Chemistry.* 31:426-429.
- Omumum AM., I. Akpan, MO. Bankole & OD. Teniola. 2005. Hydrolysis of raw starches by amylase of *Aspergillus niger* AMO7 isolated from the soil. *African Journal of Biotechnology.* 2:645-648.
- Palmer, T. & PLR. Bonner. 2007. *Enzymes: Biochemistry, Biotechnology and Clinical Chemistry.* Second Edition. Horwood, England. 416 pp.
- Pingoud, A., C. Urbanke, J. Hoggett & A. Jeltsch. 2002. *Biochemical methods.* Wiley-VCH, Weinheim.
- Polaina, J. & AP. MacCabe. 2007. *Industrial enzymes: Structure, Function and Applications.* Springer, Dordrecht.
- Saito, N. & M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution.* 4: 406-425.
- Schallmeyer, M., A. Singh & OP. Ward. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production, *Canadian Journal of Microbiology.* 50:1-17.
- Sexana, R., K. Dutt, L. Agarwal & P. Nayyar. 2007. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. *Bioresour Tecnology.* 98(2):260-265.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei & S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution.* 28: 2731-2739.

- Verhaert, R.M.D, J. Beekwilder, R. Olsthoorn, J. van Duin & WJ. Quax. 2002. Phage display selects for amylases with improved low pH starch-binding. *Journal of Biotechnology*. 96:103–118.
- Vincent, G., H. Eijsink, S. Gaseidnes, Torben V. Borchert & Bertus van den Burg. 2005. Directed evolution of enzyme stability. *Biomolecular Engineering*. 22:21–30.
- Wolfgang, A. 2007. Enzyme in industry: Production and Applications. Wiley-VCH, Weinheim.
- Zhao, W., J. Zheng, Y. Wang & H. Zhou. 2011. A marked enhancement in production of amylase by *Bacillus amyloliquefaciens* in flask fermentation using statistical methods. *Journal Central South University Technology*. 18:1054-1062.