

ISOLASI, KARAKTERISASI, DAN UJI POTENSI BAKTERI PENGHASIL ENZIM TERMOSTABIL DARI SUMBER AIR PANAS LAINEA, SULAWESI TENGGARA

ISOLATION, CHARACTERIZATION AND BACTERIAL POTENTIAL TEST OF PRODUCING TERMOSTABIL ENZYME FROM LAINEA HOT WATER SOURCES, SOUTHEAST SULAWESI

Marwati Arji^{1*}, Wina Rezky¹⁾, Wa Ode Siti Nurhaliza¹⁾, Nur Arfa Yanti²⁾

¹ Mahasiswa Program Studi Biologi, FMIPA, Universitas Halu Oleo

² Laboratorium Mikrobiologi, Program Studi Biologi, FMIPA, Universitas Halu Oleo

^{1*} E-mail corresponding author : marwatiarji2696@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat bakteri yang berpotensi sebagai penghasil enzim ekstraseluler "Proliaze" (Protease, Lipase, Amilase dan Selulase) dan mengetahui karakteristik isolat bakteri dari air panas Lainea. Tahapan-tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi pengambilan sampel, isolasi bakteri, seleksi bakteri pada media spesifik serta karakterisasi bakteri potensial penghasil enzim ekstraseluler berdasarkan karakter fenotipik. Hasil penelitian ini diperoleh 36 isolat bakteri dan hanya terdapat 3 isolat bakteri yang memiliki potensi ganda dalam menghasilkan enzim ekstraseluler. Ketiga isolat bakteri memiliki bentuk sel batang, Gram positif, tidak menghasilkan endospora, bersifat motil, katalase positif, menunjukkan hasil negatif pada uji Indol, Methyl Red, Voges Proskauer, sitrat dan mampu memfermentasi sukrosa, glukosa dan mannitol, toleran terhadap konsentrasi NaCl 3-7%, pH 5-7 dan suhu 37-70°C. Ketiga isolat bakteri dari sumber air panas Lainea tersebut identik dengan genus acuan *Listeria*.

Kata kunci : Air panas Lainea, Bakteri Proteolitik, Bakteri Lipolitik, Bakteri Amilolitik, Bakteri Selulolitik

ABSTRACT

This study aims to obtain bacterial isolates that have the potential as producers of "Proliaze" extracellular enzymes (Protease, Lipase, Amylase and Cellulase) and determine the characteristics of bacterial isolates from Lainea hot water. The stages carried out in this study include sampling, bacterial isolation, bacterial selection in specific media and characterization of extracellular enzyme-producing potential bacteria based on phenotypic characters. The results of this study obtained 36 bacterial isolates and there were only 3 bacterial isolates which had double potential in producing extracellular enzymes. The three bacterial isolates have the form of stem cells, Gram positive, do not produce endospores, are motile, positive catalase, show negative results on the test of Indol, Methyl Red, Voges Proskauer, citrate and are able to ferment sucrose, glucose and mannitol, tolerant to NaCl 3-concentration 7%, pH 5-7 and temperature of 37-70°C. The three bacterial isolates from Lainea's hot springs are identical to *Listeria*'s reference genus.

Keywords : Lainea Hot Water, Proteolytic Bacteria, Lipolytic Bacteria, Amylolytic Bacteria, Cellulolytic Bacteria

PENDAHULUAN

Enzim ekstraseluler merupakan enzim yang diproduksi oleh sel hidup yang memiliki aktivitas di luar sel. Enzim ekstraseluler memiliki sifat hidrolitik yang menguraikan molekul kompleks menjadi molekul-molekul sederhana (Pelczar dan Chan, 2010). Beberapa contoh enzim ekstraseluler yang telah banyak dimanfaatkan dalam bidang industri antara lain enzim Protease, Lipase, Amilase dan Selulase (Pandey *et al.*, 2000) yang disingkat dengan "Proliase".

Pemanfaatan enzim ekstraseluler di bidang industri saat ini terus mengalami peningkatan. Industri-industri memanfaatkan enzim ekstraseluler sebagai alternatif untuk menggantikan berbagai proses kimiawi. Bidang industri yang memanfaatkan enzim ekstraseluler umumnya beroperasi pada suhu tinggi, sehingga sangat membutuhkan enzim ekstraseluler yang bersifat termotabil dengan stabilitas dan aktivitas yang tetap optimal pada kondisi suhu yang tinggi.

Kebutuhan yang tinggi terhadap enzim ekstraseluler termotabil dan pemakaiannya yang luas pada beberapa bidang industri, menyebabkan perlu dilakukan eksplorasi terhadap sumber daya alam yang potensial untuk menghasilkan enzim ekstraseluler termotabil tersebut.

Sumber daya alam potensial sebagai penghasil enzim ekstraseluler yang bersifat termotabil adalah mikroba yang hidup

pada kondisi ekstrim seperti pada suhu tinggi. Kelompok mikroba yang banyak dieksplorasi sebagai sumber enzim ekstraseluler termotabil adalah bakteri termofilik.

Bakteri termofilik dapat ditemukan pada lingkungan yang memiliki suhu yang tinggi seperti sumber air panas, tanah yang selalu terkena sinar matahari, tanah yang mengalami fermentasi kompos, erupsi gunung merapi, kawah air panas dan sedimen laut geotermal (Purwani dkk., 2002). Sumber air panas menjadi salah satu sumber bakteri termofilik penghasil enzim ekstraseluler termotabil yang banyak dieksplorasi. Oleh karena itu, sumber daya alam di Sulawesi Tenggara yang sangat potensial untuk eksplorasi sumber-sumber enzim termotabil adalah di sumber air panas Lainea.

Sumber air panas Lainea merupakan salah satu sumber air panas yang memiliki suhu yang sangat tinggi. Hermawan dkk. (2011) sumber air panas Lainea memiliki suhu mencapai 50-86°C. Oleh karena itu, dengan adanya suhu air panas yang sangat tinggi maka sumber air panas Lainea sangat potensial digunakan sebagai sumber mikroba penghasil enzim ekstraseluler termotabil.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah media NA (*Nutrient Agar*), NB (*Nutrient Broth*) sebagai media isolasi bakteri termofilik, media *skim milk Agar*, media emulsi lipid

(Rhodamine B Agar) media agar pati 1 %, media agar *carboxymethyl cellulose* (CMC) sebagai media uji aktivitas enzimatik ekstraseluler dan media untuk karakterisasi bakteri. Alat-alat yang digunakan meliputi *laminar air flow*, Oven, mikroskop, autoklaf, *water bath*, *hot plate* dan *magnetic stirrer*.

Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan di sumber air panas Lainea, Kecamatan Lainea, Kabupaten Konawe Selatan, untuk diisolasi dan dikarakterisasi di Laboratorium Biologi Unit Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Halu Oleo (UHO), Kendari, Sulawesi Tenggara.

Isolasi Bakteri Termofilik

Tiga puluh enam isolat bakteri termofilik yang telah diisolasi dari sumber air panas Lainea, Sulawesi Tenggara selanjutnya dilakukan pemurnian, karakterisasi dan diuji potensinya dalam menghasilkan enzim ekstraseluler.

Uji Potensi Bakteri Penghasil Enzim Ekstraseluler

Uji potensi bakteri penghasil enzim ekstraseluler dilakukan berdasarkan kemampuannya menghidrolisis senyawa amilum, selulosa, protein dan lipid dengan melihat aktivitas enzimatik. Tiga puluh enam isolat bakteri dari sumber air panas Lainea yang telah dimurnikan ditumbuhkan pada media uji aktivitas enzimatik ekstraseluler dengan menggunakan

metode titik. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 66°C, 74°C dan 85°C selama 24 jam. Bakteri yang memiliki kemampuan untuk menghasilkan enzim ekstraseluler akan tumbuh dan membentuk zona jernih dan pendaran warna orange di sekitar koloni bakteri (Lay, 1994).

Daya proteolitik, amilolitik dan selulolitik dapat diketahui dengan dilakukan pengukuran dengan menggunakan rumus yang mengacu pada De Lima *et al.*, 2005 yang dimodifikasi sebagai berikut:

$$S = \frac{\pi}{4}(d_c^2 - d_{co}^2) \quad (1)$$

Keterangan:

S = Daya hidrolitik (mm²)
d_c = Diameter Zona Bening (mm)
d_{co} = Diameter Koloni (mm)

Aktivitas lipolitik ditandai dengan kemampuan isolat bakteri menghasilkan enzim lipase yang ditandai adanya pendaran berwarna orange kemerahan di sekitar koloni bakteri di bawah sinar UV pada panjang gelombang (λ) = 365 nm.

a. Karakterisasi Bakteri

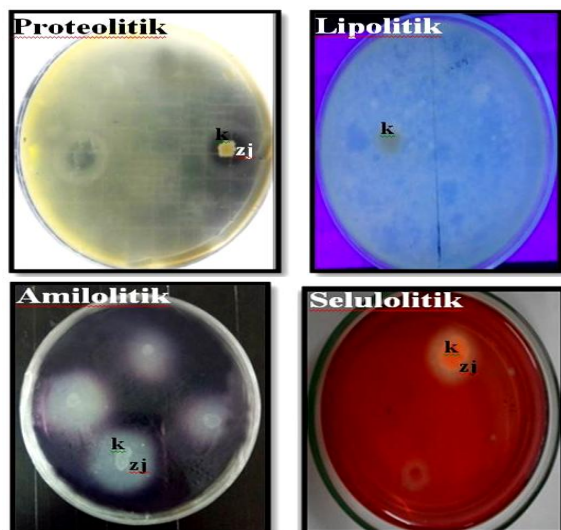
Karakterisasi dilakukan pada bakteri yang memiliki aktivitas enzimatik ekstraseluler. Sifat-sifat yang dikarakterisasi pada isolat bakteri uji adalah karakter fenotipik yang meliputi karakter morfologi (koloni dan sel), biokimia dan fisiologis (Bangun, 1987; Lay, 1994). Karakter fenotipik dan komponen karakter yang diamati disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakter Fenotipik Bakteri Terpilih untuk Karakterisasi dan Identifikasi Numerik Fenetik

No	Karakter Fenotipik	Komponen Karakter yang Diamati
1	Morfologi koloni	Bentuk, ukuran, tepi, struktur dalam, elevasi dan warna koloni.
2	Morfologi sel	Bentuk sel, pengecatan Gram, pembentukan endospora dan motilitas.
3	Biokimiawi	Reaksi katalase, <i>Methyl Red-Voges Proskauer</i> , penggunaan sitrat, produksi indol dan fermentasi karbohidrat,
4	Sifat fisiologis	Pengaruh pH, tekanan osmotik dan temperatur termofilik

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak 36 isolat bakteri yang diisolasi dari sumber air panas Lainea menunjukkan 16 isolat bakteri yang memiliki kemampuan dalam menghasilkan enzim ekstraseluler pada media uji enzimatik ekstraseluler. Bakteri tersebut menunjukkan zona jernih di sekeliling koloninya yang mengindikasikan adanya hidrolisis substrat (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil hidrolisis senyawa protein, lipid, amilum dan selulosa

Aktivitas enzimatik isolat bakteri dapat diketahui berdasarkan adanya

zona jernih yang terdapat disekitar koloni bakteri pada media uji.

1. Bakteri Proteolitik

Aktivitas proteolitik isolat bakteri, dapat diketahui berdasarkan adanya zona jernih yang terdapat disekitar koloni bakteri pada media *skim milk agar*. Zona jernih yang terbentuk mengindikasikan bahwa protein yang terkandung dalam susu skim telah dihidrolisis oleh enzim protease yang dihasilkan oleh isolat bakteri menjadi senyawa sederhana yaitu peptida dan asam amino yang sifatnya terlarut dalam media (Rosliana, 2009). Menurut Susanti (2002) susu skim mengandung kasein yang disertakan kedalam medium pertumbuhan bakteri berfungsi sebagai substrat enzim.

2. Bakteri Lipolitik

Aktivitas lipolitik isolat bakteri, dapat diketahui berdasarkan adanya pendaran warna orange disekitar koloni bakteri pada media minimal lipase (*Rhodamine B Agar*). Isolat bakteri dari sumber air panas Lainea tidak memiliki kemampuan membentuk pendaran warna

orange di bawah sinar UV dengan gelombang 365 nm yang mengindikasikan adanya aktivitas lipolitik.

Menurut Swandi (2015) bakteri yang dapat membentuk pendaran warna orange merupakan bakteri yang dapat mendegradasi lipid karena adanya indikasi aktivitas enzim ekstraseluler lipase yang dihasilkan oleh bakteri tersebut. Hal ini mungkin dipengaruhi oleh kondisi lingkungan isolat bakteri yang memiliki kandungan lipid yang rendah sehingga isolat bakteri telah teradaptasi dengan lingkungan tersebut yang mengakibatkan tidak adanya kemampuan dalam menghidrolisis lipid. Menurut Telussa (2013) bakteri yang tidak mampu menghasilkan enzim lipase dapat diakibatkan oleh 2 hal, yakni sel yang mengkonsumsi asam lemak dan tidak adanya aktivitas lipase yang dihasilkan oleh bakteri sehingga tidak adanya reaksi yang terjadi antara *rhodamin B* dengan asam lemak bebas yang terbentuk dari proses hidrolisis lemak.

3. Bakteri Amilolitik

Aktivitas amilolitik isolat bakteri, dapat diketahui berdasarkan adanya zona jernih yang terdapat di sekitar koloni bakteri pada media agar pati 1% ditambahkan larutan *iodine*. Terbentuknya zona bening merupakan hasil aktivitas enzim amilase pada daerah tersebut. Zona bening yang terbentuk di sekeliling isolat setelah ditetesi larutan *iodine* mengindikasikan bahwa enzim

amilase diproduksi oleh isolat, sehingga di daerah tersebut pati telah dihidrolisis menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti disakarida atau monosakarida. Sedangkan terbentuknya warna biru-kehitaman disebabkan karena adanya reaksi antara larutan *iodine* dengan pati yang tidak terhidrolisis (Irdawati, 2015). Apun *et al.*, (2000), menyatakan bahwa larutan *iodine* tidak memberikan warna dengan polimer karbohidrat yang kurang dari lima gugus monosakarida, misalnya glukosa.

Reaksi warna biru-kehitaman terbentuk karena *iodine* berikatan dengan cara masuk ke dalam bagian kosong pada molekul pati yang berbentuk spiral. Proses iodinisasi pada pati menghasilkan molekul yang dapat menyerap cahaya. Amilum yang telah dihidrolisis oleh enzim amilolitik ekstraseluler menjadi gula yang lebih sederhana (maltosa atau glukosa) tidak memiliki kemampuan untuk berikatan dengan *iodine* sehingga tampak sebagai zona jernih. Molekul gula yang sederhana tidak memiliki bentuk spiral sehingga tidak akan terjadi reaksi warna biru-kehitaman (Lay, 1994).

4. Bakteri Selulolitik

Aktivitas selulolitik dapat diketahui berdasarkan terbentuknya zona jernih di sekitar koloni bakteri pada media agar *carboxymethyl cellulose* (CMC) setelah ditambahkan larutan *congo red* dan dicuci dengan NaCl 1 M. Pengujian adanya aktivitas selulolitik ditunjukkan dengan adanya zona jernih pada media CMC

agar setelah diberi pewarna *congo red*. *Congo red* merupakan zat warna asam yang bermuatan negatif yang tidak dapat berikatan dengan muatan negatif yang terdapat dalam dinding sel, sitoplasma dan membran sel mikroorganisme. Sehingga zat warna ini tidak mewarnai mikroorganisme tetapi mewarnai latar belakang sediaan (media pembiakan). Hal ini mengakibatkan daerah di sekitar mikroorganisme dengan media terlihat lebih kontras dan daerah bening yang terbentuk akan semakin jelas (Lay, 1994). Daerah bening terbentuk karena ikatan β 1,4-Glikosida yang ada pada substrat CMC diputus oleh aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri

tersebut (Indrawati, 2005; Sudaryati, 1993).

Berdasarkan hasil uji potensi bakteri potensial penghasil enzim ekstraseluler menunjukkan bahwa isolat bakteri dari sumber air panas Lainea memiliki kemampuan dalam menghasilkan enzim ekstraseluler diantaranya enzim protease, amilase dan selulase. Besarnya zona jernih yang terbentuk tergantung pada besarnya kemampuan bakteri dalam mendegradasi molekul yang kompleks menjadi molekul sederhana (Bala *et al*, 2014). Hasil uji potensi bakteri berdasarkan aktivitas proteolitik, lipolitik, amilolitik dan selulolitik dapat disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Uji Potensi Bakteri Berdasarkan Aktivitas Enzimatik

No	Kode Isolat	Proteolitik (mm ²)	Lipolitik (mm ²)	Amilolitik (mm ²)	Selulolitik (mm ²)
1	LAW.I1	-	-	62,51	-
2	LAW.I2	-	-	211,60	5,78
3	LAW.II1	-	-	192,2	-
4	LAW.II2	-	-	189,90	-
5	LAW.II3	-	-	58,45	-
6	LAW.II4	-	-	142,22	20,26
7	LAW.III1	12,30	-	137,13	38,3
8	LAW.III2	-	-	96,56	-
9	LAS.I2	30,70	-	229,61	61,62
10	LAS.III2	27,31	-	178,41	8,76
11	LCW.I	-	-	125,18	-
12	LCW.II	-	-	-	27,20
13	LCW.III	-	-	119,62	29,96
14	LCS.I	-	-	68,01	33,93
15	LCS.II	-	-	126,24	-
16	LCS.III	-	-	225,46	-

LAW = Lainea zona A Air (Water)
 LBW = Lainea zona B Air (Water)
 LCW = Lainea zona C Air (Water)

LAS = Lainea zona A Sedimen
 LBS = Lainea zona B Sedimen
 LCS = Lainea zona C Sedimen

Hasil seleksi pada Tabel 1 menunjukkan bahwa dari ke 16 isolat bakteri dari air panas Lainea yang

berpotensi sebagai penghasil enzim ekstraseluler, terdapat 3 isolat bakteri yang memiliki kemampuan ganda dalam

menghasilkan 3 jenis enzim ekstraseluler yang berbeda, yaitu LAW.III1, LAS.I2 dan LAS.III2 berdasarkan kemampuannya dalam menghidrolisis substrat yang mengandung pati, selulosa dan protein. Tiga isolat bakteri yang berpotensi sebagai penghasil enzim ekstraseluler selanjutnya

dikarakterisasi secara fenotipik untuk menentukan karakter isolat bakteri.

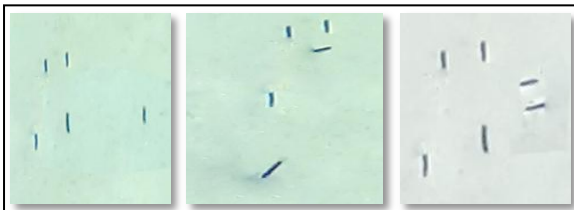
Karakter Morfologi Sel Bakteri

Karakter morfologi koloni bakteri potensial penghasil enzim ekstraseluler dilakukan berdasarkan pengamatan pada media *Nutrient Agar* (NA), pada Tabel 3.

Tabel 3. Karakter Morfologi Sel Bakteri

No.	K. Isolat	Bentuk Sel	Gram	Endospora	Motilitas
1	LAW.III1	Batang	Positif	-	Motil
2	LAS.I2	Batang	Positif	-	Motil
3	LAS.III2	Batang	Positif	-	Motil

Berdasarkan tabel 3 menunjukkan bahwa tiga isolat bakteri memiliki bentuk sel batang, Gram positif, tidak menghasilkan endospora dan bersifat motil.



Gambar 3. Morfologi sel isolat bakteri perbesaran 400x

Identifikasi Bakteri Potensial Penghasil Enzim Ekstraseluler

Metode yang digunakan untuk menganalisis karakter fenotip isolat bakteri dengan karakter kunci genus (*key character*) tertentu dalam *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994).

Tabel 4. Karakter kunci Listeria dan Cellulomonas dengan Isolat Bakteri

Karakter	Listeria	Cellulomonas	LAW.III1	LAS.I2	LAS.III2
Bentuk sel	Batang	Batang	Batang	Batang	Batang
Sifat Gram	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif
Motilitas	Positif	Negatif	Positif	Positif	Positif
Endospora	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Katalase	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif

Indeks similaritas antara bakteri LAW.III1, LAS.I2, LAS.III2 dan genus *Listeria* menunjukkan bahwa ketiga isolat bakteri potensial penghasil enzim ekstraseluler memiliki hubungan kekerabatan yang cukup tinggi dengan genus *Listeria*. Hal ini mengindikasikan bahwa bakteri LAW.III1, LAS.I2 dan

LAS.III2 kemungkinan besar merupakan anggota genus *Listeria*.

Nilai indeks similaritas dipengaruhi oleh karakter yang dimiliki masing-masing bakteri uji. Semakin banyak kesamaan karakter uji, maka nilai similaritas akan tinggi. Sebaliknya, jika semakin banyak perbedaan karakter bakteri uji maka nilai

similaritas akan rendah. Semakin tinggi nilai similaritas antar bakteri uji maka hubungan kekerabatannya semakin dekat, demikian sebaliknya semakin rendah nilai similaritas antar bakteri uji maka hubungan kekerabatannya semakin jauh.

SIMPULAN

1. Enam belas isolat bakteri termofilik asal sumber air panas Lainya memiliki kemampuan untuk menghasilkan enzim ekstraseluler, dimana terdapat 3 isolat yang memiliki kemampuan ganda dalam menghasilkan enzim ekstraseluler dalam 1 isolat.
2. Karakteristik isolat bakteri berdasarkan karakter fenotipik yang meliputi karakter morfologi koloni dan sel, karakter biokimia dan karakter fisiologi.

SARAN

Perlu dilakukannya penelitian lebih lanjut mengenai identifikasi isolat bakteri termofilik potensial penghasil enzim ekstraseluler asal sumber air panas Lainya secara molekuler untuk mengetahui identitas isolat bakteri sampai ke tingkat spesies atau strain.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kemenristekdikti atas bantuan dana penelitian melalui PKM 2017.

DAFTAR PUSTAKA

Apun, K., Jong, B.C., and Salleh, M.A., 2000, Screening and Isolation of a Cellulolytic and Amylolytic Bacillus

from Sago Pith Waste, *J. General Applied Microbiology*, **46**:263-267

Bala, J. D., Lalung, J., and Ismail, N., 2014, Biodegradation of Palm Oil Mill Effluent (POME) by Bacterial, *J. International of Scientific and Research Publications*, **4(3)**: ISSN 2250-3153.

Bangun, A., 1987, *Isolasi dan Identifikasi*, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Hermawan D, Sugianto A, Yushantari A, Dahlan, Munandar A, dan Widodo S. 2011. Kajian Panas Bumi Non Vulkanik Daerah Sulawesi Bagian Tenggara. *Prosiding Hasil Kegiatan Pusat Sumber Daya Geologi*.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, J.T., Staley, J.T., dan Williams, S.T., 1994, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Ninth Edition)*, Williams & Wilkins, United States of America.

Indrawati, I., 2005, Isolasi Jamur dari Seresah dan Uji Keefektifannya dalam Penguraian Selulosa, *J. Ilmiah Biologi* **4(2)**: 18–21

Irdawati., dan Biomed, M.F.M., 2011, Isolasi Bakteri Termofilik Penghasil Amylase Dari Sumber Air Panas Rimbo Panti, Pasaman, *Skripsi*, Biologi FMIPA, Universitas Negeri Padang, Padang.

Lay, W. B., 1994, *Analisa Mikroba di Laboratorium Edisi I*, PT. Raja Grafindo Persada, Jakarta.

Pandey A, Nigam P, Soccol CR, Soccol VT, Singh D, and Mohan R. 2000. Advance in Microbial Amylases. *J Biotechnol Appl Biochem* **31**: 135-152.

Pelczar, M. J., dan Chan, E. C., 2010, *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, Universitas Indonesia Press, Jakarta.

Purwani EY, Toharisman, Khasanah E. 2002. Studi Pendahuluan Kitinase Ekstraseluler yang dihasilkan dari Isolat Bakteri Asal Manado. *J Teknologi Pangan* **13(2)**: 111-117.

- Roslina, M., 2009, Aktivitas Enzim Protease Isolat Asal Indonesia pada Berbagai Substrat Limbah Pertanian, *Skripsi*, FMIPA, IPB, Bogor.
- Susanti, E. 2002. Isolasi dan Karakterisasi Protease dari *Bacillus subtilis* 1012M15. *J. Biodiversitas*,**4**:12 – 17
- Swandi, M.K., Periadnadi., dan Nurmiati., 2015, Isolasi Bakteri Pendegradasi Limbah Cair Industry Minyak Sawit, *J. Biologi Universitas Andalas*, **4(1)**: 71-76
- Telussa, I., 2013, Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Lipase dan Karakter Lipase dari *Coco Butter Substitute*, *Prosiding FMIPA Universitas Pattimura*, ISBN: 978-602-97522-0-5