



IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI AMILOLITIK PADA UMBI *Colocasia esculenta* L. SECARA MORFOLOGI, BIOKIMIA, DAN MOLEKULER

Morphological, Biochemical, and Molecular Identification and Characterization of Amylolytic Bacteria in Tubers of *Colocasia esculenta*

Destik Wulandari*, Desi Purwaningsih

Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi

Jln. Letjen Sutoyo Mojosongo, Jebres, Kota Surakarta, Jawa Tengah 57127

*Email: destikhakim@gmail.com

ABSTRACT

Taro tuber (Colocasia esculenta L.) has a high starch content of 77.9% so that it can be used as a substrate from which to isolate amylolytic bacteria. The purpose of this study was to isolate amylolytic bacteria from taro tubers, and subsequently to identify as well as to characterize morphologically, biochemically and molecularly using the 16S rRNA technique. Isolation of amylolytic bacteria was carried out by growing bacterial colonies on starch agar media and then selecting those colonies that had clear zones. Bacteria that produced clear zones were then characterized and identified through Gram staining, spore staining, biochemical test, and 16S rRNA molecular test. Results showed that there were seven positive isolates of amylolytic bacteria namely ECE-1, ECE-2, ECE-3, ECE-4, ECE-5, ECE-6, and ECE-7 isolates. Five isolates were identified using 16S rRNA technique. Identification results showed that the seven isolates obtained were putatively identified as Pseudomonas knackmussii, Bacillus siamensis, Bacillus siamensis, Bacillus subtilis, and Bacillus altitudinis.

Keywords: 16S rRNA analysis, amylase enzyme, amylolytic bacteria, amyllum, taro tuber

ABSTRAK

Umbi talas (*Colocasia esculenta* L.) mempunyai kandungan pati tinggi yakni sebesar 77,9% sehingga dapat digunakan sebagai bahan untuk mengisolasi bakteri amilolitik. Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi bakteri amilolitik dari umbi talas, dan kemudian mengidentifikasi serta mengkarakterisasi secara morfologi, biokimia dan molekuler menggunakan teknik 16S rRNA. Isolasi bakteri amilolitik dilakukan dengan cara menumbuhkan koloni bakteri pada media *starch agar* dan selanjutnya memilih koloni yang mempunyai zona bening. Bakteri yang menghasilkan zona bening kemudian dikarakterisasi dan diidentifikasi menggunakan metode pewarnaan Gram, pewarnaan spora, uji biokimia, dan uji molekuler 16S rRNA. Hasil menunjukkan terdapat tujuh isolat positif bakteri amilolitik yakni isolat ECE-1, ECE-2, ECE-3, ECE-4, ECE-5, ECE-6, dan ECE-7. Lima isolat diidentifikasi dengan teknik 16S rRNA. Hasil menunjukkan bahwa ketujuh isolat tersebut masing-masing secara berurutan diduga teridentifikasi sebagai *Pseudomonas knackmussii*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus subtilis*, dan *Bacillus altitudinis*.

Kata Kunci: analisis 16S rRNA, amyllum, bakteri amilolitik, enzim amilase, umbi talas

PENDAHULUAN

Talas (*Colocasia esculenta* L.) adalah salah satu tanaman penghasil umbi yang dibudidayakan secara luas di Indonesia. Tanaman ini berupa herba menahun yang sering digunakan sebagai tanaman pangan dan termasuk ke dalam suku Araceae (talas-talasan) yang memiliki umbi, dengan tangkai daun yang semu dan permukaan daun yang memiliki bagian yang tahan air. Talas mempunyai banyak kandungan kimia, di antaranya alkaloid, steroid, lemak, fenol, flavonoid, tannin, saponin, protein dan karbohidrat (Subhash et al. 2012; Pawar et al. 2018). Tanaman ini mudah tumbuh di daerah tropis dan memiliki kandungan pati cukup tinggi. Pati pada talas terdiri dari amilosa dan amilopektin. Umbi tanaman talas mengandung 77,9% pati, yang terdiri dari amilosa sebesar 25,78% dan amilopektin sebesar 52,12% (Agama-Acevedo 2011). Kandungan pati umbi garut berkisar antara 80,5–85,6% (Utomo et al. 2012). Tingginya kandungan pati dalam umbi talas memungkinkannya untuk digunakan sebagai substrat yang baik bagi pertumbuhan berbagai macam bakteri, salah satunya bakteri amilolitik. Bakteri amilolitik yang diisolasi dari sumber kaya amilum umumnya berpotensi menghasilkan amilase yang lebih baik (Vaseekaran et al. 2010).

Bakteri amilolitik merupakan jenis bakteri yang memiliki kemampuan menghidrolisis pati atau amilum menjadi senyawa lebih sederhana (Nurmalinda et al. 2013). Bakteri amilolitik adalah jenis bakteri yang dapat memproduksi enzim amilase dan dapat digunakan sebagai biokatalisator dalam proses hidrolisis pati (Türker dan Özcan 2015). Amilase merupakan enzim yang menghidrolisa molekul pati untuk menghasilkan produk bervariasi, salah satunya yaitu dekstrin (Chung et al. 1997). Bakteri amilolitik biasanya banyak terdapat pada media yang banyak mengandung pati atau amilum, misalnya pada biji-bijian, umbi-umbian, sayuran, atau buah-buahan.

Enzim amilase merupakan salah satu enzim yang digunakan dalam proses fermentasi, teknologi bioproses, industri kertas (Mitidieri et al. 2006), industri makanan (Van der Maarel et al. 2002), industri biodiesel (Singh et al. 2014). Enzim ini mempunyai peranan yang luas dalam kehidupan sehari-

hari terutama pada berbagai bidang industri. Sebanyak 30% lebih bidang industri sangat membutuhkan enzim ini di antaranya industri farmasi, tekstil, makanan, detergen dan masih banyak industri lainnya. Kenyataannya produksi enzim amilase masih belum memenuhi kebutuhan industri (Vijayalakshmi et al. 2012). Isolasi dan identifikasi bakteri amilolitik dari berbagai substrat merupakan langkah awal untuk membantu mengatasi kebutuhan produksi enzim amilase. Enzim yang diisolasi dari mikroba memiliki beberapa keunggulan antara lain produksinya tidak terbatas, dapat diproduksi hingga skala tertentu, lebih ekonomis dan produktifitasnya dapat ditingkatkan (Soeka 2010).

Identifikasi bakteri dapat dilakukan dengan berbagai metode, baik secara konvensional maupun yang lebih spesifik secara molekuler. Identifikasi secara konvensional dapat dilakukan dengan pengamatan ciri morfologi, pewarnaan Gram, maupun dari aktivitas enzimatik. Teknik molekuler untuk identifikasi spesies suatu bakteri salah satunya adalah dengan menggunakan analisis 16S rRNA. 16S rRNA berupa sekuens untuk mengidentifikasi bakteri dari urutan pasangan basanya, sehingga diperoleh hasil yang lebih akurat (Kusumawati 2014). Kemiripan urutan basa nukleotida gen 16S rRNA mampu digunakan untuk mengidentifikasi bakteri sampai pada tingkat spesies (Armougom dan Raoult 2009). Sifat variatif suatu basa dapat digunakan untuk melihat galur dalam spesies yang sama. Urutan basa 16S rRNA dapat memperlihatkan derajat persamaan yang rendah pada suatu taksa (Stackebrandt dan Goebel 1995)

Sekuen 16S rRNA digunakan untuk menentukan hubungan kekerabatan strain bakteri melalui proses penyejajaran (Cole et al. 2013). Sekuen 16S rRNA bersifat spesifik untuk prokariot, sehingga kesalahan yang terjadi selama proses penyejajaran nukleotida dapat diminimalisir, yang membedakannya dengan eukariot.

Mengingat peranan enzim amilase yang cukup penting pada berbagai bidang dan produksi yang masih minim mendorong perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai bakteri amilolitik sebagai penghasil enzim amilase. Penemuan spesies bakteri amilolitik yang baru diharapkan mampu digunakan sebagai sumber baru produksi enzim

amilase. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi bakteri endofit yang mempunyai kemampuan amilolitik pada umbi talas (*C. esculenta* L.) serta melakukan karakterisasi dan identifikasi secara morfologi, biokimia dan molekuler.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Mikrobiologi, universitas Setia Budi, Surakarta, Jawa Tengah. Waktu penelitian adalah di bulan April–September 2018.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah umbi Talas (*Colocasia esculenta* L.) yang diambil dari Desa Kalisoloro kecamatan Tawangmangu Kabupaten Karanganyar (7° 40' 11.9" S, 111° 08' 42.8" E), aquades, nutrient agar (NA), Brain Heart Infusion (BHI), Kligler's Iron Agar (KIA), Indole Test (SIM Medium), Lysine Iron Agar (LIA), media Citrat, Gram A, B, C dan D, amilum.

Isolasi bakteri amilolitik

Umbi talas yang sudah dibersihkan dari tanah dan kotoran dikupas. Umbi talas dipreparasi dengan metode maserasi (penghancuran). Tujuan penghancuran ini adalah agar bakteri yang terdapat di permukaan atau di dalam umbi talas dapat terambil semuanya. Hasil maserasi ditimbang sebanyak 5 g dan disuspensikan dalam 45 mL aquades. Hasil suspensi kemudian dibuat seri pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , dan 10^{-3} . Masing-masing seri pengenceran kemudian diambil sebanyak 1 mL dan ditanam pada media NA yang ditambah dengan 2% pati (media *starch agar*). Koloni tunggal yang tumbuh pada media selanjutnya ditetesi dengan iodine. Penambahan iodine digunakan untuk mendeteksi adanya hidrolisis pati oleh aktivitas enzim amilase (Setyati dan Subagiyo 2012). Hidrolisis pati ditandai dengan terbentuknya zona bening pada media setelah ditetesi iodin.

Karakterisasi morfologi koloni bakteri

Karakterisasi koloni bakteri dilakukan setelah koloni bakteri diinkubasi pada media NA selama 24-48 jam. Pengamatan yang dilakukan meliputi tepian koloni, bentuk koloni, elevasi, permukaan koloni, dan warna koloni.

Karakterisasi mikroskopis

Karakterisasi mikroskopis dilakukan dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram dilakukan untuk mengetahui morfologi bakteri dan sifat Gramnya. Pewarnaan Gram menggunakan empat macam cat yakni Gram A (Kristal violet), Gram B (*iodine* Lugol), Gram C (etanol 96%) dan Gram D (Safranin). Bakteri yang mempunyai sifat Gram positif akan berwarna biru keunguan sedangkan bakteri yang mempunyai sifat Gram negatif berwarna merah.

Metode ini menggunakan cat warna malachite green sebagai cat pewarna untuk spora. Pewarnaan dilakukan dengan cara membuat ulasan bakteri dan difiksasi kemudian digenangi dengan malachite green lalu dipanaskan. Tahap selanjutnya mencuci sisa cat malachite green, kemudian ditambahkan cat Safranin untuk pewarnaan sel vegetatif bakteri.

Identifikasi dengan uji biokimia

Identifikasi secara uji biokimia dilakukan dengan menanam isolat bakteri pada media KIA, SIM, LIA dan Citrat. Pada media KIA bakteri diinokulasikan dengan cara tusuk dan gores kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Tujuan inokulasi pada media ini adalah untuk mengetahui



Gambar 1. Tanaman talas (*Colocasia esculenta* L.)

Tabel 1. Karakterisasi secara makroskopis pada isolat bakteri amilolitik dari umbi *C. esculenta* L.

Isolat bakteri	Pengamatan		
	Form	Elevasi	Margins
ECE-1	<i>irregular</i>	<i>flat</i>	<i>undulate</i>
ECE-2	<i>circular</i>	<i>flat</i>	<i>entire</i>
ECE-3	<i>circular</i>	<i>flat</i>	<i>entire</i>
ECE-4	<i>circular</i>	<i>flat</i>	<i>entire</i>
ECE-5	<i>irregular</i>	<i>flat</i>	<i>undulate</i>
ECE-6	<i>irregular</i>	<i>flat</i>	<i>undulate</i>
ECE-7	<i>circular</i>	<i>flat</i>	<i>entire</i>

Tabel 2. Hasil pengukuran zona bening dan pewarnaan Gram bakteri endofit umbi *C. esculenta* L yang mempunyai aktivitas amilolitik

Isolat	Diameter zona bening (mm)	Sifat Gram
ECE-1	11	Gram –
ECE-2	19	Gram +
ECE-3	26	Gram +
ECE-4	17	Gram +
ECE-5	21	Gram +
ECE-6	19	Gram –
ECE-7	11	Gram +

kemampuan fermentasi karbohidrat dan pembentukan sulfida. Media SIM digunakan untuk mengetahui kemampuan pembentukan sulfida oleh bakteri, pembentukan cincin indol dan kemampuan motilitas bakteri. Bakteri diinokulasikan pada media SIM dengan metode tusukan dan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Media LIA digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam mendeaminasi lisin. Bakteri diinokulasikan pada media LIA dengan metode tusuk gores kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Media *citrate* digunakan untuk mengetahui sumber karbon suatu bakteri. Bakteri diinokulasikan pada media *citrate* dengan cara goresan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Identifikasi molekuler dengan 16S rRNA

Bakteri yang mampu menguraikan amilum pada uji hidrolisis kemudian diisolasi DNA genomnya. Bakteri ditumbuhkan pada media BHI dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil Isolasi DNA genom bakteri kemudian diamplifikasi menggunakan primer 16S rRNA. DNA genom dimasukkan dalam tabung PCR sebanyak 5 µL, reagen multmix PCR sebanyak 25 µL, primer *forward* sebanyak 5 µL dan DDH₂O sebanyak 10 µL. Amplifikasi PCR dilakukan dengan

kondisi suhu pradenaturasi 95°C selama 5 menit, suhu denaturasi 95°C selama 30 detik, suhu *annealing* 60°C selama 30 menit dan suhu *extension* 72°C selama 1 menit. Hasil PCR kemudian divisualisasi menggunakan elektroforesis gel agarose.

Sequensing dan analisis gen 16S rRNA

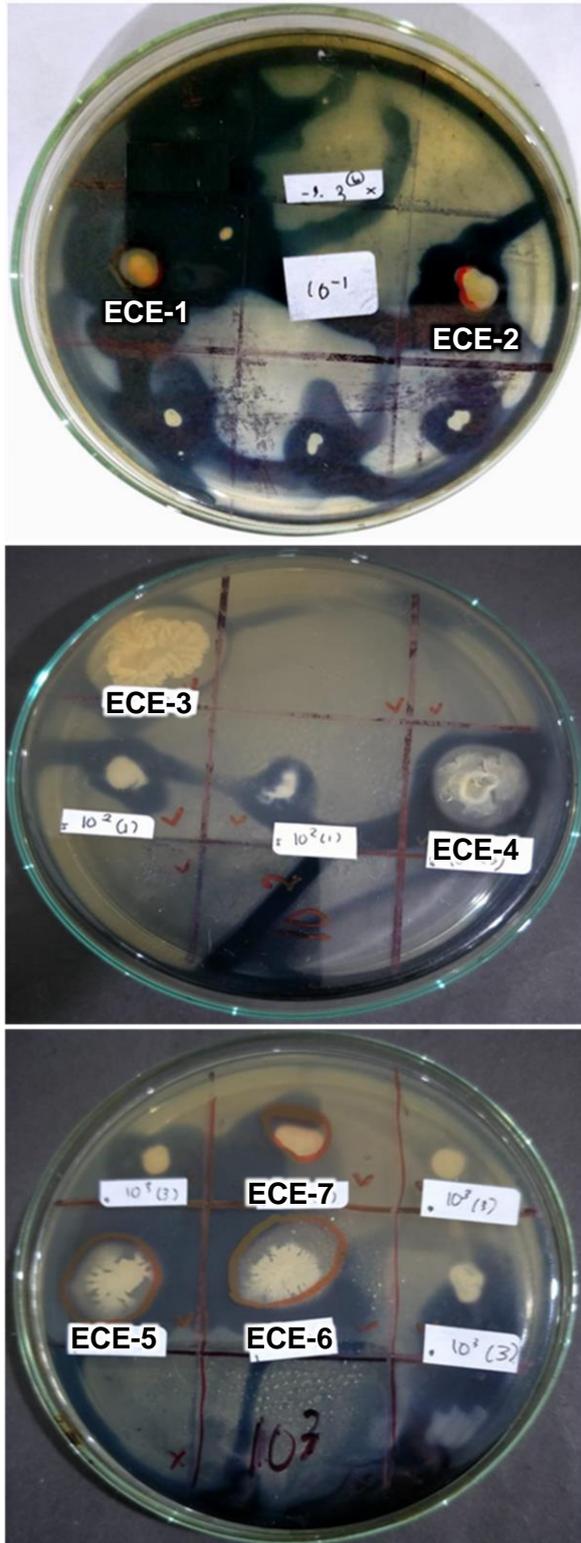
Hasil amplifikasi dari gen 16S rRNA kemudian disekuensing dan dikirim ke Macrogen. Hasil sekuensing kemudian dianalisis menggunakan program bioedit dan dibandingkan dengan data Genbank menggunakan program *nucleotide* Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Data yang diperoleh dianalisis kemiripannya berdasarkan kemiripan fragmen gen 16S rRNA bakteri isolat dengan database serta diperoleh pohon filogenetiknya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi bakteri endofit

Hasil isolasi bakteri endofit dari umbi tanaman *C. esculenta* L. (Gambar 1) diperoleh tujuh isolat bakteri yakni ECE-1, ECE-2, ECE-3, ECE-4, ECE-5, ECE-6 dan ECE-7. Ketujuh isolat tersebut kemudian diamati secara makroskopis dan mikroskopis dengan pewarnaan Gram dan spora. Isolat bakteri endofit dari umbi tanaman *C.*

esculenta L. ditanam pada media NA yang ditambah dengan amilum 2% (Gambar 2). Ketujuh isolat bakteri tersebut menghasilkan diameter zona bening yang berbeda-beda.



Gambar 2. Hasil pengujian amilolitik isolat bakteri endofit dari umbi *C. esculenta* L. setelah inkubasi selama 24 jam pada media NA amilum 2%

Mikroba endofit mampu menghasilkan senyawa yang mirip dengan inangnya, hal ini diduga karena hasil koevolusi atau transfer materi genetic dari inang (Tan dan Zou 2001).

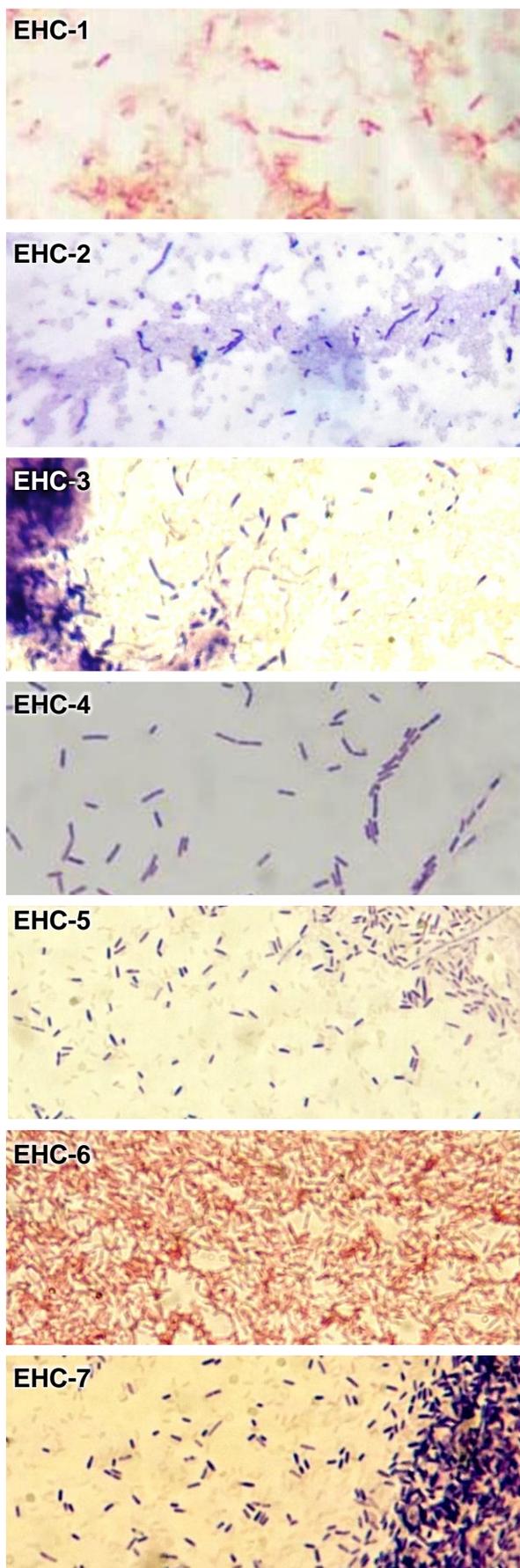
Hasil pengukuran zona bening setiap isolat bakteri yakni, isolat ECE-1 mempunyai diameter zona bening 11 mm, isolat ECE-2 mempunyai diameter zona bening 9 mm, isolat ECE-3 mempunyai diameter zona bening 26 mm, isolat ECE-4 mempunyai diameter zona bening 17 mm, isolat ECE-5 mempunyai diameter zona bening 21 mm, isolat ECE-6 mempunyai diameter zona bening 19 mm dan isolat ECE-7 mempunyai diameter zona bening 11 mm (Tabel 1). Perbedaan zona bening pada setiap isolat bakteri dapat disebabkan oleh jumlah dan aktivitas enzim yang disekresikan berbeda. Zona bening yang terlihat pada sekeliling bakteri yang ditumbuhkan pada medium NA ditambah amilum 2% dan ditetesi Lugol mengindikasikan bahwa bakteri tersebut mempunyai aktivitas amilolitik

Karakterisasi koloni beraktivitas amilolitik

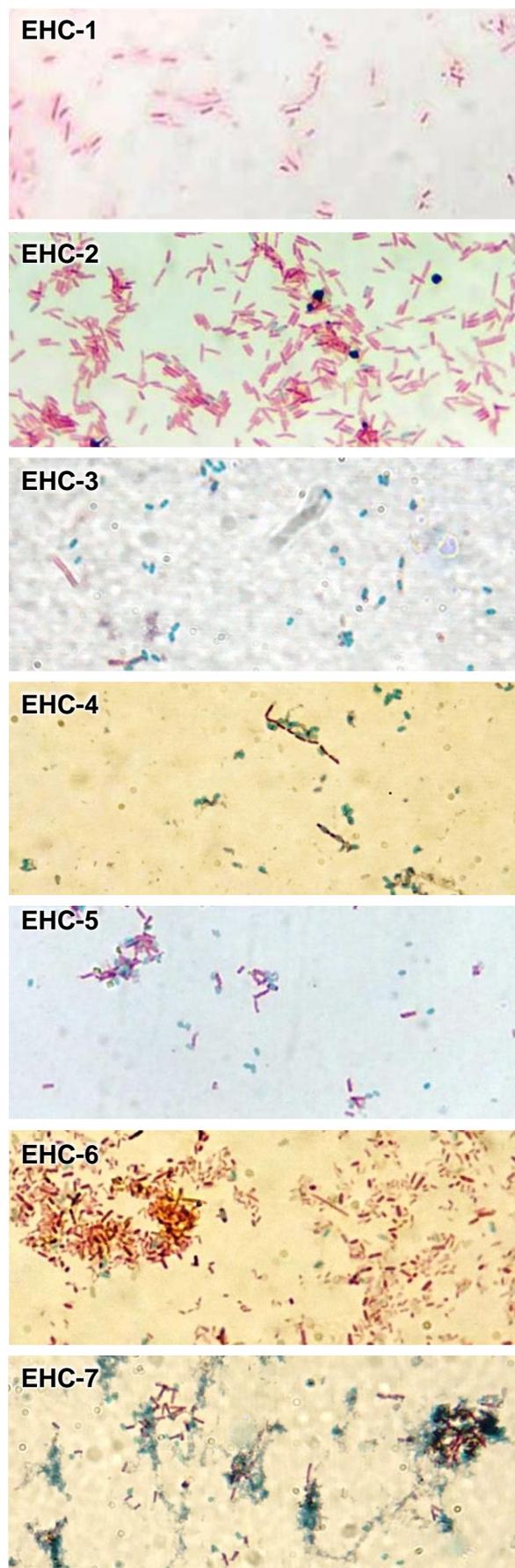
Isolat bakteri yang positif mempunyai aktifitas amilolitik kemudian diidentifikasi secara makroskopis, pewarnaan dan uji biokimia. Identifikasi makroskopis dilakukan dengan menggores bakteri pada media NA dan melakukan pengamatan pada morfologi koloni yang tumbuh pada masing-masing isolat bakteri. Hasil pengamatan morfologi koloni setiap isolat dapat dilihat pada Tabel 2.

Identifikasi dengan pewarnaan Gram dan spora

Identifikasi secara mikroskopis dilakukan dengan pewarnaan Gram dan spora pada masing-masing isolat bakteri. Hasil pewarnaan Gram menunjukkan adanya perbedaan sifat Gram pada isolat bakteri. Dari tujuh isolat diperoleh hasil dua bakteri bersifat Gram negatif dan lima bakteri bersifat Gram positif (Gambar 3). Gram negatif ditandai dengan sel yang berwarna merah dan Gram positif ditandai dengan sel berwarna ungu. Adanya perbedaan warna tersebut dikarenakan komponen penyusun dinding sel bakteri Gram negatif dan bakteri Gram positif berbeda. Bakteri Gram positif dapat mempertahankan cat utama yang berisi kristal violet karena dinding selnya mempunyai kandungan peptidoglikan yang tebal. Bakteri Gram negatif tidak dapat mempertahankan warna cat utama karena



Gambar 3. Hasil pewarnaan Gram pada isolat bakteri endofit dari umbi *C. esculenta* L. (perbesaran 100x)



Gambar 4. Hasil pewarnaan pada spora isolat bakteri endofit dari umbi *C. esculenta* L. (perbesaran 100x)

pada dinding selnya terdapat lapisan lipoprotein yang akan larut ketika dicuci dengan etanol (Gram C) (Pelczar dan Chan 2005). Hasil pewarnaan Gram menunjukkan isolat ECE-1 dan ECE-6 bersifat Gram negatif, sedangkan isolat ECE-2, ECE-3, ECE-4, ECE-5 dan ECE-7 bersifat Gram positif (Tabel 2).

Tujuan dari pewarnaan spora adalah untuk mengidentifikasi bakteri yang mampu menghasilkan spora. Hasil pewarnaan spora menunjukkan bahwa dari ketujuh isolat bakteri yang diperoleh, enam di antaranya mempunyai spora dan satu isolat tidak berspora. Isolat bakteri yang mempunyai spora adalah isolat yakni ECE-2, ECE-3, ECE-4, ECE-5, ECE-6 dan ECE-7 sedangkan isolat ECE-1 tidak menghasilkan spora. Spora adalah bentuk dari bakteri untuk mempertahankan diri dari kondisi yang kurang mendukung untuk kehidupan dari bakteri tersebut.

Spora akan lebih tahan dalam kondisi yang ekstrim misalnya dalam kondisi kering, panas dan adanya senyawa kimia yang bersifat racun terhadap bakteri tersebut. Cat yang digunakan untuk mewarnai spora adalah malachite green. Spora yang berhasil diwarnai akan mengikat kuat cat warna tersebut sehingga ketika ditutup kembali dengan cat warna lain (Safranin) spora akan tetap mempertahankan warna awalnya. Hasil pewarnaan spora menunjukkan spora akan berwarna hijau sedangkan sel vegetatif akan berwarna merah (Gambar 4).

Identifikasi dengan uji biokimia

Tahap identifikasi selanjutnya adalah melakukan uji biokimia dengan menggunakan media KIA, SIM, LIA, dan Citrat. Identifikasi bakteri melalui pendekatan biokimia dilakukan dengan melihat perilaku bakteri terhadap fermentasi gula maupun melihat aktivitas enzim yang dimilikinya (Leonita et al. 2015).

Hasil identifikasi dapat dilihat pada Tabel 3. Hasil inokulasi pada media KIA diperoleh hasil isolat ECE-2 diketahui mampu memfermentasikan glukosa, ditandai dengan bagian dasar media berwarna kuning dan tidak menghasilkan sulfida karena tidak terbentuk warna hitam pada media. Isolat ECE-1, ECE-3, ECE-4, ECE-5, ECE-6 dan ECE-7 tidak mempunyai kemampuan memfermentasikan glukosa maupun laktosa

Tabel 3. Hasil uji biokimia isolat bakteri endofit umbi *C. esculenta* L. menggunakan media KIA, LIA, SIM dan *citrate*

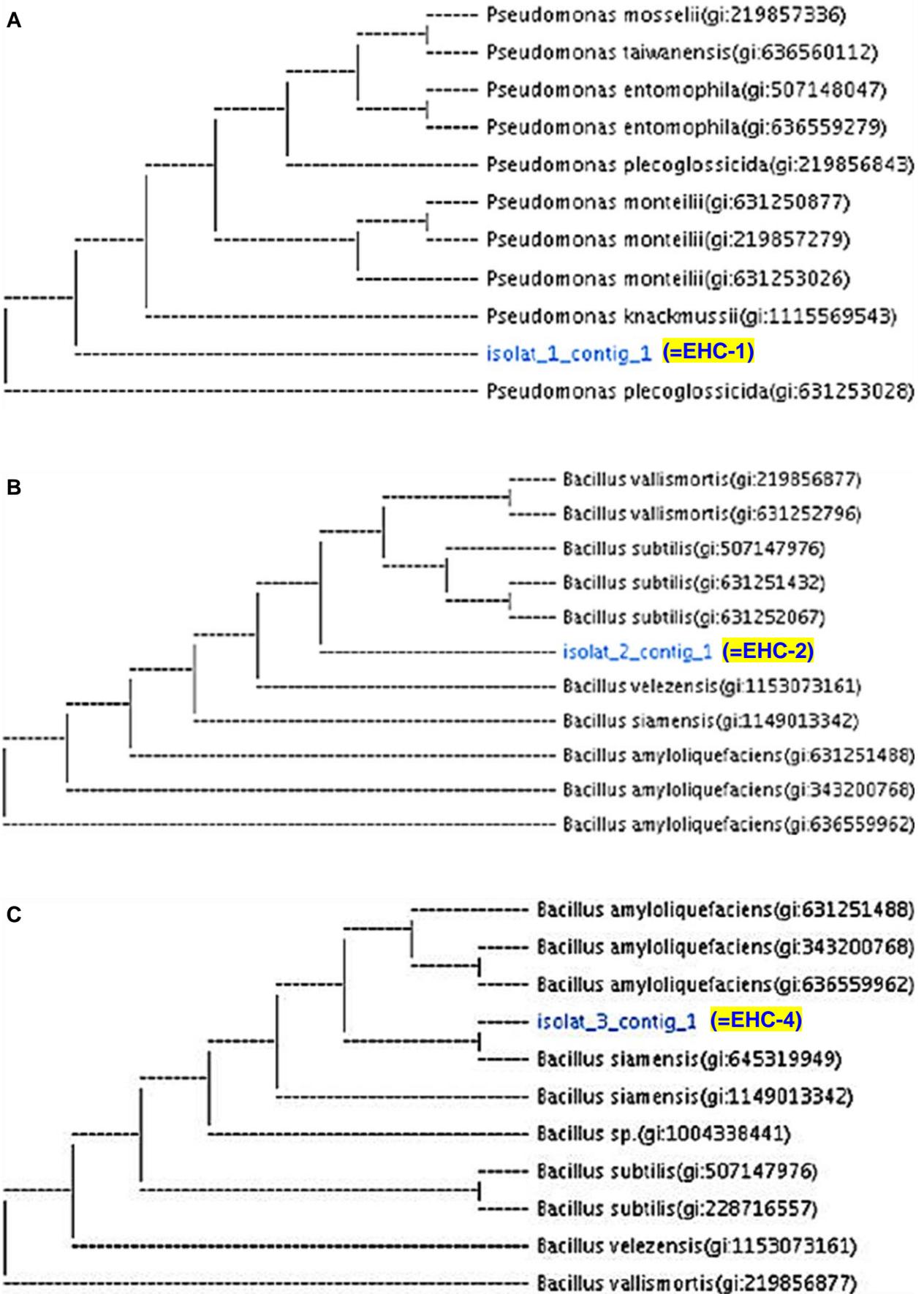
Isolat	Media			
	KIA	SIM	LIA	<i>citrate</i>
ECE-1	K/K S(-)	- + +	K/K S(-)	+
ECE-2	K/A S(-)	+ + +	K/A S(-)	+
ECE-3	K/K S(-)	- - -	K/K S(-)	-
ECE-4	K/K S(-)	- - -	K/K S(-)	-
ECE-5	K/K S(-)	- - -	K/K S(-)	-
ECE-6	K/K S(-)	- - -	K/K S(-)	-
ECE-7	K/K S(-)	- - -	K/K S(-)	-

karena pada media KIA bagian dasar dan lereng media tetap berwarna merah. Keenam isolat tersebut juga tidak mampu menghasilkan sulfida.

Hasil inokulasi pada media SIM menunjukkan bahwa isolat ECE-1 tidak menghasilkan sulfida yang ditandai dengan tidak terbentuknya warna hitam, mampu membentuk cincin indol yang ditandai dengan terbentuknya warna merah pada permukaan media setelah ditambah dengan reagen ehrlich a dan ehrlich b dan motilitas positif yang ditandai dengan pertumbuhan bakteri menyebar ke seluruh media. Isolat ECE-2 mampu membentuk indol sulfida dan motilitas positif. Isolat ECE-3, ECE-4, ECE-5, ECE-6 dan ECE-7 semuanya tidak mampu membentuk sulfida, indol dan motilitas negatif.

Pada media LIA enam isolat yakni ECE-1, ECE-3, ECE-4, ECE-5, ECE-6 dan ECE-7 mempunyai enzim dekarboksilasi yang mampu menguraikan lisin sehingga media tetap berwarna ungu. Sedangkan pada isolat ECE-2 tidak mempunyai enzim dekarboksilasi ditandai dengan media yang berubah menjadi kuning. Semua isolat juga tidak menghasilkan sulfida karena tidak terbentuknya warna hitam pada media. Mikroba yang mampu menghasilkan lisin dekarboksilasi media akan tetap berwarna ungu karena kondisi basa, sedangkan mikroba yang mampu mendeaminasi lisin menghasilkan warna kuning karena kondisi berubah menjadi asam (Brooks et al. 2013).

Pada uji biokimia dengan menggunakan media *citrate* diketahui bahwa ECE-1 dan ECE-2 menggunakan *citrate*

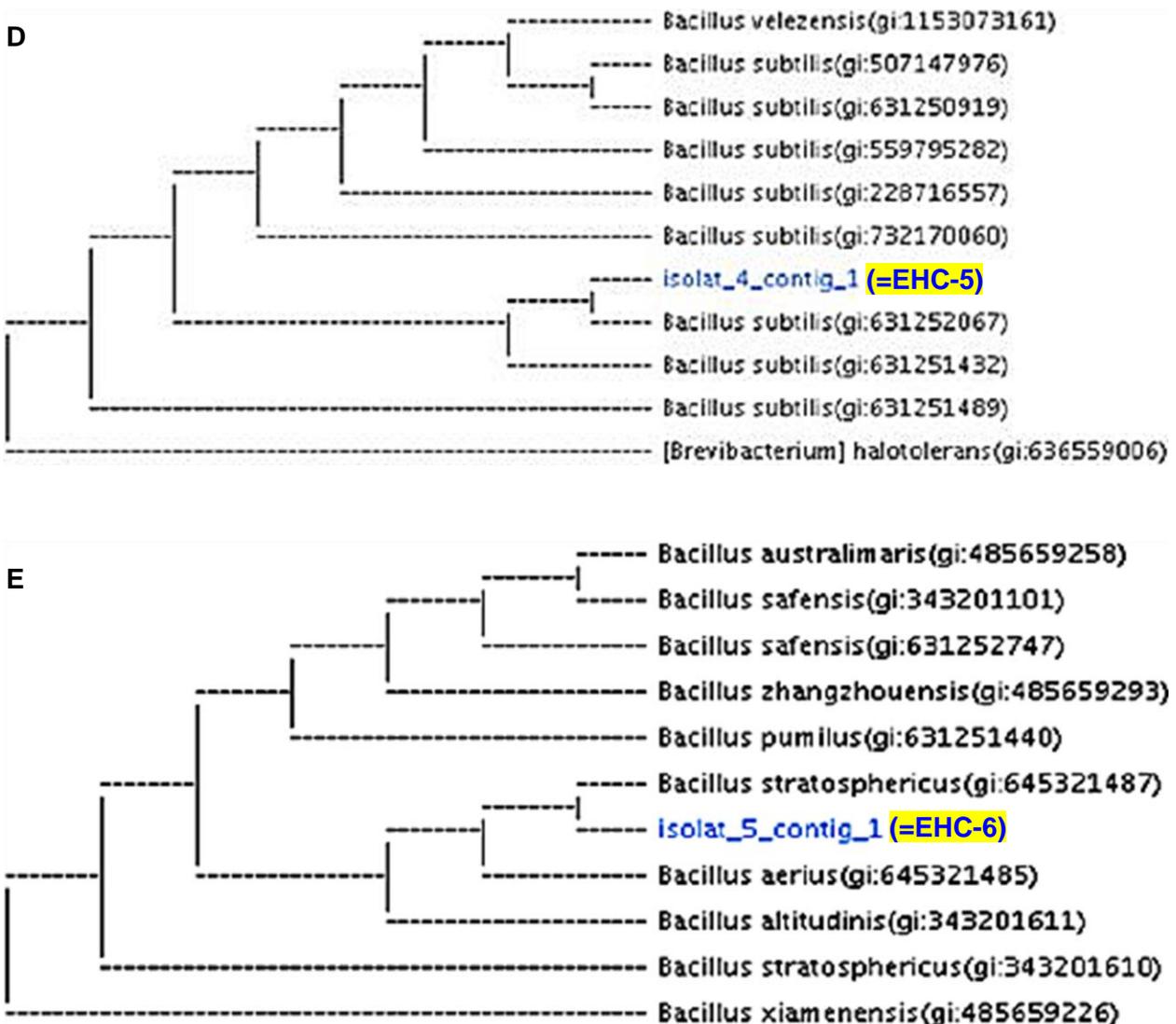


Gambar 5a. Hasil nilai kemiripan dan pohon filogenetik dari isolat ECE-1(A), ECE-2(B), dan ECE-4(C)

sebagai sumber karbonnya sedangkan isolat ECE-3, ECE-4, ECE-5, ECE-6 dan ECE-7 tidak menggunakan *citrate* sebagai sumber karbonnya. Tujuan dari uji ini adalah untuk mengetahui kemampuan suatu mikroba menggunakan *citrate* sebagai sumber karbonnya. Di dalam media *citrate* ini terdapat indikator *bromothymol blue*. Bakteri yang menggunakan *citrate* sebagai sumber karbon akan menyebabkan suasana menjadi basa sehingga terjadi perubahan warna indikator *bromothymol blue* dari hijau menjadi biru intens pada daerah miring karena reaksi basa (Brooks et al. 2013). Perubahan warna media dari hijau menjadi biru dikarenakan perubahan suasana pH pada media menjadi basa karena adanya amonium yang berasal dari *mono ammonium phosphate* yang terdapat pada media (Sardiani et al. 2015).

Hasil identifikasi dengan teknik 16S rRNA

Dari ketujuh isolat bakteri endofit yang diperoleh, lima isolat di antaranya dilanjutkan dengan identifikasi secara molekuler dengan analisis 16S rRNA. 16S rRNA adalah salah satu bagian dari ribosom pada semua organisme prokariotik, dimana bakteri merupakan salah satu organisme prokariotik. Identifikasi molekuler menggunakan 16S rRNA dapat digunakan untuk mengidentifikasi suatu bakteri i pada sampel. 16S rRNA berupa sekuens yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi bakteri dari urutan pasangan basanya, sehingga diperoleh hasil yang lebih akurat (Kusumawati 2014). Isolat yang diidentifikasi dengan analisis 16S rRNA adalah isolat ECE-1, ECE-2, ECE-4, ECE-5, dan ECE-6 sedangkan isolat ECE-3 dan ECE-7 tidak



Gambar 5b. Hasil nilai kemiripan dan pohon filogenetik dari isolat ECE-5(D) dan ECE-6(E)

diidentifikasi dengan 16S rRNA karena mempunyai kemiripan yang tinggi dengan isolat ECE-4. Hasil sekuensing dari kelima isolat kemudian disejajarkan dengan program BLAST-N (*Basic Local Alignment Search Tool-Nucleotide*) dari NCBI. Tujuan dari penjejajaran ini adalah untuk membandingkan hasil sekuen DNA isolat bakteri yang diperoleh dengan database sekuen DNA dari seluruh dunia yang telah dipublikasikan secara online pada situs NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Hasil penjejajaran menunjukkan bahwa isolat ECE-1 mempunyai nilai kemiripan yang tinggi dengan bakteri *Pseudomonas knackmussii* yakni sebesar 99% (Gambar 5a). Sedangkan isolat ECE-2 mempunyai kemiripan yang tinggi dengan *Bacillus siamensis* dengan nilai kemiripan sebesar 99% (Gambar 5a). Isolat ECE-4 mempunyai nilai kemiripan 100% dengan *Bacillus siamensis* (Gambar 5a). Isolat ECE-5 mempunyai nilai kemiripan yang sangat tinggi dengan bakteri *Bacillus subtilis* dengan nilai kemiripan sebesar 99% (Gambar 5b). Terakhir isolat ECE-6 mempunyai kemiripan yang tinggi dengan bakteri *Bacillus altitudinis* dengan nilai kemiripan sebesar 99% (Gambar 5b). Semakin besar nilai kemiripan maka semakin besar juga homologi suatu makhluk hidup, derajat kemiripan urutan basa gen penyandi 16S rRNA lebih dari 97% bukan merupakan spesies baru (Pangastuti 2006). Isolat yang mempunyai nilai kemiripan 99% merupakan bakteri dengan spesies yang sama namun mempunyai galur yang berbeda. Urutan genom pada mikroba dapat digunakan sebagai kunci untuk mengidentifikasi spesies mikroba tersebut. Spesies yang sama akan memiliki banyak kesamaan pada urutan genomnya. Berdasarkan hal tersebut, pengklasifikasian mikroba dapat berdasarkan informasi genotip dan fenotipnya (Yarza et al. 2014).

Hasil penelitian ini menunjukkan dari ketujuh isolat bakteri yang ditemukan 6 diantaranya termasuk ke dalam genus *Bacillus*. Penelitian Reddy et al. (2013) menyatakan bahwa golongan bakteri amilolitik terbanyak berasal dari genus *Bacillus*, *Lactibacillus*, *Clostridium*, *Mikrococcus* dan *Actinomycetes*. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Hastuti et al. (2014) yang berhasil mengisolasi bakteri amilolitik dari dari limbah

hasil olahan sagu. Adapun spesies yang mereka temukan adalah *Bacillus mycoides*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus alvei*, dan *Serratia liquefaciens*.

KESIMPULAN

Hasil isolasi bakteri dari umbi talas (*C. esculenta* L.) diperoleh tujuh isolat positif mempunyai aktivitas amilolitik yang mampu menghasilkan enzim amilase. Lima isolat berhasil diidentifikasi dengan analisis 16S rRNA dan diperoleh hasil isolat ECE-1 diduga *Pseudomonas knackmussii*, isolat ECE-2 diduga *Bacillus siamensis*, Isolat ECE-4 adalah *Bacillus siamensis*, isolat ECE-6 diduga *Bacillus altitudinis*. Isolat bakteri ECE-3 dan ECE-7 berdasarkan uji morfologi dan biokimia diduga golongan dari *Bacillus* sp.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kepada program Penelitian Dosen Pemula yang dibiayai oleh Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jendral Penguatan Riset dan Pengembangan, Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi, dengan Kontrak Penelitian Nomor: 005/LPPM-USb/PDP/III/2018.

DAFTAR PUSTAKA

- Agama-Acevedo E, Garcia-Suarez FJ, Gutierrez-Meraz F, Sanchez-Rivera MM, Martin ES, Bello-Perez LA (2011) Isolation and partial characterization of Mexican taro (*Colocasia esculenta* L) starch. *Starch* 63:139–146. doi: 10.1002/star.201000113
- Armougom F, Raoult D (2009) Exploring microbial diversity using 16S rRNA high-throughput methods. *J Comput Sci Syst Biol* 2:074–092. doi: 10.4172/jcsb.1000019
- Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA (2013) Mikrobiologi kedokteran Edisi 25. EGC, Jakarta
- Chung A, Rainey F, Nobre MF, Burghardt J, da Costa MS (1997) *Meiothermus Cerbereus* sp. nov., a new slightly thermophilic species with high levels of 3-hydroxy fatty acids. *Int J Syst Bacteriol* 47:1225–1230. doi: 10.1099/00207713-47-4-1225

- Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, Brown CT, Porras-Alfaro A, Kuske CR, Tiedje JM (2013) Ribosomal database project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 42:D633–642. doi: 10.1093/nar/gkt1244
- Hastuti US, Yakub P, Khasanah HN (2014) Biodiversity of indigenous amylolytic and cellulolytic bacteria in sago waste product at Susupu, North Moluccas. *J Life Sci* 8:920–924. doi: 10.17265/1934-7391/2014.11.010
- Kusumawati DE (2014) Isolasi dan karakteristik senyawa antibakteri dari bakteri endofit tanaman miana (*Coleus scutellarioides* [L.] Benth.). *Curr. Biochem.* 1:45–50. doi: 10.29244/cb.1.1.45-50
- Leonita S, Bintang M, Pasaribu FH (2015) Isolasi dan identifikasi bakteri endofit dari tumbuhan nyawai (*Ficus variegata* Blume) sebagai penghasil senyawa antibakteri. *Curr Biochem* 2:116–128. doi: 10.29244/cb.2.3.116-128
- Mitidieri S, Martinelli AHS, Schrank A, Vainstein MH (2006) Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: A comparative study with commercial detergent formulations. *Bioresour Technol* 97:1217–1224. doi: 10.1016/j.biortech.2005.05.022
- Nurmalinda A, Periadnadi, Nurmiati (2013) Isolasi dan karakterisasi parsial bakteri indigenous pemfermentasi dari buah durian (*Durio zibethinus* Murr.). *J Bio UA* 2:8–13. doi: 10.25077/jbioua.2.1.%25p.2013
- Pangastuti A (2006) Definisi spesies prokaryota berdasarkan urutan basa gen penyandi 16S rRNA dan gen penyandi protein. *Biodiversitas* 7:292–296. doi: 10.13057/biodiv/d070319
- Pawar HA, Choudhary PD, Kamat SR (2018) An overview of traditionally used herb, *Colocasia esculenta*, as a phytomedicine. *Med Aromat Plants* 7:1–7. doi: 10.4172/2167-0412.1000317
- Pelczar MJ, Chan ECS (2005) Dasar-dasar mikrobiologi. UI Press, Jakarta
- Reddy NS, Nimmagadda A, Rao KRSS (2003). An overview of the microbial α -amylase family. *Afr J Bioteknologi* 2:645–648. doi: 10.5897/AJB2003.000-1119
- Sardiani N, Litaay M, Budji RG, Priosambodo D, Syahribulan, Dwyana Z (2015) Potensi tunikata *Rhopalaea* sp. sebagai sumber inokulum bakteri endosimbion penghasil antibakteri; 1. Karakterisasi isolat. *J Alam Lingkung* 6
- Stackebrandt E, Goebel BM (1995) A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44:846–849. doi: 10.1099/00207713-44-4-846
- Setyati WA, Subagiyo S (2012) Isolasi dan seleksi bakteri penghasil enzim ekstraseluler (proteolitik, amilolitik, lipolitik dan selulolitik) yang berasal dari sedimen kawasan mangrove. *Ilm Kelaut* 17:164–168. doi: 10.14710/ik.ijms.17.3.164-169
- Singh H, Saharan R, Sharma KP (2014) Isolation and characterization of amylase producing bacteria from diverse environmental samples. *J Microbiol Biotechnol Res* 4:8–18
- Soeka Y S (2010) Optimasi dan karakterisasi a-amilase dari isolat aktinomisetes yang berasal dari Kalimantan Timur. *Ber Biol* 10:361–367. doi: 10.14203/beritabiologi.v10i3.751
- Subhash C, Sarla S, Jaybarden (2012) Phytochemical screening of garhwal himalaya wild edible tuber *Colocasia esculenta*. *Int Res J Pharm* 3:181–186. doi: 10.7879/2230-8407
- Tan R, Zou WX (2001) Endophytes: A rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep* 18:448–459. doi: 10.1039/b100918o
- Türker C, Özcan BD (2015) Isolation of alpha-amylase producing thermophilic bacillus strains and partial characterization of the enzymes. *Turk J Agric-Food Sci Technol* 3:387–393. doi: 10.24925/turjaf.v3i6.387-393.312
- Utomo JS, Yulifianti R, Kasno A (2012) Kajian sifat fisikokimia dan amilografi pati garut dan ganyong. In: *Prosiding seminar hasil penelitian tanaman aneka kacang dan umbi*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan, Malang, pp 673–680
- Van der Maarel MJ, van der Veen B, Uitdehaag JC, Leemhuis H, Dijkhuizen L (2002) Properties and applications of

starch-converting enzymes of the α -amylase family. J Biotechnol 94:137–155. doi: 10.1016/s0168-1656(01)00407-2

Vaseekaran S, Balakumar S, Arasaratnam V (2010) Isolation and identification of a bacterial strain producing thermostable α -Amylase. Trop Agric Res 22:1–11. doi: 10.4038/tar.v22i1.2603

Vijayalakshmi, Sushma K, Abha S, Chander P (2012) Isolation and characterization

of *Bacillus subtilis* KC3 for amylolytic activity. Int J Biosci Bioinform 2:336–341. doi: 10.7763/IJBBB.2012.V2.128

Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glockner FO, Ludwig W, Schleifer KH, Whitman WB, Euzéby J, Amann R, Rossello-Mora R (2014) Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. Nat Rev Microbiol 12:635–645. doi: 10.1038/nrmicro3330