

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biji Kecipir (*Psophocarpus tetragonolobus* L.)

Kecipir (*Psophocarpus tetragonolobus* L.) adalah tumbuhan merambat anggota suku Fabaceae (Leguminosae). Pucuk dan polong mudanya dimanfaatkan sebagai sayuran. Di Sumatera dikenal sebagai kacang botol atau kacang belingbing (pantai barat Sumatera), dan kacang embing (Palembang). Nama-nama lainnya adalah jaat, cipir, cicipir, kelongkang, kacang botor, kacang kumbotor, serta biraro (Manado Ternate). Dalam bahasa Inggris disebut sebagai Winged bean, Winged pea, Four-angled bean (mengacu pada bentuk buahnya), namun juga dinamai Goa bean dan Asparagus pea (Sunaryono, 1994).

Kecipir merupakan tanaman setahun yang berbentuk perdu dan bersifat membelit ke kiri. Buahnya panjang (± 20 cm), persegi empat dan bergerigi, warna buahnya hijau dan rasanya enak serta lunak. Bijinya bulat, berwarna kuning pada saat muda, dan berwarna coklat pada saat tua dengan rasanya yang getir. Biji kecipir bisa disebut “botor”. Di luar negeri kecipir ini disebut Wing Bean, mengingat bahwa tanaman ini tidak membutuhkan tempat yang subur dan buahnya (terutama bijinya) merupakan sumber protein dan banyak mengandung vitamin A, vitamin B dan vitamin C, maka dari itu tanaman ini dianjurkan untuk ditanam dipekarangan rumah atau disepanjang pagar-pagar (Sunaryono, 1994).

Kecipir merupakan tanaman dengan jenis kacang-kacangan (Fabacea). Kecipir merupakan tanaman tropis yang dapat tumbuh dengan baik di daratan tinggi (2000 mdpl) maupun daratan rendah, tanah dengan bahan organik yang rendah, tanah berlempung, berpasir serta dapat tumbuh dengan iklim yang kering sehingga tanaman memiliki potensi untuk dikembangkan di Indonesia. Kecipir berpotensi sebagai sumber pangan yang baik untuk kesehatan, hal ini karena

kandungan zat gizinya yang tinggi terutama protein, berbagai asam amino esensial serta kandungan lemak yang relatif tinggi. (Astawan, 2009 ; Handayani, 2013 ; Krisnawati, 2010).

Selama ini tanaman kecipir kurang dimanfaatkan oleh masyarakat, bahkan ada yang hanya menjadikannya sebagai pagar tanaman saja. Thompson dan Haryono (1980) menyebutkan rata-rata produksi biji kecipir di Indonesia ialah 2.282 kg/ha. Biji kecipir mengandung vitamin dan mineral yang sangat berguna bagi tubuh seperti betacaroten, tokoferol, thiamin, riboflavin, niacin, asam askorbat, kalsium, magnesium, kalium, natrium,ferum dan fosfor (Haryoto, 2001).

Tanaman kecipir mudah dibudidayakan, namun di Indonesia hingga kini belum diusahakan dengan sungguh-sungguh. Hal ini sangat disayangkan karena banyak negara tetangga yang telah membudidayakan tanaman kecipir secara intensif. Sebenarnya pada tahun 1980-an kecipir telah menjadi bahan pembicaraan masyarakat Indonesia. Bahkan dalam waktu singkat, sudah banyak masyarakat yang telah membudidayakan tanaman ini, akan tetapi keadaan padar belum siap menampung hasil produksinya (Hartoyo, 1995).

Data hasil biji kecipir, kedelai dan kacang tanah per hektar dapat dilihat pada tabel 2.

Jenis Tanaman	Hasil Biji (kg)
Kecipir	2.380
Kedelai	900
Kacang tanah	1.000

(Hartoyo, 1995).



Gambar 1. Biji Kecipir

(Tri Handayani, 2013)

Pada Gambar 1. biji kecipir berbentuk bulat dan berkulit sangat keras, biji tua berwarna krem, coklat atau hitam.

Tabel 3. Komposisi Biji Kecipir (g/100 g bobot segar)

Kandungan	Biji Muda	Biji Tua
Air	35,8 - 88,1	8,7 - 24,6
Energi (mJ)	0,10 - 1,71	1,61 - 1,89
Protein	4,6 - 10,7	29,8 - 39,0
Lemak	0,7 - 10,4	15,0 - 20,4
Karbohidrat	5,6 - 42,1	23,9 - 42,0
Serat	1,0 - 2,5	3,7 - 16,1
Abu	1,0	3,3 - 4,9

(Tadera *et al.*, 1983; Kantha *et al.*, 1986; Ikhsan, 1990; Hastutiet *al.*, 2001)

Pada Tabel 3. diketahui bahwa kandungan karbohidrat biji tua kecipir sebesar 23,9 - 42,0 gram/100 gram. Kandungan karbohidrat yang cukup tinggi ini yang dapat menghasilkan enzim amilase dari umbi kecipir dibanding bagian yang lainnya. Selain itu, kecipir juga mengandung mineral-mineral penting, seperti kalsium, zink, sodium, potasium, magnesium, fosfor, dan besi (Amoo *et al.*, 2006) yang tertera pada Tabel 3.

Tabel 4. Kandungan mineral pada berbagai bagian tanaman kecipir (dalam mg/100 g bobot segar)

	Daun	Polong muda	Biji tua	Umbi
Potasium	80 – 436	205 – 381	1110 – 1800	550
Phospor	52 – 98	26 – 69	200 – 610	30 – 64
Sulfur	-	-	380	21
Kalsium	113 – 260	53 – 330	80 – 370	25 – 40
Magnesium	54	58	110 – 255	23
Sodium	2,5 – 18	3 - 3,4	14 – 64	33
Besi	2 - 6,2	0,2 - 2,3	2 – 28	0,5 – 3
Mangan	1,5	2,2	4 – 25	10
Zink	1,4	0,2	3,1 – 5	1,3
	Daun	Polong muda	Biji tua	Umbi
Copper	0,5	0,6	1,3	1,3

(Tadera, *et al.*, 1983; Kantha, *et al.*, 1986; Ikhsan, 1990; Hastuti, *et al.*, 2001)

Pada Tabel 4. dapat dilihat bahwa zat besi pada biji tua kecipir sebesar 2 - 28 mg/100 gram. Besarnya kandungan zat besi ini penting untuk pembentukan hemoglobin darah. Adapun kandungan fosfor yang tinggi pada kecipir kurang dapat digunakan sebagai sumber mineral karena sebagian besar terdapat dalam bentuk terikat bersama asam fitat.

Klasifikasi tanaman kecipir

Divisio : Spermatophyta
 Sub division : Angiospermae
 Classis : Dicotyledoneae
 Ordo : Leguminales
 Famili : Papilionaceae
 Genus : Psophocarpus
 Spesies : *Psophocarpus tetragonolobus* L.

Kecipir termasuk dalam ordo *Leguminales* yang mempunyai ciri khas, yaitu terdapat buah yang disebut buah polong, yaitu buah yang berasal dari 1 daun dengan atau tanpa sekat semu. Bila dimasak, kering akan pecah, sehingga biji terlontar keluar atau buah terputus-putus menjadi beberapa bagian menurut sekat-sekat semunya. Diantara anggota-anggotanya yang lain termasuk kecipir ini banyak mengandung nilai gizi yang tinggi karena kandungannya akan karbohidrat, lemak vitamin dalam bijinya (Gembong, 1988).

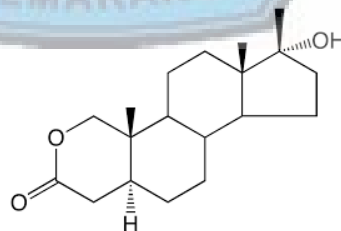
Biji kecipir tua juga dimanfaatkan sebagai bahan utama dari pembuatan tepung kecipir. Alternatif yang bisa dimanfaatkan sebagai bahan pangan selain dari terung yang berbahan dasar dari gandum.

2.1.1 Senyawa Kimia Kecipir

Daun dan biji kecipir mengandung saponin, flavonoida dan tanin (Jhonny, 1993).

a. Steroida/Triterpenoida

Steroid adalah triterpenoid yang kerangka dasarnya sistem cincin siklopentana perhidrofenantren. Uji yang biasa digunakan adalah reaksi Lieberman Burchard (asam asetat anhidrida - H_2SO_4 pekat) yang dengan kebanyakan triterpen dan steroid memberikan warna hijau biru (Harborne, 1987).



Gambar 2. Sruktur Steroida

Sumber : <http://repository.usu.ac.id/>

Triterpenoid adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari enam satuan isoprene dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C_{30} asiklik, yaitu skualena. Senyawa ini berstruktur siklik yang rumit, kebanyakan berupa alkohol,

aldehid atau asam karboksilat. Berupa senyawa warna berbentuk kristal. Sering kali bertitik leleh tinggi dan aktif optik (Harborne, 1987).

Triterpenoid mempunyai fungsi bagi tumbuhan antara lain sebagai pengatur tumbuh, misalnya seskuiterpen absisin dan diterpen giberelin. Karotenoid mempunyai fungsi sebagai senyawa warna tumbuhan dan hampir semua terpenoid C_{40} juga berperan sebagai pigmen fotosintesis (Sirait, 2007).

b. Glikosida

Glikosida adalah suatu senyawa yang jika dihidrolisis akan menghasilkan bagian gula yang disebut glikon dan bagian bukan gula disebut aglikon. Gula yang dihasilkan biasanya adalah glukosa, ramnosa dan lain sebagainya. Jika bagian gulanya adalah glukosa maka disebut glukosida sedangkan jika bagian gulanya selain glukosa disebut glikosida.

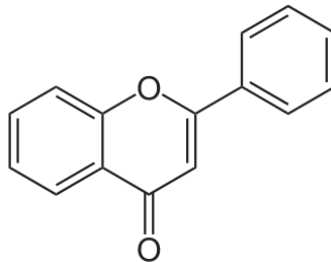
Pembagian glikosida berdasar kan atom yang menghubungkan bagian gula dan bagian bukan gula adalah sebagai berikut:

1. O–glikosida: Jika bagian gula dan bukan gula dihubungkan oleh atom O
2. S–glikosida: Jika bagian gula dan bukan gula dihubungkan oleh atom S
3. N–glikosida: Jika bagian gula dan bukan gula dihubungkan oleh atom N
4. C–glikosida: Jika bagian gula dan bukan gula dihubungkan oleh atom C

Glikosida mempunyai beberapa fungsi diantaranya sebagai penghasil hormon steroid, racun ikan, perlindungan terhadap serangga, pencahar dan lain–lain (Sirait, 2007)

c. Flavonoida

Flavonoida merupakan golongan fenol yang mengandung 15 atom karbon yang tersusun dalam konfigurasi $C_6-C_3-C_6$, yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh tiga satuan karbon (Markham, 1988).



Gambar 3. Struktur Flavonoida

Sumber : <http://repository.usu.ac.id/>

Umumnya senyawa flavonoida dalam tumbuhan terikat dengan gula disebut sebagai glikosida dan aglikon flavonoida yang berbeda-beda mungkin saja terdapat pada satu tumbuhan dalam beberapa bentuk kombinasi glikosida. Oleh karena itu dalam menganalisis flavonoida biasanya lebih baik memeriksa aglikon yang telah dihidrolisis dibandingkan dalam bentuk glukosida dengan kerumitan strukturnya. Flavonoida berkhasiat sebagai antioksidan, antibakteri dan inflamasi (Harborne, 1987).

d. Tanin

Tanin merupakan senyawa kompleks yang tersusun dari polifenol yang sukar dipisahkan dan tidak membentuk kristal. Tanin tersebar hampir pada semua tumbuhan dan biasanya terdapat pada bagian daun, buah, akar dan batang. Tanin dan senyawa turunannya bekerja dengan jalan menciutkan selaput lendir pada saluran pencernaan dan di bagian kulit yang luka. Pada perawatan untuk luka bakar, tanin dapat mempercepat pembentukan jaringan yang baru sekaligus dapat melindunginya dari infeksi atau sebagai antiseptik (Tyler, 1976).

Tanin terdapat luas dalam tumbuhan berpembuluh dalam *angiospermae* terdapat khusus dalam jaringan kayu. Secara kimia terdapat dua jenis utama tannin, yaitu tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Tanin terhidrolisis penyebarannya terbatas pada tumbuhan berkepingdua, sedangkan tanin terkondensasi terdapat dalam tumbuhan paku-pakuan dan *gymnospermae* serta tersebar luas dalam *angiospermae*. Tanin dapat

diidentifikasi dengan cara penambahan pereaksi ferri klorida menghasilkan warna hijau kehitaman atau biru kehitaman (Harborne, 1987).

e. Saponin

Saponin adalah glikosida triterpen dan sterol. Saponin merupakan senyawa aktif permukaan, bersifat seperti sabun dan dapat dideteksi berdasarkan kemampuannya membentuk busa dan menghemolisis sel darah. Pembentukan busa yang mantap sewaktu mengekstraksi tumbuhan atau pada waktu memekatkan ekstrak tumbuhan merupakan bukti terpercaya akan adanya saponin (Harborne, 1987).

Senyawa golongan ini banyak terdapat pada tumbuhan tinggi. Keberadaan saponin sangat mudah ditandai dengan pembentukan larutan koloidal dengan air yang apabila dikocok menimbulkan buih yang stabil. Saponin merupakan senyawa berasa pahit menusuk, menyebabkan bersin dan sering mengakibatkan iritasi terhadap selaput lendir (Gunawan dan Mulyani, 1995).

Dari segi ekonomi saponin memiliki toksisitas yang umum terhadap hewan ternak, misalnya alfalfa atau rasanya yang manis misalnya glisirizin dari radiks liquorice (Sirait, 2007).

2.2 Enzim Amilase

Enzim adalah golongan protein yang paling banyak terdapat dalam sel hidup, dan mempunyai fungsi penting sebagai katalisator reaksi biokimia (Wirahadikusumah, 1977). Yang terjadi dalam sel maupun di luar sel. Suatu enzim dapat mempercepat reaksi 10⁸ sampai 10¹¹ kali lebih cepat dari pada reaksi tersebut dilakukan tanpa katalis (Poedjiadi, 1994).

Enzim memiliki berat molekul mulai dari 12.000 sampai lebih dari 1 juta. Enzim bersifat spesifik dalam kerja katalitiknya. Kespesifikan ini disebabkan oleh bentuknya yang unik dan adanya gugus-gugus polar atau nonpolar dalam struktur enzim (Fessenden, 1992). Kestabilan enzim sebagai katalis dibandingkan dengan katalis sintetik antara lain:

1. Enzim mempunyai spesifitas tinggi.
2. Enzim bekerja secara spesifik (hanya mengkatalisis substrat tertentu).
3. Tidak berbentuk produk samping yang tidak diinginkan.
4. Mempunyai produktivitas tinggi.
5. Produk akhir pada umumnya tidak terkontaminasi sehingga mengurangi biaya purifikasi dan mengurangi efek kerusakan terhadap lingkungan (Chaplin dan Bucke, 1990).

Enzim amilase termasuk golongan enzim hidrolase. Enzim amilase merupakan enzim yang mempunyai aktivitas memecah ikatan-ikatan pada amilum hingga terbentuk maltosa (Poedjadi, 1994). Amilase dapat dikelompokkan menjadi tiga yaitu α -amilase, β -amilase, dan glukamilase (Rahman, 1992).

a. α -Amilase Enzim

α -Amilase menghidrolisis ikatan α -1,4 glukosidik amilosa, amilopektin dan glikogen. Enzim ini bersifat sebagai endoamilase, yaitu enzim yang memecah pati secara acak dari tengah atau bagian dalam molekul. Berat molekul α -amilase rata-rata ± 50 kd. Enzim ini mempunyai rantai peptida tunggal pada gugusan proteinnya dan setiap molekul mengandung satu gram atom Ca. Adanya kalsium yang berikatan dengan molekul protein enzim, membuat enzim α -amilase bersifat relatif tahan terhadap suhu, pH, dan senyawa seperti urea (Suhartono, 1989). Secara umum α -amilase stabil pada pH 5,5 – 8,0 dan aktivitas optimum secara normal berada pada pH 4,8 – 6,5. Amilase dari *Bacillus subtilis* mempunyai pH optimum 6,0 dan suhu optimum 60°C (Judoamidjojo, 1989).

Hidrolisis amilosa oleh α -amilase terjadi melalui dua tahap, pertama adalah degradasi menjadi dekstrin yang terjadi secara acak. Degradasi ini terjadi sangat cepat diikuti dengan menurunnya viskositas dengan cepat. Tahap kedua relatif sangat lambat dengan pembentukan glukosa dan maltosa sebagai hasil akhir (Suhartono, 1989). Aktivitas α -amilase dapat diukur berdasarkan penurunan kadar pati yang larut,

kadar dekstrin yang terbentuk, dan pengukuran viskositas atau jumlah gula pereduksi yang terbentuk (Judoamidjojo *et al.*, 1989).

Pati bereaksi secara kimiawi dengan iodium, reaksi ini terlihat sebagai warna biru-kehitaman. Warna ini terjadi bila molekul iodium masuk ke dalam bagian yang kosong pada molekul zat pati (amilosa) yang berbentuk spiral. Bila zat pati ini telah diuraikan menjadi maltosa atau glukosa, warna biru tidak terjadi karena tidak adanya bentuk spiral (Lay, 1994).

Aktivitas enzim α -amilase ditentukan dengan mengukur penurunan kadar pati yang larut dengan menggunakan substrat jenuh. Kejenuhan pati berpengaruh terhadap laju reaksi enzimatis. Apabila larutan pati terlalu jenuh maka enzim sulit terdifusi ke dalam larutan sehingga kerja enzim akan terhambat (Winarno, 1986).

b. β -Amilase

β -Amilase (β -1,4 glukon malthohidrolase), memecah pati dari luar molekul dan menghasilkan unit-unit maltosa dari ujung non pereduksi pada rantai polisakarida. Bila tiba pada ikatan α -1,6 glukosida seperti yang dijumpai pada amilopektin atau glikogen, aktivitas enzim ini akan terhenti. Enzim ini bekerja pada ikatan α -1,4 glukosida dan memiliki pH optimum antara 5 - 6. (Judoamidjojo, 1989).

c. Glukoamilase

Glukoamilase (α -1,4-D-glukan glukohidrolase) memecah ikatan α -1,4 dalam amilose, amilopektin, dan glikogen dari ujung gula non pereduksi. Enzim ini dapat juga menghidrolisis ikatan α -1,6 dan α -1,3, meskipun pemecahan ikatan tersebut sangat lambat. pH optimum enzim ini adalah 4-5 (Judoamidjojo, 1989). Faktor yang mempengaruhi kerja enzim Kerja enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain :

a. Ph

Struktur ion enzim bergantung pada pH lingkungan. Enzim dapat berbentuk ion positif dan ion negative (Zwitter ion). Dengan demikian perubahan pH akan mempengaruhi efektivitas bagian aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim-substrat. pH yang rendah atau pH yang tinggi dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi dan ini akan mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim (Poedjiadi, 1994).

b. Suhu

Suhu yang rendah menyebabkan reaksi kimia berlangsung lambat, sedangkan pada suhu tinggi, reaksi kimia akan berlangsung cepat. Pada enzim, suhu yang tinggi menyebabkan terjadinya proses denaturasi. Hal ini menyebabkan bagian aktif enzim terganggu dan dengan demikian konsentrasi efektif enzim menjadi berkurang dan kecepatan reaksinya pun akan menurun (Martono, 1993).

c. Konsentrasi enzim

Pada suatu konsentrasi substrat tertentu, laju reaksi meningkat secara linier dengan bertambahnya konsentrasi enzim (Page, 1997).

d. Konsentrasi substrat

Pada konsentrasi enzim tetap dan konsentrasi substrat rendah, kompleks enzim-substrat yang terbentuk sedikit (masih banyak enzim bebas/tidak berikatan dengan substrat). Bila konsentrasi substrat diperbesar, maka makin banyak substrat yang bereaksi dengan sisi aktif enzim, sehingga konsentrasi enzim-substrat makin besar dan menyebabkan meningkatnya laju reaksi. Namun pada batas konsentrasi substrat tertentu, semua enzim telah bereaksi dengan substrat (tidak terdapat enzim bebas). Dalam kondisi ini, bertambahnya konsentrasi substrat tidak menyebabkan bertambahnya konsentrasi enzim-substrat, sehingga laju reaksinya pun tidak meningkat (Poedjiadi, 1994).

e. Inhibitor

Inhibitor merupakan suatu zat yang dapat menghambat reaksi enzimatik. Ikatan inhibitor dengan enzim dapat mengubah kemampuan enzim dalam mengikat substrat

dan mengubah kemampuan daya katalisator enzim. umumnya inhibitor akan menyerang sisi aktif enzim sehingga enzim tidak lagi berikatan dengan substrat dan tidak memiliki fungsi katalitik (Lehninger, 1998).

f. Waktu inkubasi

Waktu inkubasi yang dibutuhkan enzim untuk bereaksi dengan substrat secara optimum adalah berbeda-beda. Ada beberapa enzim membutuhkan waktu inkubasi yang lama untuk bereaksi dengan substrat (Lehninger, 1998).

2.2.1 Klasifikasi Enzim Amilase

Menurut Rohman (1992) enzim amilase dikelompokkan menjadi α -Amilase, β -Amilase dan Glukoamilase. α -Amilase yaitu enzim yang memecah pati secara acak dari tengah atau bagian dalam molekul. β -Amilase memecah pati dari luar molekul dan menghasilkan unit-unit maltosa dari ujung non pereduksi pada rantai polisakarida, sedangkan Glukoamilase memecah ikatan α -1,4 dalam amilose, amilopektin, dan glikogen dari ujung gula non pereduksi.

2.2.2 Sumber-Sumber Enzim Amilase

Sumber enzim amilase yang telah diketahui berasal dari hewan, mikroorganisme dan tanaman. Enzim amilase dapat diperoleh dari berbagai sumber seperti tanaman, binatang dan mikroorganisme. Penggunaan enzim dari mikroorganisme memiliki beberapa kelebihan diantaranya: lebih mudah isolasinya, lebih sederhana dibandingkan enzim yang berasal dari tumbuhan maupun hewan dan dapat dikendalikan dengan baik pada proses pembuatannya (Wang, 1979). Salah satu sumber penghasil enzim amilase yang paling banyak diteliti adalah bakteri. Pemilihan bakteri sebagai sumber enzim amilase disebabkan beberapa alasan yaitu:

1. Bakteri mudah cepat tumbuh dengan kecepatan yang lebih cepat dibandingkan makhluk hidup lainnya.
2. Skala produksi enzim mudah ditingkatkan.
3. Biaya produksi enzim relatif rendah.

4. kondisi produksi tidak bergantung pada musim dan waktu proses produksi lebih pendek (Poernomo dan Djoko, 2003).

2.3 Bakteri Amilolitik

Bakteri adalah kelompok mikroorganisme bersel tunggal dengan konfigurasi selular prokariotik (tidak memiliki inti). Bakteri sebagai makhluk hidup memiliki informasi genetik berupa DNA tetapi tidak terlokalisasi dalam tempat khusus (nukleus) dan tidak ada membran inti. DNA pada bakteri berbentuk sirkuler, panjang dan biasa disebut nukleoid. DNA bakteri tidak mempunyai intron dan hanya tersusun atas ekson saja. Bakteri juga memiliki DNA ekstrakromosal yang tergabung menjadi plasmid yang berbentuk kecil dan sirkuler (Jawetz, 2004).

Berdasarkan peranannya dalam memproduksi enzim, terdapat bakteri yang disebut sebagai amilolitik. Bakteri amilolitik adalah bakteri yang mampu memproduksi enzim amilase ekstraseluler, yaitu enzim yang mampu memecah pati menjadi senyawa yang lebih sederhana (Abraham, 1993). Pada umumnya bakteri amilolitik adalah bakteri dari genus *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Streptobacillus*, dan *Staphylococcus*.

Semua bakteri umumnya mempunyai enzim amilase dalam sel, tetapi tidak semua mempunyai enzim amilase ekstraseluler. Mikroorganisme melalui sistem enzim yang kompleks, memecah amilase menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana.

Bakteri amilolitik dapat digolongkan menjadi beberapa kelompok :

1. *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis*, dan *Bacillus amyloliquefaciens* diketahui sebagai penghasil α -Amilase termostabil yang baik, bakteri tersebut telah banyak digunakan untuk produksi komersial dari enzim untuk berbagai aplikasi.

2. Amilase halofilik telah dikarakterisasi dari bakteri halofilik seperti *Chromohalobacter* sp., *halobacillus* sp., *Holaarcula hispanica*, *Halomonas meridiana*, dan *Bacillus dipsosauri*.

3. Kelompok bakteri *Bacillus*, *Clostridium*, *Bacteriodes*, *Micrococcus*, *Thermus*, dan *Actinomycetes* (Reddy *etal.*,2003).

2.3.1 Identifikasi Bakteri amilolitik

Identifikasi bakteri amilolitik secara mikrobiologi dilakukan dengan cara mengidentifikasi koloni bakteri penghasil amilase dengan menggunakan analisis fenotip yang meliputi pengamatan morfologi dan pewarnaan gram. Pengamatan morfologi bakteri penghasil amilase dapat dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada medium non selektif *Nutrient Agar* (NA).Morfologi yang dapat diamati secara makroskopis meliputi warna koloni, bentuk, tepi, elevasi, ukuran, dan konsistensi (Putri, 2012).

Bakteri juga dapat dilihat jenis dan bentuknya secara mikroskopis melalui pewarnaan gram. Pada pewarnaan gram akan diketahui bakteri tergolong dalam gram negatif atau gram positif. Selain itu bentuk bakteri yang dapat ditemukan dengan pengamatan menggunakan mikroskop yaitu bentuk basil (batang), kokus (bulat) dan spiral. Bentuk sel kokus terdapat sebagai sel bulat tunggal, berpasangan (diplokokus), berantai (streptkokus) atau berkelompok seperti buah anggur (stafilokokus). Bentuk sel berupa batang biasanya bervariasi, memiliki panjang mulai dari batang pendek sampai batang panjang yang melebihi dari beberapa kali diameternya (Murwani, 2015).

Identifikasi morfologi bakteri penghasil amilase dapat dilihat dengan cara mengisolasi bakteri menggunakan media pati larut(Soluble srach).Pepton Starch cair dengan komposisi: Meat Extract, Peptic digest of animal tissue, Starch, soluble, Agar, sampai pH (25°C) 7.2 ± 0.1 . Timbulnya zona bening dengan diameter ≥ 12 mm

menandakan adanya bakteri amilase yang dapat menghidrolisis amilum (Vedder, 1915).

2.4 Fermentasi

Fermentasi merupakan suatu proses perubahan kimia pada suatu substrat organik melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme (Suprihatin, 2010). Proses fermentasi dibutuhkan starter sebagai mikroba yang akan ditumbuhkan dalam substrat. Starter merupakan populasi mikroba dalam jumlah dan kondisi fisiologis yang siap diinokulasikan pada media fermentasi (Prabowo, 2011).

Fermentasi dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu spontan dan tidak spontan. Fermentasi spontan adalah yang tidak ditambahkan mikroorganisme dalam bentuk starter atau ragi dalam proses pembuatannya, sedangkan fermentasi tidak spontan adalah yang ditambahkan starter atau ragi dalam proses pembuatannya. Mikroorganisme tumbuh dan berkembang secara aktif merubah bahan yang difermentasi menjadi produk yang diinginkan pada proses fermentasi (Suprihatin, 2010). Proses optimum fermentasi tergantung pada jenis organismenya (Sulistyaningrum, 2008). Hidayat dan Suhartini (2013) menambahkan faktor yang mempengaruhi proses fermentasi adalah suhu, pH awal fermentasi, inokulum, substrat dan kandungan nutrisi medium.

2.5 Degradasi

Degradasi adalah suatu reaksi perubahan kimia atau peruraian suatu senyawa atau molekul menjadi senyawa atau molekul yang lebih sederhana (Yatim, 2007). Misalnya, penguraian polisakarida selulosa menjadi monosakarida (glukosa). Degradasi polimer dasarnya berkaitan dengan terjadinya perubahan sifat karena ikatan rantai utama makromolekul. Pada polimer linear, reaksi tersebut mengurangi massa molekul atau panjang rantainya. Faktor-faktor yang mempengaruhi degradasi antara lain :

- a. Substrat

Ukuran dan komponen senyawa yang menyusun substrat merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi degradasi. Degradasi akan berlangsung lebih cepat bila ukuran substrat lebih kecil dan senyawa penyusunnya lebih sederhana. Sebaliknya, jika ukuran substrat lebih besar dan senyawa penyusunnya lebih kompleks dibutuhkan waktu yang lebih lama untuk mendegradasinya.

b. pH

pH aktivitas enzim sangat penting untuk proses degradasi, karena enzim-enzim tertentu hanya akan mengurai suatu substrat sesuai dengan aktivitasnya pada pH tertentu. Umumnya fungi menyukai pH di bawah 7 (Gandjar, 2006).

c. Suhu

Selain pH, suhu juga mempengaruhi kerja enzim untuk mendegradasi substrat. Peningkatan suhu menyebabkan energi kinetik pada molekul substrat dan enzim meningkat, sehingga degradasi juga meningkat. Namun suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan rusaknya enzim yang disebut denaturasi, sedangkan suhu yang terlalu rendah dapat menghambat kerja enzim. Bila kerja terhambat atau struktur enzim rusak maka degradasi tidak dapat berlangsung dengan baik.

d. Kelembaban

Kelembaban merupakan faktor penting yang dapat mempengaruhi pertumbuhan fungi, biosintesis, dan sekresi enzim. Kelembaban yang rendah menyebabkan berkurangnya kelarutan nutrisi di dalam substrat, derajat pertumbuhan rendah, dan tegangan air tinggi. Sedangkan level kelembaban yang lebih tinggi dapat menyebabkan berkurangnya enzim yang dihasilkan karena dapat mereduksi porositas (jarak interpartikel) pada matriks padatan, sehingga menghalangi transfer oksigen (Alamet *al.*, 2005). Jika jumlah enzim berkurang, maka proses degradasi akan berlangsung lebih lama.

2.6 Isolasi Bakteri

Mikroorganisme terestial (bumi) dijumpai dimana-mana, disegala lingkungan hidup manusia. Populasi tersebut ada di tanah, lingkungan akuatik, berkisar dari aliran sampai pada lautan dan atmosfer (Hajoeningtjas, 2012). Mikroorganisme yang terdapat pada suatu lingkungan alami merupakan populasi campuran dari berbagai macam jenis, baik mikroorganisme pada tanah, air, udara, makanan, maupun yang terdapat pada tubuh hewan dan tumbuhan. Pemisahan bakteri pada populasi campuran diperlukan untuk mengetahui berbagai jenis, mempelajari kultural, morfologi, fisiologi dan karakteristik dari bakteri tersebut. Teknik pemisahan tersebut disebut isolasi yang disertai dengan pemurnian (Soeroso, 1999).

Isolasi bakteri merupakan suatu proses pengambilan bakteri dari medium atau lingkungan asalnya lalu menumbuhkannya pada medium buatan sehingga dapat memperoleh biakan bakteri yang murni (Singelton & Sainsbury, 2006). Cara atau metode yang dapat dilakukan untuk memperoleh mikroorganisme yang murni dari suatu biakan campuran yaitu metode cawan gores dan cawan tuang (Hadioetomo, 1993).

a. Metode Cawan Gores

Metode cawan gores dalam isolasi bakteri bertujuan untuk membuat garis sebanyak mungkin pada permukaan media biakan menggunakan jarum ose atau ose tusuk. Mikroba yang terlepas pada garis-garis goresan tersebut semakin lama semakin sedikit, sehingga pada garis terakhir koloni yang terbentuk akan terpisah agak jauh dan sebagai koloni tunggal. Koloni tunggal adalah koloni yang timbul dan tumbuh secara terpisah dari satu sel atau beberapa sel. Pada umumnya koloni sel memiliki ukuran kecil-kecil (Irianto, 2012).

b. Metode Cawan Tuang

Metode cawan tuang yang dilakukan dalam isolasi bakteri bertujuan untuk menentukan perkiraan jumlah bakteri hidup dalam suatu sample dan isolasi mikroorganisme. Hasil perhitungan jumlah bakteri dengan cara ini dinyatakan dalam

bentuk koloni (Irianto, 2012). Menurut Hadioetomo (1993) metode cawan tuang digunakan untuk memperoleh koloni murni dari populasi campuran mikroorganisme.

c. Metode Pengenceran (diltion method)

Metode pengenceran (dilution method) pada prinsipnya adalah cara untuk melarutkan sample ke dalam akuades steril sehingga lebih mudah dalam isolasi mikroorganisme. Suspensi sample yang berupa campuran bermacam- macam spesies diencerkan dengan medium steril dengan harapan pada akhirnya akan diperoleh pertumbuhan dari suatu sel (Stainer, 1982).

d. Metode Cawan Sebar

Metode cawan sebar pada umumnya sama dengan cawan gores menggunakan ose steril yang dicelupkan ke dalam suspensi organisme yang diencerkan, lalu dibuat serangkain goresan sejajar yang tidak saling menutupi di atas permukaan yang telah memadat (Stainer, 1982).

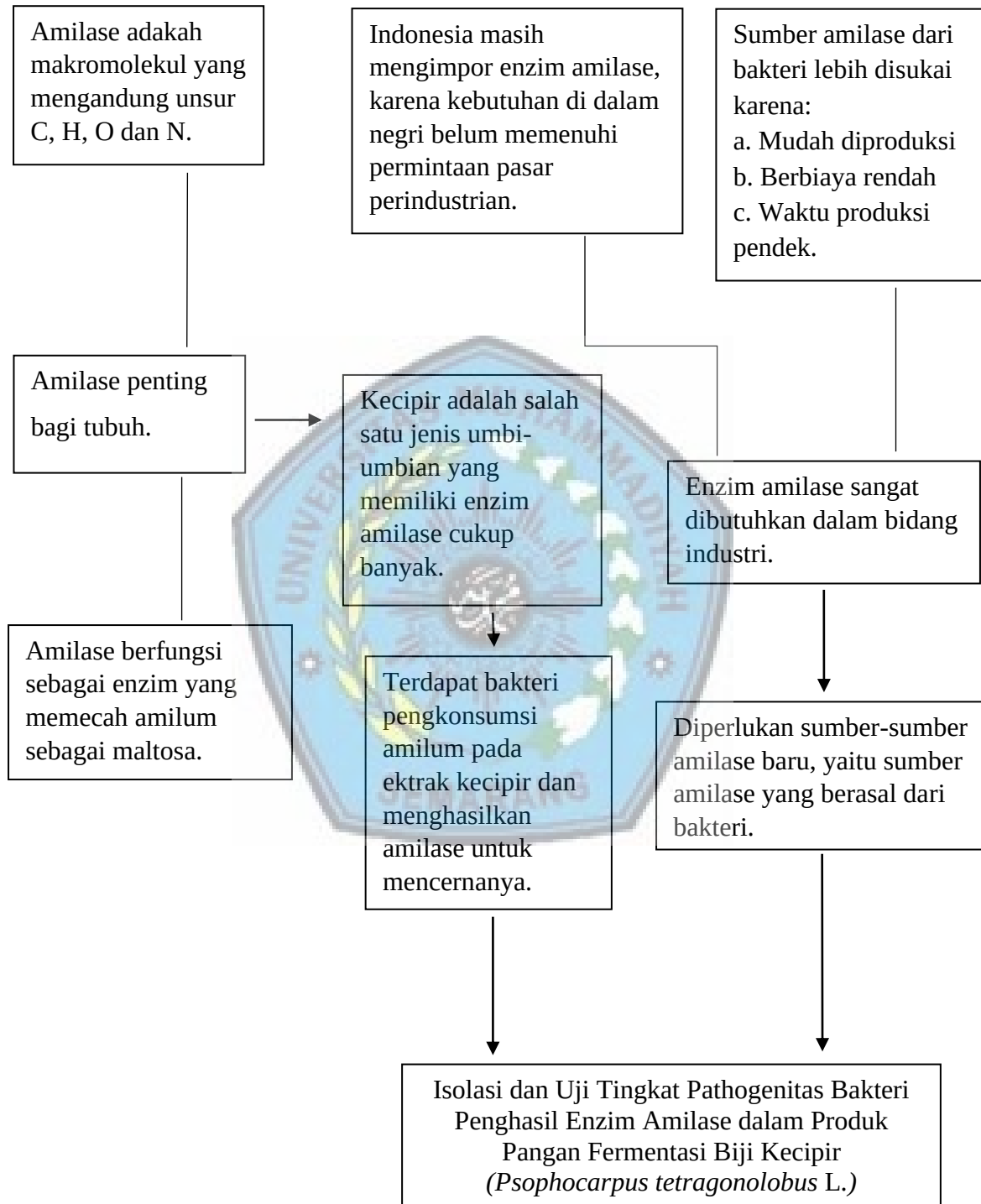
2.7 Uji Tingkat Pathogenitas

Seleksi patogenitas dapat dilakukan menggunakan media selektif bakteri patogen, yaitu MC dan BAP (Ethica *et, al.*, 2017). Bakteri nonpatogen pada media MC umumnya mampu memfermentasikan laktosa, dan pada media BAP bakteri nonpatogen umumnya tidak mampu melisiskan darah (Ethica, 2018). Media MC merupakan media selektif karena mengandung garam empedu (bile salts) dan crystal violet yang menghambat pertumbuhan bakteri gram positif. Media MC juga merupakan media diferensial karena mampu membedakan bakteri berdasarkan kemampuan memfermentasi laktosa (Leboffe dan Pierce, 2011). Media MC mengandung indikator pH berupa Neutral red, sehingga bakteri yang termasuk laktosa fermenter dalam suasana asam akan menghasilkan warna merah muda. Media BAP merupakan media diperkaya karena mengandung 5% darah, sehingga medium ini mampu mengisolasi dan mengkultivasi berbagai macam bakteri yang umumnya sulit ditumbuhkan. Media BAP juga termasuk media diferensial karena dapat

membedakan bakteri berdasarkan kemampuan dalam menghemolisis sel darah merah (Willey *et, al.*, 2009). Ada 3 tipe hemolisis yaitu, β -hemolisis, α -hemolisis, γ -hemolisis. Bakteri dengan tipe β hemolisis mampu mendestruksi sel darah merah dan hemoglobin secara sempurna sehingga menghasilkan zona jernih disekitar koloninya. Bakteri α -hemolisis mendestuksi sel darah sebagian sehingga menghasilkan warna hijau disekitar koloni. Bakteri γ -hemolisia tidak mampu mendestruksi sel darah merah sehingga tidak mampu mengubah warna media di sekitar koloni (Leboffe dan Pierce, 2011).



2.8 Kerangka Teori



Bagan 1. Kerangka teori identifikasi bakteri penghasil amilase.

