

Skrining Bakteri Penghasil Enzim β -Siklodekstrin Glukosil Transferase (β -CGTase) dari Tanah Jatinangor

Tina Rostinawati*, Hilda Shinta Lestari

Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran, Jl. Raya Bandung-Sumedang KM 21 Jatinangor 45363

Abstrak

Siklodekstrin merupakan oligosakarida yang bernilai tinggi serta memiliki manfaat dalam bidang farmasi, pangan, dan kosmetik. Dari ketiga jenis siklodekstrin yang paling banyak digunakan dalam bidang farmasi adalah β -siklodekstrin. Produksi β -siklodekstrin dihasilkan oleh enzim β -Siklodekstrin Glukosil Transferase (β -CGTase) dengan mengubah pati menjadi β -siklodekstrin. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memperoleh bakteri penghasil enzim β -CGTase dari tanah Jatinangor dan pati yang memberikan aktivitas enzim terbaik. Metode yang digunakan dalam skrining menggunakan media Horikoshi dengan indikator fenolftalein. Hasil positif ditandai dengan adanya *yellow hollow zone* di sekitar pertumbuhan bakteri. Dari hasil skrining sampel tanah beberapa daerah di Jatinangor diperoleh 5 isolat bakteri yang menghasilkan β -CGTase. Kelima bakteri tersebut diidentifikasi merupakan genus Bacillus. Untuk pati yang memberikan aktivitas CGTase terbesar adalah pati sagu. Pengujian aktivitas enzim dari isolat terbesar (Bacillus TRU) dengan menggunakan pati sagu memberikan aktivitas sebesar 26,23 U/mL.

Kata kunci: CGTase, β -CGTase, β -siklodekstrin, bacillus

1. Pendahuluan

Siklodekstrin (CD) telah digunakan dalam berbagai industri seperti industri farmasi, pangan, dan kosmetik. Penggunaan siklodekstrin dalam industri farmasi sangat bermanfaat sebagai kompleks untuk meningkatkan kelarutan dalam air dari obat-obat yang kurang larut air, seperti prostaglandin dan piroxicam. Siklodekstrin juga memiliki manfaat untuk menstabilkan obat, menutupi rasa dan bau yang tidak enak [1, 2]. Siklodekstrin tergolong oligosakarida termodifikasi yang bernilai \$20-\$500 untuk tiap kilogramnya pada tahun 2002 [3].

Siklodekstrin tersusun atas 6,7,8 unit glukosa melalui ikatan α -(1,4) membentuk struktur melingkar seperti kue donat. Siklodekstrin memiliki cincin luar bersifat polar (hidrofil) sedangkan bagian dalamnya rongga yang bersifat nonpolar (hidrofob). Siklodekstrin tersusun atas 6,7,8 unit glukosa melalui ikatan α -(1,4) membentuk struktur melingkar seperti kue donat. Siklodekstrin memiliki cincin luar bersifat polar (hidrofil) sedangkan bagian dalamnya rongga yang bersifat nonpolar (hidrofob).

Berdasarkan jumlah unit glukosanya siklodekstrin dibedakan menjadi tiga jenis yaitu α -CD (6 unit), β -CD (7 unit), dan γ -CD (8 unit). Jenis β -CD dan γ -CD lebih

sering digunakan karena toksisitasnya yang lebih rendah daripada α -CD. Dalam bidang farmasi β -CD digunakan karena β -CD mudah membentuk kompleks dengan senyawa lain. Kelarutan β -CD yang paling rendah menyebabkan kompleks tersebut bersifat lebih stabil dan mudah dipisahkan dari air. Penggunaan γ -CD juga sedang banyak dikembangkan karena γ -CD memiliki diameter rongga yang paling besar sehingga molekul berukuran besar dapat masuk [2].

Siklodekstrin dihasilkan dari degradasi pati menggunakan enzim Siklodekstrin Glukosil Transferase (CGTase). CGTase merupakan eksoenzim yang mampu mengubah pati menjadi siklodekstrin melalui reaksi transglukosilasi intramolekuler. CGTase bekerja pada ikatan α (1-4) glikosidik dan mengubahnya menjadi ikatan siklik [5, 6].

Enzim CGTase diproduksi oleh berbagai macam bakteri yaitu Bacillus, Thermoanaerobacterium, dan Brevibacterium. Produksi siklodekstrin secara alami paling banyak dihasilkan oleh bakteri Bacillus dengan enzim ekstraseluler CGTase. Pencarian sumber penghasil enzim CGTase banyak dilakukan terhadap mikroorganisme yang hidup di tanah. Mikroorganisme

*Departemen Biologi Farmasi
Email: tinarostinawati@gmail.com

terbesar yang ada dalam tanah adalah bakteri. Bakteri dapat hidup dalam tanah karena tersedianya kebutuhan nutrisi seperti air, mineral, dan karbon [6, 7, 8].

Dalam pencarian bakteri penghasil β -CGTase digunakan media spesifik Horikoshi yang mengandung indikator fenolftalein. Bakteri penghasil enzim β -CGTase akan mengubah pati menjadi siklodekstrin. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya *yellow hollow zone* di sekitar koloni bakteri menunjukkan adanya aktivitas β -CGTase. Kesesuaian bentuk dari fenolftalein dengan rongga β -CD yang menyebabkan fenolftalein dalam media Horikoshi masuk ke dalam rongga β -CD [9]. Produksi siklodekstrin berasal dari pati. Jenis pati yang berbeda dapat mempengaruhi hasil siklodekstrin yang terbentuk akibat aktivitas CGTase [10].

Mengingat manfaat yang dimiliki oleh siklodekstrin sebagai kompleks bernilai tinggi yang sangat bermanfaat dalam bidang farmasi maka perlu dilakukan penelitian ini. Penelitian dilakukan untuk pencarian bakteri penghasil enzim CGTase. Penelitian akan dilakukan melalui tahapan pengumpulan sampel tanah, skrining bakteri penghasil β -CGTase, dan diakhiri dengan pengujian aktivitas β -CGTase dengan variasi sumber pati.

2. Metode

2.1 Pengambilan Sampel Tanah

Sampel tanah diambil dari beberapa daerah di Jatiningor seperti Arboretum Universitas Padjadjaran, taman sekitar Unpad, Kiara Payung, halaman pemukiman, hutan bambu, sawah daerah Caringin dan Sayang, daerah hutan Unwim, dan BGG. Sampel tanah diambil 1 cm dari permukaan tanah dan dimasukkan ke dalam botol vial steril.

2.2 Skrining bakteri penghasil enzim β -CGTase

Pembuatan Suspensi Bakteri

Sebanyak 0,5 gram tanah dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan media Nutrien Broth steril sebanyak 5 ml. Suspensi bakteri diinkubasi 37°C 18-24 jam.

Pembuatan Medium Horikoshi

Medium Horikoshi terdiri dari pati (2%), pepton (0,5%), ekstrak ragi (0,5%), $MgSO_4$ (0,02%), K_2HPO_4 (0,1%), agar (1,5%), fenolftalein (0,03%), metil jingga (0,01%), dan Na_2CO_3 (1,5%). Pati, pepton, ekstrak ragi, magnesium sulfat, dikalium hidrogen fosfat, dan agar dibuat dalam satu erlenmeyer. Setiap bahan dilarutkan dalam aquades hangat satu persatu, kemudian disterilisasi dengan autoklaf suhu 121°C. Erlenmeyer

yang kedua berisi natrium karbonat yang disterilisasi terpisah. Kemudian erlenmeyer berisi medium pertama ditambahkan natrium karbonat steril sehingga diperoleh pH 10. Setelah medium agak hangat ditambahkan indikator fenolftalein dan metil jingga dan diaduk hingga rata

Skrining Bakteri Penghasil Enzim β -CGTase

Medium horikoshi dituang ke dalam cawan petri dan dibiarkan hingga memadat. Kemudian sebanyak 20 μ L suspensi tanah dimasukkan ke atas media dan disebar menggunakan *spreader*. Cawan diinkubasi pada 37°C selama 24-48 jam. Adanya koloni bakteri dengan *yellow hollow zone* menunjukkan adanya bakteri penghasil enzim β -CGTase.

Isolasi Koloni bakteri

Satu ose dari setiap koloni bakteri yang memberikan *yellow hollow zone* digoreskan pada medium Horikoshi dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Terbentuknya *yellow hollow zone* menunjukkan bakteri menghasilkan enzim β -CGTase. Isolasi dilakukan hingga diperoleh isolat bakteri tunggal.

Pembuatan Master Plate Bakteri

Isolat bakteri yang positif memberikan *yellow hollow zone* digoreskan ke nutrient agar untuk dijadikan master plate dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

Pengujian Aktivitas Enzim β -CGTase dari Isolat

Pengujian aktivitas enzim CGTase diuji dengan metode difusi agar dengan cara perforasi dengan tahapan sebagai berikut. Satu ose bakteri dari masterplate disuspensikan dengan NaCl dan diaduk. Suspensi bakteri sebanyak 1 ml diambil dengan mikropipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 10 mL medium Horikoshi (tanpa agar dan indikator fenolftalein-metil jingga). Kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Media yang digunakan adalah agar Horikoshi-fenolftalein dengan komposisi yang sama dengan media skrining. Media disterilisasi di autoklaf dengan suhu 121°C. Setelah agak hangat media dituang ke cawan petri dan dibiarkan hingga memadat.

Suspensi bakteri uji yang telah diinkubasi selama 24 jam diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi, kemudian disentrifugasi 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil sebanyak 50 μ L dan dimasukkan ke dalam agar Horikoshi yang telah dilubangi. Cawan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Aktivitas enzim β -CGTase ditunjukkan dengan terbentuknya *yellow hollow zone*. Semakin besar zona yang terbentuk maka semakin

besar aktivitas enzim CGTase yang dimiliki bakteri uji. Pengujian ini dilakukan dengan kelima isolat bakteri.

2.3 Identifikasi Bakteri

Pewarnaan Gram

Gelas objek dibersihkan dengan alkohol 70% dan diberi aquades, kemudian dipanaskan di atas nyala api. Diambil secara aseptik 1 ose suspensi bakteri, diratakan pada kaca objek dan difiksasi di atas nyala api. Kemudian ditetesi dengan zat warna karbol gentian violet dan didiamkan selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Selanjutnya ditetesi dengan lugol dan dibiarkan selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Kemudian dicuci dengan alkohol 96% selama 3 detik, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Setelah itu ditetesi dengan air fuchsin selama 30 detik, kemudian dicuci dengan air. Preparat dikeringkan dan atasnya diberi satu tetes minyak emersi. Preparat diamati dengan mikroskop. Bakteri gram positif akan berwarna ungu dan bakteri gram negatif akan berwarna merah.

Pewarnaan Spora

Bakteri disuspensikan dengan NaCl di tabung reaksi. Ditambahkan karbon fuksin sebanyak 1:1 ke dalam suspensi bakteri. Tabung dipanaskan di dalam penangas air bersuhu 80°C selama 10 menit. Kaca obyek yang bersih diolesi suspensi bakteri yang sudah dipanaskan. Olesan digenangi dengan H₂SO₄ 1% selama 2 detik lalu dicuci dengan air. Olesan digenangi dengan pewarna biru metilen selama 5 menit. Zat yang berlebih dibilas dengan air suling lalu dikeringkan dengan kertas saring. Kaca obyek ditetesi dengan minyak emersi lalu diamati di bawah mikroskop. Spora akan berwarna merah dan badan vegetatif berwarna biru.

2.4 Pengujian dengan reaksi biokimia

Uji Katalase

Diambil secara aseptik 1 ose suspensi bakteri, diratakan pada kaca objek dan difiksasi di atas nyala api. Kemudian ditambahkan 2-3 tetes larutan H₂O₂ 3% pada permukaan kaca obyek. Jika terjadi reduksi H₂O₂ akan terlihat adanya gelembung O₂ di atas kaca obyek.

Uji Motilitas

Masing-masing isolat bakteri diinokulasi pada medium SSM (*Semi Solid Medium*) pada tabung reaksi secara aseptik dan tusukan pada agar tegak kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Uji akan bernilai positif ditunjukkan dengan melebarnya bekas

tusukan pada media yang merupakan indikasi bakteri tersebut bersifat motil.

Uji hidrolisis karbohidrat

Bakteri digoreskan pada media agar yang mengandung 1% pati. Media diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Cawan hasil inkubasi ditetesi dengan larutan Iodium. Zona berwarna bening di sekitar bakteri menunjukkan bakteri positif menghidrolisis karbohidrat.

Uji Glukosa, Laktosa, Maltosa, Sakarosa, Manosa

Uji gula-gula menggunakan larutan berisi glukosa, laktosa, maltosa, sakarosa, manosa dengan indikator fenol merah. Ke dalam media uji gula-gula dimasukkan isolat bakteri dan diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Apabila warna medium berubah menjadi kuning berarti bakteri tersebut membentuk asam dari fermentasi.

2.5 Pengujian aktivitas pembentukan β -Siklodekstrin

Reagen PHP terdiri dari 4 ml fenoltalein (4mM fenoltalein dalam etanol) dilarutkan dengan 100 mL Na₂CO₃ 125mM. Enzim β -CGTase sebanyak 100 μ L diinkubasi dengan pati 10% dalam 10 mL buffer Tris-HCl (pH 7). Setiap 2, 4, 8, 12, 24 jam diambil 1 mL dan ditambahkan 100 μ L HCl 1,2 N. Sebanyak 0,5 mL diambil, ditambahkan reagen PHP 2 mL dan divortex. Absorbansi diukur dengan pada 550 nm [11].

2.6 Pengukuran aktivitas CGTase dari isolat superior

Larutan pati sebanyak 0,6% dicampurkan ke dalam 0,05 M dapar asetat (PH=5,5). Larutan diambil sebanyak 0,45 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan enzim sebanyak 50 μ L dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C. Larutan diambil sebanyak 50 μ L dan ditambahkan 0,8 mL campuran iodine 0,01 M dalam kalium iodida 0,25 M. Kemudian ditambahkan aquades 2 mL sedikit demi sedikit. Untuk kontrol dibuat dengan perlakuan yang sama tanpa diinkubasi. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 660 nm [3].

$$\text{Aktivitas enzim (U/mL)} = (\text{Ro} - \text{R}) / \text{Ro} \times \text{D} \times 100$$

dimana Ro = absorbansi kontrol; R = absorbansi sampel enzim dan diinkubasi; D = faktor pengenceran.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Hasil Pengambilan Sampel Tanah

Sampel tanah diambil dari beberapa daerah di Jatiningor seperti Arboretum Unpad, taman sekitar Unpad, Kiara Payung, hutan bambu dekat daerah

pemukiman, sawah daerah Caringin dan Sayang, daerah hutan Unwim, dan BGG. Sampel tanah diambil 1 cm dari permukaan karena dari bakteri penghasil enzim β -CGTase merupakan bakteri aerob.



Gambar 1. Hasil pengumpulan sampel tanah beberapa daerah di Jatiningor

3.2 Skrining bakteri penghasil enzim β -CGTase

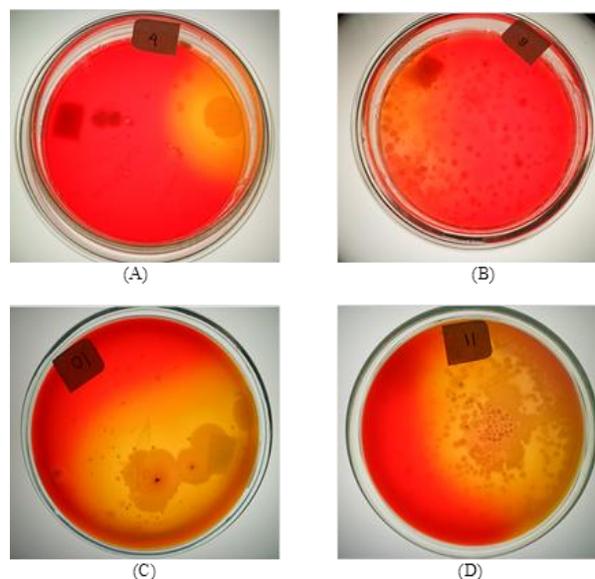
Skrining bakteri penghasil enzim β -CGTase menggunakan medium Horikoshi dan indikator fenolftalein-metil jingga. Hasil positif bakteri penghasil enzim β -CGTase ditandai dengan adanya yellow hollow zone di sekitar pertumbuhan bakteri. Enzim β -CGTase merupakan enzim ekstraseluler yang memiliki aktivitas transferase dimana mampu mengubah pati menjadi β -siklodekstrin. Adanya kesesuaian antara fenolftalein dan rongga dalam β -siklodekstrin ini yang menyebabkan fenolftalein dari media tertarik dan masuk ke dalam rongga siklodekstrin. Fenolftalein dalam keadaan basa akan kehilangan ion H^+ dan menghasilkan warna merah fuchsin pada media agar. Fenolftalein yang kehilangan ion H^+ kemudian berikatan dengan gugus hidroksil rongga dari β -siklodekstrin. Fenolftalein yang tertarik menyebabkan tidak adanya fenolftalein di media sekitar pertumbuhan bakteri.

Tabel 1. Hasil skrining bakteri penghasil enzim β -CGTase dari daerah di Jatiningor

Daerah Pengambilan Sampel	Koloni Bakteri Penghasil Enzim β -CGTase
Arboretum farmasi Unpad	-
Arboretum biologi Unpad	-
Arboretum tanaman angka	-
Taman rumput Unpad	+
Kiara payung	-
Hutan bambu	-
Sawah daerah Caringin	-
Pepohonan Sayang Jatiningor	-
Sawah Sayang Jatiningor	+
Hutan Pepohonan Jatiningor	+
BGG	+
Pepohonan rindang	-

Keterangan: (+) = terbentuk koloni dengan yellow hollow zone; (-) = tidak terbentuk koloni dengan yellow hollow zone

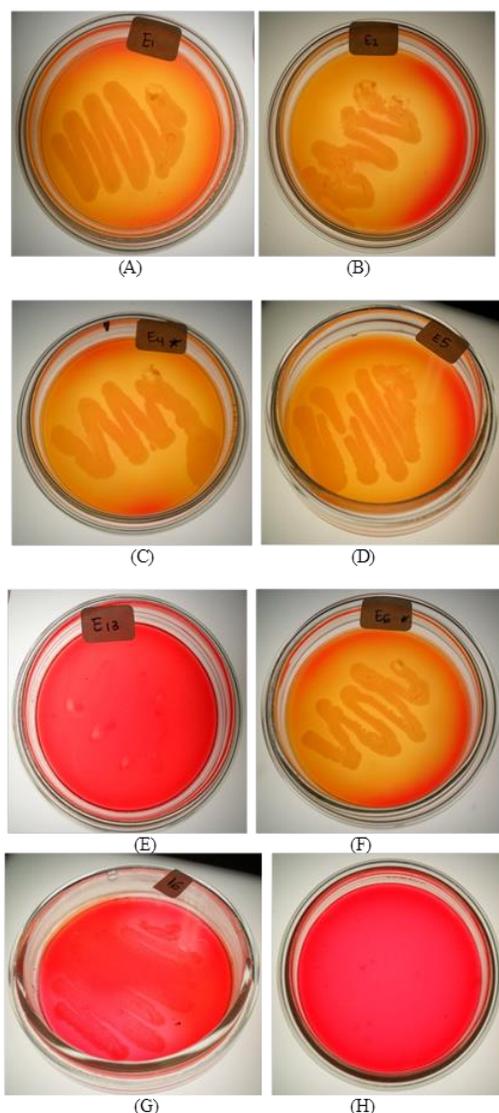
Park dkk (1989) telah melakukan uji modifikasi dengan menambahkan indikator metil jingga sehingga warna kuning (*yellow hollow zone*) yang tampak berasal dari metil jingga dalam suasana basa. Penambahan indikator metil jingga juga untuk dapat membedakan adanya bakteri penghasil asam. Pada medium yang hanya mengandung indikator fenolftalein saja, jika terdapat bakteri penghasil asam (yang belum tentu menghasilkan β -CGTase) maka fenolftalein akan menjadi bening dalam suasana asam. Dengan penambahan metil jingga maka dapat dibedakan bakteri penghasil asam akan merubah warna media menjadi merah (metil jingga dalam suasana asam), sehingga tidak terbentuk yellow hollow zone [9]. Hasil pengujian keduabelas sampel tanah yang diuji dengan medium Horikoshi terdapat 4 lokasi daerah yang memberikan hasil positif dengan data pada Tabel 1. Hasil koloni yang terbentuk dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Koloni bakteri penghasil β -CGTase; (A) hasil dari tanah Taman rumput Unpad; (B) hasil dari tanah Sawah Sayang Jatiningor; (C) hasil dari tanah hutan pepohonan Jatiningor; (D) hasil dari tanah BGG.

3.3 Pengujian koloni bakteri yang menghasilkan enzim β -CGTase

Setiap koloni berbeda yang menghasilkan *yellow hollow zone* diuji lagi ke dalam medium Horikoshi untuk memastikan setiap koloni tersebut positif menghasilkan enzim β -CGTase, dimana dalam 4 cawan terdapat beberapa koloni yang diuji kembali dengan cara digores pada medium Horikoshi. Hasil gores dari setiap koloni yang terbentuk dapat dilihat pada Gambar 3.

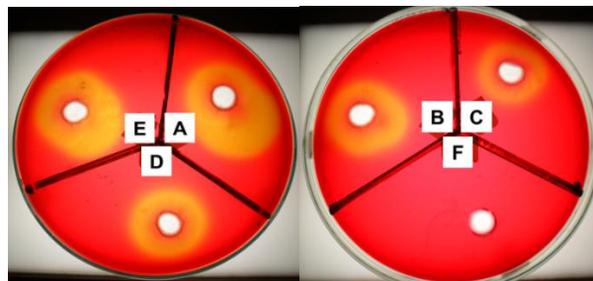


Gambar 3. Koloni bakteri penghasil β -CGTase; (A) Isolat TRU (Taman Rumput Unpad); (B) isolat SSJ1 (Sawah Sayang Jatinangor); (C) isolat SSJ2; (D) isolat HPJ (Hutan Pepohonan Jatinangor) 1; (E) isolat HPJ2; (F) isolat BGG (Bandung Giri Gahana) 1, (G) isolat BGG2, (H) kontrol negatif

3.4 Pengujian aktivitas enzim β -CGTase dari beberapa isolat dari beberapa isolat

Pengujian ini dilakukan untuk memperoleh isolat superior yang memiliki aktivitas enzim β -CGTase terbesar. Media pengujian menggunakan media yang sama yaitu media Horikoshi dengan indikator fenoltalein-metil jingga. Suspensi bakteri ditumbuhkan ke dalam media Horikoshi cair dan diinkubasi 24 jam. Enzim β -CGTase merupakan ekstraseluler enzim yang dikeluarkan dari tubuh bakteri. Hasil inkubasi

disentrifugasi dan supernatan yang mengandung crude enzim dimasukkan ke dalam lubang perforasi. Semakin besar diameter *yellow hollow zone* yang terbentuk maka semakin besar aktivitas enzim tersebut. Dari hasil pengujian kelima isolat diperoleh hasil isolat bakteri TRU memiliki aktivitas enzim β -CGTase terbesar dengan diameter zona yang terbentuk paling lebar yaitu 1,42 cm. Hasil pengujian semua isolat dapat dilihat pada Gambar 4



Gambar 4. Diameter *yellow hollow zone* dari isolat; (A) isolat TRU; (B) isolat SSJ1; (C) isolat SSJ2; (D) isolat HPU1; (E) isolat BGG1; (F) kontrol negatif.

3.5 Pengujian aktivitas enzim β -CGTase dengan variasi pati

Siklodekstrin dihasilkan dari pati dengan enzim β -CGTase. Perbedaan pati yang digunakan dapat mempengaruhi banyaknya hasil siklodekstrin yang dihasilkan. Setelah diperoleh lima isolat bakteri yang menghasilkan enzim β -CGTase maka selanjutnya digunakan variasi pati untuk memperoleh produksi siklodekstrin yang terbesar.

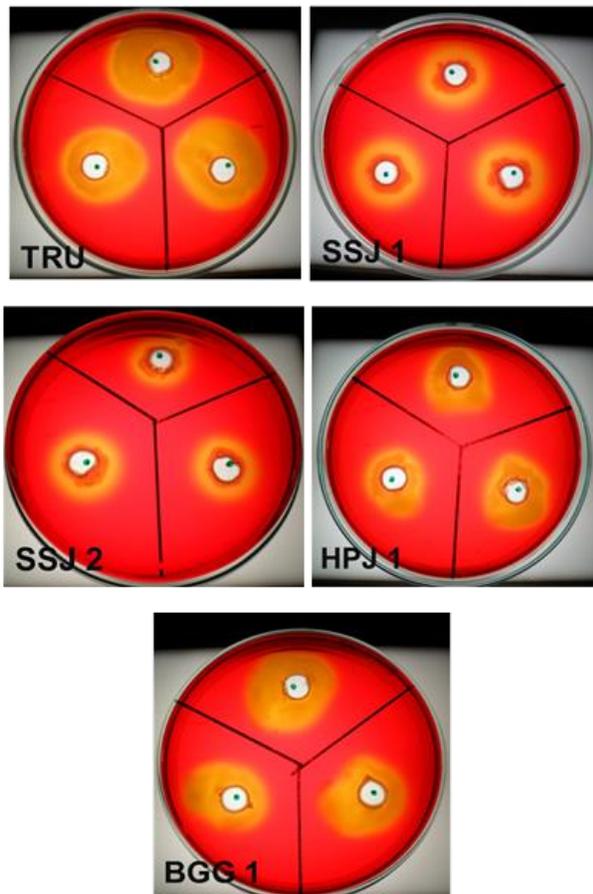
Tabel 2. Diameter *yellow hollow zone* dari aktivitas enzim β -CGTase

Isolat bakteri	Diameter <i>yellow hollow zone</i> (cm)			Rata-Rata (cm)
	I	II	III	
TRU	1,67	0,97	1,62	1,42
SSJ 1	1,08	1,03	1,06	1,06
SSJ 2	0,97	0,95	0,97	0,96
HPU 1	1,38	1,24	1,08	1,23
BGG 1	1,26	1,29	1,25	1,27

Pengujian kelima isolat menggunakan media yang sama dengan skrining dan digunakan variasi pati yaitu pati jagung, pati sagu, dan pati tapioka. Dari hasil pengujian diperoleh hasil dimana penggunaan pati sagu menghasilkan diameter yang paling besar dengan isolat bakteri TRU. Isolat TRU inilah yang menjadi isolat superior penghasil enzim β -CGTase dengan penggunaan pati sagu. Hasil pengamatan dapat dilihat pada Gambar 5 dan Tabel 3.

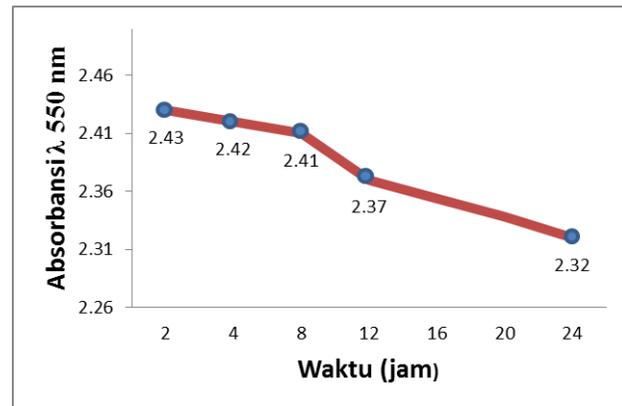
3.6 Pengujian aktivitas pembentukan β -Siklodekstrin dari isolat superior *Bacillus* TRU

Isolat superior *Bacillus* TRU digunakan untuk pengukuran aktivitas pembentuk β -siklodekstrin dan pengukuran aktivitas enzimnya. Pengujian aktivitas pembentukan β -siklodekstrin dilakukan dengan pengukuran penurunan absorbansi fenolftalein pada panjang gelombang 550 nm [11]. Terbentuknya β -siklodekstrin berasal dari hasil pemecahan pati oleh β -CGTase.

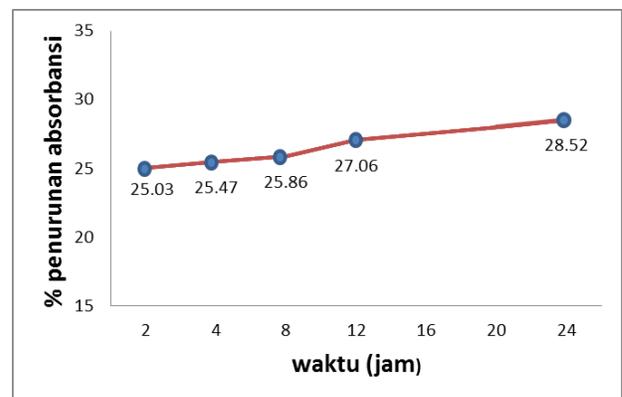


Gambar 5. Diameter yellow hollow zone dari kelima isolat dengan variasi pati (Untuk setiap cawan dari atas searah jarum jam yaitu pati sagu, jagung, tapioka)

Produk β -siklodekstrin yang terbentuk berikatan dengan fenolftalein sehingga setiap jamnya absorbansi fenolftalein juga semakin turun (Gambar 6a). Dari setiap data absorbansi setiap jam dapat diukur persen penurunan absorbansinya, semakin besar persen penurunan absorbansi fenolftalein maka semakin banyak β -siklodekstrin yang terbentuk (Gambar 6b)



(A)



(B)

Gambar 6. Penurunan absorbansi fenolftalein selama waktu inkubasi enzim (A); dan persen penurunan absorbansi sampel sebanding dengan pembentukan β -CD (B).

Isolat TRU dibiakkan dalam media horikoshi cair dengan pati sagu dan diinkubasi selama 24 jam suhu dan diukur aktivitasnya. Pengukuran dengan spektrofotometri berdasarkan interaksi antara pati dengan iodine. Pati yang tidak terpecah oleh enzim CGTase akan berikatan dengan iodine dan absorbansinya diukur pada panjang gelombang 660 nm. Pengukuran aktivitas enzim pada sampel dibandingkan dengan kontrol yang berasal dari pengukuran pati-iodine saat tidak bereaksi dengan enzim CGTase. Hasil aktivitas isolat *Bacillus* TRU sebesar 26,23 U/mL.

3.7 Identifikasi Bakteri

Dari kelima isolat yang positif menghasilkan enzim β -CGTase diidentifikasi genus bakterinya melalui pewarnaan gram, pewarnaan spora, dan uji biokimia. Hasil identifikasi kelima isolat diketahui kelimanya merupakan genus *Bacillus* yang ditandai dengan hasil Gram positif bentuk basil, memiliki spora, aerob, motil,

Tabel 3. Diameter yellow hollow zone dari aktivitas enzim β -CGTase

Jenis Pati	Isolat bakteri	Diameter <i>yellow hollow zone</i> (cm)			Rata-rata (cm)
		I	II	III	
Pati Jagung	TRU	2,87	2,78	2,56	2,74
	SSJ 1	1,69	1,62	1,68	1,66
	SSJ 2	1,60	1,41	1,46	1,49
	HPU 1	2,19	2,01	1,83	2,07
	BGG 1	2,83	2,35	2,58	2,59
Pati Sagu	TRU	2,88	2,60	2,89	2,79
	SSJ 1	1,54	1,51	1,54	1,53
	SSJ 2	1,49	1,52	1,45	1,49
	HPU 1	2,09	2,19	2,10	2,11
	BGG 1	2,56	2,55	2,66	2,59
Pati Tapioka	TRU	3,25	2,36	2,53	2,71
	SSJ 1	1,55	1,57	1,50	1,54
	SSJ 2	1,56	1,53	1,54	1,51
	HPU 1	1,93	2,01	1,76	1,90
	BGG 1	2,10	2,09	2,19	2,13

Tabel 4. Hasil identifikasi bakteri

Ciri-ciri	Hasil Pengamatan Isolat bakteri				
	TRU	SSJ 1	SSJ 2	HPJ 1	BGG
Warna koloni	putih krem	Putih krem	Putih krem	Putih krem	Putih krem
Bentuk koloni	bulat	Bulat	bulat	Bulat	bulat
Pewarnaan gram	+	+	+	+	+
Bentuk	basil	basil	basil	basil	basil
Spora	+	+	+	+	+
Aerob	+	+	+	+	+
Motil	+	+	+	+	+
Katalase	+	+	+	+	+
Fermentasi Glukosa	+	+	-	+	+
Fermentasi Laktosa	-	-	-	-	-
Fermentasi Maltosa	-	-	-	-	-
Fermentasi Sakarosa	-	-	-	-	-
Fermentasi Manosa	-	-	-	-	-

dapat mengfermentasi karbohidrat, dan menghasilkan enzim katalase. Hasil identifikasi bakteri ada pada Tabel 4.

4. Kesimpulan

Hasil skrining sampel tanah dari beberapa daerah di Jatiningor menunjukkan bahwa kelima isolat tersebut merupakan bakteri genus *Bacillus*. Penggunaan pati sagu memberikan aktivitas β -CGTase paling besar.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia sebagai penyedia dana penelitian melalui Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi 2017.

Daftar Pustaka

- Loftsson T. Cyclodextrin in Pharmaceutical Formulation. *A Report For Nordic Industrial Fund.*, 1998, 2-35
- Yunianto PK, Rahayu B, Wahyuntari. Pengaruh PH dan Suhu Terhadap Produksi β -Siklodekstrin Glukosil Transferase (β -CGTase) oleh *Bacillus* sp BK-1. *Jurnal Sains dan Teknologi*, 2000, 2:27-28.
- Rosso. Optimization of Batch Culture Condition for Cyclodextrin Glucanotransferase Production From *Bacillus Circulan* DF9R. *Biomed Central*. 2002, 1-8.
- Mangunwidjaja, D., A.Sugiri, M. Gatot, Amran. *Produksi Siklodekstrin dari Pati dengan CGTase Paenibacillus Macerans Imobil*. 2000, 232-233.
- Dwidjoseputro D. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta, 2005, Penerbit Djambatan. 179-184.
- Soeka, Y.S., E. Naiola, J. Sulistyono. 2007. Aktivitas Antimikroba Flavonoid-Glikosida Hasil Sintesis Secara Transglikosilasi Enzimatik. *Berita Biologi*. 8 : 455.

7. Perry, J. and J.T. Stanley. 1997. *Microbiology Dynamics and Diversity*. Soundas College Publishing. USA. 632.
8. Ong, R.M., K.M. Goh, N.M. Mahadi, O. Hassan, R.N.Z.R.A. Rahman, R. Illias. 2008. Cloning Extracellular Expression and Characterization of A Predominant β -CGTase from Bacillus sp G1 in E. coli. *Microbiol. Biotechnol.* 35 : 1705-1707
9. Park, S.C., Park, H.H. and Kim, S.H. 1989. A Rapid Screening Method for Alkaline b- Cyclodextrin Glucanotransferase Using Phenolphthalein-Methyl Orange Containing Solid Media. *Agricultural Biological Chemistry*, 53: 1167-1169.
10. Yap PW, Ariff AB, Woo KK, Hii SL, Production of Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase) by Bacillus lehensis S8 using Sago Starch as Carbon Source, *J. of Biol. Sci.*, 2010, 10(7), 676-681.
11. Goel and Nene. 1995. Modification in the Phenolphthalein Method for Spectrophotometric Estimation of Beta Cyclodextrin. *Starch*. 399-400