

LAPORAN AKHIR
PENELITIAN DASAR KOMPETITIF NASIONAL



BIOPROSPECTING EXTREMOPHILES MICROORGANISMS UNTUK
APLIKASI INDUSTRI PANGAN

Ketua/Anggota Tim

Indrayani, S.Pi, M.Biotech.Stu, Ph.D NIDN: 0023127404 (Ketua)

Reski Praja Putra, S.TP, M.Si NIDN:0006048408 (Anggota)

Di biyai oleh
Direktorat Riset, Teknologi, dan Pengabdian Kepada Masyarakat,
Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Riset, dan Teknologi
Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi
Sesuai dengan Kontrak Pelaksanaan Program Penelitian
Tahun Anggaran 2022 Nomor: 122/E5/PG.02.00.PT/2022

UNIVERSITAS NEGERI MAKASSAR
NOVEMBER 2022

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Penelitian : Bioprospecting Extremophiles Microorganisms Untuk Aplikasi Industri Pangan

Ketua Peneliti:

a. Nama Lengkap : Indrayani, S.Pi, M.Biotech.Stu, Ph.D
b. NIP/NIDN : 197412232001122001/0023127404
c. Jabatan Fungsional : Lektor
d. Program Studi : Pendidikan Terknologi Pertanian
e. Nomor HP : 087840311101 / 082188629424
f. Alamat surel (e-mail) : indrayani@unm.ac.id

Anggota Peneliti (1)

a. Nama Lengkap : Reski Praja Putra, S.TP, M.Si
b. NIP/NIDN : 0006048408
c. Perguruan Tinggi : Universitas Negeri Makassar

Lama Penelitian : 3 Tahun

Tahun ke- : 1

Biaya Penelitian : Rp. 85.600.000

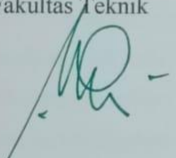
Jumlah Mahasiswa Yang Dilibatkan: 2 Orang

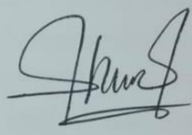
Makassar, 20-November-2022

Mengetahui,

Dekan Fakultas Teknik

Ketua Peneliti,


Prof. Dr. H. Muhammad Yahya, M.Kes, M. Eng
NIP 19630623199103 1 002


Indrayani, S.Pi, M.Biotech.Stu, Ph.D
NIP 19741223 200112 2 001

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat
Universitas Negeri Makassar



Prof. Dr. H. Bakhran A. Rauf, M.T.
NIP. 19611016 198803 1 006

RINGKASAN

Extremophiles adalah organisme yang hidup pada lingkungan ekstrim yang memiliki kondisi fisika-kimia di atas ambang batas normal untuk mendukung kehidupan sebagian besar organisme. Yang termasuk habitat ekstrim diantaranya adalah habitat dengan suhu dan pH yang sangat tinggi atau rendah serta lingkungan dengan tekanan, radiasi, salinitas serta bahan pencemar yang sangat tinggi. Extremophiles telah berevolusi dan mengembangkan berbagai strategi dan mekanisme untuk hidup dalam kondisi yang ekstrim tersebut. Mikroorganisme merupakan organisme yang paling banyak ditemukan pada habitat ekstrim. Hal inilah yang menjadikan mikroorganisme extremophiles sebagai objek yang potensial untuk bioprospeksi penemuan dan pengembangan produk bioaktif baru untuk berbagai aplikasi komersial termasuk dalam industri makanan, pharmaceuticals, nutraceuticals dan cosmeceuticals.

Habitat ekstrim banyak ditemukan di Sulawesi Selatan diantaranya sumber air panas (hot springs) dan tambak garam (salt ponds) dimana mikroorganisme yang hidup pada habitat ekstrim tersebut belum diteliti dan dieksplorasi potensi pemanfaatannya untuk berbagai aplikasi industri. Penelitian ini membuka peluang yang sangat besar bagi penemuan senyawa-senyawa baru untuk dikembangkan menjadi produk bioteknologi untuk berbagai aplikasi industri termasuk pangan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk; 1). mengisolasi bakteri dan mikroalga pada habitat ekstrim yang terdapat di Sulawesi Selatan. 2). mengkarakterisasi senyawa kimia yang dihasilkan oleh isolat bakteri maupun mikroalga. 3). mengoptimalkan produksi produk komersial yang dihasilkan oleh isolate bakteri maupun mikroalga extremophiles.

Penelitian ini rencananya akan berlangsung selama 3 tahun. Adapun rencana kegiatan yang akan dilakukan adalah Tahun 1). Melakukan isolasi bakteri dan mikroalga pada beberapa habitat ekstrim yang ada di Sulawesi Selatan diantaranya Waepella Hot Spring di Kabupaten Sinjai, Hot Spring Le'ja di Kabupaten Soppeng, Hot spring Sulili di Kabupaten Pinrang, Hot Spring Wae Makkula di Kabupaten Tanah Toraja, dan tambak garam kab. Jeneponto. Pada Tahun ke 2) Melakukan karakterisasi terhadap isolate yang dihasilkan. Untuk bakteri akan dilakukan karakterisasi morfologi, pewarnaan gram, endospora, uji enzimatis (katalase, amilase, selulase, pectinase, proteinase dan lipase) sedangkan untuk mikroalga akan dilakukan karakterisasi pertumbuhan serta komposisi biokimia (protein, karbohidrat, lipid, pigments, metabolite sekunder). Pada tahun ke 3) Melakukan optimasi terhadap pertumbuhan serta

produksi produk target yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai produk pangan komersil.

Luaran yang ditargetkan dari penelitian ini adalah Tahun 1). Akan dihasilkan puluhan hingga ratusan isolat mikroorganisme yang akan disimpan pada pusat koleksi mikroba Prodi Pendidikan Teknologi Pertanian UNM; 2 Publikasi pada jurnal internasional bereputasi yakni Biodiversitas (Scopus, Q3) atau AACL Bioflux (Scopus, Q3). Pada tahun 2). 2 Publikasi pada jurnal internasional bereputasi yaitu Journal of Applied Phycology (Springer Nature, Q2); draft paten sederhana. Pada tahun 3). Publikasi pada jurnal internasional bereputasi yaitu Journal of Applied Microbiology/Bioresource Technology (Elsevier, Q1); paten sederhana (terdaftar) TKT penelitian ini adalah untuk tahun ke-1 berada pada TKT 1, tahun ke-2 berada pada TKT 2 dan tahun ke-3 masuk ke TKT 3.

PRAKATA

Puji dan syukur kami panjatkan kehadiran Allah SWT atas limpahan Berkah, Rahmat, Karunia dan RidhoNya sehingga kami dapat menyelesaikan Laporan Kemajuan Penelitian yang berjudul: “Bioprospecting Extremophiles Microorganisms Untuk Aplikasi Industri Pangan”. Laporan ini disusun sebagai salah satu bentuk pertanggungjawaban ilmiah atas kegiatan penelitian yang dilakukan oleh Tim Peneliti berdasarkan Surat Keputusan Nomor 122/E5/PG.02.00.PT/2022 dan Perjanjian/Kontrak Nomor 2389/UN36.11/LP2M/2022

Pada kesempatan ini peneliti mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Bapak Rektor Universitas Negeri Makassar yang telah memberikan kepercayaan dan dukungan kepada peneliti untuk melakukan penelitian ini
2. Bapak Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Pada Masyarakat Universitas Negeri Makassar beserta unsurnya yang telah memberikan kesempatan dan kepercayaan kepada peneliti untuk melakukan penelitian ini.
3. Bapak Dekan Fakultas Teknik Universitas Negeri Makassar atas kepercayaan dan dukungan kepada peneliti untuk melakukan penelitian ini
4. Bapak/Ibu Dosen Program Studi Pendidikan Teknologi Pertanian atas bantuan dan kerjasamanya sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.
5. Adik-adik mahasiswa yang dilibatkan dalam penelitian ini atas bantuan dan kerjasamanya sehingga penelitian ini dapat diselesaikan dengan baik dan tepat waktu.

Akhirnya, peneliti mengharapkan agar Laporan Kemajuan Penelitian ini dapat bermanfaat bagi pembaca dan berkontribusi pada pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi khususnya dibidang bioteknologi pangan. Peneliti menyadari bahwa Laporan ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, kritik dan saran yang bersifat konstruktif dari para pembaca sangat diharapkan, guna perbaikan dan penyempurnaan Laporan ini. Peneliti tak lupa menyampaikan permohonan maaf jika dalam penulisan Laporan Kemajuan Penelitian ini terdapat kekeliruan dan kekurangan.

Demikian, dan terima kasih.

Makassar, November 2022

Tim Peneliti.

DAFTAR ISI

| | |
|--|------|
| HALAMAN SAMPUL | ii |
| HALAMAN PENGESAHAN | iii |
| RINGKASAN | iv |
| PRAKATA | v |
| DAFTAR ISI | vi |
| DAFTAR TABEL | vii |
| DAFTAR GAMBAR | viii |
| DAFTAR LAMPIRAN | ix |
| BAB I. PENDAHULUAN | 1 |
| BAB II. TINJAUAN PUSTAKA | 3 |
| BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN | 9 |
| BAB IV. METODE PENELITIAN | 10 |
| BAB V. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI | 14 |
| BAB VI. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA | 25 |
| BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN | 26 |
| DAFTAR PUSTAKA | 27 |
| LAMPIRAN | 30 |

DAFTAR TABEL

| | | |
|----|--|----|
| 1 | Parameter kualitas air sumber air panas Lejja Kabupaten Soppeng | 14 |
| 2 | Karakteristik isolate Bakteri dari sumber air panas Lejja Kabupaten Soppeng | 14 |
| 3 | Parameter kualitas air sumber air panas Sulili Kabupaten Pinrang | 15 |
| 4 | Karakteristik isolate Bakteri dari sumber air panas Sulili Kabupaten Pinrang | 15 |
| 5 | Parameter kualitas air sumber air panas Wae Makkula Kabupaten Tanah Toraja | 16 |
| 6 | Karakteristik isolate Bakteri dari sumber air panas Wae makkula Kabupaten Tanah Toraja | 16 |
| 7 | Parameter kualitas air sumber air panas Waepella Kabupaten Sinjai | 17 |
| 8 | Karakteristik isolate Bakteri dari sumber air panas Waepella Kabupaten Sinjai | 17 |
| 9 | Amylolytic activity of the isolates | 18 |
| 10 | Cellulolytic enzyme activity of the isolates | 19 |
| 11 | Pectinolytic enzyme activity of the isolates | 20 |
| 12 | Proteolytic enzyme activity of the isolates | 21 |

DAFTAR GAMBAR

| | | |
|---|--|----|
| 1 | Road Map Penelitian “Bioprospecting Extremophiles Mikroorganisme Untuk Aplikasi Industri Pangan | 8 |
| 2 | Bagan Alir Penelitian | 13 |
| 3 | The formation of a clear zone around the paper disk containing bacteria on agar media with 1% starch | 19 |
| 4 | The formation of a clear zone around the paper disk containing bacteria on agar media with 1% pectin | 21 |
| 5 | The formation of a clear zone around the paper disk containing bacteria on agar media with 1% skimmed milk | 21 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | | |
|---|--|--|
| 1 | Personalia tenaga peneliti beserta kualifikasinya (CV) | |
| 2 | Kontrak Pelaksanaan Program Penelitian | |
| 3 | Surat Izin Penelitian | |
| 4 | Surat Keterangan Telah Melakukan Penelitian | |
| 5 | Artikel Ilmiah (draft, status submit/accepted) | |
| 6 | Sertifikat | |

BAB 1. PENDAHULUAN

Bioprospecting didefinisikan sebagai eksplorasi keanekaragaman hayati sebagai sumberdaya genetik dan senyawa biokimia yang bernilai komersial untuk tujuan ekonomi dan konservasi (Firn 2003). Kegiatan bioprospekting memegang peranan penting dalam penemuan dan pengembangan senyawa baru dari sumber-sumber baru untuk menghasilkan produk komersial untuk aplikasi industri termasuk produksi dan proses pengolahan makanan, barang konsumsi, kesehatan masyarakat, lingkungan dan energi. Keanekaragaman mikroorganisme merupakan reservoir sumberdaya hayati yang sangat besar untuk dieksploitasi (Bull et al. 2020; Egorova and Antranikian 2005). Mikroorganisme merupakan sumber enzim yang menarik karena dapat dibudidayakan dalam jumlah banyak dalam waktu yang relatif jangka waktu yang singkat dan dengan demikian mereka dapat menghasilkan berlimpah, pasokan reguler produk enzim yang diinginkan. Lebih-lebih lagi, protein mikroba seringkali lebih stabil daripada enzim sejenis spesifitas yang diperoleh dari sumber tumbuhan atau hewan dan sering mungkin disimpan di bawah kondisi yang kurang ideal selama berminggu-minggu tanpa kehilangan aktivitas biologis yang signifikan (41). Oleh karena itu sebagian besar enzim komersial berasal dari mikroorganisme (95) dan sering digunakan dalam proses komersial yang sebelumnya baik mekanik atau seluler. Mikroorganisme memiliki telah digunakan selama ribuan tahun dalam produksi bir, anggur, cuka, yoghurt dan keju, tetapi jumlah yang potensial dan terealisasi aplikasi terus tumbuh di industri lain juga yaitu, industri kue, industri kulit, industri kertas, industri tekstil dll. (Tabel 1). Banyak enzim memiliki persyaratan yang sangat spesifik untuk pH dan suhu sebelum berfungsi dan cukup sering, persyaratan ini berbeda dari situasi nyata di pabrik industri. Namun, kita sekarang tahu bahwa beberapa mikroorganisme seperti ekstrofil dapat menghasilkan enzim yang dapat bertahan dan berfungsi dalam kondisi ekstrim, yaitu umumnya diperlukan untuk aplikasi ini (34, 85).

Komunitas mikroba di habitat ekstrim yang beragam secara fisiologis beradaptasi dengan tekanan lingkungan yang keras seperti suhu tinggi / rendah, salinitas / hipersalinitas, kekeringan, asam / alkalinitas, radiasi UV dan stres kimia yang beragam [7]. Baru-baru ini, komunitas mikroba (archaeal, bakteri dan jamur) di habitat ekstrim yang keras telah memperhatikan aplikasi di berbagai bidang seperti bioteknologi putih dan hijau, produksi obat-obatan dan makanan dan industri pengolahan makanan [8]. Ekstremofil/ Mikroba adaptif stres diklasifikasikan sebagai mikroba hidup yang bertahan hidup atau beradaptasi di habitat di bawah kondisi stres seperti pH

(asidofilik, basa), tekanan (piezofil), radiasi (tahan radiasi), potensial redoks (Yadav et al 2019a;2019b).

Mikroorganisme ekstremofilik memiliki kemampuan untuk menghasilkan senyawa bioaktif penting seperti asam indol asetat, asam giberelat, sitokinin, hidrogen sianida, amonia, siderofor, 1-aminosiklopropana-1 -karboksilat deaminase dan enzim hidrolitik mikroba ekstraseluler (amilase, protease, pektinase, kitinase, selulase dan lipase) yang memiliki berbagai aplikasi yang sangat luas di berbagai bidang seperti pertanian, industri makanan dan minuman, biodegradasi, pemrosesan kimia, biokonversi hemiselulosa, biologi molekuler, pengomposan, industri deterjen, industri makanan, aditif pakan, industri pakan, industri kulit, industri kertas dan selulosa, sintesis peptida, industri farmasi dan agen terapeutik [11-13] (Dumorne et al 2017; Saxena et al 2020; Kumar et al 2021). Mikroorganisme ekstremofilik digunakan dalam industri makanan dan pengolahan makanan karena memiliki kemampuan untuk menghasilkan berbagai macam senyawa bioaktif, metabolit sekunder dan produk bernilai tambah seperti rasa, bahan makanan, dan vitamin [14, 15] (Rasmussen et al 2007; Barcelos et al 2020).

Habitat ekstrim banyak ditemukan di Sulawesi Selatan diantaranya sumber air panas (hot springs) dan tambak garam (salt ponds) dimana mikroorganisme yang hidup pada habitat ekstrim tersebut belum diteliti dan dieksplorasi potensi pemanfaatannya untuk berbagai aplikasi industri. Penelitian ini membuka peluang yang sangat besar bagi penemuan senyawa-senyawa baru untuk dikembangkan menjadi produk bioteknologi untuk berbagai aplikasi industri termasuk pangan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri dan mikroalga pada habitat ekstrim yang terdapat di Sulawesi Selatan diantaranya Waepella Hot Spring di Kabupaten Sinjai, Hot Spring Le'ja di Kabupaten Soppeng, Hot spring Sulili di Kabupaten Pinrang, Hot Spring Wae Makkula di Kabupaten Tanah Toraja, dan tambak garam kab. Jeneponto.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Extremophiles Mikroba

Mikroorganisme tidak hanya hidup pada perairan umum namun juga dapat bertahan pada kondisi lingkungan yang keras seperti lingkungan dengan tingkat radiasi yang ekstrem, tekanan dan temperatur yang ekstrim (Horneck et al., 2010; Yamagishi et al., 2018). Mikroorganisme ekstremophiles telah beradaptasi dengan sangat baik pada kondisi ekstrem yang memungkinkan mereka untuk hidup bahkan bereproduksi pada lingkungan tersebut (Rothschild and Mancinelli, 2001).

Extremophilic organisms termasuk prokaryotic (archaea dan bacteria/cyanobacteria) serta eukaryotic. Ekstremophiles mikroba dapat digambarkan sebagai acidophilic (memiliki pH yang optimal untuk tumbuh antara pH 1 -5); alkaliphilic (tumbuh optimal pada pH diatas 9); halophilic (tumbuh optimal pada salinitas yang sangat tinggi); thermophilic (tumbuh optimal pada suhu antara 60- 80 °C [140 and 176 °F]); hyperthermophilic (tumbuh optimal pada suhu diatas 80 °C [176 °F]); psychrophilic (tumbuh optimal pada suhu ≤ 15 °C [60 °F] dengan maksimum suhu yang dapat ditolerir adalah 20 °C [68 °F] dan suhu minimal pada/dibawah 0 °C [32 °F]); piezophilic, atau barophilic (otumbuh optimal pada tekanan hidrostatis yang tinggi); oligotrophic (tumbuh pada lingkungan yang miskin nutrient); endolithic (tumbuh didalam batu atau di dalam pori batuan mineral dan xerophilic (tumbuh pada kondisi kering) (Varshney et al. 2015).

Mikroalga merupakan kelompok tumbuhan berukuran renik yang termasuk dalam kelas alga, diameternya antara 3-30 μ m, baik sel tunggal maupun koloni yang hidup di seluruh wilayah perairan tawar maupun laut, yang lazim disebut fitoplankton. Di dunia mikrobial, mikroalga termasuk eukariotik, umumnya bersifat fotosintetik dengan pigmen fotosintetik hijau (klorofil), coklat (fikosantin), biru kehijauan (fikobilin), dan merah (fikoeritrin). Morfologi mikroalga berbentuk uniseluler atau multiseluler tetapi belum ada pembagian tugas yang jelas pada sel-sel komponennya. Hal itulah yang membedakan mikroalga dari tumbuhan tingkat tinggi (Romimohtarto, 2004). Mikroalga merupakan sumber bahan baku alternatif untuk produksi biodiesel. Biodiesel dapat dibuat dari berbagai macam sumber, seperti minyak nabati, lemak hewani, dan sisa dari minyak atau lemak (misalnya sisa minyak penggorengan). Walaupun lemak hewani dapat digunakan, akantetapi minyak nabati merupakan bahan baku yang paling banyak dimanfaatkan untuk biodiesel (Raharjo, 2007). Dalam hasil penelitian yang dilakukan oleh Chisti (2007), mikroalga merupakan satu-satunya sumber bahan terbarukan untuk biodiesel yang

mampu memenuhi permintaan global untuk bahan bakar transportasi, dan berpotensi untuk menggantikan penggunaan bahan bakar fosil secara penuh.

Umumnya organisme tidak mampu bertahan hidup di lingkungan yang ekstrem seperti suhu, salinitas, pH atau keberadaan xenobiotik. Namun, ada daerah di bumi yang kondisi lingkungannya berada di luar batas normal untuk pertumbuhan organisme dan lingkungan yang demikian tergolong sebagai lingkungan yang ekstrim (Varshney et al. 2015). Organisme yang dapat mengatasi pH, suhu, tekanan, dan salinitas yang ekstrem disebut organisme ekstremofil. Terkadang organisme ini memiliki tambahan kualitas seperti kemampuan untuk mengatasi tingkat gas yang sangat tinggi seperti CO₂, atau tumbuh dengan adanya logam dengan konsentrasi tinggi dan beberapa dapat berkembang dengan kombinasi lebih dari satu stres (polyextremophiles). Beberapa organisme bahkan memiliki kemampuan yang luar biasa untuk tumbuh di bawah tingkat radiasi yang sangat tinggi dan mengakumulasi radionuklida (Rivasseau et al., 2013).

Beberapa jenis mikroalga diketahui memiliki kemampuan untuk hidup pada habitat ekstrim termasuk dua jenis mikroalga yang sudah diproduksi secara komersial oleh industri yakni mikroalga hijau *Dunaliella salina* yang diisolasi dari hypersaline pond yang mampu hidup pada salinitas yang sangat tinggi mencapai 3 M atau 300 ppt (Varshney et al. 2015). Jenis yang lainnya adalah mikroalga *Spirulina* yang merupakan alga cyanobacteria berfilamen yang blooming pada danau alkaline dengan pH 9-11 (Silli et al, 2012). *Dunaliella* digunakan sebagai sumber alami β-karoten sedangkan *Spirulina* memiliki pasar sebagai makanan dan pakan tambahan nutrisi manusia dan hewan karena kandungan nutrisinya terutama protein. Faktor kunci keberhasilan komersial kedua spesies ini adalah kemampuan mereka untuk tumbuh dalam kondisi ekstrim tertentu yang membantu mengurangi kontaminasi oleh spesies alga lainnya (Avron dan Ben-Amotz, 1992). Diatom *Amphora* sp. MUR258 memiliki kemampuan hidup pada salinitas yang tinggi hingga 5 kali salinitas air laut (150ppt) dan suhu yang tinggi mencapai 40°C (Indrayani et al. 2019; Indrayani et al. 2020). Diatom *Amphora* ini memiliki kandungan lipid yang sangat tinggi mencapai 65% dari berat biomasnya sehingga potensial untuk dikembangkan sebagai bahan baku biodiesel (Indrayani, 2017).

2.2 Peranan Extremophiles Mikroba dalam Bidang Bioteknologi

Extremophiles mikroba sangat menarik perhatian bioteknologis karena kemampuannya untuk memproduksi extremozymes yakni enzim yang tetap aktif dan fungsional pada kondisi ekstrim. Extremozymes sangat berguna dalam proses produksi industri dan aplikasi research karena kemampuannya untuk tetap aktif pada kondisi yang ekstrim seperti suhu, tekanan dan pH yang tinggi yang digunakan dalam proses industri (Arora and Panosyan 2019).

Potensi komersial mikroalga telah diakui lebih dari 50 tahun namun jumlah spesies mikro-alga yang ada saat ini diproduksi dalam skala besar dalam proses ekonomi yang berkelanjutan masih sangat terbatas (Richmond, 2004). Kendala utama dalam menciptakan perkembangan baru, berbasis mikro-alga terletak pada pencapaian skala besar pada kondisi luar ruangan (Torzillo et al., 2003). Tingginya cahaya, suhu, fluktuasi musiman dan diurnal dalam cahaya dan suhu dan kontaminasi oleh organisme lain mempengaruhi pertumbuhan dan produktivitas pada kultur di luar ruangan (Vonshak dan Richmond, 1988). Dari beberapa strain mikroalga yang telah mencapai tahap menjadi produk yang diperdagangkan secara komersial, terdapat dua mikroalga ekstremofil yaitu *D. Salina* dan *Spirulina* sp.

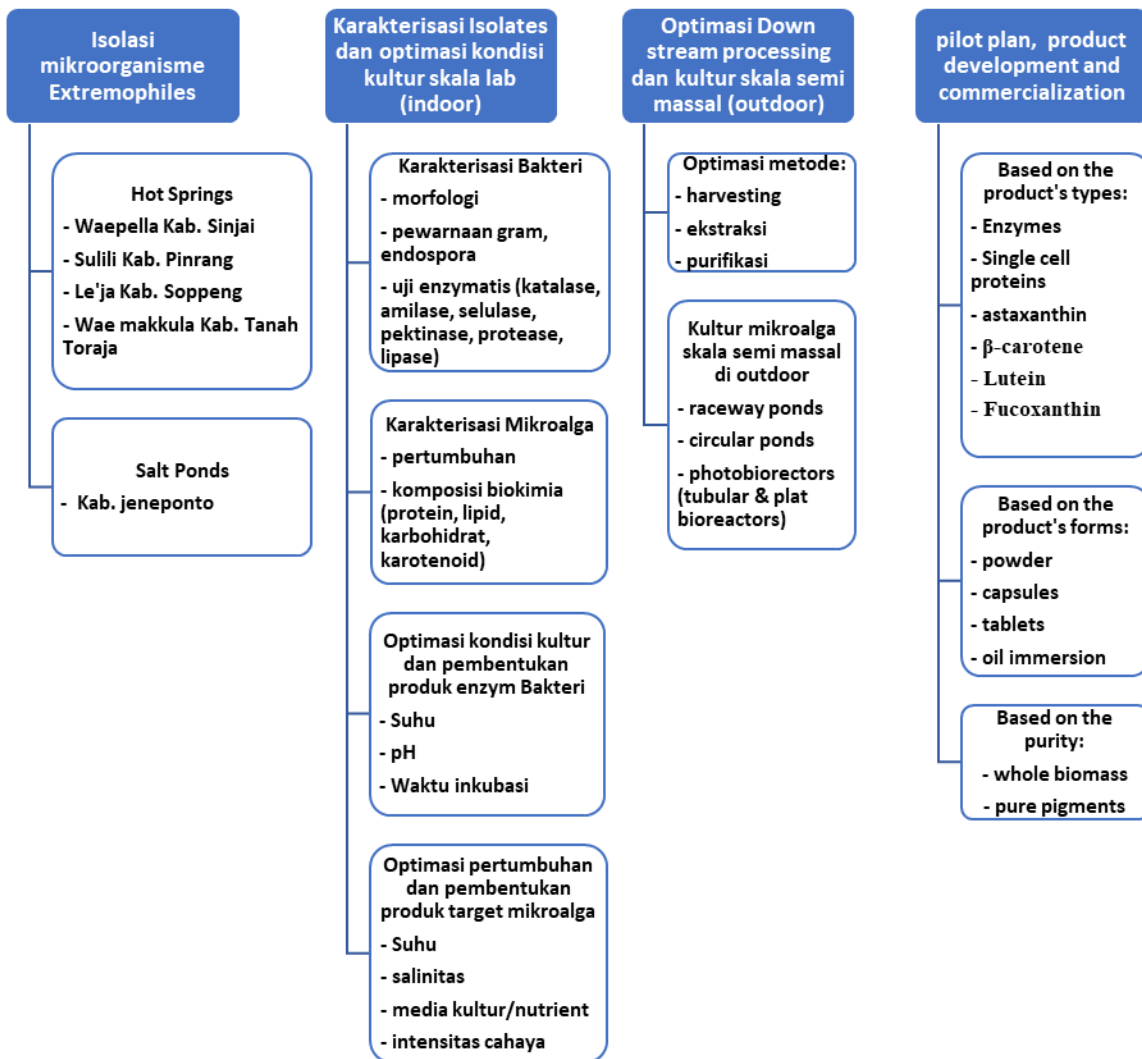
Dunaliella salina merupakan mikroalga laut dari jenis kelas Chlorophyceae yang responsif terhadap perubahan osmotik yang mampu hidup pada salinitas yang sangat tinggi hingga 300 ppt. Spesies ini dikenal karena kemampuannya untuk menghasilkan karotenoid sebagai sumber antioksidan sekitar 1.100-2.100 mg β -karoten per 100 gram berat kering (Del Campo et al., 2007). Beta-karoten dari mikroalga *D. salina* dapat dimanfaatkan dalam tiga kategori yakni dalam industri farmasi, industri pangan dan industri kosmetik (termasuk dalam jenis fine chemical). Beta karoten alami memiliki kandungan karotenoid yang kompleks dan nutrisi esensial dibandingkan dengan β -karoten buatan sehingga permintaan global tahunan untuk β -karoten adalah sekitar 1.430 ton per tahun dan sisanya dipenuhi melalui karoten sintesis (Ramajaj and Juntawong, 2015). Selain itu, β -karoten dapat meningkatkan penampilan produk pangan dan minuman seperti margarin, keju, jus, makanan kalengan, dan sebagainya (Nur, 2014). Di bidang akuakultur *D. salina* banyak dimanfaatkan sebagai pakan alami kaya akan karotenoid untuk post larva (Kusumaningrum dan Zainuri 2013). Selain kandungan karotenoid, *D. salina* juga memiliki senyawa bioaktif lainnya seperti fenol, sulfat polisakarida dan vitamin, yang salah satu fungsi dari senyawa bioaktif tersebut dapat mempengaruhi regulasi sel, respon kekebalan tubuh dan sebagai antioksidan (de Fretes et al., 2012). Oleh karena itu, *D. salina* selain

dimanfaatkan sebagai pakan alami bagi ikan tetapi berpotensi sebagai bahan pangan alternatif potensial dan produk kesehatan yang menjadi target penjualan pasar dunia. Salah satu produsen *Dunaliella salina* terbesar di dunia adalah Parry's agro Ltd. di India untuk skala farmasi dengan produk untuk 180 kapsul dihargai \$72.86 atau setara Rp. 973.992,00. Perusahaan lain yang memproduksi *Dunaliella* adalah ABC Biotech Ltd. di Tamil, Nadu (Nur, 2014). *Dunaliella salina* dapat menghasilkan β -karoten sampai 17% per berat kering sehingga memiliki nilai ekonomis tinggi karena dengan mengkultur *D. salina* dengan skala yang besar dapat menghemat lahan pertanian untuk menanam wortel dan tentunya menghemat waktu mulai dari penanaman hingga pemanenan. Menurut National Measurement Institute Australia and Craft Technologies Inc., sebuah perusahaan di Amerika menjelaskan bahwa 2 kg *Algotene* 500 mg kapsul berisi *D. Salina* dapat menyediakan β -karoten lebih daripada 1 kg wortel.

Spirulina sp. adalah Cyanobacterium fotosintesis, multiseluler, berfilamen dan spiral yang diproduksi dalam skala besar. *Spirulina sp.* memiliki kemampuan untuk hidup pada lingkungan dengan pH yang sangat tinggi yang tumbuh baik pada pH 9-11. Mikroalga ini menonjol karena kandungan proteinnya yang tinggi dan keberadaan asam lemak esensial, vitamin, dan mineral. *Spirulina platensis* merupakan organisme autotroph berwarna hijau kebiruan terdiri dari sel-sel silindris yang membentuk koloni dimana selnya berkolom membentuk filament terpilin menyerupai spiral (helix) sehingga disebut juga alga biru hijau berfilamen (Ariyati, 1998; Hariyati, 2008). Beberapa penelitian yang pernah dilakukan menunjukkan bahwa *spirulina* mempunyai aktivitas biologis seperti mencegah replikasi virus, mencegah anemia, mencegah penyakit akibat perlemakan hati, menurunkan kadar glukosa darah, profil lipid, serta menurunkan tekanan darah. *Spirulina* mengandung beberapa bahan aktif terutama Phycocyanin dan β karoten yang memiliki aktivitas antioksidan dan antininflamasi yang kuat. Phycocyanin memiliki kemampuan untuk mengikat radikal bebas, termasuk radikal alkoxyl, hidroksil, dan peroksil. Bumi adalah rumah bagi sekitar 1 triliun spesies mikroba yang tersebar luas yang secara taksonomi, metabolik dan fungsional sangat beragam (Locey dan Lennon, 2016). Dari sekian banyak mikroba baru sekitar 0,001% yang berhasil diisolasi atau diperkirakan sekitar 99,999% taksa mikroba yang belum ditemukan (Locey dan Lennon, 2016) Contoh klasik ekstrofil dan senyawa bioaktifnya adalah DNA polimerase dari bakteri termofilik (misalnya, *Thermus aquaticus*) dari lingkungan hidrotermal (Chien et al., 1976). Tidak diragukan lagi, kemajuan dalam biologi molekuler dan ilmu kehidupan selama tiga dekade terakhir tidak

akan mungkin terjadi tanpa ekstremozim ini. Lain contohnya adalah enzim aktif-dingin dari ekstrofil Artik atau Antartika (hewan, tumbuhan, dan mikroorganisme), yang sangat menarik bagi ahli bioteknologi karena dapat digunakan dalam makanan pengolahan untuk meningkatkan fermentasi susu, untuk menyimpan yogurt beku, dan untuk meningkatkan es krim produksi (Cid et al., 2016). Oleh karena itu, ekstremozim dan senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh extremophiles, dan aplikasi potensial mereka dalam bioteknologi, telah diakui di berbagai bidang, seperti obat-obatan (misalnya, antibiotik dan antitumor), teknologi pangan (misalnya, fitase dan fosfatase), produksi biofuel (misalnya, protease dan lipase), industri kosmetik dan suplemen nutrisi (karotenoid), biomining dan remediasi tanah yang terkontaminasi (enzim pendegradasi xenobiotik), pertanian (penginduksi pertumbuhan tanaman), dan siklus residu organik (selulosa dan lignoselulosa) (Rampelotto, 2016; Dumorne et al., 2017)

Termofil adalah mikroorganisme yang menyukai panas dengan suhu pertumbuhan 45 C atau lebih, sementara hipertermofil tumbuh pada suhu di atas 80 C (Sarmiento et al., 2015). Termofil dan hipertermofil ada di berbagai ekosistem, seperti air panas bumi, mata air panas, gunung berapi, ventilasi hidrotermal laut dalam, dan ekosistem lainnya dengan parameter suhu tinggi. Termofil memiliki termostabil protein dan membran sel yang tidak terdenaturasi pada suhu tinggi, dan beberapa mungkin juga menolak proteolisis (Sarmiento et al., 2015). Khususnya, polimerase dari thermophiles telah meletakkan dasar untuk penemuan polimerase reaksi berantai (PCR), sebuah teknik yang telah menjadi penting dalam kedokteran dan penelitian. Hari ini kita dapat menemukan berbagai enzim dari thermophiles (misalnya, dari *Thermus aquaticus* dan *Pyrococcus furiosus*) menemukan penggunaannya dalam PCR karena stabilitasnya dan biaya yang wajar (Brock, 1997; Bruins et al., 2001; Irwindan Baird, 2004). Seiring dengan polimerase, banyak perbedaan enzim termofilik, seperti lipase, lakase, dan xilanase, juga di pasar, sehingga membuat proses industri jauh lebih ramah lingkungan (Damiano et al., 2003; Atala dkk., 2019)



Gambar 1. Road Map Penelitian “Bioprospecting Extremophiles Mikroorganisme Untuk Aplikasi Industri Pangan

BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

- 1). mengisolasi bakteri dan mikroalga pada habitat ekstrim yang terdapat di Sulawesi Selatan.
- 2). mengkarakterisasi senyawa kimia yang dihasilkan oleh isolat bakteri maupun mikroalga.
- 3). mengoptimalkan produksi produk komersil yang dihasilkan oleh isolate bakteri maupun mikroalga extremophiles.

3.2 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat penelitian ini adalah:

1. Dari penelitian ini akan dihasilkan isolate baik bakteri maupun mikroalga dari habitat ekstrim
2. Isolat yang potensial akan dikembangkan menjadi produk untuk aplikasi industry pangan seperti enzim hidrolitik dari bakteri (protease, amilase, lipase, selulase dan pectinase) serta biopigmen dari mikroalga
3. Meningkatkan partisipasi dan pengalaman belajar mahasiswa dalam penelitian
4. Meningkatkan publikasi/Haki/Paten dosen

BAB IV. METODE PENELITIAN

3.1 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel air akan dilakukan di beberapa habitat ekstrim di Provinsi Sulawesi Selatan diantaranya Hot spring Waepella di Kabupaten Sinjai, Le'ja di Kabupaten Soppeng, Sulili di Kabupaten Pinrang, Wae Makkula di Kabupaten Toraja, dan tambak garam kab. Jeneponto.

3.2 Isolasi

Untuk isolasi mikroalga akan menggunakan metode enrichment dan agar plating (Andersen and Kawachi, 2005) menggunakan berbagai media yakni f//2, Walne dan Jaworsky. Sample diinkubasi pada intensitas cahaya rendah ($20-30 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) dengan siklus gelap dan terang (12 jam: 12 jam) pada suhu kamar. Sedangkan isolasi bakteri menggunakan metode agar dengan media TSA, PDA dan MRSA. Isolat yang diperoleh akan di murnikan dengan cara penggoresan berulang pada media agar hingga didapatkan isolat murni.

3.3 Biakan murni dan skale-up

Isolat murni mikroalga yang diperoleh selanjutnya di scale-up dari 2 mL – 10 mL -50 mL – 100 mL – 500 mL dan 1 L sehingga didapatkan cukup inoculum untuk tahapan selanjutnya. Sedangkan untuk bakteri, masing-masing isolat murni bakteri akan digores pada media agar miring untuk dipersiapkan pada tahapan selanjutnya yakni karakterisasi.

3.4 Karakterisasi Isolat

Isolat yang diperoleh dikarakterisasi dengan pemeriksaan warna koloni, bentuk sel, pewarnaan gram, uji endospore dan uji katalase. Untuk uji pewarnaan gram, satu koloni bakteri digoreskan pada permukaan kaca objek steril sebelum ditambahkan 1 tetes kristal violet pada lapisan bakteri dan didiamkan selama 1 menit. Setelah 1 menit, slide dibilas dengan air sampai pewarna memudar. Kaca objek dikeringkan di atas bunsen sebelum ditambahkan 1 tetes larutan iodine pada permukaan kaca objek dan didiamkan selama 1 menit. Kaca objek dibilas dengan air diikuti dengan alkohol 70% dibilas sampai semua pewarna memudar dan kemudian dicuci kembali dengan air. Slide dikeringkan di atas bunsen sebelum ditambahkan 1 tetes safranin dan didiamkan selama 45 detik. Slide kemudian dicuci dengan air dan dikeringkan. Kaca objek diamati dengan menggunakan mikroskop. Bakteri gram negatif akan berwarna merah muda atau merah dan bakteri gram positif akan berwarna biru atau ungu

Untuk uji katalase, satu koloni isolat bakteri diletakkan pada kaca objek sebelum ditambahkan 1-2 tetes larutan H₂O₂ 3%. Jika terbentuk gelembung menandakan bakteri positif katalase dan jika tidak terbentuk gelembung menandakan bakteri katalase negatif.

Untuk pewarnaan endospora, satu koloni isolat bakteri digoreskan pada permukaan slide steril kemudian dilakukan fiksasi dengan menambahkan 1-2 tetes malachite green dan dipanaskan selama 2-3 menit. Jika terjadi penguapan, hijau perunggu dijatuhkan lagi pada kaca objek. Setelah itu, kaca slide dibilas dengan akuades dan dikeringkan sebelum ditambahkan 1 tetes safranin pada permukaan kaca objek. Gelas objek kemudian didiamkan selama 1 menit. Preparat dicuci kemudian diamati menggunakan mikroskop. Endospora positif akan berwarna hijau sedangkan sel endospora negatif/vegetatif akan berwarna merah.

Uji aktivitas proteolitik dilakukan pada media agar dengan menggunakan susu skim 1% (Nespolo et al. 2010). Secara singkat, kertas cakram dimasukkan ke dalam biakan cair isolat bakteri menggunakan pinset steril. Paper disc kemudian diletakkan pada media skim milk agar (1%), diinkubasi pada suhu 30°C selama 3 hari. Aktivitas proteolitik terlihat dari terbentuknya zona bening di sekitar paper disc. Uji aktivitas proteolitik dilakukan selama 3 hari.

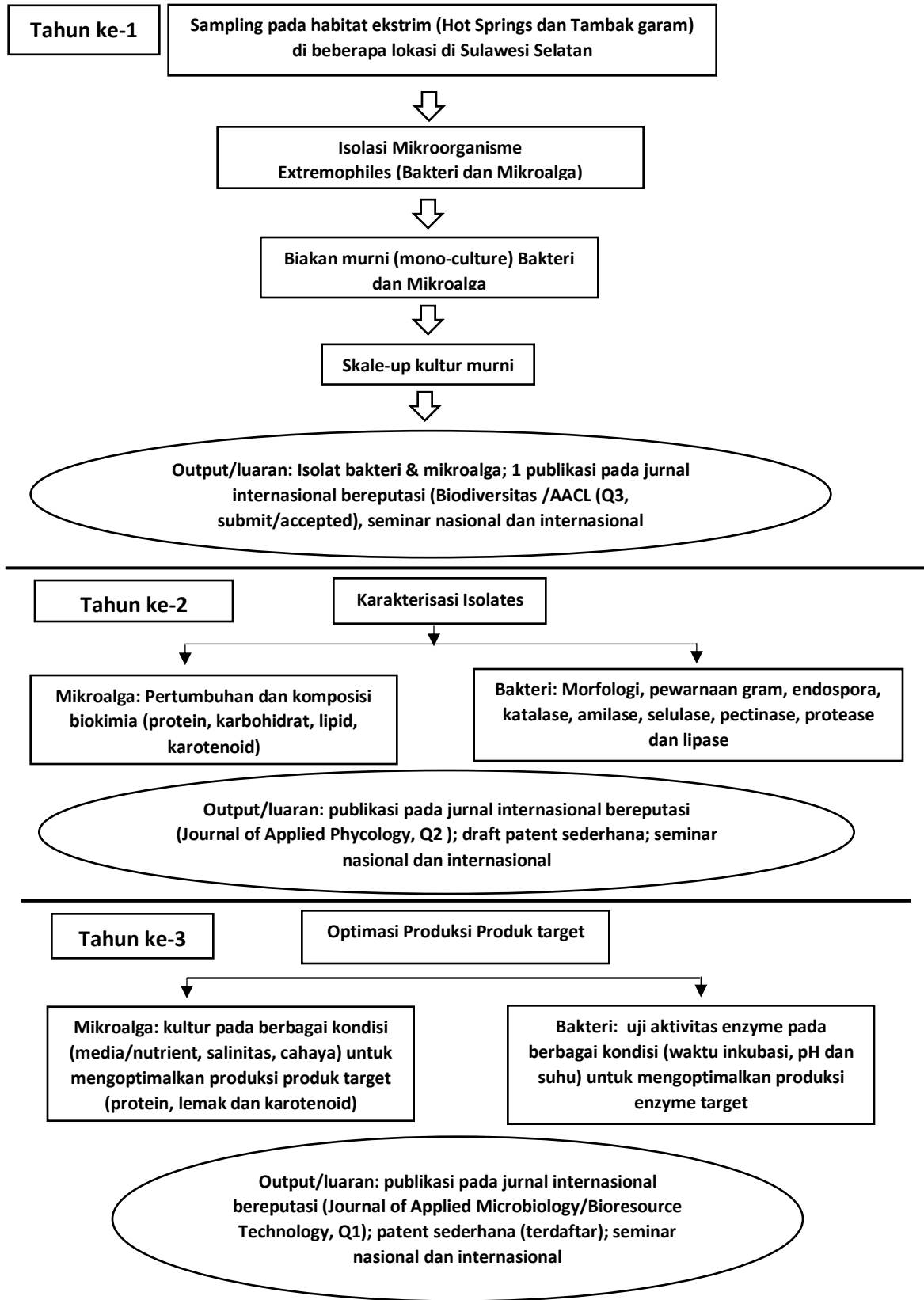
Uji aktivitas amilolitik dilakukan pada media agar dengan pati 1% (Fossi et al. 2005). Secara singkat, 20 l biakan bakteri berumur 48 jam dipipet ke atas kertas cakram (diameter 5,5 mm) kemudian ditempatkan pada media agar dengan pati 1% dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 3 hari. Pengamatan zona bening di sekitar koloni dilakukan dengan menambahkan lugol pada media (Fossi et al. 2005). Uji aktivitas amilolitik dilakukan selama 3 hari.

Uji aktivitas lipolitik dilakukan pada media MRS agar dengan penambahan 2 ml minyak zaitun (Svetlitschnyl et al., 1996). Secara singkat, 20 l biakan bakteri berumur 48 jam dipipet ke atas kertas cakram (diameter 5,5 mm) kemudian ditempatkan pada media agar MRS dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 3 hari. Aktivitas lipase bakteri ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni yang menunjukkan bahwa media telah terhidrolisis. Uji aktivitas lipolitik dilakukan selama 3 hari.

Uji aktivitas selulolitik dilakukan pada media padat yang mengandung 1% Carboxy Methyl Cellulose (CMC) dan 0,1% indikator Congo red. Secara singkat, sekitar 20 l suspensi bakteri berumur 48 jam diteteskan ke atas kertas cakram steril (diameter 5,5 mm) kemudian diletakkan di atas permukaan media dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 3 hari. Kemampuan

bakteri dalam mendegradasi selulosa ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar cakram. Pengukuran zona bening dilakukan setiap hari selama 3 hari.

Uji aktivitas pektinolitik dilakukan pada media padat yang mengandung indikator pektin 1% dan indikator merah Kongo 0,1%. Secara singkat, 20 l suspensi bakteri umur 48 ditetaskan ke atas kertas cakram (diameter 5,5 mm) kemudian diletakkan di atas permukaan media. Plate kemudian diinkubasi selama 3 hari. Kemampuan bakteri dalam menguraikan pektin ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar cakram. Diameter zona bening yang terbentuk diukur setiap 24 jam selama 3 hari.



Gambar 2. Bagan Alir Penelitian

BAB V. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1 Hasil

A. Isolasi Bakteri pada sumber air panas dan tambak garam

1. Lejja Hot Spring

Kondisi kualitas air lokasi sampling di Sumber Air Panas Lejja KABUPATEN Soppeng dapat dilihat pada Tabel 1. Lokasi sampling merupakan sumber air panas air tawar dengan salinitas 0%. Kisaran suhu lokasi sampling adalah 43-58oC sementara pH berkisar 7,8-8,1.

Tabel 1. Parameter kualitas air sumber air panas Lejja Kabupaten Soppeng

| Parameters | Station | | |
|------------------|-----------|-----------|-----------|
| | Station 1 | Station 2 | Station 3 |
| Temperature (°C) | 58 | 53 | 43 |
| Salinity (ppt) | 0 | 0 | 0 |
| pH | 7.8 | 8.1 | 7.9 |

Dari hasil isolasi bakteri diperoleh 13 isolat dengan bentuk sel bakteri hampir semuanya bulat (coccus) kecuali isolate TLB03 yang berbentuk batang (Rod). Hasil uji perwarnaan gram menunjukkan mayoritas isolate adalah bakteri gram positif kecuali isolate TLA03 dan TLB03. Demikian juga untuk uji katase, hampir semua isolate adalah katalase positif kecuali isolate TLB01. Sementara hasil uji pewarnaan endospore menunjukkan bahwa 5 dari 13 isolat adalah positive endospore (Tabel 2).

Tabel 2. Karakteristik isolate Bakteri dari sumber air panas Lejja Kabupaten Soppeng

| No | Kode Isolat | Bentuk sel | Pewarnaan gram | Pewarnaan endospora | Uji Katalase |
|-----|-------------|------------|----------------|---------------------|--------------|
| 1. | TLA01 | Bulat | + | - | + |
| 2. | TLA02 | Bulat | + | - | + |
| 3. | TLA03 | Bulat | - | - | + |
| 4. | TLA04 | Bulat | + | + | + |
| 5. | TLA05 | Bulat | + | + | + |
| 6. | TLA06 | Bulat | + | + | + |
| 7. | TLB01 | Bulat | + | - | - |
| 8. | TLB02 | Bulat | + | - | + |
| 9. | TLB03 | Batang | - | + | + |
| 10. | TLB04 | Bulat | + | + | + |
| 11. | TLC01 | Bulat | + | - | + |
| 12. | TLC02 | Bulat | + | - | + |

| | | | | | |
|-----|-------|-------|---|---|---|
| 13. | TLC03 | Bulat | + | - | + |
|-----|-------|-------|---|---|---|

2. Sulili Hot Spring Kabupaten Pinrang

Kondisi kualitas air lokasi sampling di Sumber Air Panas Sulili Kabupaten Pinrang dapat dilihat pada Tabel 3. Lokasi sampling merupakan sumber air panas air tawar dengan salinitas 0%. Kisaran suhu lokasi sampling adalah 37-40°C sementara pH berkisar 7,6-7,9.

Tabel 3. Parameter kulaitas air sumber air panas Sulili Kab. Pinrang

| Parameters | Station | | |
|------------------|-----------|-----------|-----------|
| | Station 1 | Station 2 | Station 3 |
| Temperature (°C) | 37 | 39 | 40 |
| Salinity (ppt) | 0 | 0 | 0 |
| pH | 7,6 | 7,9 | 7,8 |

Dari hasil isolasi bakteri diperoleh 15 isolat dengan bentuk sel bakteri hampir semuanya bulat (coccus) kecuali isolate TSB06 dan TSC01 yang berbentuk batang (Rod). Hasil uji perwarnaan gram menunjukkan mayoritas isolate adalah bakteri gram positif kecuali isolate TSA01, TSA03, TSB06 dan TSC01. Demikian juga untuk uji katase, hampir semua isolate adalah katalase positif kecuali isolate TSA01, TSA03 dan TSC01. Sementara hasil uji pewarnaan endospore menunjukkan bahwa terdapat 2 dari 15 isolat adalah positive endospore (Tabel 2).

Tabel 4. Karakteristik isolate Bakteri dari sumber air panas Sulili Kabupaten Pinrang

| No | Kode Isolat | Bentuk sel | Pewarnaan gram | Pewarnaan endospora | Uji Katalase |
|-----|-------------|------------|----------------|---------------------|--------------|
| 1. | TSA01 | Bulat | - | - | - |
| 2. | TSA02 | Bulat | + | - | + |
| 3. | TSA03 | Bulat | - | - | - |
| 4. | TSA04 | Bulat | + | - | + |
| 5. | TSA05 | Bulat | + | + | + |
| 6. | TSB01 | Bulat | + | + | + |
| 7. | TSB02 | Bulat | + | - | + |
| 8. | TSB03 | Bulat | + | - | + |
| 9. | TSB05 | Bulat | + | - | + |
| 10. | TSB06 | Batang | - | - | + |
| 11. | TSC01 | Batang | - | - | - |
| 12. | TSC02 | Bulat | + | - | + |
| 13. | TSC03 | Bulat | + | - | + |
| 14. | TSC04 | Bulat | + | - | + |
| 15. | TSC05 | Bulat | + | - | - |

3. Wae Makkula Kabupaten Tanah Toraja

Kondisi kualitas air lokasi sampling di Sumber Air Panas Wae Makkula Kabupaten Tanah Toraja dapat dilihat pada Tabel 5. Lokasi sampling merupakan sumber air panas air tawar dengan salinitas 0%. Kisaran suhu lokasi sampling adalah 37-41°C sementara pH berkisar 7,6-7,9.

Tabel 5. Parameter kualitas air sumber air panas Wae makkula Kab. Tanah Toraja

| Parameters | Station | | |
|------------------|-----------|-----------|-----------|
| | Station 1 | Station 2 | Station 3 |
| Temperature (°C) | 41 | 38 | 37 |
| Salinity (ppt) | 0 | 0 | 0 |
| pH | 7,6 | 7,9 | 7,8 |

Dari hasil isolasi bakteri diperoleh 10 isolat dengan bentuk sel bakteri hampir semuanya bulat (coccus) kecuali isolate TTD02 yang berbentuk batang (Rod). Hasil uji perwarnaan gram menunjukkan mayoritas isolate adalah bakteri gram positif kecuali isolate TTB01 dan TTD02. Untuk uji katase, 3 dari 10 isolat adalah katalase negative. Sementara hasil uji pewarnaan endospore menunjukkan bahwa terdapat hanya 1 isolat yang positive endospore (Tabel 6).

Tabel 6. Karakteristik isolate Bakteri dari sumber air panas Wae Makkula Kabupaten Tanah Toraja

| No | Kode Isolat | Bentuk sel | Pewarnaan gram | Pewarnaan endospora | Uji Katalase |
|-----|-------------|------------|----------------|---------------------|--------------|
| 1. | TTA01 | Bulat | + | - | + |
| 2. | TTA02 | Bulat | + | - | + |
| 3. | TTA03 | Bulat | + | - | + |
| 4. | TTB01 | Bulat | - | - | + |
| 5. | TTB02 | Bulat | + | - | - |
| 6. | TTC01 | Bulat | + | - | + |
| 7. | TTC02 | Bulat | + | - | - |
| 8. | TTC03 | Bulat | + | - | + |
| 9. | TTD01 | Bulat | + | + | - |
| 10. | TTD02 | Batang | - | - | + |

4. Waepella Hot Spring

Sampling site

Waepella hot spring is a freshwater hot spring (salinity 0 ppt) located in Kampala Village, East Sinjai District, Sinjai Regency. The water temperature ranges from 49-55°C with the pH ranged from 7.28-7.61 (Table 1).

Table 7. Water quality parameters at the Waepella Hot Spring Sinjai

| Parameters | Station | | |
|------------------|-----------|-----------|-----------|
| | Station 1 | Station 2 | Station 3 |
| Temperature (°C) | 55 | 53 | 49 |
| Salinity (ppt) | 0 | 0 | 0 |
| pH | 7.43 | 7,61 | 7,28 |

Morphological characterization

Bacterial isolation was carried out by the agar plating method on Tryptic Soy Agar (TSA) media. There are 18 newly isolated thermophilic bacteria successfully established from Waepella Hot Spring. All isolates have rounded colonies and almost all of them have milky white color except for the isolate BHSS8 and 18 which have yellow color and isolate BHSS16 with brown color. Based on the gram staining test, most of the isolates are gram negative (15 isolates) and only 3 isolates are gram positive. The catalase test showed that most of the isolates obtained are positive catalase (14 isolates) and 4 isolates are negative catalase. For the endospore test, only 4 isolates are positive endospore (Table 2).

Table 8. Characteristics of Thermophilic bacteria isolated from hot springs Waepella Hot Spring Sinjai

| No. | Isolate code | Colony colour | Gram Staining | Cell shapes | Katalase | Endospore |
|-----|--------------|---------------|---------------|-------------|----------|-----------|
| 1. | BHSS1 | White | positive | Rod | - | + |
| 2. | BHSS2 | White | negative | Rod | - | - |
| 3. | BHSS3 | White | negative | Cocci | + | + |
| 4. | BHSS4 | White | positive | Cocci | + | - |
| 5. | BHSS5 | White | negative | Cocci | + | - |
| 6. | BHSS6 | White | negative | Cocci | + | - |
| 7. | BHSS7 | White | negative | Rod | + | - |

| | | | | | | |
|-----|--------|--------|----------|-------|---|---|
| 8. | BHSS8 | Yellow | negative | Cocci | + | - |
| 9. | BHSS9 | White | Negative | Cocci | + | - |
| 10. | BHSS10 | White | positive | Cocci | + | + |
| 11. | BHSS11 | White | Negative | Rod | - | - |
| 12. | BHSS12 | White | negative | Rod | + | - |
| 13. | BHSS13 | White | Negative | Cocci | + | - |
| 14. | BHSS14 | White | Negative | Cocci | + | + |
| 15. | BHSS15 | White | Negative | Cocci | + | - |
| 16. | BHSS16 | brown | Negative | Cocci | + | - |
| 17. | BHSS17 | White | Negative | Rod | + | - |
| 18. | BHSS18 | Yellow | Negative | Cocci | + | - |

Enzyme Production

All isolates obtained were further screened for the production of various hydrolytic enzymes including amylase, lipase, protease, pectinase and cellulase. The amylolytic activity test aims to determine the activity of the extracellular amylase enzyme on agar media with 1% starch. The ability of isolates to produce extracellular amylase enzymes was shown by the formation of a clear zone around the paper disk containing bacteria. The results showed that eight out of 18 isolates showed amylolytic activity with the clear zone ranging from 5.73 ± 0.15 to 22.6 ± 0.44 mm (Table 3). The highest amylolytic activity was observed from the isolate BHSS10 with the diameter of the clear zone of about 22.6 ± 0.44 mm followed by isolate BHSS1 (19.6 ± 0.62 mm) dan BHSS2 (18.57 ± 0.60 mm) (Figure 1).

Table 9. Amylolytic activity of the isolates

| No. | Isolate Code | Clear Zone Diameter (mm) | | |
|-----|--------------|--------------------------|------------------|------------------|
| | | Day 1 | Day 2 | Day 3 |
| 1. | BHSS1 | 3.97 ± 0.76 | 12.27 ± 0.6 | 19.6 ± 0.62 |
| 2. | BHSS2 | 11.1 ± 0.15 | 12.23 ± 0.38 | 18.57 ± 0.60 |
| 3. | BHSS5 | 0 | 5.77 ± 0.75 | 11.47 ± 0.74 |
| 4. | BHSS7 | 0 | 8.3 ± 0.7 | 15.63 ± 0.76 |

| | | | | |
|----|--------|-----------|------------|-----------|
| 5. | BHSS10 | 9.77±0.21 | 15.60±0.52 | 22.6±0.44 |
| 6. | BHSS12 | 0 | 4.2±0 | 5.73±0.15 |
| 7. | BHSS16 | 6.97±0.81 | 11.43±0.57 | 14.5±0.78 |
| 8. | BHSS18 | 4.53±0.32 | 7.77±0.31 | 11±0.36 |

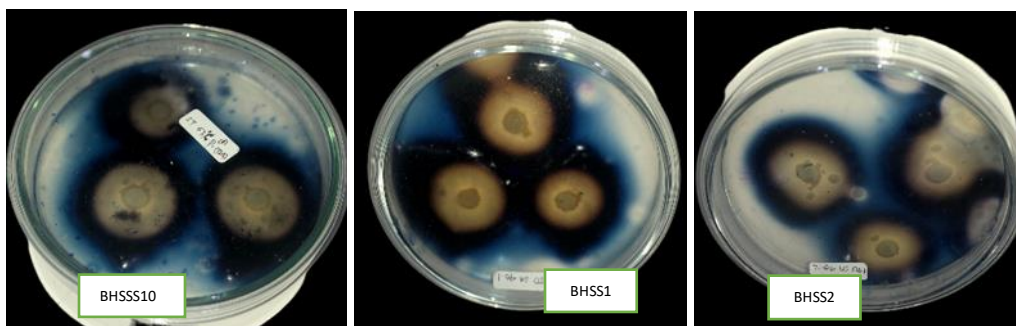


Figure 3. The formation of a clear zone around the paper disk containing bacteria on agar media with 1% starch

The cellulolytic activity test aims to determine the activity of the extracellular cellulolytic enzyme on agar media containing CMC 1%. The ability of isolates to produce extracellular cellulolytic enzymes was shown by the formation of a clear zone around the paper disk containing bacteria. The results showed that nine out of 18 isolates showed cellulolytic activity (Table 4). The highest cellulolytic enzyme activity was observed from the isolate BHSS7 with the diameter of the clear zone of about 11.6±0.4 mm.

Table 10. Cellulolytic enzyme activity of the isolates

| No. | Isolate Code | Clear Zone Diameter (mm) | | |
|-----|--------------|--------------------------|-----------|-----------|
| | | Day 1 | Day 2 | Day 3 |
| 1. | BHSS1 | 2.23±0.32 | 3.63±0.47 | 3.93±0.67 |
| 2. | BHSS4 | 0 | 0 | 4.03±0.15 |
| 3. | BHSS5 | 0 | 0 | 3.13±0.15 |
| 4. | BHSS6 | 0 | 2.57±0.29 | 3.67±0.15 |
| 5. | BHSS7 | 4.5±0.3 | 7.73±1.01 | 11.6±0.4 |
| 6. | BHSS11 | 0 | 1.73±0.40 | 2.33±0.32 |
| 7. | BHSS12 | 0 | 0 | 2.8±0.2 |
| 8. | BHSS15 | 0 | 0 | 3.5±0.44 |
| 9. | BHSS17 | 1.6±0.2 | 2.13±0.23 | 2.4±0.26 |

The pectinolytic enzyme activity test aims to determine the activity of the extracellular pectinolytic enzyme on agar media containing 1% pectin. The ability of isolates to produce

extracellular pectinolytic enzymes was shown by the formation of a clear zone around the paper disk containing bacteria. The results showed that sixteen out of 18 isolates showed pectinolytic activity (Table 5). The highest pectinolytic enzyme activity was observed from the isolate BHSS16 with the diameter of the clear zone of about 12 ± 0.24 mm, followed by isolate BHSS12 and BHSS2 with the clear zone diameter of 11.43 ± 0.15 mm and 10.53 ± 0.49 mm, respectively.

Table 11. Pectinolytic enzyme activity of the isolates

| No. | Isolate Code | Clear Zone Diameter (mm) | | |
|-----|--------------|--------------------------|----------------|-----------------|
| | | Day 1 | Day 2 | Day 3 |
| 1. | BHSS2 | 7.53 ± 0.40 | 8.1 ± 0.67 | 10.53 ± 0.49 |
| 2. | BHSS3 | 0 | 5.9 ± 0.3 | 6.57 ± 0.57 |
| 3. | BHSS4 | 2.37 ± 0.67 | 6.37 ± 0.35 | 8.73 ± 0.31 |
| 4. | BHSS5 | 2.33 ± 0.35 | 6.4 ± 1.01 | 7.37 ± 0.23 |
| 5. | BHSS6 | 0 | 3.37 ± 0.11 | 3.5 ± 0.26 |
| 6. | BHSS8 | 0 | 4.47 ± 0.45 | 4.87 ± 0.35 |
| 7. | BHSS9.1 | 5.03 ± 0.15 | 5.67 ± 0.25 | 6.4 ± 0.5 |
| 8. | BHSS10 | 2.17 ± 0.15 | 7.07 ± 0.45 | 9.4 ± 0.72 |
| 9. | BHSS11 | 0 | 4.97 ± 0.40 | 5.23 ± 0.59 |
| 10. | BHSS12 | 3.3 ± 0.3 | 8.97 ± 0.15 | 11.43 ± 0.15 |
| 11. | BHSS13 | 3.7 ± 0.46 | 6.9 ± 0.79 | 8.7 ± 0.56 |
| 12. | BHSS14 | 5.27 ± 0.15 | 6.27 ± 0.15 | 9.33 ± 0.21 |
| 13. | BHSS15 | 2.67 ± 0.23 | 7.43 ± 0.15 | 9.73 ± 0.15 |
| 14. | BHSS16 | 8.07 ± 0.12 | 8.9 ± 0.16 | 12 ± 0.24 |
| 15. | BHSS17 | 2.47 ± 0.15 | 3.3 ± 0.2 | 3.43 ± 0.15 |
| 16. | BHSS18 | 1.4 ± 0.36 | 2.73 ± 0.15 | 3.47 ± 0.38 |

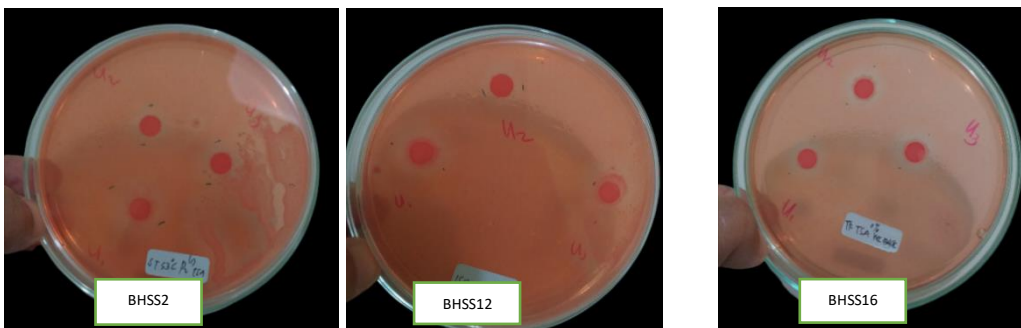


Figure 4. The formation of a clear zone around the paper disk containing bacteria on agar media with 1% pectin

The proteolytic activity test was carried out by placing a paper disk containing bacteria on a medium containing 1% skimmed milk agar. The ability of bacteria to grow by utilizing the media is indicated by the formation of a clear zone around the paper disk. The formation of the clear zone around the disk was observed for 3 consecutive days. There were only 3 isolates showed proteolytic enzyme activity (Table 6). The larger the clear zone formed, the greater the ability of the isolate to produce protease enzymes. Isolate BHSS15 showed the highest proteolytic enzyme activity with a zone diameter of 9.83 ± 0.40 mm.

Table 12. Proteolytic enzyme activity of the isolates

| No. | Isolate Code | Clear Zone Diameter (mm) | | |
|-----|--------------|--------------------------|-----------------|-----------------|
| | | Day 1 | Day 2 | Day 3 |
| 1. | BHSS13 | 0 | 5.57 ± 0.72 | 6.67 ± 0.60 |
| 2. | BHSS15 | 0 | 2.77 ± 0.15 | 9.83 ± 0.40 |
| 3. | BHSS17 | 0 | 5.43 ± 0.25 | 6.53 ± 0.35 |

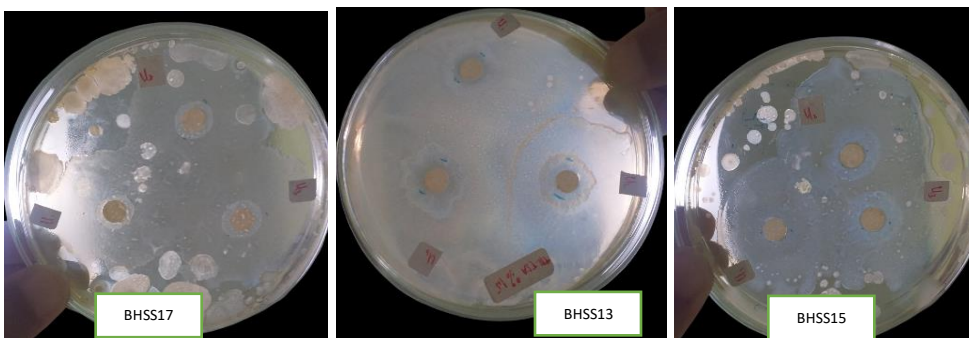


Figure 5. The formation of a clear zone around the paper disk containing bacteria on agar media with 1% skimmed milk

For the lipolytic enzyme activity test, there were no clear zone formed in any of the plates after 3 days incubation indicating that none of the isolates capable of hydrolyzing lipids.

Discussion

Hot spring is one of the extreme environments formed naturally. This environment is an interesting research object as it has very high temperatures far exceeding the optimum temperature to support the life of most living organisms. Microorganisms that live and reproduce in a hot spring with temperatures higher above 45°C is known as thermophiles (Sarmiento et al. 2015). Microorganisms living under this condition have certain mechanisms to survive including the presence of the thermostable proteins enzymes and cell membranes that remained stable at high temperatures (Sarmiento et al. 2015). Waepella hot spring is one the hot spring in South Sulawesi Province in Indonesia and it has not been studied with respect to the microbial biodiversity and the exploration of their potential biotechnological applications. Waepella hot spring has temperature ranging from 49-55°C and therefore it is classified as thermophiles with an optimum growth temperature of 45°C or above (Mohammad et al. 2017).

From this study, 18 isolates have been successfully established. Most isolates have milky white colony color and only two yellowish isolates and one brown colony. The difference in the color of the bacterial colonies is caused by differences in the pigment content including carotenoid pigments, anthocyanins and melanin (Savitri 2006). For the determination of cell shape and bacterial cell structure, gram staining procedures is performed. In gram staining, gram-positive bacteria will appear purple while gram-negative bacteria will appear red or pink. The difference in the results of Gram staining of bacteria was caused by differences in the structure of the cell walls of the bacterial isolates. Gram-positive bacteria have a cell wall structure that is only composed of one relatively thick layer of peptidoglycan, while gram-negative bacteria have a cell wall composed of two cell wall layers, namely the outer layer composed of lipopolysaccharide and protein, and the inner layer composed of peptidoglycan but thinner than the peptidoglycan layer in gram-positive bacteria. Most of the isolates obtained in this study are gram negative bacteria. For the cell shape, 12 of them have spherical shape (coccus) and the other 6 isolates have rod shape (bacillus). Bacterial cell shape is used as one of the characteristics to classify bacteria.

All isolates also subjected to catalase, endospore and hydrolytic enzyme activity tests. For the catalase test, most of the isolates are positive catalase. Catalase positive bacteria are indicated by the formation of air bubbles when 3% H₂O₂ is dripped, which means there is the formation of

oxygen gas (O_2) as a result of the breakdown of hydrogen peroxide (H_2O_2) by the catalase enzyme produced by these bacteria, while in catalase negative bacteria no air bubbles will be formed when dripped with H_2O_2 . Catalase is an enzyme that catalyzes the decomposition of hydrogen peroxide into water and oxygen where H_2O_2 is toxic to cells as it deactivates enzymes in cells (Locke et al. 2013). Catalase positive bacteria are aerobic because hydrogen peroxide is formed during aerobic metabolism so that aerobic bacteria must decompose toxic H_2O_2 (Lay 1994). From the endospore test, there were only 4 isolates of endospore positive bacteria. According to Travis (2007), endospore positive bacteria enable bacteria to survive unfavorable environmental factors such as heat, acid and salt for a long period of time, until environmental conditions are suitable for their development.

Enzyme is a natural product that broadly used in various industrial applications including agriculture, food, textiles, chemicals, pharmaceuticals, and biofuels (Sysoev et al. 2021). One of the group of enzymes that have great benefits and very important in industry is hydrolytic enzymes. Enzyme production and trade is dominated by a group of hydrolytic enzymes such as amylase, protease, cellulase, catalase, pectinase and lipase (Gurung et al. 2013, Liu and Kokare 2017). This research focused on the isolation and screening of thermophilic bacteria for their ability to produce hydrolytic enzymes. These enzymes have an extraordinary ability to catalyze the formation of various industrial products. However, most enzymes currently used for various industrial applications are limited by the narrow range of biocatalyst stability (Raddadi et al. 2015, Sysoev et al. 2021). The use of extremozymes derived from microorganisms that thrive under extreme conditions can overcome the limitation of the narrow range enzymatic stability for chemical reaction (i.e temperature) and the demand for these extremozymes is higher than ever (Singh et al. 2016a, Jorquera et al. 2019). The current study found that all the thermophilic bacteria isolated from the Waepella hot spring were capable of producing at least one extracellular hydrolytic enzyme. Eight out of 18 isolate showed amylolytic activity with the isolate BHSS10 as the top producer of extracellular amylase enzyme. This enzyme plays important roles in hydrolyzing starch into maltose, glucose and dextrin molecules (Benson 2001) that have application in beverage, food, textile, pharmaceuticals dan distillation industries (Pandey et al. 2000). Nine isolates are the producer of the cellulolytic enzyme that is used to hydrolyze celluloses which are used in various industrial application including brewery, wine, textile, paper and pulp, food processing and biofuel industries (Rodrigues and Odaneth 2021). Pectinase enzyme activity is

observed in almost all isolates. Pectinase is a group of enzymes capable of hydrolyzing pectin polymers, which are polysaccharides found in plant cell walls. Pectinase plays an important role in the beverage industry because of its ability to increase clarity and reduce the viscosity of fruit juices. Pectinase is naturally found in animals, plants and microbes. However, microbes are the main source of enzymes because of its easy to grow, easy to harvest, yield improvement can be done through genetic engineering, as well as being able to produce enzymes under extreme conditions (Sing et al. 2016b). Only 3 isolates showed proteolytic activity. The three isolates showed high protease enzyme activity indicating their ability to hydrolyze natural peptides in the media into peptides and amino acids (Wilson and Remigio 2012). Proteases have a wide range of usage like in cosmetics, detergents, leather, food and medical (Baltaci et al. 2017).

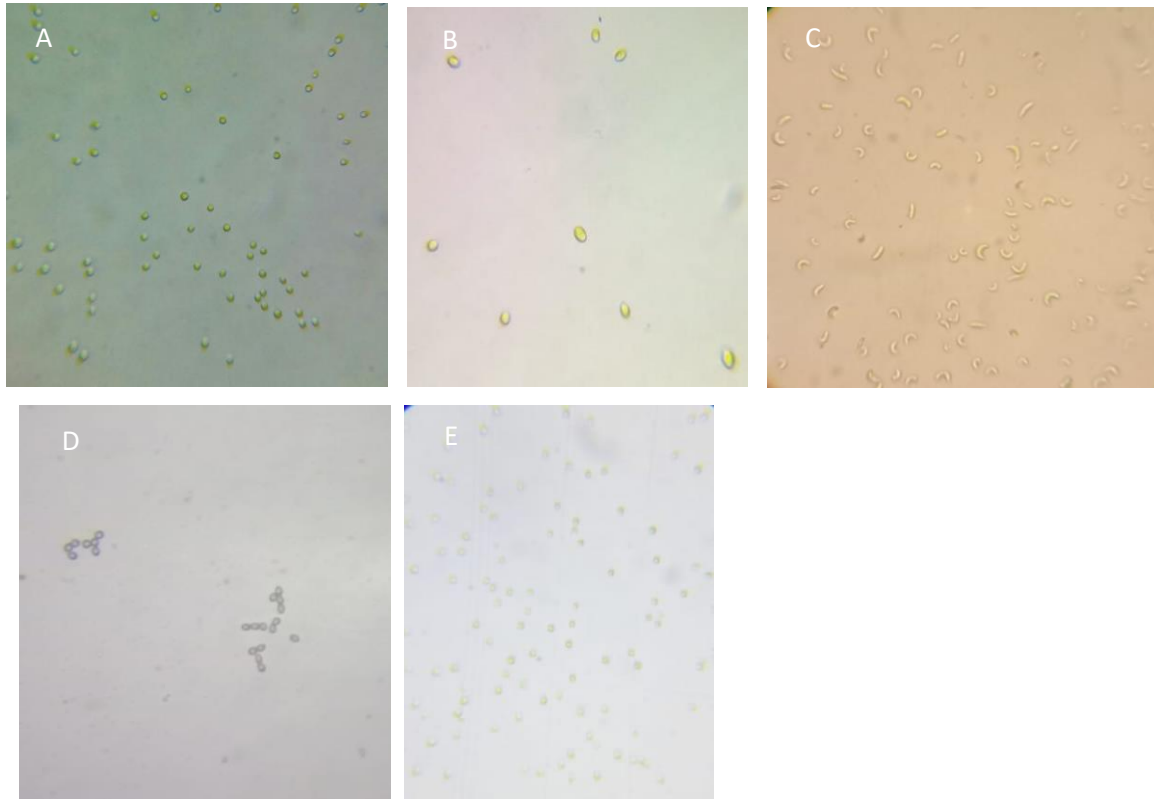
The results of this study indicate that the bacteria isolated from the Waepella hot springs have the ability to produce various important hydrolysis enzymes that have very wide industrial applications. Most importantly, these bacteria are thermophilic bacteria well-known of producing thermostable enzymes that are very important for industrial applications owing to their stability against many solvents, detergents, acidic and alkaline pH, and high temperatures (Baltaci et al. 2017). It is clear that this study is very important as a basis for the development of the thermophilic bacteria as a producer of hydrolytic enzymes for industrial application.

Eighteen isolates are successfully established. Eight of them have amylolytic activity with the highest clear zone of about 22.6 ± 0.44 (isolate BHSS10). Nine isolates have cellulolytic activity with the highest clear zone of about 11.6 ± 0.4 mm (isolate BHSS7). Sixteen isolates have pectinolytic activity with the highest clear zone of about 12 ± 0.24 mm (isolate BHSS16). Only 3 isolates have proteolytic activity with the highest clear zone of about 9.83 ± 0.40 mm (Isolate BHSS15) and none of them showed any lipolytic activity. All the isolates have the potential as hydrolytic enzyme producers. However, further studies are still needed to optimize the enzyme production.

B. Isolasi Mikroalga

Mikroalga merupakan organisme yang berukuran mikroskopis yang berfotosintesis yang dapat ditemukan pada hampir semua habitat perairan termasuk pada habitat ekstrim yang memiliki kondisi fisika-kimia diluar ambang batas yang dapat ditolerir oleh kebanyakan organisme. Pada penelitian ini berhasil diisolasi beberapa jenis mikroalga pada beberapa habitat ekstrim yakni sumber air panas (Waepella Sinjai, Lejja Soppeng, Sulili Enrekang, Waemakkula Toraja) dan

tambak garam geneponto. Isolate yang diperoleh dari sumber air panas Waepella Sinjai sebanyak 2 isolates, masing-masing 1 isolat dari sumber air panas Lejja, Sulili dan Waemakkula) serta 1 isolat dari tambak garam Jeneponto. Biakan murni mikroalga yang berhasil diisolasi dapat dilihat pada Gambar 3 serta photomicrograph dari isolate dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Photomicrograph isolat microalgae A. Isolat dari sumber air panas Waepella Sinjai (UNM-IND1), B. Isolat dari Tambak Garam Kab. Jeneponto (UNM-IND2), C. Isolate dari Sumber Air Panas Sulili Kab. Pinrang (UNM-IND3), D. Isolate dari sumber air panas Lejja Soppeng (UNM-IND4), E. Isolat dari sumber air panas Waemakkula Toraja (UNM-IND5).

Sebenarnya terdapat lebih dari 10 isolat yang berhasil tumbuh pada media agar namun isolate yang dapat tumbuh dengan baik pada media cair dan tidak menempel kuat pada wadah kultur adalah 5 isolat seperti yang tampak pada Gambar diatas. Karakteristik mikroalga seperti ini memungkinkan mereka untuk mudah dikultur pada kolam terbuka raceway yang digerakkan dengan paddle wheel sehingga sel-sel mikroalga akan tetap tersuspensi dalam kolom air untuk mendapatkan cahaya yang optimal untuk pertumbuhan serta memiliki produktivitas yang tinggi. Mikroalga ini tidak hanya akan mampu hidup pada kondisi perairan yang ekstrim tetapi juga akan meminimalisir kontaminasi dari jenis mikroalga lainnya karena tidak banyak mikroalga yang dapat

bertahan hidup pada kondisi ekstrim. Sebagai contoh, mikroalga *Dunaliella salina* yang telah diproduksi secara komersial untuk menghasilkan beta-karotene tumbuh dengan baik pada kadar garam yang tinggi mencapai 300 ppt. Dengan kadar garam yang sangat tinggi tersebut, mikroalga ini berhasil dikultur pada kolam outdoor tanpa gangguan yang berarti dari kontaminan. Demikian juga dengan mikroalga jenis *Spirulina sp.* yang diproduksi secara komersial untuk berbagai aplikasi industri termasuk sebagai food supplement dan bahan obat, bahan baku pakan, obat, kosmetik tumbuh dengan baik pada kadar pH yang sangat tinggi yakni pH 9 -11 sehingga peluang terjadinya kontaminasi sangat kecil karena tidak banyak mikroalga yang dapat bertahan pada pH tersebut.

Mikroalga yang dapat tumbuh dengan baik pada habitat ekstrim memiliki mekanisme tertentu untuk bertahan pada kondisi ekstrim. *D. salina* yang hidup pada kadar garam sangat tinggi memproduksi glycerol sebagai osmoregulant dan beta-karotene sebagai pelindung dari intensitas cahaya matahari yang sangat tinggi (Indrayani, 2017). Mikroalga yang hidup pada sumber air panas potensial untuk dikembangkan sebagai sumber enzim yang tahan terhadap suhu tinggi (Varshney et al. 2014). Extremophiles bakteri dan mikroalga memiliki potensi untuk dikembangkan untuk berbagai keperluan bioteknologi dan industri. Oleh karena itu kegiatan bioprospeksi dari extremophiles perlu terus dilakukan. Penelitian ini merupakan bagian dari upaya eksplorasi dan pengembangan extremophiles untuk menghasilkan produk-produk baru untuk berbagai aplikasi industri

5.2 Luaran Yang Dicapai

- 1). Berhasil diisolasi puluhan isolate mikroorganisme extremophiles dari beberapa lokasi
- 2). 1 Artikel sudah disubmit pada jurnal internasional bereputasi Biodiversitas Scopus, Q3 (Status review memasuki Round 2).
- 3). Hasil penelitian dipresentasikan pada internasional ICoLibe Fakultas MIPA UNM pada hari Senin, 15 November 2022 (sertifikat)
- 4). Hasil penelitian dipresentasikan pada seminar Nasional dalam rangka dies natalis ke 34 Politeknik Pertanian Negeri Pangkep (Sertifikat).

BAB VI. RENCANA LUARAN SELANJUTNYA

Rencana tahapan selanjutnya :

Pada tahun ke-2: Uji aktivitas enzim bakteri, identifikasi molekuler serta karakterisasi pertumbuhan dan senyawa biokimia mikroalga

1. Isolat Bakteri yang dihasilkan akan dilakukan pengujian aktivitas enzim hidrolase termasuk amilase, selulase, pektinase, protease dan lipase (Svetlitshtnyl et al., 1996; Nespolo et al., 2010; Fossi et al 2005). Sedangkan untuk isolat mikrolaga akan dilakukan karakterisasi pertumbuhan serta senyawa biokimia termasuk protein, karbohidrat, lipid serta karotenoid terutama astaxanthin, β -karotene, lutein dan fucoxanthin (Indrayani 2017; Indrayani et al 2018; Indrayani et al. 2019; Indrayani et al. 2020; Indrayani et al. 2021; Indrayani et al. 2022).
2. Identifikasi species akan dilakukan terhadap isolat bakteri yang potensial dikembangkan sebagai penghasil enzim hidrolases serta isolat mikroalga yang potensial sebagai penghasil protein untuk protein sel tunggal serta high value karotenoid untuk food suplement (nutraceuticals). Identifikasi akan dilakukan secara molekuler.
3. Target luaran adalah publikasi pada Jurnal internasional bereputasi Journal of Applied Phycology (Springer Nature, Q1) dan draft paten sederhana.

Pada Tahun ke-3. Optimasi produksi produk target

1. Akan dilakukan optimasi produk target. Isolat bakteri yang potensial sebagai penghasil enzim hidrolase akan diuji kemampuannya menghasilkan enzim berdasarkan waktu inkubasi, suhu dan pH sehingga akan diketahui kondisi optimum untuk produksi enzim target. Sedangkan isolat mikroalga yang potensial untuk protein sel tunggal dan produser high value karotenoid terutama karotenoid astaxanthin, β -karotene, lutein dan fucoxanthin akan dikultur pada berbagai kondisi yang berbeda untuk memaksimalkan produksi produk target.
2. Target luaran adalah publikasi pada jurnal internasional bereputasi yaitu Bioresource Technology (Elsevier, Q1) serta patent (terdaftar)

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Extremophile bakteri yang berhasil diisolasi dari 5 habitat ekstrim (sumber air panas Lejja, Sulili, Waepella, Wae Makkula dan Tambak Garam) sebanyak 76 isolat. Isolat didominasi oleh sel berbentuk bulat, gram positive bakteri, endospore negative serta katalase positif.
2. Mikroalga yang berhasil diisolasi yang tumbuh dengan baik pada media cair sebanyak 5 isolat yakni isolate UNM-IND1 (dari sumber air panas Waepella Sinjai), isolate UNM-IND2 (dari tambak garam), isolate UNM-IND3 (dari sumber air panas Sulili), isolate UNM-IND4 (dari sumber air panas Lejja), isolate UNM-IND5 (dari sumber air panas Wae Makkula)

Saran

Penelitian ini perlu dilanjutkan untuk mencakup wilayah yang lebih luas lagi bukan hanya di Sulawesi Selatan tapi juga di wilayah Sulawesi lainnya seperti Sulawesi Barat dan Sulawesi Tenggara yang juga terdapat beberapa habitat ekstrim sehingga dapat dihasilkan lebih banyak isolate extremophiles yang akan diekslore potensi pemanfaatannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Andersen, R.A., Kawachi, M. (2005). Traditional microalgae isolation techniques. In: Andersen RA (ed) Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press, London, pp83-100 .
- Arora, N.K., Panosyan, H. (2019). Extremophiles: applications and roles in environmental sustainability. *Environmental Sustainability* 2:217–218 <https://doi.org/10.1007/s42398-019-00082-0>.
- Avron, M., Ben-Amotz, A. (1992). *Dunaliella: Physiology, Biochemistry, and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton.
- Borowitzka, M.A., (2013). Species and strain selection. In: Borowitzka MA, Moheimani NR (eds) *Algae for biofuels and energy*. Springer, Dordrecht, pp77-89.
- Bull, A.T.; Ward A.C.; Goodfellow, M. (2000). Search and Discovery Strategies for Biotechnology: the Paradigm Shift. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 46(3), 573-606
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from Microalgae. *Institute of Technology and Engineering, Massey University, Biotechnology Advances* 25, 294–306 p.
- Del Campo, J. A., Garcia-Gonzales, M., and Guerrero, M. G. (2007). Outdoor Cultivation of 461 Microalgae for Carotenoid Production. *Current State and Perspectives*. 74: 1163-1174.
- De Fretes, H., A. B. Susanto., B. Prasetyo, dan L. Limantara. 2012. Karotenoid dari Mikroalga dan Makroalga: Potensi Kesehatan Aplikasi dan Bioteknologi. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. Vol. XXIII (2): 221-228.
- Egorova, K.; Antranikian, G. (2005). Industrial relevance of thermophilic Archaea. *Curr Opin. Microbiol.*, 8, 649-655.
- Gong, Y., Jiang, M. (2011). Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel. *Biotechnol Lett* 33:1269-1284.
- Horneck, G., Klaus, D. M., and Mancinelli, R. L. (2010). Space microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 121–156. doi: 10.1128/MMBR.00016-09.
- Indrayani, I. (2017). Isolation and Characterization of Microalgae with Commercial Potential. [Dissertation]. Murdoch University, Perth, Western Australia.
- Indrayani, I., Haslianti,., Asriyana. (2018). Isolation and screening of marine microalgae from Kendari waters, Southeast Sulawesi, Indonesia suitable for outdoor mass cultivation in hypersaline media. *AAAL Bioflux* 11 (5): 1445-1455.
- Indrayani, I., Moheimani, N.R., Borowitzka, M.A. (2019). Long-term reliable culture of a halophilic diatom, *Amphora* sp. MUR258, in outdoor raceway ponds. *J Appl Phycol* 31: 2771-2778.
- Indrayani, I., Moheimani, N.R., de Boer K., Bahri, P.A., Borowitzka, M.A. (2020). Temperature and salinity effects on growth and fatty acid composition of a halophilic diatom, *Amphora* sp. MUR258 (Bacillariophyceae). *J Appl Phycol* 31 (5), 2771-2778.
- Kusumaningrum, H. P., Zainuri, M. (2013). Aplikasi Pakan Alami Kaya Karotenoid untuk Post Larvae *Penaeus monodon* Fab. *Jurnal Ilmu Kelautan* Vol.18 (3) : 143-149. ISSN0853-7291.
- Larkum, A.W.D., Ross, I.L., Kruse, O., Hankamer, B. (2012). Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. *Trends Biotechnol* 30(4):198-205.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew Sust Energy Rev* 14 (1):217-232.
- Olaizola, M. (2003). Commercial development of microalgal biotechnology : from test tube to the marketplace. *Biomol Eng* 20:459-466.

- Merino, N., Aronson, H.S.4., Bojanova, D.P., Jayme Feyhl-Buska, J., Wong, M.L., Zhang, S., Iovannelli, D. (2019). Living at the Extremes: Extremophiles and the Limits of Life in a Planetary Context. *Frontiers in Microbiology* 10. doi: 10.3389/fmicb.2019.00780.
- Novianti, T. (2019). Kajian Pemanfaatan Mikroalga *Dunaliella Salina* Sebagai Bahan Fortifikasi Pangan Dengan Pendekatan Bioekonomi Kelautan. *Mangifera Edu* 3 (2): 100-109.
- Nur, M.M.A. (2014). Potensi Mikroalga sebagai Sumber Pangan Fungsional di Indonesia (overview). *Jurnal Eksergi*. Vol XI (2) : 1-6.
- Raharjo. (2007). Analisa Performa Mesin Diesel dengan Bahan Biodiesel dari Minyak Jarak Pagar. Makalah pada Seminar Nasional Teknologi, Yogyakarta.
- Ramajaj, S., Juntawong. (2015). Identification and Comparison of Culture Medium for High β -carotene Production by *Dunaliella salina* KU11 Isolated from Salt Soil Samples Collected from Northeastern parts of Thailand. *Bioscience Program, Faculty of Science, Kasetsart University*. Bangkok. Research gate. 10pp.
- Richmond, A. (2004). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science, Oxford, OX, UK; Ames, Iowa, USA.
- Romimohtarto, K. (2004). *Meroplankton Laut: Larva Hewan Laut yang Menjadi Plankton*, Djambatan, Jakarta.
- Rivasseau, C., Farhi, E., Atteia, A., Couté, A., Gromova, M., Gromovade Gouvion Saint Cyr, D., Boisson, A.-M., Féret, A.-S., Compagnon, E., Bligny, R. (2013). An extremely radioresistant green eukaryote for radionuclide bio-decontamination in the nuclear industry. *Energy Environ. Sci.* 6, 1230.
- Rothschild, L.J., Mancinelli, R.L. (2001). Life in extreme environments. *Nature* 409, 1092–1101. doi: 10.1038/35059215.
- Sakti, Mayta., Darmono, S.S., Nyoman Suci, W. (2015). Pengaruh suplementasi spirulina terhadap beberapa parameter sindrom metabolik (studi di puskesmas lebdosari kota semarang). *Jurnal Gizi Indonesia* (ISSN : 1858-4942).
- Silli, C., Torzillo, G., Vonshak, A. (2012). *Arthrospira (Spirulina)*, pp. 677–705. In: Whitton, B.A. (Ed.), *Ecology of Cyanobacteria II. Their Diversity in Space and Time*. Springer.
- Torzillo, G., Pushparaj, B., Masojidek, J., Vonshak, A. (2003). Biological constraints in algal biotechnology. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 8, 338–348.
- Varshney, P., Mikulic, P., Vonshak, A., Beardall, J., Wangikar, J.P. (2015). Extremophilic micro-algae and their potential contribution in biotechnology. *Bioresource Technology* 184 : 363–372.
- Vonshak, A., Richmond, A. (1988). Mass production of the blue-green *Spirulina*: an overview. *Biomass* 15, 233–247.
- Yamagishi, A., Kawaguchi, Y., Hashimoto, H., Yano, H., Imai, E., Kodaira, S., et al. (2018). Environmental data and survival data of *Deinococcus aetherius* from the exposure facility of the Japan experimental module of the international space station obtained by the tanpopo mission. *Astrobiology* 18, 1369–1374. doi: 10.1089/ast.2017.1751.
28. Firn, R.D. (2003). Bioprospecting-Why is it so unrewarding? *Biodiversity and Conservation*, 12, 207-216.
7. Yadav AN, Gulati S, Sharma D, Singh RN, Rajawat MVS, Kumar R, Dey R, Pal KK, Kaushik R, Saxena AK. Seasonal variations in culturable archaea and their plant growth promoting attributes to predict their role in establishment of vegetation in Rann of Kutch. *Biologia*. 2019; 74(8):1031-1043. <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00259-2>.

- Yadav AN, Kour D, Rana KL, Yadav N, Singh B, Chauhan VS, Rastegari AA, Hesham AE-L, Gupta VK: Metabolic Engineering to Synthetic Biology of Secondary Metabolites Production. In: New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. Edited by Gupta VK, Pandey A. Amsterdam: Elsevier; 2019: 279-320. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63504-4.00020-7> .
11. Kumar M, Yadav AN, Saxena R, Rai PK, Paul D, Tomar RS. Novel methanotrophic and methanogenic bacterial communities from diverse ecosystems and their impact on environment. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2021; 33:102005 <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102005>.
 12. Dumorné K, Córdova DC, Astorga-Eló M, Renganathan P. Extremozymes: a potential source for industrial applications. *J Microbiol Biotechnol.* 2017; 27(4):649-659. <https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11006>.
 13. Saxena AK, Padaria JC, Gurjar GT, Yadav AN, Lone SA, Tripathi M, S RMV: Insecticidal formulation of novel strain of *Bacillus thuringiensis* AK 47. In.: Indian Patent 340541; 2020.
 14. Rasmussen RS, Morrissey MT. Marine biotechnology for production of food ingredients. *Adv Food Nutr Res.* 2007; 52:237-292. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(06\)52005-4](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(06)52005-4) .
 15. Barcelos MC, Ramos CL, Kuddus M, Rodriguez-Couto S, Srivastava N, Ramteke PW, Mishra PK, Molina G. Enzymatic potential for the valorization of agro-industrial by-products. *Biotechnol Lett.* 2020:1-29. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02957-3> .
- Chien, A., Edgar, D. B., and Trela, J. M. (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.* 127, 1550–1157.
- Cid, F. P., Rilling, J. I., Graether, S. P., Bravo, L. A., Mora, M. L., and Jorquera, M. A. (2016). Properties and biotechnological applications of ice-binding proteins in bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 363: fnw099. doi: 10.1093/femsle/fnw099.
- Dumorné, K., Córdova, D. C., Astorga-Eló, M., and Renganathan, P. (2017). Extremozymes: a potential source for industrial applications. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 649–659. doi: 10.4014/jmb.1611.11006.
- Rampelotto, P. H. (2016). *Biotechnology of Extremophiles: Advances and Challenges*. Cham: Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-319-13521-2.
- Sarmiento, F., Peralta, R., and Blamey, J. M. (2015). Cold and hot extremozymes: industrial relevance and current trends. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 3:148. doi: 10.3389/fbioe.2015.00148.
- Atalah, J., Cáceres-Moreno, P., Espina, G., and Blamey, J. M. (2019). Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. *Bioresour. Technol.* 280, 478–488. doi:10.1016/j.biortech.2019.02.008.
- Locey, K. J., and Lennon, J. T. (2016). Scaling laws predict global microbial diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 5970–5975. doi: 10.1073/pnas.1521291113