

KARAKTERISASI ENZIM AMILASE DARI BEBERAPA STRAIN BAKTERI INDIGENOUS INDONESIA

Pujoyuwono M¹⁾, Desi Trinovia²⁾, Nur Richana¹⁾,
Djoko S. Damardjati¹⁾, Untung Murdiyatmo¹⁾

ABSTRACT

*Amylase enzymes (α -amylase, β -amylase, glucoamylase) have been used in various industrial purposes nowadays (food and beverages, textile). Indonesia still import these enzymes, because the enzyme production is not available. There are two main problems that constraint the enzyme production which are not available high yielding microorganism strain and expertises at enzyme production technologies. In this research, indigenous microorganism yielding amylase enzymes have been isolated and selected from the soil sample taken from unique location of Indonesia (Ujung kulon, Tangkuban Perahu, and Dieng). The purpose of this research is to obtain high yielding amylase strains. Isolation stage yielded 56 isolates of mesophile bacteria and 37 isolates thermophile bacteria. After selected there are 15 isolates of mesophile bacteria and 5 isolates of thermophile bacteria which have high activity. The enzyme activity range beetwen 218.33-746.3 U/ml. The highest activity was showed by isolate named M II₁₀. The protein content range beetwen 0.82-4.13 mg/ml, and the highest specific activity was showed by M II₁₀ isolate. There are five selected isolates have been identified and all of them were *Bacillus* sp. In the electrophoretic analysis, there was a major band which is indicated an amylase band.*

PENDAHULUAN

Ada empat jenis enzim yang telah diproduksi secara besar-besaran, yaitu protease, glucoamilase, α -amilase, dan glukosa isomerase (Suhartono, 1989). Enzim amilase merupakan enzim yang banyak digunakan di berbagai industri (makanan, minuman, tekstil). Enzim-enzim amilase dimanfaatkan dalam konversi pati menjadi sirup dekstrosa, sedangkan glukosa isomerase membantu pengubahan selanjutnya menjadi sirup fruktosa (HFS). Pada industri tekstil, enzim amilase digunakan sebagai pendegradasi pati yang terdapat dalam serat bahan baku. Enzim tersebut sampai sekarang masih diimpor.

Indonesia banyak menghasilkan bahan berpati seperti ubikayu, sagu, dan lain-lain. Pada tahun 1993 produksi ubikayu mencapai 17,3 juta ton (Statistik Indonesia, 1994). Pengembangan proses secara enzimatik pada bahan tersebut akan dapat meningkatkan nilai ekonominya. Penggunaan α -amilase yang tahan asam dan panas jika dikombinasikan dengan

¹⁾ Peneliti pada Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan Bogor.

²⁾ Mahasiswa Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Institut Pertanian Bogor

amiloglukosidase akan lebih efektif bila diaplikasikan dalam suatu industri sirup glukosa (Llyod dan Nelson, 1984). Pengembangan manfaat amilase dewasa ini dapat digunakan untuk campuran makanan ternak dan pengembangan di bidang kedokteran yaitu untuk pengujian diabetes. Disamping itu amilase juga digunakan dalam industri tekstil. Enzim-enzim amilase juga digunakan dalam industri tekstil sebesar 40 ton/bulan (E. Sukara, P3 Bioteknologi LIPI, Komunikasi pribadi).

Sekalipun potensi penggunaan enzim-enzim amilase sangat besar, namun masih terdapat kendala, yaitu bahwa enzim tersebut masih harus diimpor dan harganya cukup mahal. Untuk memproduksi sendiri juga masih menghadapi beberapa kendala, antara lain tidak tersedianya strain mikroba unggul penghasil enzim amilase dan kurangnya pengetahuan tentang teknologi produksi enzim. Dilain pihak, pakar dari negara maju mengakui bahwa negara yang kaya biodiversitas (termasuk Indonesia) merupakan sumber mikroba maupun tanaman yang potensial untuk *bioprospecting* (Fox, 1994).

Enzim amilase merupakan golongan enzim hidrolase yang berfungsi memecah pati. Enzim amilase terdiri dari beberapa jenis yaitu α -amilase, β -amilase, dan glukoamilase. Enzim α -amilase adalah enzim yang memecah ikatan 1,4 glukosida dalam polisakarida dan hasil degradasinya. Hasil akhirnya adalah oligosakarida dengan jumlah monomer dua sampai enam. Enzim ini merupakan golongan endoamilase yang memecah substrat dari bagian tengah atau bagian dalam molekul secara acak. β -amilase termasuk endoamilase yang bekerja pada ikatan 1,4 glikosidik dengan memutuskan ikatan dua unit glukosa dari ujung. Sedangkan glukoamilase merupakan eksoamilase yang bekerja pada sisi molekul dengan memecah ikatan antar monomer dalam polisakarida. Hasil kerja dari campuran ketiga enzim tersebut adalah dekstrin dan glukosa.

Mikroba yang sudah umum digunakan untuk menghasilkan enzim amilase adalah bakteri *Bacillus* dan kapang *Aspergillus*. Kedua mikroba dari genus tersebut mensekresikan beberapa enzim ekstraselular dalam jumlah yang relatif besar (Aunstrup et.al, 1978). Selama ini penelitian mengenai produksi enzim oleh bakteri masih sedikit dilakukan. Sedangkan enzim yang dihasilkan bakteri tidak lebih rendah bila dibandingkan kapang.

Enzim amilase merupakan enzim ekstraseluler, yaitu enzim yang dihasilkan didalam sel tetapi dikeluarkan ke medium fermentasi untuk membantu kelangsungan hidupnya. Oleh karena itu untuk mengisolasi bakteri yang memproduksi enzim tertentu, diperlukan substrat yang dapat

menginduksi produksi enzim tersebut oleh sel bakteri. Enzim jenis ini cocok diproduksi dalam skala besar karena dihasilkan dalam jumlah relatif banyak serta tidak terlalu sulit metode ekstraksinya (Stanbury dan Whitaker, 1984).

Kimura dan Chiba (1983) telah melakukan penelitian α -amilase yang diproduksi oleh *B. subtilis* dengan substrat pati dari ubijalar dan barley. Sedangkan Ratanakhanokchai, et al (1992) mencoba *Chloflexus aurantiacus* untuk memproduksi amilase yang dapat menghidrolisis pati menjadi maltotetraose dan maltopentose.

Dengan melihat kekayaan sumber biodiversitas mikroba di Indonesia, maka perlu dilakukan seleksi mikroba unggul penghasil enzim amilase terutama yang berasal dari daerah yang masih belum terpengaruh oleh pencemaran lingkungan (native) dan daerah yang berciri sangat khas (eksotik). Daerah-daerah seperti ini merupakan sumber biodiversitas mikroba novel atau unik yang belum dieksplorasi.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan koleksi kultur mikroba murni penghasil enzim amilase, Data karakteristik enzim yang dihasilkan oleh mikroba terpilih, dan Profil protein enzim kasar pada gel akrilamid.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah contoh tanah dari beberapa lokasi (Taman Nasional Ujung Kulon, Kawah Dieng, dan Kawah Tangkuban Perahu). Media untuk pertumbuhan terdiri atas yeast extract, Bacto tryptone, $MgCl_2$, $CaCl_2$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NaCl, $(NH_4)_2SO_4$, dan pati ubikayu. Bahan kimia untuk analisis yang digunakan terdiri atas Pereaksi Lowry, pereaksi DNS, buffer sitrat-fosfat pH 7, standar BSA, standar maltosa, dan pereaksi untuk keperluan elektroforesis.

Metode

Karakterisasi dan identifikasi bakteri mesofil penghasil amilase

Contoh tanah diambil dari beberapa daerah, yaitu Taman Nasional Ujung Kulon (native soil), kawah Dieng dan Tangkuban Perahu (exotic soil). Tanah diambil secara aseptik dan dimasukkan kedalam kantong plastik steril dan disimpan sampai siap digunakan.

Isolasi mikroba dari contoh tanah dilakukan dengan metode "enrichment culture" menggunakan substrat pati singkong (tapioka). Seleksi bakteri penghasil amilase dilakukan

dengan mengamati terbentuknya zona bening di sekitar isolat pada media yang mengandung pati. Isolat yang memberikan hasil positif dalam uji kualitatif akan ditumbuhkan pada medium propagasi dengan kondisi yang sama.

Tiap isolat yang diperoleh akan diuji kemampuannya berdasarkan pengukuran produksi biomassa, kadar protein terlarut total, dan aktivitas enzimnya. Kadar protein diukur dengan metode Lowry. Standar yang digunakan adalah Bovine Serum Albumin (BSA) dengan konsentrasi 100-800 ppm. Hasil reaksi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 650 nm.

Aktivitas amilase diukur dengan cara mengukur banyaknya gula reduksi yang dihasilkan dari hidrolisis pati terlarut oleh enzim yang terdapat dalam supernatan. Sebagai standar digunakan deret standar maltosa dengan konsentrasi 100-700 ppm. Analisis gula reduksi dilakukan dengan pereaksi DNS dengan berdasarkan serapannya pada panjang gelombang 550 nm. Satu unit aktivitas amilase adalah sejumlah enzim yang dapat menghasilkan gula reduksi (maltosa) sebanyak 1 μ mol/menit pada kondisi pengujian.

Berdasarkan data yang diperoleh dilakukan pemilihan isolat yang memiliki profil pertumbuhan terbaik. Kriteria pemilihan didasarkan pada produksi biomassa, kandungan protein, aktivitas enzim, dan aktivitas spesifik tertinggi. Isolat-isolat terpilih diidentifikasi dengan menggunakan metode Bergey's Manual for Bacteriology (Buchanan dan Gibbons, 1974). Metode identifikasi didasarkan pada analisis sifat morfologi dan reaksi-reaksi fisiologis/biokimia untuk menentukan spesiesnya, meliputi pewarnaan Gram, uji methyl red, uji Voges-Proskaur (VP test), uji indol, uji hidrolisis pati, uji urease, uji nitrat, uji arabinosa, uji manitol, uji xylosa, uji pertumbuhan pada medium pH 5,7; suhu 45°C dan dalam NaCl 7%.

Ekstraksi dan karakterisasi enzim amilase

Setelah diperoleh isolat terpilih, dilakukan karakterisasi enzim yang dihasilkan. Tahap pertama dilakukan pengendapan protein terlarut dalam supernatan. Pengendapan dilakukan dengan 70% ammonium sulfat dan diikuti dengan dialisis. Selain itu diuji pula pengendapan dengan aseton dingin (-20°C) dengan perbandingan supernatan:aseton = 1:2. Endapan dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 7500 rpm dan dilarutkan dalam buffer sitrat-fosfat. Protein hasil pengendapan akan diuji karakteristiknya dengan pengukuran aktivitas dan elektroforesis Native-PAGE. Konsentrat protein digunakan untuk pengujian pola protein dengan elektroforesis Native-PAGE.

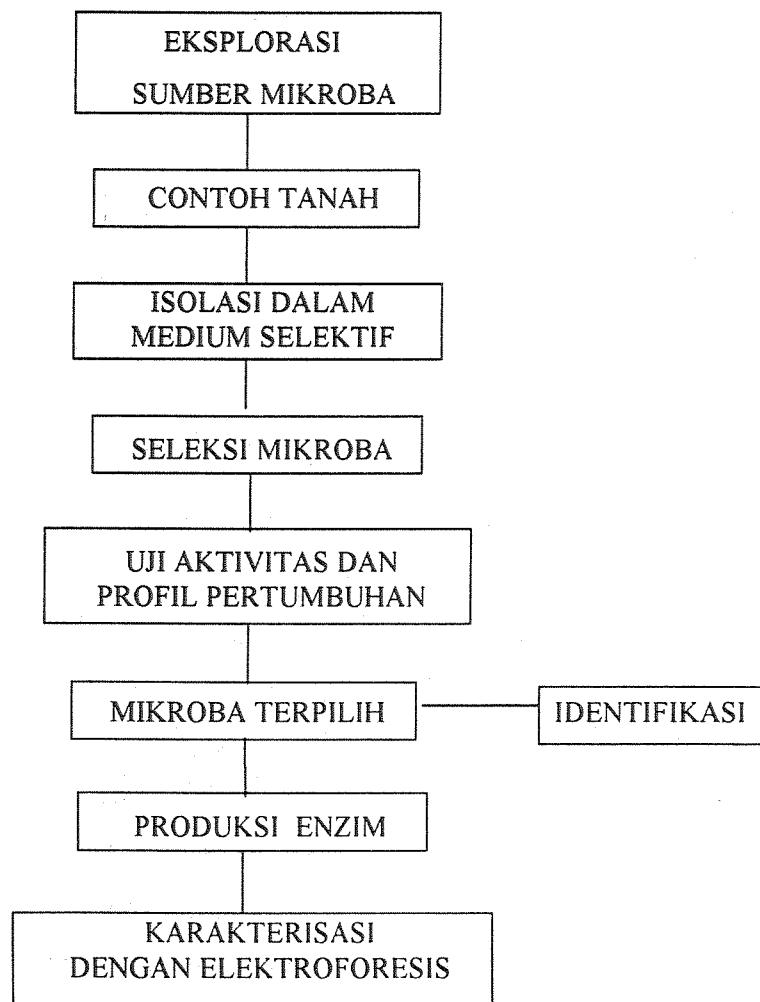
Elektroforesis dilakukan dalam gel poliakrilamid dengan konsentrasi 'separating gel'

8% dan 'stacking gel' 4%. Marker yang digunakan terdiri dari bovine serum albumin dan chicken albumin. Pewarnaan (staining) dilakukan menggunakan coomasie blue R-250 dengan konsentrasi 0,005% dalam ethanol dan asam asetat.

Optimasi produksi enzim amilase

Pada tahap awal dilakukan karakterisasi pertumbuhan bakteri skala kecil dengan menggunakan labu erlenmeyer 250 ml. Variasi kondisi dilakukan terhadap pH dan suhu. pH media yang digunakan yaitu 5,5; 5,0; 6,5; 7,0; dan 7,5. Sedangkan suhu inkubasi divariasikan pada kondisi 30, 40, dan 50°C. Tolok ukur yang diamati yaitu *optical density*, biomassa, kandungan protein, aktivitas enzim, dan gula yang dihasilkan. Komposisi media yang digunakan sama dengan media untuk keperluan isolasi.

Secara umum proses isolasi dan karakterisasi mikroba serta enzim yang dihasilkan ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Diagram alir proses isolasi dan karakterisasi mikroba penghasil enzim amilase

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari tahap isolasi bakteri dari tanah dari 3 lokasi diperoleh 56 isolat bakteri mesofil yang ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni pada media agar yang mengandung pati tapioka dan mineral.

Karakterisasi dan identifikasi bakteri mesofil penghasil amilase.

Hasil isolasi menunjukkan adanya 56 isolat yang dapat menghasilkan zone bening pada media agar yang mengandung pati (Gambar 2). Keseluruhan isolat tersebut dipilih dari isolat-isolat yang mampu menghasilkan diameter zona bening lebih dari 3 cm. Hal ini menunjukkan bahwa ke-56 isolat bakteri tersebut mampu menghasilkan enzim amilase. Zone bening terbentuk karena hidrolisis pati oleh aktivitas enzim amilase.

Gambar 2. Zone bening disekitar koloni bakteri yang menunjukkan aktivitas enzim amilase.

Kerapatan optik pada akhir pertumbuhan dari 56 isolat berkisar antara 0,169 sampai 2,979 dengan jumlah biomassa berkisar 0,420 - 1,776 g/l. Perbedaan tersebut diakibatkan oleh kemampuan tiap-tiap isolat untuk memperbanyak diri dalam kondisi yang diberikan. Dalam hal ini isolat yang mampu tumbuh dengan baik memberikan indikasi bahwa bakteri tersebut mampu memanfaatkan satu-satunya sumber karbon dalam medium pertumbuhan, yaitu pati. Dalam produksi enzim akan lebih baik jika digunakan isolat-isolat yang mampu tumbuh dengan baik dengan induksi substratnya.

Berdasarkan hasil pengamatan biomassa, aktivitas enzim, dan aktivitas spesifik, maka dari 56 isolat bakteri tersebut terpilih 15 isolat terbaik yaitu, M II₁, M II₁₀, M III₁, M VIII₂₁, M IX₁₃, DKW 6, DKW 7, DKW 8, DKW 10, DKW 11, DKW 13, DKW 14, DKW 27, DKW 37 dan DKW 39 (Tabel 1). Isolat-isolat tersebut akan dikembangkan pada tahap penelitian

berikutnya. Dari 15 isolat terpilih, hasil tertinggi untuk biomassa ditunjukkan oleh isolat DKW 27 (1.032 g/l), hampir sama dengan hasil yang dicapai oleh strain standar *B. subtilis* ATCC 0060 sebesar 1.234 g/liter.

Tabel 1. Karakterisasi dari isolat bakteri indigenous mesofil terseleksi.

Isolat	OD ₍₄₉₀₎	Biomassa g/l	Akt. enzim U/ml	Protein g/l	Akt. spesifik U/mg protein
M II ₁	1.961	0.648	582.90	1.29	451.86
M II ₁₀	1.721	0.682	746.30	1.07	697.48
M III ₁	2.133	0.618	486.30	1.03	472.14
M VIII ₂₁	2.167	0.954	412.70	0.82	503.29
M IX ₁₃	2.250	0.664	462.90	1.86	248.76
DKW 6	2.145	0.725	373.32	1.46	255.69
DKW 7	2.565	0.985	395.48	2.69	147.02
DKW 8	2.516	0.957	315.93	4.13	76.50
DKW 10	2.872	0.886	247.47	0.87	284.5
DKW 11	2.979	1.025	312.69	2.95	105.99
DKW 13	2.260	0.752	353.39	4.66	75.83
DKW 14	2.229	0.721	268.28	0.95	282.4
DKW 27	2.768	1.032	218.33	0.89	245.3
DKW 37	2.565	0.985	357.09	3.61	98.92
DKW 39	2.089	0.579	358.48	3.97	90.30
ATCC 0060	2.685	1.234	759.80	1.23	617.72
ATCC 0079	2.673	1.776	801.50	1.06	756.13

Aktivitas enzim berkisar antara 218.33-746.3 U/ml. Hasil tertinggi diperoleh oleh isolat M II₁₀ (746.3 U/ml). Hasil ini 1.77% lebih rendah dibandingkan aktivitas enzim amilase yang dihasilkan strain standar ATCC 0060 (759.8 U/ml). Sedangkan aktivitas ATCC 0079 sebesar 801,5 U/ml. Hasil ini 6.88% lebih tinggi dibandingkan aktivitas enzim isolat M II₁₀. Dengan melihat kandungan proteinnya yang berkisar antara 0,82-4,13 g/l maka aktivitas spesifik tertinggi dicapai oleh isolat M II₁₀ yaitu sebesar 697,48 U/mg protein, dengan aktivitas enzim 746.3 U/ml dan protein 1,07 mg/ml. Sedangkan aktivitas spesifik strain standar ATCC 0060 sebesar 617 U/mg protein dan ATCC 0079 sebesar 756,13 U/mg protein. Aktivitas spesifik enzim amilase yang dihasilkan oleh isolat M II₁₀ lebih tinggi 13,04% jika dibandingkan aktivitas spesifik enzim strain ATCC 0060, tetapi masih lebih rendah jika dibandingkan strain ATCC 0079 sebesar 7,76%.

Dari 15 isolat terpilih baru dilakukan identifikasi 5 isolat yang hasilnya disajikan pada Tabel 2. Identifikasi dilakukan dengan mengamati sifat-sifat morfologi dan reaksi biokimia yang muncul dalam reaksi berdasarkan metode Buchanan dan Gibbons (1974). Hasilnya menunjukkan bahwa semua isolat adalah *Bacillus sp.* Diperkirakan isolat M II₁ adalah *B. pantothenicus*, M II₁₀ adalah *B. licheniformis*, M III₁ adalah *B. pantothenicus*, M VIII₂₁ adalah *B. pumilus*, dan M IX₁₃ adalah *B. coagulans*.

Tabel 2. Hasil identifikasi dari isolat bakteri mesofil terseleksi

	M II ₁	M II ₁₀	M III ₁	M VIII ₂₁	M IX ₁₃
Gram	+ / batang	+ / batang	+ / batang	+ / batang	+ / batang
Aerob/an	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Sitrat	-	-	-	+	+
MR test	-	-	-	-	-
VP test	-	-	+	-	+
Indole	-	-	-	-	-
Urease	-	+	-	+	+
Nitrat	+	+	+	-	+
Arabinosa	d	d	d	+	-
Manitol	d	-	d	-	d
Xylosa	d	d	d	+	+
Tumbuh pada					
pH 5,7	+	+	+	d	-
T = 45°C	d	-	d	+	+
7% NaCl	-	-	-	d	d
Perkiraan jenis mikroba	<i>B.panto-thenticus</i>	<i>B.lichenifor-mis</i>	<i>B.panto-thenticus</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B.coagu-lans</i>

Ekstraksi dan karakterisasi enzim amilase

Pengendapan protein

Penelitian selanjutnya adalah uji coba pengendapan protein dengan pereaksi organik (aseton) dan ammonium sulfat untuk menghasilkan enzim kasar. Proses ini selain bertujuan untuk memekatkan enzim juga bertujuan untuk fraksinasi komponen protein enzim berdasarkan sifat-sifat ioniknya. Tahap ini juga sering dilakukan untuk memisahkan enzim dari komponen non-enzim yang masih tercampur (Irawadi, 1991).

Menurut Stanbury dan Whitaker (1984), ada dua metode untuk mendapatkan fraksi protein, yaitu:

- a. 'Salting-out' protein menggunakan garam anorganik, misalnya ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
- b. Menambahkan pelarut organik pada filtrat pada kondisi suhu $< 5^\circ\text{C}$.

Arima (1964) menyarankan penggunaan garam dengan konsentrasi 70% jenuh untuk mengendapkan protein enzim. Untuk menghindari penambahan volume yang cukup besar, biasanya ditambahkan dalam bentuk padatan. Waktu pengendapan minimal 15 menit, tetapi akan lebih efisien jika proses pengendapan dilakukan semalam pada suhu 4°C . Setelah pengendapan diikuti dengan tahap dialisis yang akan menghilangkan sisa garam melalui membran semipermeabel.

Pengendapan enzim dengan pelarut organik seperti aseton akan menghasilkan produk dengan aktivitas tinggi, tetapi kondisi reaksi harus dipertahankan pada suhu rendah ($< -5^\circ\text{C}$). Aseton digunakan secara luas untuk fraksinasi protein karena beberapa enzim sangat stabil dalam aseton seperti halnya enzim amilase.

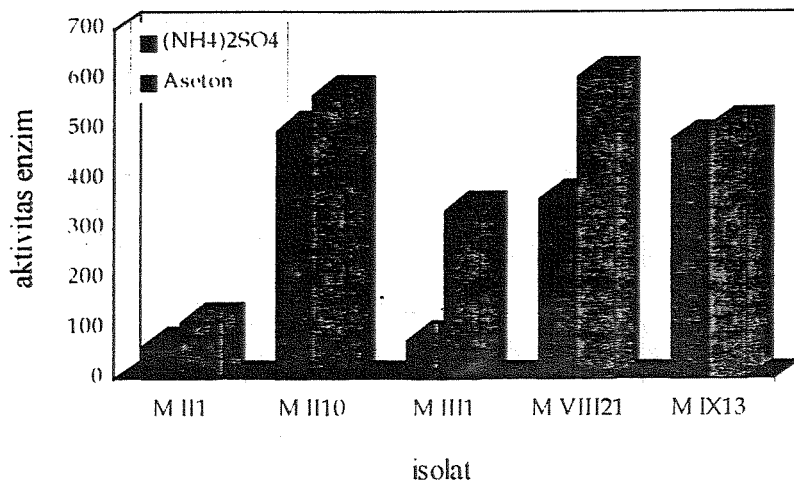
Dari 15 isolat terpilih dilakukan uji pengendapan terhadap 5 isolat (Tabel 3).

Tabel 3. Aktivitas enzim amilase setelah perlakuan pengendapan.

Isolat	Aktivitas setelah pengendapan (U/ml)	
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Aseton
M II ₁	67.4	115.4
M II ₁₀	497.6	570.8
M III ₁	78.2	338.6
M VIII ₂₁	361.3	604.9
M IX ₁₃	479.8	507.4

Ternyata enzim kasar yang dihasilkan dari pengendapan dengan aseton memiliki aktivitas enzim yang lebih tinggi dibandingkan ammonium sulfat (Gambar 3). Aktivitas enzim setelah pengendapan dengan aseton berkisar antara 115,4-604,9 U/ml, sedangkan setelah pengendapan dengan ammonium sulfat berkisar antara 67,4-497,6 U/ml. Ada dua isolat yang menunjukkan konsistensi aktivitasnya setelah proses pengendapan, yaitu M II₁₀ dan M IX₁₃. Aktivitas enzim kedua isolat tersebut tetap tinggi baik pada pengendapan dengan ammonium sulfat maupun aseton, walaupun tetap lebih tinggi aktivitasnya dengan pengendapan aseton. Sebaliknya isolat

M VIII₂₁ memiliki aktivitas tertinggi pada pengendapan dengan aseton (604,9 U/ml) tetapi relatif sedang pada pengendapan dengan ammonium sulfat. Sehingga dapat dikatakan bahwa pengendapan enzim amilase cocok dilakukan dengan menggunakan aseton dibandingkan bahan pengendap lain karena enzim amilase yang dihasilkan tidak kehilangan aktivitasnya. Hal ini sesuai dengan pernyataan Manning dan Champbell (1961) yang menggunakan aseton dalam salah satu tahap pemurnian enzim amilase pada suhu -10°C.



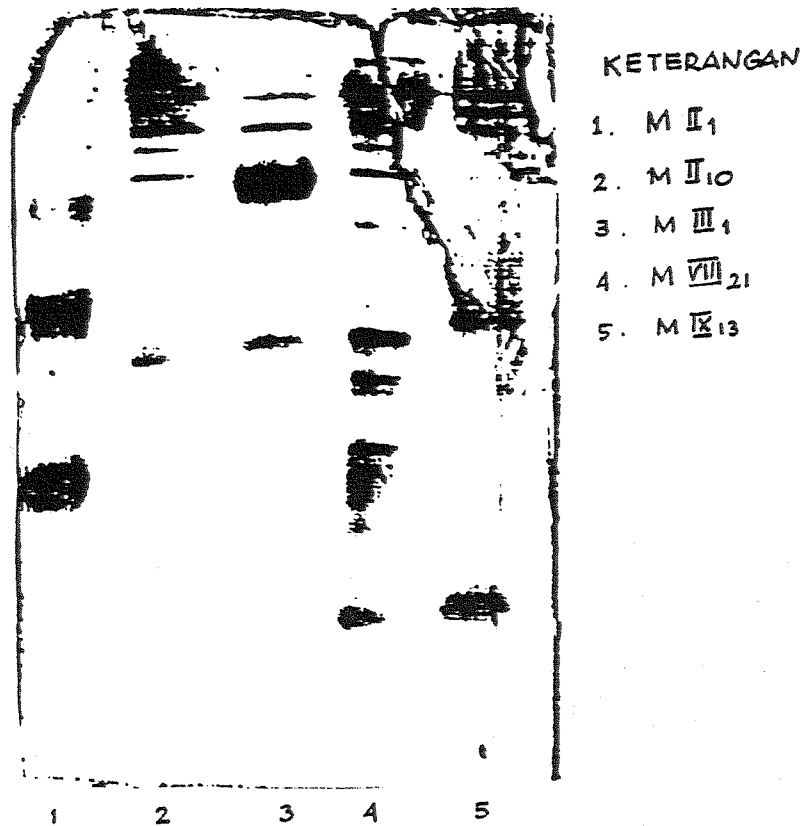
Gambar 3. Aktivitas enzim setelah pengendapan

Elektroforesis protein hasil pengendapan

Enzim kasar yang dihasilkan dipersiapkan untuk pemurnian dan penetapan bobot molekul menggunakan teknik elektroforesis. Elektroforesis merupakan salah satu teknik yang sangat tepat dan bermanfaat untuk mempelajari karakteristik protein. Pemisahan dengan elektroforesis dikembangkan atas dasar prinsip bahwa setiap ion atau gugus yang bermuatan akan bergerak sesuai dengan muatannya bila kepadanya diberikan medan listrik. Oleh karena protein mempunyai muatan yang berbeda pada setiap nilai pH kecuali pada titik isoelektriknya, maka protein juga akan bermigrasi dengan kecepatan yang dipengaruhi oleh densitas muatannya (nisbah muatan terhadap ukuran molekul). Hasil elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 4.

Hasil elektroforesis menunjukkan adanya pita dominan pada isolat M II₁₀. Pita tersebut diduga adalah enzim amilase. Hal ini didukung dengan data aktivitas spesifik yang tinggi. Semakin tinggi aktivitas spesifik maka komposisi protein dalam ekstrak didominasi oleh enzim yang

dimaksud:



Gambar 4. Pola elektroforesis preparat enzim kasar dari beberapa isolat penghasil amilase pada Native-PAGE.

Optimasi produksi enzim amilase

Sebelum memproduksi enzim dalam fermentor, terlebih dahulu diawali dengan optimasi kondisi dalam labu erlenmeyer menggunakan variasi pH awal media untuk kondisi fermentasi yang sama yaitu suhu 30°C dan kecepatan goyangan 175 rpm. Tiga isolat digunakan dalam pengujian kondisi optimum produksi enzim amilase. Pertimbangan digunakannya ketiga isolat tersebut adalah dua isolat (M II₁₀ dan M IX₁₃) yang memiliki sifat enzim yang konsisten dengan dua cara pengendapan. Sedangkan isolat M II₁ menunjukkan aktivitas jauh lebih tinggi dengan pengendapan aseton daripada ammonium sulfat. Ada beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim yang dihasilkan oleh sel, yaitu substrat, pH, dan suhu. Substrat yang digunakan dalam proses fermentasi berpengaruh terhadap

aktivitas dan produktivitas enzim. Adanya substrat tertentu didalam medium produksi dapat memacu mikroorganisme untuk mensekresi metabolit selnya (Boing, 1982). Dalam penelitian ini digunakan pati sebagai substrat sehingga bakteri dipacu untuk menghasilkan enzim amilase yang dapat memecah pati.

Suhu berpengaruh langsung terhadap kecepatan pertumbuhan mikroba, kecepatan sintesis enzim, dan kecepatan inaktivasi enzim. Suhu terlalu tinggi dapat mengakibatkan proses pengeringan protein yang dapat mengakibatkan kematian sel. Sedangkan suhu yang terlalu rendah dapat mengakibatkan berkurangnya aktivitas enzim sehingga pertumbuhan mikroorganisme terganggu. Suhu optimum produksi enzim amilase sekitar 25 - 30°C, karena itu digunakan suhu 30°C.

Penentuan nilai pH awal media fermentasi adalah salah satu faktor lain yang penting untuk pertumbuhan mikroorganisme dan pembentukan produk metabolitnya. Lloyd dan Nelson (1984) menyatakan bahwa aktivitas optimum enzim berkisar pada pH pertumbuhan mikroorganisme penghasil enzim tersebut. Enzim amilase pada umumnya stabil pada kisaran pH 5,5-8,0. Aktivitas optimum umumnya terjadi pada pH 4,8 dan 6,5. Akan tetapi pH optimum aktivitas enzim ini berbeda-beda tergantung organisme penghasil enzimnya (Suhartono, 1989). Pendapat senada dikemukakan oleh Bull (1979) yang menyatakan jenis mikroba penghasil enzim akan mempengaruhi aktivitas enzim amilase yang dihasilkannya. Enzim yang dihasilkan oleh bakteri terutama dari genus *Bacillus*, biasanya lebih tahan panas dan memiliki aktivitas optimum pada pH yang lebih tinggi dibandingkan enzim yang dihasilkan oleh kapang (Aunstrup, 1979; Fogarty, 1983).

Sedangkan dalam penelitian ini enzim diproduksi oleh bakteri yang pertumbuhannya berkisar antara pH 5,5 sampai 7,5. Proses sakarifikasi yang dilakukan oleh PT Ajinomoto yang melakukan biokonversi pati dengan enzim α -amilase dilakukan pada pH 7-8. Berdasarkan acuan-acuan diatas, maka penelitian ini menggunakan kisaran pH antara 5,5 sampai 7,5 dengan selang 0,5.

Pengaruh variasi pH terhadap pertumbuhan mikroba maupun aktivitas enzim yang dihasilkan dapat dilihat pada Tabel 4. Pada tabel ini terlihat bahwa aktivitas tertinggi untuk ketiga isolat berada pada kondisi pH 7,0, dengan aktivitas tertinggi dicapai oleh isolat MIII₁ yaitu 618,70 U/ml. Menurut Fogarty dan Kelly (1979), bentuk kurva aktivitas dan nilai aktivitas optimum α -amilase terhadap pH dapat berbeda-beda tergantung pada sumber enzim tersebut. Ternyata dari penelitian ini dari 3 isolat bakteri yang digunakan, pH optimum

aktivitas enzim yang dihasilkannya hampir sama. Kctiganya mencapai aktivitas optimum pada pH 7,0.

Buchanan dan Gibbs (1974) menyatakan bahwa derajat keasaman untuk pertumbuhan *Bacillus sp* berkisar antara pH 7 dan 8. Selain itu pada pH 8,0 diharapkan kemungkinan kontaminasi oleh kapang dapat diperkecil karena pertumbuhan kapang membutuhkan pH relatif rendah.

Tabel 4. Hasil pengamatan OD, protcin, gula, dan aktivitas enzim pada beberapa variasi pH dari 3 isolat terpilih.

Isolat	pH	OD ₆₀₀	Biomassa (mg/ml)	Aktivitas enzim (U/ml)	Protein (mg/ml)	Aktivitas spesifik (U/mg protein)	Gula reduksi (mg/ml)
M II ₁	5,5	0,71	0,8	523,83	0,654	800,96	6,254
	6,0	0,85	1,2	483,62	0,672	719,67	5,590
	6,5	0,83	0,8	564,05	0,888	635,19	7,820
	7,0	0,88	1,2	618,70	0,730	847,53	6,101
	7,5	1,02	1,2	593,95	0,710	836,55	5,880
M II ₁₀	5,5	0,27	0,8	641,38	0,872	735,53	7,905
	6,0	0,42	0,8	605,29	0,920	657,92	8,416
	6,5	0,83	0,4	672,32	0,936	718,29	8,620
	7,0	0,67	0,4	678,51	0,984	689,54	8,893
	7,5	0,50	0,8	589,83	1,070	551,24	9,182
M III ₁	5,5	0,72	0,8	545,49	1,146	475,99	6,254
	6,0	0,75	0,8	510,43	0,708	720,95	5,590
	6,5	0,84	0,8	532,08	0,794	670,13	7,820
	7,0	0,89	0,8	604,26	0,755	800,34	6,101
	7,5	0,99	0,8	481,55	0,698	689,90	5,880

Pertumbuhan isolat M II₁ ternyata tetap baik pada pH 6,0 sampai 7,5 dengan OD berkisar 0,85-1,02. Pada kisaran pH 5,5-7,5 aktivitas cnzim berkisar antara 483,63-618,70 U/ml dengan aktivitas enzim tertinggi dicapai pada pH 7,0 yaitu sebesar 618,7 Unit/ml. Aktivitas spesifik berkisar antara 635,19-847,53 U/mg protein dengan aktivitas spesifik tertinggi dicapai pada pH 7,0.

Pertumbuhan isolat M II₁₀ pada pH asam 5.5 - 6,0 kurang baik dengan nilai OD masing-masing 0.27 dan 0.42. Pertumbuhan mulai meningkat pada pH 6,5; 7,0 dan 7,5 dengan OD maksimum pada pH 6,5, yaitu sebesar 0.83. Kadar protein semakin meningkat dengan peningkatan pH dengan kisaran 0.872-1.070 mg/ml. Aktivitas enzim tertinggi dicapai pada pH 7.0 yaitu sebesar 678,51 Unit/ml. Pada kinctika pertumbuhan isolat M II₁₀ terlihat bahwa protein yang ada pada suspensi kultur menunjukkan kenaikan sesuai dengan kenaikan aktivitas enzim. Protein media yang berasal dari ekstrak khamir dan bakto tripton digunakan oleh bakteri sebagai sumber nitrogen organik. Menurut Soputro (1987), selama proses pertumbuhan, selain dihasilkan enzim amilse, juga dihasilkan protein enzim ekstraseluler lain dan protein hasil metabolisme bakteri, sehingga terjadi peningkatan kadar protein. Produksi enzim amilase yang tinggi berkorelasi dengan kenaikan kadar ekskresi nitrogen organik.

Isolat M III₁ tumbuh meningkat dengan meningkatnya pH. Hal ini ditunjukkan dengan meningkatnya nilai OD mulai dari 0,72 sampai 0,99. Aktivitas enzim berkisar antara 481,55 (pH7,5) sampai dengan 604,26 pada pH 7,0. Berdasarkan hasil pengamatan tersebut maka pH optimum untuk ketiga isolat tersebut adalah pH 7,0.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

- I. a. Telah terseleksi 15 isolat bakteri mesofil penghasil enzim amilase dengan aktivitas enzim berkisar antara 125,81-721,20 U/ml dan aktivitas spesifik 71,3-674,0 U/mg protein. Aktivitas tertinggi ditunjukkan oleh isolat M II₁₀ (721,20 U/ml). Demikian pula aktivitas spesifik tertinggi ditunjukkan oleh isolat M II₁₀, yaitu sebesar 674,0 U/mg protein. Dari 15 isolat tersebut telah diidentifikasi 5 isolat, yaitu M II₁, M II₁₀, M III₁, M VIII₂₁, dan M IX₁₃. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa isolat-isolat tersebut masing-masing adalah *B. panthotenticus*, *B. licheniformis*, *B. panthotenticus*, *B. pumilus*, dan *B.coagulans*.
- b. Pengendapan protein lebih baik menggunakan aseton daripada ammonium sulfat. Penggunaan aseton menunjukkan aktivitas enzim yang lebih tinggi. Hasil elektroforesis menunjukkan adanya pita dominan pada enzim kasar yang dihasilkan oleh isolat M II₁₀. Pita tersebut diperkirakan adalah enzim amilase
- c. Berdasarkan data optimasi proses diketahui bahwa pertumbuhan mikroba optimal dilakukan pada suhu 30°C dan pH 7,0. Dengan demikian produksi selanjutnya dilakukan pada pH tersebut.

Saran

Perlu dilakukan identifikasi isolat terpilih lebih lanjut sehingga dapat ditentukan sampai ke tingkat strain. Selain itu perlu dilakukan pula pengembangan metode identifikasi enzim yang lebih sensitif. Untuk mengetahui karakteristik produksinya, perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan fermentor skala laboratorium.

PUSTAKA

- Anonim. 1994. Statistik Indonesia 1994. Biro Pusat Statistik, Jakarta.
- Arima, K. 1964. Microbial enzyme production in industrial and chemical microbiology. *dalam* D.S. Mortimer (ed). Global impact of applied microbiology. John Wiley and Sons. New York.
- Aunstrup K. 1979. Enzyme of industrial interest: Traditional products. *dalam* Tsao G.T (ed). Annual reports on fermentation processes. Vol. 6. Academic Press. New York.
- Boing, J.T.P. 1982. Enzyme production. *dalam* Reed G (ed). Presscot and Dunns Industrial Microbiology. 4th ed. Avi Publishing Company, Inc. West Port.
- Brock, T.D. 1986. Introduction: and overview of the thermophiles. *dalam* T.D. Brock (ed.). Thermophiles. General, molecular, an applied microbiology. Willey. New York. pp. 1-6.
- Buchanan, R. E. and N.E. Gibbons. 1974. Bergey's manual for determinative bacteriology. William and Wilkins. Baltimore. 1268 pp.
- Bull, M.J. 1979. Progress in industrial microbiology. Vol. XV. John Willey and Sons. New York.
- Chen Wen Ping & Tsong Teh Kuo. 1993. A simple and rapid methods for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. Nucleic acid Research. 21: 9.
- Fox, J. L. 1995. Biodiversity promises great prospecting. Bio/Technology. Vol. 13: 544-545.
- Irawadi, T.T. dan Herastuti S.R. 1991. Teknik Pemurnian Sellulase. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor.
- Kimura, A. and C.Chiba. 1983. Quantitative Study of Anomeric Forms of Maltose Produced by α - and β - amilases. Agric. Biol. Chem. 47 (8) : 1747 - 1753.
- Lloyd, N.E., and W.J. Nelson. 1984. Glucose and fructose containing sweeteners from starch. *dalam* Whistler *et al.*, (eds). Starch: Chemistry and Technology. Academic Press. 611-659.
- Murdiyatmo, U., et.al. 1994. Dekstranase bakterial: produksi dan penggunaannya. Seminar Nasional Bioteknologi II. Puslitbang Bioteknologi LIPI. Cibinong.
- Ratanakhanokchai, K., J. Kaneko, Y. Kamio, and K. Izaki. 1992. Purification and Properties of a Maltotetraose and Maltoriose- Producing Amylase from *Chloroflexus aurantiacus*. Appl. and Environ. Microbial. 58(8) : 2490-2494.
- Soputro, L. 1987. Produksi α -amilase pada fermentasi *Aspergillus niger* dan *Aspergillus oryzae* dengan suplementasi limbah tapioka dan dedak padi. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian. IPB. Bogor.
- Stanbury, P.F., and A. Whitaker. 1984. Principles of fermentation technology. Pergamon Press Ltd. Oxford.
- Suhartono, M.T. 1989. Enzim dan Bioteknologi. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Ditjen Dikti. PAU Bioteknologi IPB. Bogor.
- Yasueda, H., et.al. 1990. High-level direct expression of semi-synthetic human interleukin-6 in *E. coli* and production of N-terminus met-free product. Bio/Technology. 8: 1036-1040.

