

Aktivitas amilase bakteri amilolitik asal larva *black soldier fly* (*Hermetia illucens*)

Amylase activity of amylolytic bacteria from black soldier fly (Hermetia illucens)

Irma KRESNAWATY^{1*)}, Rizki WAHYU²⁾ & Ashadi SASONGKO²⁾

¹⁾ Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia, Jl Taman Kencana No.1, Bogor 16128

²⁾ Jurusan Teknik Kimia, Institut Teknologi Kalimantan,, Jl Sukarno Hatta km 15, Balikpapan 76127

Diterima tgl 22 Juli 2019 / disetujui tgl 31 Oktober 2019

Abstract

*Amylase is an enzyme that has been widely used as a biocatalyst in food and bioethanol industries. The availability of thermostable amylase will further expand the market and extend the shelf life of this enzyme. Amylase is produced by amylolytic bacteria using media with high-cost nitrogen sources, such as pepton. Black soldier fly (BSF) is a potential source of amylolytic bacteria since its ability to degrade organic matters rapidly. This research aimed to explore amylolytic bacteria from the larvae of BSF with highest amylase activity that can be produced using low-cost media. The screening of amylase activity was conducted by culturing the bacteria on starch containing media. Bacteria with the highest amylase activity were cultured in liquid media with two different nitrogen sources (urea and nitrate). Determinations of the optimum pH and temperature for this enzyme activity were carried out in the pH range 4 to 7 and temperature 35 to 65 °C. Three amylase-producing isolates were obtained in this study. M1 isolate which has the highest activity was characterized based on catalase activity and Gram staining. The results showed that the M1 isolate might belong to genus *Proteus* sp. At the optimum condition (45 °C and pH 7), amylase activity in nitrate media was 0.791 U/mL, which was about 18-folds higher than that in urea media (0,041 U/mL). Thus, amylase isolated from BSF larvae can be classified as a mesophilic enzyme and has the potential to be developed commercially at lower production costs.*

[Keywords: crude extract enzyme, *Proteus* sp., thermostable]

Abstrak

Amilase merupakan salah satu enzim yang telah digunakan secara luas sebagai biokatalis dalam industri pangan dan bioetanol. Ketersediaan amilase termotabil akan semakin memperluas pasar dan memperpanjang daya simpan enzim ini. Selama ini, produksi amilase dilakukan dengan memanfaatkan bakteri amilolitik menggunakan

media dengan sumber nitrogen yang mahal, misalnya pepton. *Black soldier fly* (BSF) merupakan sumber bakteri amilolitik yang potensial karena BSF memiliki kemampuan mendegradasi bahan organik dengan cepat. Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi bakteri amilolitik dengan kemampuan amilase tinggi yang dapat diproduksi menggunakan media yang lebih murah. Skrining bakteri penghasil amilase dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada media yang mengandung pati. Bakteri dengan aktivitas amilase tertinggi dikulturkan dalam media cair dengan dua sumber nitrogen yang berbeda, yaitu urea dan nitrat. Penentuan pH dan suhu optimum aktivitas enzim ini dilakukan pada rentang pH 4 sampai 7 dan suhu 35 sampai 65 °C. Tiga isolat penghasil amilase diperoleh dalam penelitian ini. Isolat M1 yang memiliki aktivitas tertinggi dikarakterisasi berdasarkan uji katalase dan uji pewarnaan Gram. Hasilnya menunjukkan bahwa isolat M1 termasuk genus *Proteus* sp. Pada kondisi optimum (suhu 45 °C dan pH 7), aktivitas amilase pada media nitrat adalah 0,791 U/mL, lebih kurang 18 kali lebih tinggi dibanding aktivitas pada media urea (0,041 U/mL). Dengan demikian, amilase yang dihasilkan oleh bakteri asal larva BSF merupakan enzim mesofilik dan berpotensi untuk dikembangkan secara komersial dengan biaya produksi yang lebih murah.

[Kata kunci: enzim ekstrak kasar, *Proteus* sp., termotabil]

Pendahuluan

Amilase merupakan salah satu enzim dengan permintaan pasar terbesar karena penggunaannya yang luas, mulai dari industri pangan, tekstil hingga bioetanol. Pada industri pangan, amilase digunakan untuk menghidrolisis pati menjadi gula sebagai bahan pembuatan sirup glukosa. Pada industri tekstil, enzim ini digunakan untuk menghilangkan pati pada saat proses penunuan. Sementara pada industri bioetanol, gula sebagai bahan fermentasi mikroorganisme penghasil etanol didapat dari hidrolisis pati dengan amilase (Souza,

^{*)}Penulis korespondensi: irma.kresnawaty@yahoo.com

2010). Seiring perkembangan teknologi, para ahli mulai melakukan inovasi untuk memproduksi amilase secara efisien menggunakan mikroorganisme potensial yang dapat diperbanyak secara massal (Ellaiah *et al.*, 2002; Mojsov, 2012; Gopinath *et al.*, 2017).

Sebagian besar bakteri yang digunakan dalam produksi amilase berasal dari genus *Bacillus*, seperti *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis*, dan *Bacillus amyloliquefaciens* yang sudah teruji secara industri. Salah satu kelebihanannya yaitu dapat memproduksi enzim yang tahan suhu tinggi (*thermostable*) (Souza, 2010; Vidyalakshmi *et al.*, 2009). Sekitar 90% dari isolat bakteri penghasil enzim yang digunakan di industri merupakan mikroba rekombinan untuk memperoleh karakter produk dan proses yang diharapkan (Ferreira *et al.*, 2018). Kendala yang masih dihadapi adalah produksi enzim dengan bakteri tersebut masih membutuhkan nutrisi, khususnya nitrogen yang tinggi biayanya. Oleh karena itu, salah satu tantangan dalam memproduksi enzim pada skala industri adalah menyeleksi *host microorganism* yang mudah dibiakkan pada media yang murah dengan kondisi operasi yang mudah (Fessner, 2003) untuk menghemat biaya produksi.

Black soldier fly (BSF) merupakan salah satu organisme yang potensial yang dapat mendegradasi bahan organik dengan nutrisi minimal secara cepat. Hal ini karena pencernaan BSF merupakan habitat bakteri amilolitik (Ng *et al.*, 2019). Keberadaan bakteri dalam usus larva tersebut membantu BSF dalam mengkonversi limbah organik menjadi lemak dan protein menjadi biomassa tubuhnya (Zheng *et al.*, 2011). Supriyatna & Ukit (2016) menunjukkan bahwa pada usus larva BSF terdapat bakteri *B. subtilis* yang dapat memproduksi amilase. Sementara, Kim *et al.* (2011) menemukan adanya potensi amilase, lipase, dan protease dari ekstrak usus larva BSF. Tetapi belum diteliti tentang karakter enzim tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi bakteri penghasil amilase dari pencernaan BSF, serta mengkarakterisasi amilase yang dihasilkannya.

Bahan dan Metode

Isolasi dan karakterisasi bakteri dari larva BSF

Larva BSF yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari *rearing* di laboratorium Mikrobiologi dan Lingkungan, Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia (PPBBI). Larva BSF yang berada pada fase pupa direndam dalam disinfektan, kemudian dipindahkan ke cawan petri secara aseptik. Usus larva BSF dimasukkan ke dalam tabung berisi larutan fisiologis (NaCl 0,1%). Selanjutnya, dibuat serangkaian pengenceran mulai dari 10^{-2} hingga 10^{-8} dan dilakukan isolasi bakteri dari masing-masing pengenceran dengan metode *spread plate*.

Uji kualitatif untuk menentukan ada tidaknya aktivitas amilase dilakukan dengan meneteskan larutan lugol ke dalam cawan petri yang berisi koloni dan ditunggu selama 5 menit. Zona bening yang timbul pada koloni diamati dan diukur. Bakteri yang memiliki lebar zona bening paling tinggi dimurnikan di dalam agar miring sebagai isolat stok. Bakteri amilolitik diidentifikasi dengan pewarnaan gram dan uji katalase.

Media spesifik amilolitik yang digunakan terdiri dari 1,5 g *beef extract*, 5 g *soluble starch* dan 6 g agar bakto yang dilarutkan ke dalam 500 mL akuades (Atlas, 2010). Kultur bakteri tersebut diinkubasi selama 2x24 jam pada suhu 34°C. Koloni bakteri yang tumbuh diamati secara makroskopis meliputi bentuk, permukaan (*elevasi*), tepi (*margin*), dan warna.

Ekstraksi amilase

Isolat bakteri terpilih ditumbuhkan dalam media amilolitik yang mengandung nitrogen (nitrat atau urea), fosfat, sulfur dan beberapa kofaktor (Mg, Zn, Mn, dan Fe). Sumber karbon yang digunakan adalah pati. Inkubasi dilakukan selama 0, 1, 2, dan 3 hari. Masing-masing kultur bakteri tersebut disentrifus pada 10.000 rpm, 4 °C, selama 15 menit untuk memisahkan supernatant (ekstrak enzim kasar) dari biomassa bakteri.

Uji aktivitas amilase

Uji aktivitas amilase dilakukan dengan metode DNS. Ke dalam tabung yang telah diisi 1 mL substrat pati 1% dimasukkan 1 mL ekstrak kasar enzim, kemudian dihomogenkan menggunakan *vortex* dan diinkubasi selama 30 menit dalam *shaker incubator* pada suhu 40 °C (Supriyatna & Ukit, 2016). Reaksi dihentikan dengan menambahkan 1 mL reagen DNS dan dihomogenkan dengan *vortex*. Semua tabung ditutup dengan *aluminium foil* kemudian dipanaskan dalam *waterbath* selama 15 menit dengan kondisi air mendidih. Larutan blanko terdiri dari 1 mL reagen pati 1%, 1 mL buffer fosfat dan 1 mL reagen DNS. Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm menggunakan alat spektrofotometer Multiskan GO.

Uji pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas enzim dan populasi bakteri

Sebanyak 50 mL media steril diinokulasi dengan 1 mL suspensi bakteri di dalam *Biosafety Cabinet*. Kultur bakteri tersebut diinkubasi dalam *environmental shaker incubator* dengan waktu optimum yang diperoleh sebelumnya pada beberapa suhu yang berbeda (35, 45, 55, dan 65 °C). Pengujian pengaruh pH media dilakukan pada rentang pH 4-7. Aktivitas amilase dihitung dengan metode DNS, sedangkan populasi bakteri dihitung menggunakan metode *total plate count*.

Pemisahan amilase

Ke dalam ekstrak kasar enzim ditambahkan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dengan variasi konsentrasi 40, 60, dan 80 % untuk memisahkan enzim dari komponen lain. Campuran kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam *ice bath* bersuhu 4 °C. Selanjutnya, larutan dipisahkan dengan sentrifugasi pada 11.000 rpm, 4 °C selama 20 menit. Supernatan dibuang dan endapan garam yang mengandung enzim dilarutkan dalam buffer fosfat 50 mM pH 7. Amilase dimurnikan dari garam dengan cara dialisis menggunakan buffer fosfat 50 mM pH 7 (Putranto *et al.*, 2017).

Hasil dan Pembahasan

Isolasi bakteri amilolitik dari BSF

Hasil isolasi bakteri menunjukkan adanya bakteri potensial yang dominan pada pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} dan 10^{-6} dengan morfologi yang berbeda. Pengamatan makroskopis terhadap empat koloni bakteri terpilih disajikan dalam Tabel 1.

Dari keempat isolat yang ditumbuhkan di media pati, tiga isolat diidentifikasi menghasilkan amilase yaitu isolat M1, M3, dan M4 (Tabel 2). Berdasarkan diameter zona bening yang terbentuk, tampak bahwa isolat M1 memiliki aktivitas amilolitik tertinggi (Gambar 1). Dengan demikian, isolat M1 dipilih untuk uji selanjutnya.

Amilase merupakan enzim ekstraseluler yang dikeluarkan oleh sel bakteri ke lingkungan sekitarnya untuk memecah pati menjadi

monosakarida dan disakarida yang kemudian akan diserap oleh sel untuk pertumbuhan (Saini *et al.*, 2017). Media mengandung pati yang ditumbuhi koloni bakteri dan ditetesi larutan iodine lugol akan menghasilkan warna biru apabila bakteri tidak menghasilkan amilase. Sebaliknya, apabila bakteri menghasilkan amilase, maka amilum akan terhidrolisis sehingga tidak akan memunculkan warna kebiruan dan menandakan adanya aktivitas amilolitik (Hemraj *et al.*, 2013).

Karakterisasi isolat M1 berdasarkan pewarnaan Gram dan uji katalase

Identifikasi pewarnaan Gram menunjukkan bahwa isolat M1 merupakan bakteri Gram negatif. Selain itu, pengamatan mikroskopis menunjukkan bahwa sel bakteri berbentuk batang (*basil*), berfilamen, elevasi meningkat dan berwarna kuning (Tabel 1).

Hasil uji aktivitas enzim katalase menunjukkan bahwa bakteri positif menghasilkan enzim katalase, sehingga isolat ini diduga termasuk genus *Proteus* sp. Beberapa bakteri dapat memproduksi enzim katalase yang berperan untuk menetralkan H_2O_2 yang bersifat racun dan mengubahnya menjadi air dan oksigen. Oksigen inilah yang akan muncul dalam bentuk gelembung sehingga isolat dinyatakan positif pada uji katalase. Hasil karakterisasi bakteri amilolitik pada penelitian ini berbeda dengan yang dilaporkan oleh Supriyatna & Ukit (2016) yang menunjukkan isolat bakteri dari larva BSF meru pakan *Bacillus* sp.

Tabel 1. Morfologi koloni bakteri yang diisolasi dari pencernaan larva BSF

Table 1 Morphology of bacteria colony isolated from intestinal BSF larvae

Kode isolat (Isolate code)	Morfologi (Morphology)			
	Bentuk/ Shape	Elevasi/ Elevation	Pinggiran/ Margin	Warna/ Color
M1	Tidak beraturan/ Irregular	Meningkat/Raised	Berfilamen/Filamentous	Kuning/Yellow
M2	Tidak beraturan/ Irregular	Umbonate	Bergelombang/Undulate	Oranye/Orange
M3	Tidak beraturan/ Irregular	Datar/Flat	Erose	Kuning/Yellow
M4	Tidak beraturan/ Irregular	Datar/Flat	Entire	Kuning/Yellow

Tabel 2. Zona bening yang dihasilkan oleh bakteri amilolitik larva BSF

Table 2. Clear zone produced by larvae- BSF amylolytic bacteria

Kode / Code	Zona bening (cm)/ Clear zone (cm)
M1	1,3
M2	0,0
M3	0,2
M4	1,0

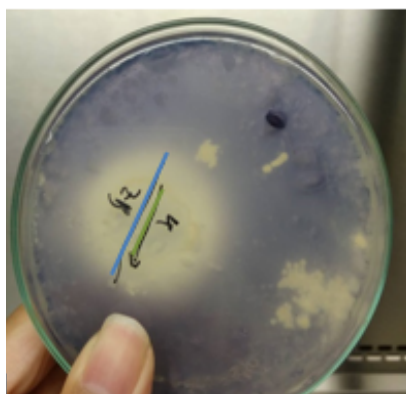
Pengujian aktivitas amilase

Hasil uji aktifitas amilase (Gambar 2) menunjukkan nilai optimum dicapai pada hari pertama (24 jam). Nilai aktivitas pada hari ke-0, 1, 2, dan 3 masing-masing adalah sebesar 0,006; 0,034; 0,009; dan 0,009 U/mL. Soetart & Vandame (2010) memaparkan bahwa kemampuan mikroorganisme menghasilkan enzim dalam waktu yang singkat merupakan kriteria yang tepat dalam seleksi. Dengan demikian, enzim yang dihasilkan dalam penelitian ini berpotensi untuk dikembangkan untuk keperluan industri komersial. Pada tahap ini digunakan media pati-nitrat. Tujuan penggunaan media ini adalah mengoptimalkan produksi amilase karena tidak adanya sumber karbon lain yang dapat dimanfaatkan selain amilum. Selain itu, pada media tidak mengandung sumber protein yang bisa digunakan sebagai sumber karbon yang biasanya terdapat pada *yeast extract* atau pepton (Funke & Case, 2010). Produksi enzim dipengaruhi kebutuhan nutrisi dari mikroba itu sendiri, sehingga pada masa *lag phase* mikroba membutuhkan sumber karbon yang dapat dicerna dalam hal ini glukosa sehingga mikroba memproduksi amilase yang dapat menguraikan amilum yang tidak dapat dicerna. Sebagai perbandingan penelitian yang dilakukan Soeka (2016) memiliki aktivitas amilase pada hari ke-6. Jika sumber karbon yang bisa langsung diserap seperti glukosa pada media sudah habis, maka mikroba memanfaatkan karbohidrat kompleks seperti pati atau selulosa untuk dipecah menjadi glukosa menggunakan amilase.

Pengaruh suhu dan pH pada aktivitas amilase serta populasi bakteri isolat M1

a) Pengaruh suhu inkubasi

Pengujian suhu inkubasi pada amilase ekstrak kasar mencapai aktivitas optimum di suhu 45 °C sebesar 0,039 U/mL, kemudian diikuti di suhu 40,



Gambar 1. Zona bening yang dihasilkan isolat mikroba pada media amilolitik

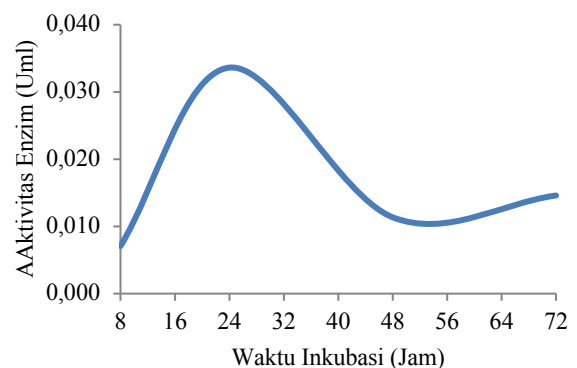
Figure 1. Clear zone produced by amylolytic bacteria

55, 65, dan 35 °C (Gambar 3). Suhu merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi kinerja enzim dalam mengkatalisasi reaksi. Molekul cenderung bergerak lebih cepat saat ada kenaikan suhu dan bergerak lambat pada suhu rendah, dan apabila suhu terlalu rendah suatu reaksi tidak akan mempunyai energi aktivasi yang cukup. Suhu tinggi menyebabkan denaturasi protein, akibatnya terjadi perubahan sisi aktif dan bentuk enzim sehingga enzim kehilangan kemampuan kataliknya. Pada Gambar 3, suhu inkubasi di atas 55 °C menyebabkan penurunan aktivitas menjadi 0,177 U/mL. Penurunan drastis ini diduga karena terjadi denaturasi protein, seperti yang dilaporkan oleh Funke & Case (2010).

b) Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim

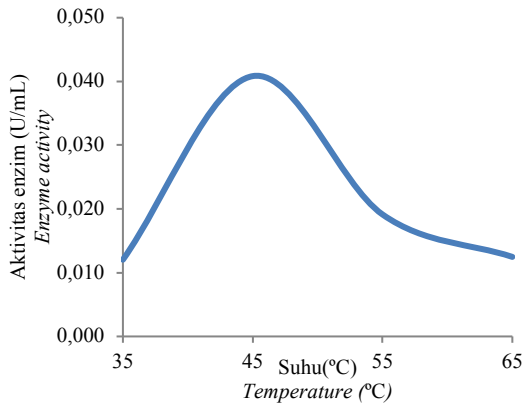
Berdasarkan hasil pengujian pH, aktivitas amilase tertinggi terjadi pada media dengan pH 7 yaitu sebesar 0,039 U/mL (Gambar 4). Aktivitas amilase menurun seiring dengan penurunan pH. Hasil pengujian menunjukkan aktivitas amilase pada pH 4 dan 5 menurun menjadi masing-masing 0,012 dan 0,013 U/mL. Pengujian pada pH asam dilakukan untuk mengurangi potensi terjadinya kontaminasi. Apabila pertumbuhan bakteri masih seperti kondisi normal dan aktivitas enzim masih tinggi pada pH rendah, maka ini akan memudahkan kontrol kontaminan pada proses produksi enzim komersial.

Souza (2010) mengklasifikasikan amilase yang berasal dari bakteri memiliki pH optimum 4-10. Penelitian Asoodeh *et al.*, (2010) menyimpulkan bahwa *Bacillus ferdowsicus* memiliki pH optimum 4,5 dan suhu optimum 70 °C. Sedangkan amilase *Bacillus sp. YX-1* memiliki pH optimum 5 dan suhu optimum 40-50 °C (Liu & Xu, 2008). Berbeda dengan penelitian lainnya, Kajiwaru *et al.* (1997), melaporkan amilase dari *Aspergillus kawachii* memiliki pH optimum pH 3 dan suhu



Gambar 2. Aktifitas amilase isolat M1 terhadap waktu inkubasi pada medium nitrat

Figure 2. Amylase activity of M1 isolate versus time period of incubation in nitrate medium



Gambar 3. Pengaruh suhu inkubasi terhadap aktivitas amilase ekstrak kasar isolat M1

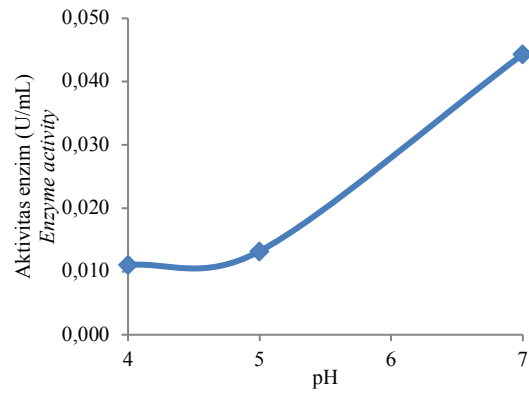
Figure 3. Effect of temperature on the activity of crude extract amylase of M1 isolate

optimum 30 °C. Enzim yang stabil pada pH rendah sangat cocok digunakan pada industri pengolahan pati karena salah satu permasalahan umum adalah proses sakarifikasi yang berlangsung pada pH rendah. Berdasarkan penelitian ini amilase isolat M1 cenderung memiliki aktivitas yang menurun saat derajat keasaman bertambah sehingga kurang cocok diterapkan di industri pati.

c) Populasi bakteri pada variasi pH dan suhu

Suhu dan pH media kultur mempengaruhi pertumbuhan koloni bakteri, sehingga penting untuk mengetahui jumlah populasi dari sebuah kultur untuk bisa memanipulasi jumlah mikroorganisme yang dibiakan. Hubungan aktivitas dan populasi bakteri pada suhu pengujian 35-65 °C disajikan pada Gambar 5. Berdasarkan Gambar tersebut, tampak bahwa pertumbuhan bakteri mengikuti pola yang sama dengan aktivitas enzim seperti yang dinyatakan Meryandini *et al.* (2012). Amilase yang diekstrak dari isolat M1 merupakan enzim mesofilik karena optimum pada suhu 45 °C. Di samping itu, bakteri ini juga tumbuh optimum (memiliki populasi tertinggi) pada suhu tersebut. Hal ini dikarenakan pada suhu tersebut, semakin banyak nutrisi karbon (glukosa atau maltosa) yang diserap bakteri hasil hidrolisis pati oleh amilase, dimana karbon sendiri merupakan elemen penting penyusun sel setelah air (Funke & Case, 2010). Isolat M1 dapat diklasifikasikan sebagai *neutrophile* yang tumbuh pada rentang pH netral (5-9).

Hubungan aktivitas enzim dan populasi bakteri pada rentang pH 4-7 disajikan pada Gambar 6. Berdasarkan Gambar tersebut terlihat kemiripan pola antara aktifitas enzim dan populasi bakteri terhadap perlakuan pH. Aktivitas enzim



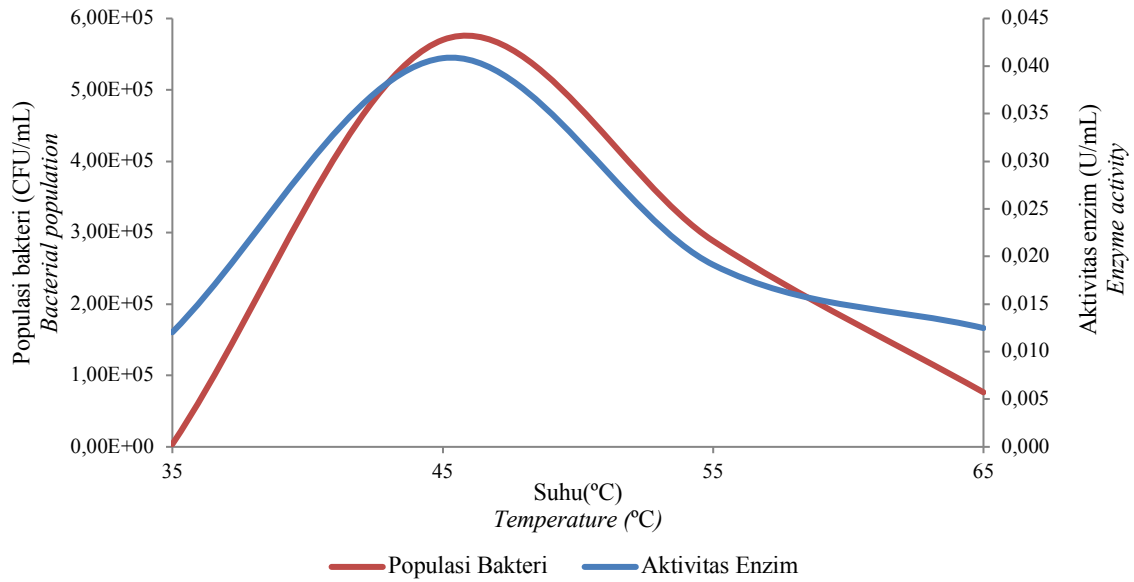
Gambar 4. Pengaruh pH terhadap aktivitas amilase ekstrak kasar isolat M1

Figure 4. Effect of pH on the activity of crude extract amylase of M1 isolate

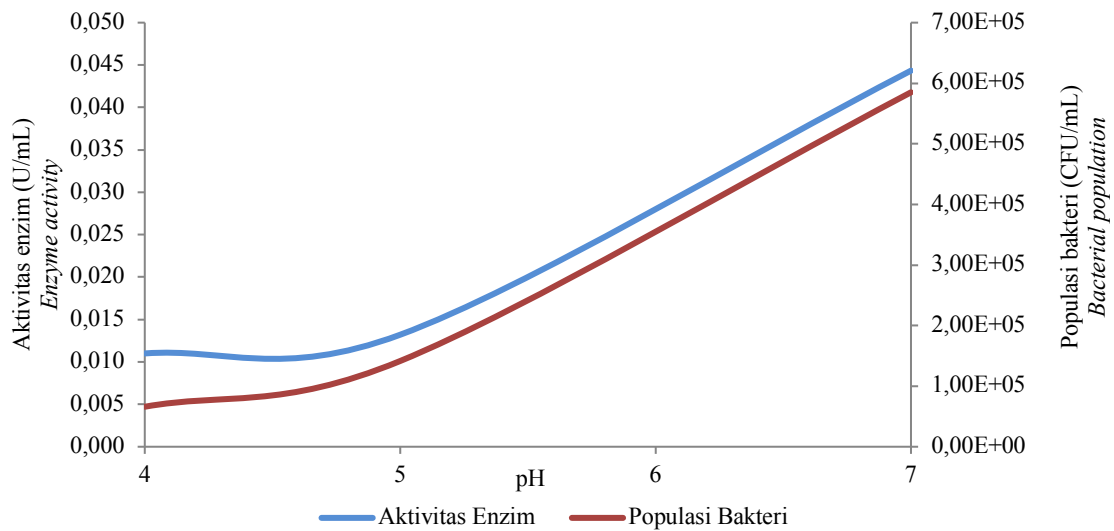
dan populasi bakteri tertinggi dihasilkan pada pH 7. Penurunan pH menyebabkan nilai dari dua variabel tersebut ikut menurun. Aktivitas enzim terkecil terjadi pada pH 4,5, namun terjadi sedikit peningkatan aktivitas pada kondisi yang lebih asam, yaitu pH 4. Populasi bakteri semakin menurun dengan semakin rendahnya nilai pH. Aktivitas enzim semakin menurun dikarenakan adanya denaturasi protein akibat penambahan drastis ion H⁺, sehingga mengubah struktur sisi aktif enzim (Funke & Case, 2010). Populasi bakteri semakin menurun seiring bertambahnya keasaman, hal ini sesuai dengan dasar teori yang menyebutkan bahwa bakteri mesofilik pada umumnya tidak dapat bertahan pada pH asam (Sundberg *et al.*, 2004).

Pemisahan enzim dengan (NH₄)₂SO₄ dan dialisis

Dalam tahapan ini diharapkan diperoleh molekul protein yang terbebas dari pengotor seperti sisa media ataupun metabolit yang mengganggu aktivitas enzim. Pada dua variasi media yang dilakukan yaitu nitrat dan urea dapat dilihat perbedaan kejenuhan pada 3 variasi konsentrasi amonium sulfat. Amonium sulfat dapat mengendapkan protein pada konsentrasi 40, 60 dan 80% pada media nitrat, sedangkan pada medium urea kejenuhan diperoleh pada konsentrasi 40% saja. Tabel 3 menunjukkan bahwa pemisahan dengan amonium sulfat meningkatkan aktivitas amilase secara linear pada media nitrat, sementara pada media urea konsentrasi optimum amonium sulfat diperoleh sebesar 60%. Kenaikan aktivitas amilase pada medium nitrat mencapai 18 kali dibandingkan pada media urea.



Gambar 5. Aktivitas amilase dan populasi bakteri M1 pada berbagai suhu inkubasi
 Figure 5. Activity of amylase and population of M1 bacteria in different temperatures



Gambar 6. Aktivitas amilase dan populasi bakteri M1 pada berbagai pH
 Figure 6. Activity of amylase and population of M1 bacteria in different pH

Tabel 3. Aktivitas amilase hasil pemisahan dengan amonium sulfat dan kenaikan aktivitas dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim

Table 3. Amylase activity from separation using ammonium sulphate and enzyme activity increase compared to enzyme crude extract

Konsentrasi Amonium Sulfat/Ammonium sulphate concentration (%)	Rata-rata aktivitas enzim/Average of enzyme activity (U/ml)	Peningkatan aktivitas terhadap ekstrak kasar/Activity increase compared to crude extract
K40	0,106	3x lipat (folds)
K60	0,237	8x lipat (folds)
K80	0,174	5x lipat (folds)
D40	0,126	2x lipat (folds)
D60	0,729	17x lipat (folds)
D80	0,791	18x lipat (folds)

Keterangan/Notes:

K = Media urea/Urea-media (minimum)

D = Media nitrat/Nitrate-media

Kesimpulan

Isolat bakteri amilolitik dari BSF dapat dikelompokkan dalam genus *Proteus* sp. Amilase yang dihasilkan oleh isolat ini memiliki suhu optimum 45 °C dan pH optimum pada pH 7. Pada kondisi optimum ini aktivitas amilase mencapai 0,041 U/mL dengan populasi bakteri sebesar $5,7 \times 10^5$ CFU/mL. Enzim isolat M1 memiliki aktivitas yang lebih tinggi pada media nitrat dibandingkan media urea, sehingga amilase dari isolat M1 memiliki potensi sebagai produk komersial.

Daftar Pustaka

- Asoodeh A, A Alemi, A Heydari & J Akbari (2013). Purification and biochemical characterization of an acidophilic amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. DR90. *Extremophiles* 17(2), 339-348.
- Atlas RM (2010). *Handbook of microbiological media*. Boca Raton, CRC Press.
- Ellaiah P, K Adinarayana, Y Bhavani, P Padmaja & B Srinivasulu (2002). Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. *Process Biochemistry* 68, 615-620.
- Ferreira RDG, AR Azzoni & S Freitas (2018). Techno-economic analysis of the industrial production of a low-cost enzyme using *E. coli*: the case of recombinant β -glucosidase. *Biotech for biofuels* 11(1), 81.
- Fessner WD (Ed.) (2003). *Biocatalysis: from discovery to application*. Springer Science & Business Media.
- Funke BR & CL Case (2010). *Microbiology an Introduction*. 10th edition. San Fransisco, Pearson.
- Gopinath G, S Kalemli-Özcan, L Karabarbounis & C Villegas-Sanchez (2017). Capital allocation and productivity in South Europe. *The Quarterly J of Economics* 132(4), 1915-1967.
- Hemraj V, S Diksha & G Avneet (2013). A review on commonly used biochemical test for bacteria. *Innovare J Life Sci* 1(1), 1-7.
- Kajiwaru Y, N Takeshima, H Ohba, T Omori, M Shimoda & H Wada (1997). Production of acid-stable α -amylase by *Aspergillus kawachii* during barley Shochu-Koji production. *J of fermentation & bioengineering* 84(3), 224-227.
- Kim W, S Bae S, K Park, S Lee, Y Choi, S Han & Y Koh (2011). Entomology biochemical characterization of digestive enzymes in the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *J of Asia-Pacific Entomology* 14 (1), 11-14.
- Liu XD & Y Xu (2008). A novel raw starch digesting α -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: purification and characterization. *Bioresource Tech* 99(10), 4315-4320.
- Meryandini A, W Widosari W, B Maranatha, TC Sunarti, N Rachmania & H Satria (2012). Isolasi bakteri selulolitik dan karakterisasi enzimnya. *Makara of Sci Series* 13(1), 33-38.
- Mojsov, K. (2012). Microbial alpha-amylases and their industrial applications: a review. *International Journal of Management, IT and Engineering (IJMIE)* 2(10), 583-609.
- Ng SM, LH Tey, SY Leong & SA Ng (2019). Isolation, screening and characterization of the potential microbes to enhance the conversion of food-wastes to bio-fertilizer. In *AIP Conference Proceedings* 2157 (1), 020048.
- Putranto RA, AS Mulyatni, A Budiani & R Tistama (2017). Purification, characterization, and bioassay of putative protease inhibitors from *Hevea brasiliensis* latex. *E-Journal Menara Perkebunan* 84(2), 76-87.
- Saini R, HS Saini & A Dahiya (2017). Amylases: Characteristics and industrial applications. *J. Pharmacogn. Phytochem* 6 (4), 1865-1871.
- Soeka YS (2016). Karakterisasi bakteri penghasil alfa-amilase dan identifikasi isolat C2 yang di isolasi dari terasi curah Samarinda Kalimantan Timur. *Jurnal ilmu hayati* 15(2),1-7.
- Soetart W & EJ Vandame (2010). *Industrial Biotechnology sustainable growth and economic success*. Ghent, Wiley-Vch.
- Souza, PMD (2010). Application of microbial α -amylase in industry-A review. *Brazilian journal of microbiology* 41(4), 850-861.
- Sundberg C, S Smårs & H Jönsson (2004). Low pH as an inhibiting factor in the transition from mesophilic to thermophilic phase in composting. *Bioresource Tech* 95(2), 145-150.
- Supriyatna A & Ukit U (2016). Screening and isolation of cellulolytic bacteria from gut of black soldier flays larvae (*Hermetia illucens*) feeding with rice straw. *Biosaintifika: J of Biology and Biology Education* 8(3), 314-320.
- Vidyalakshmi R, R Paranthama & J Indhumathi (2009). Amylase production on submerged fermentation by *Bacillus* spp. *World Journal of Chemistry* 4(1), 89-91.
- Zheng L, Q Li, J Zhang & Z Yu (2011). Double the biodiesel yield: rearing black soldier fly larvae, *hermetia illucens*, on solid residual fraction of restaurant waste after grease extraction for biodiesel production. *Renewable Energy* 41, 75-79.