

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI AMILOLITIK *Bacillus* sp. DARI TANAH RHIZOSFER
DESA TEGALWATON KABUPATEN SEMARANG****(ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF AMYLOLYTIC *Bacillus* sp. FROM THE
RHIZOSPHERE SOIL OF TEGALWATON VILLAGE, SEMARANG REGENCY)****Henokh Christian Prasgi¹ Theresia Avilla Jessica Puspitasari¹****¹Program Studi Biologi, Fakultas Biologi, Universitas Kristen Satya
Wacana Corresponding author : henokhchristianprasgi@gmail.com****Abstrak**

Bakteri amilolitik yang memiliki kemampuan menghidrolisis pati menjadi glukosa sebagai sumber energi bagi pertumbuhan bakteri, dapat ditemukan di lingkungan terestrial termasuk lapisan tanah rhizosfer. Enzim amilase berguna secara luas dalam industri, sehingga diperlukan eksplorasi dan penelitian terkait bakteri yang memiliki kemampuan amilolitik. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri amilolitik genus *Bacillus* yang ditemukan pada tanah rhizosfer Desa Tegalwaton, Kabupaten Semarang. Metode dilakukan secara eksperimental di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Biologi, Universitas Kristen Satya Wacana meliputi isolasi dan uji karakter morfologi, biokimia dan fisiologi. Hasil penelitian diperoleh 3 isolat bakteri dengan kode A1, A2 dan A3 yang teridentifikasi sebagai genus *Bacillus* dan memiliki kemiripan dengan *Bacillus thuringiensis*, termasuk dalam bakteri kelompok batang (*rods*) amilolitik yang motil, Gram positif dan memiliki spora. *B. thuringiensis* dapat memfermentasi glukosa, dapat mengubah hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi H_2O dan O_2 . Sebaliknya tidak dapat memanfaatkan sitrat sebagai sumber karbon, tidak dapat mengoksidasi glukosa dan tidak dapat membentuk asetil metil karbinol. *Bacillus thuringiensis* dapat dikembangkan menjadi galur industri untuk enzim amilase. Diperlukan uji molekuler untuk mengidentifikasi spesiesnya secara spesifik.

Kata kunci: Bakteri Amilolitik, *Bacillus* sp, Isolasi, Uji Morfologi, Biokimia dan Fisiologi

Abstract

Amyolytic bacteria have the ability to hydrolyze starch into glucose as an energy source for bacterial growth, can be found in terrestrial environments including the rhizosphere soil layer. Amylase enzymes are widely used in industry, so exploration and research are needed related to bacteria which have amyolytic abilities. This study aims to isolate and characterize amyolytic bacteria of the genus *Bacillus* found in the rhizosphere soil of Tegalwaton Village, Semarang Regency. Experiments carried out experimentally in the Microbiology Laboratory, Faculty of Biology, Satya Wacana Christian University include isolation and character tests of morphology, biochemistry and physiology. The results of the study showed 3 bacterial isolates with codes A1, A2 and A3 identified as *Bacillus* genus and have similarities to *Bacillus thuringiensis*, including in the amyolytic rods group bacteria, Gram positive and have spores. *B. thuringiensis* can ferment glucose, convert hydrogen peroxide (H_2O_2) into H_2O and O_2 . Instead it cannot utilize citrate as a carbon source, it cannot oxidize glucose and cannot forms acetyl methyl carbinol. *Bacillus thuringiensis* can be developed into an industrial strain for amylase enzymes. Molecular tests are needed to identify the specific species.

Keywords: Amyolytic Bacteria, *Bacillus* sp, Isolation, Morphology, Biochemical and Physiology Test

PENDAHULUAN

Tanah merupakan sumber mikroorganisme pengurai pati yang sangat berlimpah. Berbagai jenis tanah mengandung berbagai jenis mineral dan nutrisi di dalamnya yang memengaruhi diversitas mikroorganisme, sehingga beberapa penelitian tentang mikroorganisme terkait penguraian pati dari berbagai sumber tanah dengan aktivitas amilase sangat bervariasi dalam uji morfologi, biokimia dan fisiologi (Serin *et al.*, 2012). Amilase diproduksi oleh berbagai organisme mulai dari prokariota (bakteri) sampai eukariota (tanaman dan manusia), diekstraksi dari beberapa mikroorganisme termasuk ragi, bakteri, actinomycetes dan jamur. Amilase yang diekstraksi dari bakteri dan jamur telah mendominasi berbagai aplikasi di industri berbasis bioteknologi. α -amilase yang dihasilkan dari *Bacillus* spp. memutus ikatan α -1,4 pada *endo fashion*, enzim dari *B. licheniformis* digunakan dalam mencairkan pati dan tepung maizena, *B. halodurans* berperan dalam sakarifikasi (Schallmeyer *et al.*, 2004). Pernyataan tersebut diperkuat oleh Souza dan Magalhaes (2010) bahwa enzim amilase hanya dapat ditemukan dari berbagai jenis makhluk hidup seperti tanaman, hewan, manusia, sampai mikroba. Enzim amilase yang berasal dari mikroba umumnya

mempunyai spektrum yang lebih luas dalam industri sebab sifatnya lebih stabil jika dibandingkan yang berasal dari tanaman dan hewan. Banyak mikroorganisme yang berpotensi menghasilkan amilase antara lain *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stercorophilus* dan lain-lain (Pokhrel *et al.*, 2013). Saat ini diketahui sekitar 3000 enzim tetapi hanya sedikit yang telah dimanfaatkan di industri, terutama enzim hidrolitik ekstraseluler yang mendegradasi polimer alami seperti protein, selulosa, pektin dan pati menjadi monomer yang lebih sederhana (Alariya *et al.*, 2013). Amilase adalah enzim penting untuk digunakan dalam industri pengolahan pati untuk konversi polisakarida (pati) menjadi monosakarida (glukosa). Beberapa sektor industri menggunakan enzim amilase dalam produksi seperti glukosa dan fruktosa dalam pembuatan sirup. Pati mengalami pengurangan berat molekul supaya mendapatkan viskositas dan kemanisan dalam industri, mampu bertindak dalam proses hidrolisis bersama-sama dengan selulase, protease dan lipase (koktail enzimatik) Van der Maarel *et al.*, (2002). Amilase dimanfaatkan untuk menghasilkan etanol, dibuat dari substrat seperti pati melalui proses hidrolisis enzimatik. Substrat tersebut melimpah di alam dengan biaya produksi yang rendah (Chi *et al.*, 2009).

Langkah identifikasi bakteri amilolitik sangat diperlukan agar isolat yang didapatkan bisa dikembangkan sebagai galur industri melalui serangkaian uji karakteristik meliputi morfologi, biokimia dan fisiologi, seperti pewarnaan spora, KOH string dan pewarnaan gram. Spora pada bakteri biasa disebut dengan endospora dan terbentuknya endospora dalam kultur bakteri dapat dideteksi dengan pewarnaan malachite green. Lapisan endospora yang sangat keras mengakibatkan diperlukannya penguapan untuk memungkinkan penetrasi zat warna (Sandle, 2016). Tes kalium hidroksida (KOH) merupakan uji untuk membuktikan bakteri gram negative. Dengan adanya tes ini mengakibatkan dinding sel gram negatif rusak melepaskan bahan kromosom kental, ini menyebabkan suspensi bakteri menjadi tebal dan berserat, sehingga dapat melisis sel termasuk DNA bakteri tersebut (Public Health England, 2018).

Tujuan penelitian ini untuk mengkarakterisasi dan mendapatkan isolat *Bacillus* sp. dari rhizosfer yang memiliki kemampuan amilolitik

METODE PENELITIAN

Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Maret - April 2022. Sumber isolat berasal dari tanah rhizosfer di Desa Tegalwaton, Kabupaten Semarang, Provinsi Jawa Tengah. Uji karakter morfologi, biokimia dan fisiologi dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Biologi, Universitas Kristen Satya Wacana, Kota Salatiga. Isolasi bakteri amilolitik dilaksanakan pada tanggal 3 – 8 Maret 2022, uji hidrolisis pati dilaksanakan tanggal 9 – 15 Maret 2022 serta uji morfologi, biokimia dan fisiologi dilaksanakan tanggal 26 Maret – 5 April 2022.

Bahan dan Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, kapas, ose, jarum, batang L (*spreader*), bunsen spiritus, mikroskop merek Olympus CX22, autoklaf merek Hirayama, vortex merek Termoline, *cover glass*, *objek glass* merek Sail Brand, korek api, pilus, pipet ukur merek HBG, plastik wrap (*cling*), spidol permanen, solasi. Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini yaitu medium NA, medium Simon Citrate, medium TSA, medium SIM, medium cair MR-VP (*glucose phosphate broth*), malachite green, kristal violet (Gram A), iodine (Gram B), alkohol + aseton (Gram C), safranin (Gram D), KOH, barit A, barit B, metil red, akuades, larutan garam fisiologis.

Prosedur Penelitian

a. Sterilisasi alat dan bahan

Alat dibungkus menggunakan kertas HVS atau plastik tahan panas, diikat lalu dimasukkan ke dalam autoklaf selama 30 menit pada suhu 121°C untuk disterilisasi (Artha *et al.*, 2019).

b. Pembuatan medium isolasi dan identifikasi

Pembuatan medium isolasi dan identifikasi mengikuti prosedur dari Bergey *et al.*, (2009) dengan modifikasi untuk tahapan isolasi (NA), uji hidrolisis pati (NA-*starch*), uji katalase, Simon Citrate, fermentasi glukosa, MR-VP dan motilitas. Setiap bahan medium ditimbang, diberi akuades lalu dipanaskan dengan *hotplate* sampai semua komponen medium terlarut. Selanjutnya dididamkan agar hangat, dituang ke cawan petri ataupun tabung (medium miring), diamkan agar mengeras

c. Pengambilan sampel

Sampel didapatkan dari tanah rhizosfer Desa Tegalwaton, Kabupaten Semarang, Provinsi Jawa Tengah. Tanah diambil dari kedalaman 15 cm dari permukaan tanah, ditimbang sebanyak 1,0 gram, dibuat 2 kali ulangan (tanah A dan B) (Setyati dan Subagiyo, 2012).

d. Isolasi bakteri amilolitik dari tanah rhizosfer

1,0 gram tanah rhizosfer disuspensikan ke larutan garam fisiologis 9 mL pada tabung reaksi. Selanjutnya diencerkan secara bertingkat sampai 10^{-4} , diambil 0,1 mL larutan suspensi dan disebar ke permukaan medium NA, lalu diinkubasi selama 24 – 48 jam (Setyati dan Subagiyo, 2012). Langkah tersebut diulangi untuk tanah B. Teknik goresan (*streak*) dilakukan untuk mendapatkan isolat murni, lalu dilakukan uji morfologi, biokimia dan fisiologi.

e. Uji morfologi, biokimia dan fisiologi isolat

Uji biokimia dimulai dengan uji hidrolisis pati, pertama diinokulasikan isolat ke medium NA-starch, diinkubasi selama 24 – 48 jam. Ditetesi lugol pada permukaan koloni, amati terbentuknya zona terang (berlaku reaksi positif) (Setyati dan Subagiyo, 2012). Pada uji dengan pewarnaan gram, langkah pertama yang dilakukan adalah *objek glass* yang berisi isolat bakteri ditetesi dengan Gram A, kemudian didiamkan selama 1 menit dibuang dan dibilas, setelah itu ditetesi Gram B, didiamkan selama 1 menit dibuang dan dibilas. Lalu, ditetesi dengan Gram C dibiarkan mengalir dan dibilas. Tahap terakhir, ditetesi dengan Gram D kemudian dibuang, dibilas dengan akuades. Larutan Gram yang berlebih diseka dengan tisu lalu isolat pada gelas objek diamati di bawah mikroskop (warna biru/ungu adalah Gram positif) (Wulandari dan Purwaningsih, 2019). Pada uji dengan spora, langkah yang dilakukan adalah *objek glass* yang sudah berisikan isolat bakteri dipanaskan. Selama pemanasan, ditetesi dengan malachit green selama 15 menit dan malachit green jangan sampai kering, diamati di bawah mikroskop (warna hijau menunjukkan bagian spora (generatif) (Wulandari dan Purwaningsih, 2019). Pada uji dengan KOH string test, langkah pertama yang dilakukan adalah mengambil sedikit isolat bakteri dari cawan petri dan dipindahkan ke objek glass yang sudah berisi KOH. Kemudian, ose diangkat sedikit dan diamati apakah terdapat seperti serat putih yang mengental atau tidak (Vetbact, 2017). Pada uji dengan katalase, langkah yang harus dilakukan adalah medium TSA ditetesi dengan H_2O_2 dan nantinya menghasilkan gelembung atau tidak (Capucino dan Sherman, 1983; Lay, 1994). Pada uji MR dan VP, langkah yang dilakukan MR adalah ditetesi sebanyak 5 tetes metil red dan pada VP ditetesi menggunakan barit A dan barit B sebanyak 5 tetes. Kemudian, divortex agar tercampur rata, diamati terjadi perubahan warna (+) (Libretexts, 2021a). Pada uji fermentasi glukosa, diinokulasikan ose yang terdapat isolat bakteri ke tabung reaksi berisi *glucose phosphate broth*, diamati selama 48 jam terjadi perubahan warna disertai kemunculan gas (Libretexts, 2021b). Pada uji motilitas, media dalam tabung reaksi ditusuk, kemudian ditunggu apakah selanjutnya terdapat penyebaran pada daerah tusukan tersebut. Pada uji Simon Citrate, langkah yang dilakukan adalah isolat bakteri dari cawan petri dipindahkan ke tabung reaksi dengan cara dikorek. Kemudian saat pemindahan ke tabung reaksi yang sudah berisi reagen Simon Citrate digoreskan di dalamnya dan ditunggu selama 2 hari apakah warna berubah atau tidak (Wulandari dan Purwaningsih, 2019).

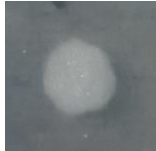
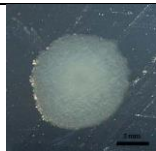
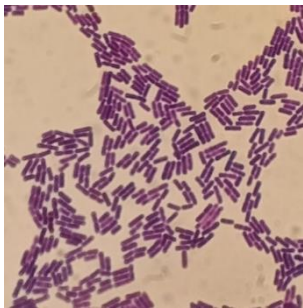
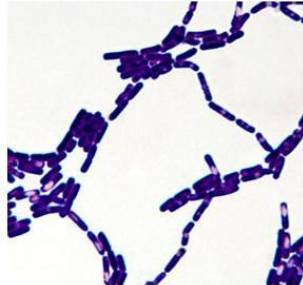
HASIL DAN PEMBAHASAN

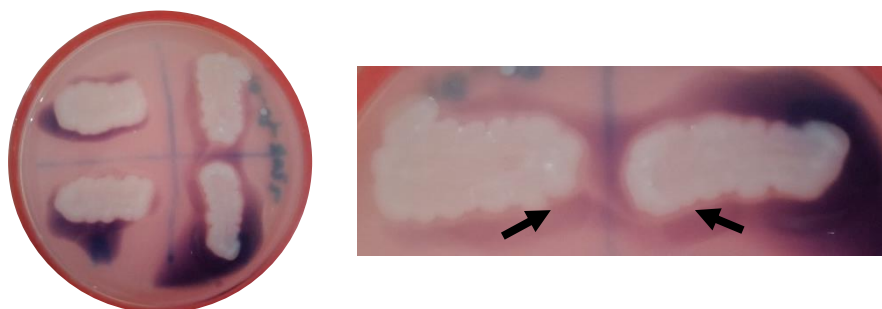
Isolasi Bakteri Amilolitik dari Tanah Rhizosfer

Isolasi dari 2 ulangan tanah rhizosfer (A dan B) menggunakan teknik goresan (*streak*) mendapatkan 3 tipe koloni yang dikode A1, A2 dan A3. Isolat murni didapatkan setelah dilakukan *streak* bertingkat sebanyak dua kali. Masing-masing isolat diinokulasikan pada medium NA-starch untuk uji hidrolisis pati, didapatkan hasil kualitatif termasuk kelompok bakteri amilolitik (dapat membentuk zona terang di sekitar koloni) (**Gambar 1**). Setelah uji hidrolisis pati, dilanjutkan dengan uji karakter morfologi, biokimia dan fisiologi yang dideskripsikan pada **Tabel 1** dan **Tabel 2** untuk menentukan genus ataupun spesies isolat bakteri tersebut. Perbandingan hasil dengan pustaka dari Bergey *et al.*, (2009); Adwitiya *et al.*, (2008) dan Luang-In *et al.*, (2019) menunjukkan bahwa ketiga isolat mengindikasikan bakteri *Bacillus* sp. dan memiliki kemiripan dengan *Bacillus thuringiensis*.

Tabel 1. Persamaan karakter morfologi, biokimia dan fisiologi isolat (A1, A2 dan A3) terhadap

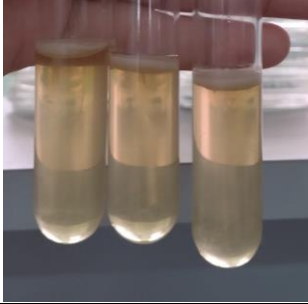
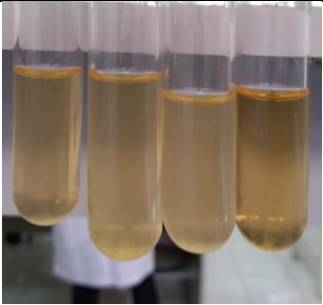
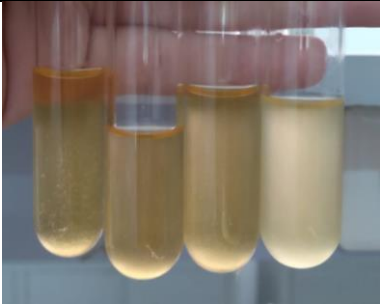
Bacillus thuringiensis berdasarkan pustaka.

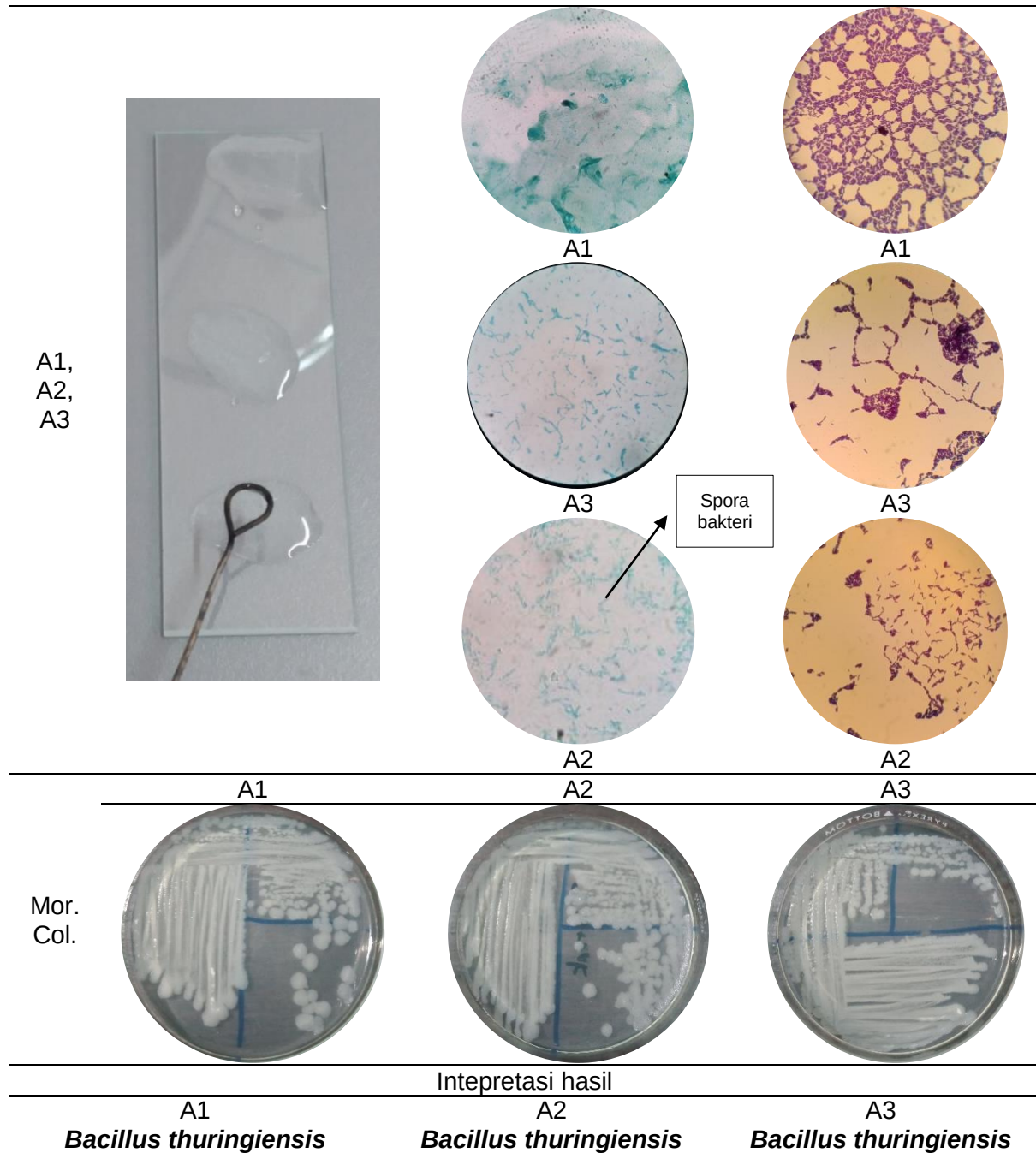
Karakter atau uji	Isolat (A1, A2 dan A3)	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Morfologi		
Bentuk koloni	Bulat (<i>round</i>)/ <i>irregular</i>	Bulat (<i>round</i>)/ <i>irregular</i>
Margin	Bergelombang (<i>undulate</i>)	Bergelombang (<i>undulate</i>)
Tekstur	<i>Rough</i>	<i>Rough</i>
Transparansi	Tidak tembus cahaya	Tidak tembus cahaya
Warna	Putih	Putih
Tampilan koloni		
		(Chai <i>et al.</i> , 2016)
Bentuk sel		
	Batang (<i>rod</i>), <i>diplobacilli</i>	Batang (<i>rod</i>), <i>diplobacilli</i> Zakeel <i>et al.</i> , (2009)
Gram	Positif (ungu)	Positif (ungu)
Spora	Ya	Ya
Biokimia		
Simmon Citrate (S. Cit)	Negatif	Negatif (Abirami <i>et al.</i> , 2016)
Methyl Red (MR)	Negatif	Negatif (Charen <i>et al.</i> , 2014)
Voges Proskauer (VP)	Negatif	Negatif (Abirami <i>et al.</i> , 2016)
Katalase (Cat.)	Positif	Positif (Abirami <i>et al.</i> , 2016)
KOH	Negatif	Negatif (Afriani <i>et al.</i> , 2018)
Hidrolisis Pati	Positif	Positif (Abirami <i>et al.</i> , 2016)
Fisiologi		
Motilitas (Mot.)	Positif	Positif (Abirami <i>et al.</i> , 2016)
Persamaan (%)	100	100



Gambar 1. Uji kualitatif hidrolisis pati. Terbentuk zona bening di sekitar koloni (tanda panah) yang menunjukkan terjadinya hidrolisis amilum (aktivitas amilase)

Tabel 2. Identifikasi isolat bakteri amilolitik berdasarkan uji morfologi, biokimia dan fisiologi.

Kode Isolat	S. Cit.	Mot.	F. Glu.	MR	VP	Cat.	KOH	Spores	Gram
A1	-	+	+ (A), - (G)	-	-	+	-	+	+
A2	-	+	+ (A), - (G)	-	-	+	-	+	+
A3	-	+	+ (A), - (G)	-	-	+	-	+	+
Pengamatan secara visual									
Kode Isolat	S. Cit.			Mot.			F. Glu.		
A1, A2, A3									
Kode Isolat	MR			VP			Cat.		
A1, A2, A3									
	Paling kanan: kontrol			Paling kanan: kontrol					
Kode Isolat	KOH			Spores			Gram		



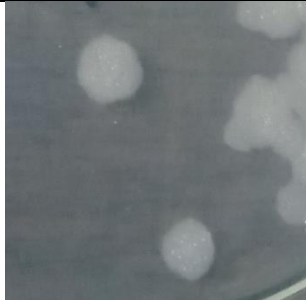
Keterangan: S. Cit. (Simon Citrate), Mot. (motilitas), F. Glu. (fermentasi glukosa), MR (metil merah), VP (Voges Proskauer), Cat. (katalase), KOH (KOH *string*), Spores (cat spora), Gram (pewarnaan Gram), Mor. Col. (morfologi koloni), A (acid), G (gas)

Uji Morfologi Bakteri Amilolitik

Karakter morfologi diidentifikasi melalui pengamatan secara makroskopis (morfologi koloni isolat) dan mikroskopis (morfologi sel melalui pewarnaan spora dan Gram). Seluruh isolat (A1, A2 dan A3) merupakan bakteri bentuk batang (*rods*), Gram positif (berwarna ungu) dan memiliki spora (bentuk bulat berwarna hijau akibat pewarnaan *malachite*). Ketiga isolat menunjukkan kesamaan dengan *Bacillus thuringiensis* karena memiliki bentuk koloni bulat ataupun tidak beraturan (*irregular*), tepi koloni bergelombang, warna koloni putih dengan tekstur permukaan kasar, tidak tembus pandang, Gram positif dan memiliki spora (Astuti *et al.*, 2018; Bergey *et al.*, 2009). Dinding sel *B. thuringiensis* memiliki peptidoglikan tebal yang mengandung polimer anionik bermuatan tinggi (asam teikoat), terdiri dari pengulangan alditol fosfat sehingga saat pengecatan Gram berwarna ungu/biru. Prevalensi asam dinding teikoat dengan D-alanin sangat tinggi pada Gram positif berkaitan dengan

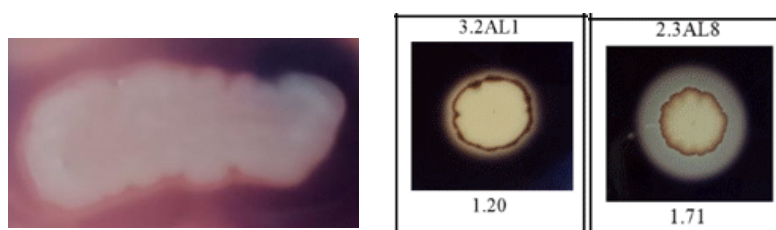
interaksi bakteri patogen dengan inangnya (Kamar *et al.*, 2017). Pada pengamatan ketiga isolat melalui pewarnaan spora menggunakan pewarna *green malachite* di bawah mikroskop (**Tabel 2**), ditemukan adanya endospora (spora yang terbentuk di dalam sel) yang terwarnai hijau dan berbentuk oval/bulat, sesuai dengan penelitian Kassogue *et al.*, (2015) bahwa *B. thuringiensis* memiliki spora internal yang terwarnai hijau dan sel vegetatif terwarnai merah (safranin).

Tabel 3. Karakteristik morfologi koloni dan sel isolat bakteri amilolitik

Karakteristik morfologis	A1	A2	A3
Bentuk koloni	Bulat (<i>round</i>) / <i>irregular</i>	Bulat (<i>round</i>) / <i>irregular</i>	Bulat (<i>round</i>) / <i>irregular</i>
Margin	Bergelombang (<i>undulate</i>)	Bergelombang (<i>undulate</i>)	Bergelombang (<i>undulate</i>)
Tekstur	<i>Rough</i>	<i>Rough</i>	<i>Rough</i>
Transparansi	Tidak tembus cahaya	Tidak tembus cahaya	Tidak tembus cahaya
Warna	Putih	Putih	Putih
Tampilan koloni			
	5-6 mm	5 mm	4-5 mm
Bentuk sel	Batang (<i>rod</i>), <i>diplobacilli</i>	Batang (<i>rod</i>), <i>diplobacilli</i>	Batang (<i>rod</i>), <i>diplobacilli</i>
Gram	Positif (ungu)	Positif (ungu)	Positif (ungu)
Spora	Ya	Ya	Ya

Uji Biokimia Bakteri Amilolitik

Uji biokimia pada penelitian ini meliputi uji hidrolisis pati, Simon Citrate, fermentasi glukosa, uji MR-VP, katalase serta uji KOH string (**Tabel 2**) dan didapatkan bahwa ketiga isolat (A1, A2 dan A3) merupakan bakteri amilolitik. Bakteri amilolitik memiliki enzim beta 1,4 glukosidase yang dapat memfermentasi glukosa. Enzim glukosidase ini akan memecah ikatan beta 1,6 pada rantai cabang dan dekstrin menjadi glukosa (Enny, 2008), kemudian dapat mengubah hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi H_2O dan O_2 ; sebaliknya tidak dapat memanfaatkan sitrat sebagai sumber karbon, tidak dapat mengoksidasi glukosa dan tidak dapat membentuk asetil metil karbinol. Tes biokimia merupakan langkah penting dalam penentuan kelompok bakteri berdasarkan berbagai reaksi kimia yang dapat bernilai positif dan negatif. Berdasarkan perbandingan antara hasil dengan pustaka Bergey *et al.*, (2009); Adwitiya *et al.*, (2009) serta Luang-In *et al.*, (2019), didapatkan bahwa ketiga isolat memiliki kesamaan dengan bakteri *Bacillus thuringiensis* didasarkan pada uji hidrolisis pati, katalase dan glukosa (asam) bernilai positif (+) serta uji Simon Citrate, glukosa (gas), uji MR-VP, dan KOH-string bernilai negatif (-). Pada uji hidrolisis pati, tepi koloni *B. thuringiensis* menghasilkan daerah atau zona bening dengan luasan yang kecil, diduga karena kemampuan setiap spesies yang berbeda dalam menghidrolisis pati. Hasil penelitian dibandingkan dengan Luang-In *et al.*, (2019) ditunjukkan pada **Gambar 2**.



Gambar 2. Perbandingan luasan zona bening pada hidrolisis pati. Kiri: isolat bakteri amilolitik, kanan: kode 3.2AL1 = *B. thuringiensis* IARI-IIWP-38, kode 2.3AL8 = *Bacillus cereus* DFT-1 (Luang-In et al., 2019)

Pada pengujian Simon Citrate pada medium agar miring (*slant tube*), warnanya tetap sama (hijau) sehingga berlaku reaksi negatif. Hal tersebut disebabkan karena ketiga isolat bakteri tidak menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal. Mac-Williams, (2009) menjelaskan bahwa pada saat asam organik sitrat digunakan sebagai sumber karbon dan energi tunggal, karbonat alkali dan bikarbonat akan dihasilkan, lalu mengubah indikator pH yang membuat warna medium berubah menjadi biru (berlaku reaksi positif). Uji fermentasi glukosa berlaku positif menunjukkan bahwa *B. thuringiensis* dapat memanfaatkan glukosa dalam fermentasi menjadi sumber energi dan karbon (enzim yang berperan glukosidase). KOH-string negatif memberikan nilai berlawanan dengan uji Gram, sehingga uji Gram positif maka KOH-string negatif. Aryal, (2019) menjelaskan bahwa prinsip tes KOH-string yaitu potassium hidroksida dapat melarutkan peptidoglikan yang tipis (Gram negatif) dan sebaliknya bagi Gram positif, sehingga kromosom dan DNA terlisiskan dan mengental, memunculkan benang saat ose dinaik-turunkan. Uji MR-VP digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam mengoksidasi glukosa dengan menghasilkan asam sebagai produk akhir, sehingga kondisi pH berubah dan apabila ditetesi metil merah akan mengubah warnanya dari kuning ke merah (reaksi berlaku positif). Pada uji katalase, enzim katalase menginisiasi pemecahan hidrogen peroksida menjadi oksigen dan air, sehingga dihasilkan gelembung (reaksi berlaku positif) (Aryal, 2019)

Uji Fisiologi Bakteri Amilolitik

Karakter fisiologis dapat dilihat melalui uji motilitas (pergerakan sel) (**Tabel 2**) di mana didapatkan pada ketiga isolat menunjukkan reaksi positif (koloni mengalami pergerakan dari tengah medium ke pinggir). Aryal, (2019) menjelaskan bahwa bakteri motil akan melewati medium SIM (*Sulphate Indole Motility*) sehingga dalam interval waktu tertentu akan mengalami kekeruhan atau bagian koloni tengah yang menjalar ke pinggir.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan penelitian, dapat disimpulkan bahwa isolat bakteri tanah rhizosfer dari Desa Tegalwaton Kabupaten Semarang dengan kode A1, A2 dan A3 merupakan bakteri genus *Bacillus* sp. dan memiliki kemiripan dengan *Bacillus thuringiensis* berdasarkan uji morfologi, biokimia dan fisiologi. Ketiga isolat menunjukkan hasil positif pada hidrolisis pati, fermentasi glukosa, katalase, cat spora dan Gram serta motilitas, dan berlaku negatif pada uji MR-VP, sitrat dan KOH-string. Ketiga isolat memiliki kemampuan amilolitik dan berpotensi untuk dikembangkan menjadi *strain* bakteri skala industri untuk enzim amilase.

SARAN

Diperlukan penggunaan metode lain terkait isolasi dan karakterisasi bakteri amilolitik seperti uji indole, urease dan fermentasi TSI dan berbagai sumber glukosa agar penentuan spesies semakin tepat. Selain itu, dapat dilakukan penelitian lanjutan mengenai aktivitas enzimatik lainnya (selulolitik, lipolitik, dan sebagainya) yang dimiliki oleh kelompok *Bacillus* sp. dari Desa Tegalwaton, Kabupaten Semarang.

DAFTAR PUSTAKA

- Abirami, P., Pornima, K., Suguna P., Saranya, V., Selvanayagam, P. & Shenbagarathai, R. (2016). Phenotypic Characterization of an Indigenous *Bacillus thuringiensis* Strain (*B.t.* LDC 501) Expressing Cancer Cell Killing Protein. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 4(2), 232-241. [http://dx.doi.org/10.18006/2016.4\(2\).232.241](http://dx.doi.org/10.18006/2016.4(2).232.241)
- Adwitiya, P., Ashwini, P., Avinash, K. A., Badri, R., Kajal, D., Voms, P., & Srividya, S. (2009). Mutagenesis of *Bacillus thuringiensis* IAM 12077 for increasing poly (- β -) hydroxybutyrate (PHB) production. *Turk J Biol*, 33 (2009), 225–230. <https://doi.org/10.3906/biy-0808-10>

- Afriani, S. R., Pujiastuti, Y., Irsan, C., Damiri, N., Nugraha, S. & Sembiring, E. R. (2018). Isolation and toxicity test of *Bacillus thuringiensis* from Sekayu region soil, South Sumatra on *Spodopteralitura*. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 102(2018) 012066. doi :10.1088/1755-1315/102/1/012066
- Alariya, S.S., Sethi, S. & Gupta, B.L. (2013). Amylase Activity of A Starch Degrading Bacteria Isolated from Soil. *Archives of Applied Science Research*, 5(1), 15-24.
- Aryal, S. (2019a). Potassium Hydroxide Test – Principle, Procedure, Uses and Interpretation. Online access. <https://microbiologyinfo.com/potassium-hydroxide-test/>.
- Aryal, S. (2019b). Catalase Test- Principle, Uses, Procedure, Result Interpretation with Precautions. Online access. <https://microbiologyinfo.com/catalase-test-principle-uses-procedure-result-interpretation-with-precautions/>.
- Aryal, S. (2019c). Motility Test – Principle, Procedure, Uses and Interpretation. Online access. <https://microbiologyinfo.com/motility-test/>.
- Astuti, D. T., Pujiastuti, Y., Suparman, S. H. K., Damiri, N., Nugraha, S., Sembiring, E. R., & Mulawarman. (2018). Exploration of *Bacillus thuringiensis* Berl. from soil and screening test its toxicity on insects of Lepidoptera order. *International Symposium on Food and Agro-Biodiversity*, 102(012063), 1–8. <https://doi.org/doi:10.1088/1755-1315/102/1/012063>
- Bergey, D. H., Whitman, W. B., De, V. P., Garrity, G. M., & Jones, D. (2009). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Vol. 3*. New York: Springer.
- Capucino, J. G. dan Sherman, N. (1983). *Microbiology A Laboratory Manual*. New York: State University of New York.
- Chai, P. F., Rathinam, X., Ghazali, A. H. & Subramaniam, S. (2016). Characterization of a native *Bacillus thuringiensis* isolates from Malaysia that produces exosporium enclosed parasporal inclusion. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 28(9), 653-659. doi: 10.9755/ejfa.2015-09-714
- Charen, T., Vaishali, P., Kaushalya, M., Amutha, K., Ponnusami, V., & Gowdhaman, D. (2014). Isolation and identification of polyhydroxybutyrate producing bacterial strain (*Bacillus thuringiensis* GVP) from chlorine contaminated soil. *International Journal of ChemTech Research*, 6, 3197-3202.
- Chi, Z., Chi, Z., Liu, G., Wang, F., Ju, L., & Zhang, T. (2009). *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology. *Biotechnology advances*, 27(4), 423-431.
- Enny, W. (2008). Peranan Mikroba Tanah Pada Kegiatan Rehabilitasi Lahan Bekas Tambang. *Jurnal Info Hutan*, 5(2), 151-160.
- Kamar, R., Réjasse, A., Jéhanno, I., Attieh, Z., Courtin, P., Nielsen-Ieroux, C., Lereclus, D., & Sanchis-borja, V. (2017). DltX of *Bacillus thuringiensis* Is Essential for D -Alanylation of Teichoic Acids and Resistance to Antimicrobial Response in Insects. *Front. Microbiol.*, 8(August), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01437>
- Kassogu , A., Ma ga, K., Traor , D., Dicko, A. H., Fan , R., Guissou, T., Faradji, F. A., Valicente, F. H., Hamadoun, A., & Babana, A. H. (2015). Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* (Ernst Berliner) strains indigenous to agricultural soils of Mali. *African Journal of Agricultural Research*, 10(28), 2748–2755. <https://doi.org/10.5897/AJAR2015.9848>.
- Lay, B. W. (1994). *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Jakarta: PT Gradindo Persada.
- Libretexts. (2021a). Lab: 8 Using Biochemical Testing to Identify Bacteria. Online acces. https://bio.libretexts.org/Learning_Objects/Laboratory_Experiments/Microbiology_Labs/Microbiology_Labs_II/Lab_08%3A_Using_Biochemical_Testing_to_Identify_Bacteria.
- Libretexts. (2021b). 7.1: Introduction to Biochemical Tests Part 1. Online access. [https://bio.libretexts.org/Courses/North_Carolina_State_University/MB352_General_Microbiology_Laboratory_2021_\(Lee\)/07%3A_Microbial_Metabolism/7.01%3A_Introduction_to_Biochemical_Tests_Part_I](https://bio.libretexts.org/Courses/North_Carolina_State_University/MB352_General_Microbiology_Laboratory_2021_(Lee)/07%3A_Microbial_Metabolism/7.01%3A_Introduction_to_Biochemical_Tests_Part_I).
- Luang-In, V., Yotchaisarn, M., Saengha, W., Udomwong, P., Deeseenthum, S., & Maneewan, K. (2019). Isolation and identification of amylase-producing bacteria from soil in Nasinuan community forest, Maha Sarakham, Thailand. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 12(3), 1061–1068. <https://doi.org/10.13005/bpj/1735>
- Mac-Williams, M. P. (2009). Citrate Test Protocol. In *American Society for Microbiology* (Issue December 2009, pp. 1–7).

- Pokhrel, B., Wanjare, P., Singh S. (2013). Isolation, screening and characterization of promising-amylase producing bacteria from sewage enriched soil. *Int. J. Adv. Biotechnol. Res.*, 4(2), 286-290.
- Public Health England. (2018). *UK Standards for Microbiology Investigations Potassium hydroxide*. (Issue December 2018, pp. 1-13).
- Sandle, T. (2016). 9 – Microbial identification in *Pharmaceutical Microbiology*. (2016, pp. 103-113).
- Schallmeyer, M., Singh, A., & Ward, O. P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbial.*, 50(2004), 1-17. doi: 10.1139/W03-076
- Souza, P.M. and Magalhães, P.O. (2010). Application of Microbial α -Amylase in Industry – A Review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 850-861. <https://doi.org/10.1590%2FS1517-83822010000400004>
- Serin, B., Akcan, N. and Uyar, F. (2012). Production and optimization of α -amylase from *Bacillus circulans* ATCC 4516 with solid state fermentation. *J. Biol. Chem*, 40(4), 393-400.
- Setyati W. A. & Subagiyo S. (2012). Isolasi dan Seleksi Bakteri Penghasil Enzim Ekstraseluler (Proteolitik, Amilolitik, Lipolitik dan Selulolitik) yang Berasal dari Sedimen Kawasan Mangrove. *Ilm. Kelaut.*, 17(3), 164–168. doi: 10.14710/ik.ijms.17.3.164-169
- Van Der Maarel, M. J., Van der Veen, B., Uitdehaag, J. C., Leemhuis, H., & Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of biotechnology*, 94(2), 137-155.
- Vetbact. (2017). Potassium Hydroxide Test. Online access. <https://www.vetbact.org/>.
- Wulandari, D dan Purwaningsih, D. (2019). Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri Amilolitik pada Umbi *Colocasia esculenta* L. Secara Morfologi, Biokimia dan Molekuler. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains*, 6(2), 247-258. <https://doi.org/10.29122/jbbi.v6i2.3084>
- Zakeel, M. C. M., Dissanayake, D. M. D. & Weerasinghe, P. A. (2009). Molecular Characterization of *Bacillus Thuringiensis* Strains Isolated from A Selected Site In Nochchiyagama, Anuradhapura In Sri Lanka. *Tropical Agricultural Research & Extension*, 12(1), 31-34.