

Analisis Gula Reduksi Hasil Hidrolisis Enzimatik Pati Ubi Kayu oleh α -Amilase Termotabil dari *Bacillus stearothermophilus* TII₁₂

Analysis of Reducing Sugars on Hydrolysis of Cassava Starch by a Thermostable α -Amylase from Bacillus stearothermophilus TII₁₂

PUJI LESTARI^{1*}, ABDUL AZIZ DARWIS², KHASWAR SYAMU²,
NUR RICHANA¹ & DJOKO SAID DAMARDJATI¹

¹Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Jalan Tentara Pelajar No. 3A, Bogor 16111

²Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680

The product of α -amylase hydrolysis was evaluated for their application in sugar syrup industry. The objectives of this experiment were to determine the enzyme production of *Bacillus stearothermophilus* TII₁₂ in a five liter bioreactor and to analyze its hydrolysis product on cassava starch using thin layer chromatography and high performance liquid chromatography. The bacterium was cultured in the bioreactor for 48 hours, and then the biomass, enzyme activity, protein and reducing sugar contents in the filtrate were evaluated in the course of cultivation. The strain secreted an extracellular α -amylase in the optimal condition at pH 6.5, 50°C, agitation of 300 rpm and aeration of 1.5 vvm for 24 hours. The highest activity of α -amylase and reducing sugar content of 1 068.87 U/ml and 4.48 g/l respectively were obtained after 24 hours incubation. Hydrolysis products by the crude enzyme on cassava starch were evaluated at different incubation time. In the course of incubation the content of glucose, dextrin, maltose and oligosaccharides were increasing. After 24 hours the concentration of glucose and maltose reached 51 970 and 10 090 ppm respectively. Based on the enzymatic products, we concluded that thermostable α -amylase produced by *B. stearothermophilus* was an endo- α -amylase.

Key words: thermostable α -amylase, *Bacillus stearothermophilus*, cassava starch, enzymatic hydrolysis

Alfa amilase banyak dimanfaatkan untuk industri gula cair seperti glukosa, maltosa, dekstrosa, alkohol, dan proses biokonversi pati menjadi monomernya. Sebagai negara yang banyak menghasilkan bahan berpati, ubi kayu, dan sagu Indonesia sangat berpotensi untuk mengembangkan industri yang menghasilkan amilase. Nilai ekonomi ubi kayu maupun tapioka akan dapat ditingkatkan apabila dihasilkan produk yang bernilai ekonomi tinggi seperti sirup glukosa, fruktosa, dan maltosa.

Alfa amilase umumnya digunakan pada tahap likuifikasi pati pada proses pembuatan gula cair. Proses likuifikasi berlangsung pada suhu sekitar 90°C sehingga α -amilase termotabil sangat tepat untuk proses ini. Alfa amilase akan memecah amilosa menjadi glukosa dan maltosa serta sisa oligosakarida yang tidak terhidrolisis. Proses selanjutnya, sakarifikasi, memerlukan amiloglukosidase untuk memecah pati yang menghasilkan glukosa. Agar proses sakarifikasi berjalan optimum, sering kali α -amilase ditambahkan pada proses ini untuk membantu amiloglukosidase dalam mempercepat dan meningkatkan kandungan glukosa.

Bacillus stearothermophilus sebagai bakteri termofil yang mampu menghasilkan α -amilase telah lama diteliti. Alfa amilase dari *B. stearothermophilus* telah diteliti stabilitas termal dan

sifat fisiko kimianya (Ogasahara *et al.* 1970), purifikasi dan karakterisasi (Galabova 1982), uji kemampuan memproduksi pululanase termotabil (Suzuki & Chisiro 1983), purifikasi enzim ekstra dan intraselulernya (Srivastava 1984), bentuk α -amilase maltogenik (Suzuki & Imai 1985). Informasi tentang suhu optimum pertumbuhan juga telah diketahui seperti *B. stearothermophilus* 1 518 pada 60-70°C, *B. stearothermophilus* Donk BS-1 pada 55°C, *B. stearothermophilus* ATCC 12 980 pada 58°C, *B. stearothermophilus* ATCC 7 954 pada 60°C (Vihinen & Mantsala 1989).

Upaya mengembangkan pemanfaatan enzim pada berbagai proses industri dan potensi mikroorganisme penghasil α -amilase sudah saatnya untuk ditingkatkan. Saat ini telah ditemukan bakteri termofil lokal yang berhasil diisolasi dari kawah Pegunungan Dieng, yaitu *B. stearothermophilus*. Penelitian ini bertujuan memproduksi enzim kasar α -amilase dari *B. stearothermophilus* TII₁₂ dan menganalisis produk hidrolisisnya.

BAHAPANMETODE

Bakteri. *Bacillus stearothermophilus* TII₁₂ yang digunakan merupakan koleksi Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan Bogor.

* Penulis untuk korespondensi, Tel. +62-251-337975, Fax. +62-251-338820, E-mail: borif@indo.net.id

Produksi Enzim. Produksi α -amilase dilakukan dalam fermentor lima liter. Erlenmeyer satu liter diisi media amilum termodifikasi dari Gao *et al.* (1984) yang terdiri dari ekstrak ragi 0.25%, bakto tripton 0.5%, $MgSO_4$ 0.05%, $CaCl_2$ 0.5%, KH_2PO_4 0.05%, NaCl 0.1%, dan 1% pati ubi kayu. Media sebanyak 300 ml, pH 6.5 diinokulasi dengan dua ose isolat TII₁₂ yang berumur 24 jam, kemudian diinkubasikan pada inkubator goyang pada suhu 50°C, kecepatan 150 rpm selama 24 jam (Kim *et al.* 1995). Kultur propagasi tersebut dimasukkan ke dalam fermentor lima liter yang berisi 2.7 liter media steril dengan konsentrasi antibiuh silikon 0.075%, dan diinkubasi selama 48 jam. Proses fermentasi dilakukan pada suhu 50°C, pH 6.5, agitasi 300 rpm, dan aerasi 1.5 vvm (volume udara per vessel per menit). Pengamatan meliputi biomassa sel, aktivitas enzim dengan metode 3,5-dinitrosalicylic acid (Bernfeld 1955), protein terlarut dengan metode Bradford (Bollag & Edelstein 1991) dan gula reduksi (Miller 1959).

Isolasi Enzim. Kultur hasil fermentor dipisahkan supernatannya melalui membran mikrofiltrasi dengan volume umpan lima liter pada tekanan 0.5 kg/cm². Supernatan diendapkan dengan aseton dingin (suhu -20°C) pada perbandingan 2:3 dan diaduk perlahan, kemudian disimpan pada suhu 4°C semalam. Campuran disentrifugasi pada putaran 4 000 rpm, suhu 4°C selama 30 menit (Manning & Campbell 1981). Pelet dicuci dengan akuades untuk menghilangkan sisa aseton, selanjutnya pelet dilarutkan dengan bufer fosfat sitrat pH 7.0. Campuran disentrifugasi kembali dan fase atas diambil untuk selanjutnya disebut enzim kasar, kemudian disimpan pada suhu -20°C.

Likuifikasi Pati. Suspensi pati ubi kayu sebanyak 2% diatur pH-nya pada 6.0-6.5 dengan $CaCO_3$, kemudian dipanaskan sampai tergelatinisasi (Howling 1979). Setelah suspensi pati dingin, ditambahkan enzim kasar sebanyak 5% (v/v) dan disuspensikan pada suhu 90°C dengan variasi waktu 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, dan 24 jam. Hidrolisis pati dengan enzim standar α -amilase dari *B. licheniformis* E.C. 3.2.1.1. (SIGMA) dilakukan selama dua jam. Proses hidrolisis tersebut dihentikan dengan cara didinginkan dan ditambah arang aktif 2% dari bobot pati, kemudian diinkubasi selama satu jam pada suhu 80°C. Setelah selesai inkubasi, larutan disaring dengan kertas Whatman. Hasil hidrolisis enzim tersebut dianalisis melalui thin layer chromatography (TLC) dan high performance liquid chromatography (HPLC).

TLC. Analisis gula hasil hidrolisis pati oleh amilase diuji dengan metode TLC menggunakan silika gel 60 (Merck art No. 5553; 20-20 cm) sebagai fase diam. Sebagai pelarut digunakan isopropanol, aseton, dan asam laktat 0.1 M dengan perbandingan 4:4:2 (Ratanakhanokchai *et al.* 1992). Larutan hasil hidrolisis enzim langsung disuntikkan sebanyak dua ml dan spot gula dideteksi dengan pereaksi pembangkit warna yang terdiri dari campuran anilin sebanyak 4 ml, α -difenilamin 4 g, aseton 200 ml, dan 30 ml H_3PO_4 80%. Spot gula akan timbul setelah pemanasan pada suhu 100°C selama 30 menit (Touchstone 1973). Sebagai standar digunakan glukosa, maltosa,

dekstrin, dan pembanding α -amilase dari *B. licheniformis* E.C.3.2.1.1. (SIGMA).

HPLC. Hasil hidrolisis enzim pada tahap likuifikasi dilarutkan dalam metanol dengan perbandingan 2:1, kemudian disaring dengan kertas Whatman 40. Sebagai larutan standar digunakan glukosa dan maltosa dengan konsentrasi 8 000 ppm. HPLC dilakukan dalam kondisi kecepatan aliran 0.25 ml/menit, suhu 25°C, pelarut asetonitril:air (60:40), dan kolom p-NH₂.

HASIL DAN PEMBAHASAN

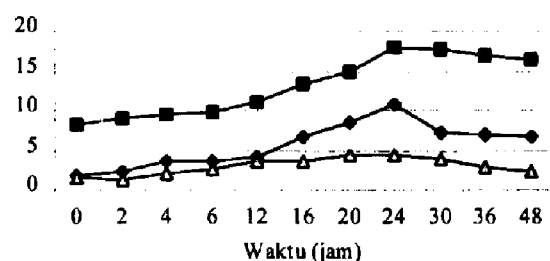
Produksi Enzim. Pertumbuhan sel bakteri TII₁₂ secara cepat mencapai fase eksponensial (Gambar 1). Fase stasioner dicapai sel bakteri TII₁₂ setelah jam ke-24 dan mengalami penurunan sampai jam ke-48. Fase lag yang cepat tersebut karena tahap propagasi yang tepat, artinya selama propagasi bakteri mampu memperbanyak jumlah sel karena sel telah beradaptasi.

Kandungan gula reduksi tertinggi dicapai pada jam ke-24 (4.48 g/l). Saat awal kultivasi bakteri akan memecah gula-gula sederhana seperti glukosa, setelah gula sederhana habis barulah bakteri memecah substrat kompleks, yaitu pati. Glukosa berperan sebagai sumber karbon yang berguna dalam aktivitas metabolisme sel bakteri. Apabila sumber karbonnya ialah glukosa maka gula reduksi saat awal fermentasi menunjukkan jumlah tertinggi namun apabila substratnya ialah pati menunjukkan nilai gula reduksi yang rendah, selaras dengan aktivitas enzim.

Pada saat yang sama, yaitu waktu kondisi kultivasi optimum ternyata aktivitas α -amilase TII₁₂ yang tinggi diikuti oleh gula reduksi yang tinggi pula (jam ke-24). Hal ini membuktikan bahwa aktivitas α -amilase dalam menghidrolisis pati merupakan proses pemanfaatan karbon yang akan digunakan sebagai energi oleh sel bakteri untuk metabolisme dalam selnya.

Aktivitas α -amilase maksimum dicapai pada jam ke-24 sebesar 1 068.87 U/ml dan selanjutnya aktivitas mengalami penurunan sampai akhir kultivasi. Waktu kultivasi selama 24 jam menghasilkan aktivitas enzim tertinggi, untuk itu waktu optimum produksi α -amilase TII₁₂ ditentukan selama 24 jam.

Pembentukan α -amilase menunjukkan pola pembentukan produk yang berkorelasi positif dengan pertumbuhan sel *B. stearothermophilus*. Pertumbuhan sel yang tinggi diikuti oleh aktivitas α -amilase yang tinggi pula. Hal tersebut menunjukkan



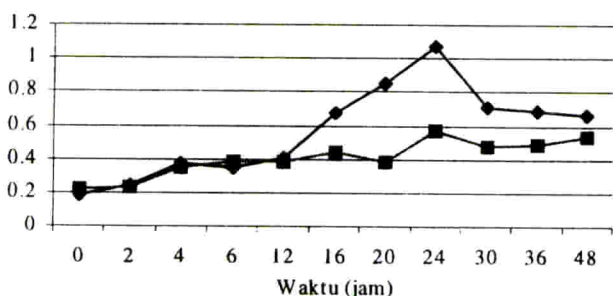
Gambar 1. Pola pertumbuhan bakteri, aktivitas enzim dan gula reduksi yang dihasilkan selama kultivasi *Bacillus stearothermophilus* TII₁₂: ◆ aktivitas enzim U/ml (x 100), ■ biomassa mg/ml (x 0.1), ▲ gula reduksi g/l.

bahwa α -amilase mulai terbentuk pada saat metabolisme awal. Oleh sebab itu, produk yang terbentuk merupakan metabolit primer dan merupakan hasil langsung jalur metabolisme katalitik (Scragg 1991). Pola pembentukan produk seperti yang dimiliki oleh isolat TII₁₂ dikategorikan pola pembentukan produk berasosiasi dengan pertumbuhan.

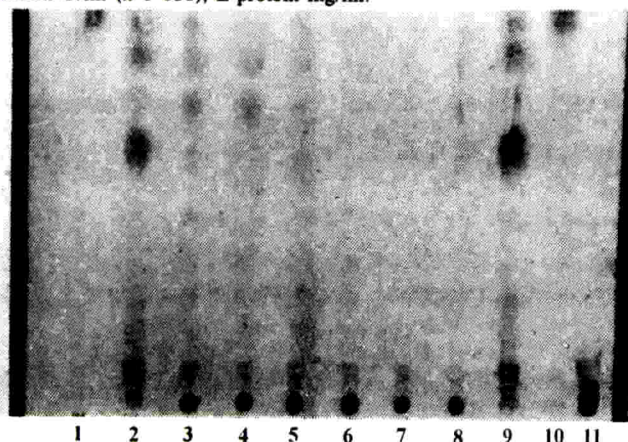
Gambar 2 menyajikan hubungan antara protein dan aktivitas α -amilase. Pada saat protein terlarut maksimum ternyata aktivitas enzim juga maksimum.

Protein terlarut mencapai nilai maksimum pada jam ke-24 yaitu 0.57 mg/ml artinya protein terlarut yang tinggi diikuti pula oleh peningkatan protein α -amilase sehingga aktivitas α -amilase juga maksimum. Suhu yang tinggi dapat menurunkan kandungan protein yang dihasilkan oleh mikroorganisme karena suhu tinggi dapat menyebabkan denaturasi protein, namun hal tersebut tidak berlaku untuk α -amilase TII₁₂ yang merupakan enzim termostabil dan dihasilkan oleh bakteri termofil.

Analisis Produk Hidrolisis Enzim dengan TLC. Pola kromatogram dari produk hidrolisis enzim yang dihasilkan oleh *B. stearothermophilus* TII₁₂ menunjukkan pola yang sama dengan standar α -amilase dari *B. licheniformis*, yaitu glukosa, maltosa, dan oligosakarida (Gambar 3).



Gambar 2. Hubungan aktivitas enzim dan konsentrasi protein yang dihasilkan selama kultivasi *Bacillus stearothermophilus* TII₁₂. ◆ aktivitas enzim U/ml (x 1 000), ■ protein mg/ml.



Gambar 3. Pola kromatogram dari produk hidrolisis enzim yang dihasilkan oleh *Bacillus stearothermophilus* TII₁₂: Sumur 1. Standar glukosa dan maltosa, 2. Standar α -amilase, 3. Produk hidrolisis sampel pada 0 j, 4. Produk hidrolisis sampel pada 0.5 j, 5. Produk hidrolisis sampel pada 1 j, 6. Produk hidrolisis sampel pada 1.5 j, 7. Produk hidrolisis sampel pada 2 j, 8. Produk hidrolisis sampel pada 24 j, 9. Standar α -amilase, 10. Standar glukosa dan maltosa, 11. Standar dekstrin.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai (*retention factor*) Rf berlainan pada tiap gula hasil hidrolisis pati oleh α -amilase TII₁₂ (Tabel 1). Hidrolisis pati ubi kayu oleh α -amilase TII₁₂ menghasilkan maltosa, glukosa, dan oligosakarida. Beberapa malto-oligosakarida dan dekstrin yang merupakan sakarida pendek memiliki Rf lebih kecil dibandingkan glukosa (monomer) dan maltosa (disakarida). Sesuai dengan hasil penelitian ini, bahwa malto-oligosakarida yang merupakan gabungan molekul-molekul glukosa berada diantara glukosa dengan dekstrin.

Hidrolisis enzimatis oleh α -amilase TII₁₂ terhadap pati ubi kayu pada awal hidrolisis yaitu antara 0.5 sampai 1 jam menunjukkan bahwa dekstrin, malto-oligosakarida yang lebih pendek telah terbentuk, dan setelah dua jam maltosa mulai sedikit terbentuk. Selama dua jam hidrolisis belum menghasilkan glukosa, tetapi setelah 24 jam telah terbentuk glukosa. Hal tersebut disebabkan kandungan glukosa belum terbentuk pada proses likuifikasi singkat. Proses hidrolisis menghasilkan glukosa membutuhkan waktu hidrolisis lebih lama.

Setelah 24 jam hidrolisis, telah terbentuk dekstrin, maltotriosa, maltosa, dan glukosa, sedangkan malto-oligosakarida lainnya mulai mengecil konsentrasinya terlihat dari semakin pudar warnanya. Produk hidrolisis α -amilase *B. stearothermophilus* TII₁₂ yang beragam tersebut seperti maltosa, glukosa, maltotriosa, maltotetrosa, dan malto-oligosakarida lainnya, menunjukkan pola pemecahan enzim yang terjadi secara acak. Menurut Ratanakhanokchai *et al.* (1992), glukosa, maltosa, dan malto-oligosakarida dapat dihasilkan dari pemecahan pati oleh α -amilase *B. subtilis*. Ivanova *et al.* (1993) memberikan hasil bahwa α -amilase dari *B. licheniformis* 44MB82-A menghidrolisis maltoheksosa secara lengkap dan parsial terhadap maltotetrosa dan maltopentosa menghasilkan maltotriosa, maltosa, dan glukosa. Shih dan Labbe (1995) menambahkan, α -amilase *Clostridium perfringens* tipe A menghasilkan maltosa, maltotriosa, dan maltotetrosa sebagai produk utama dan glukosa terbentuk setelah 24 jam hidrolisis.

Pola pemecahan substrat pati yang terjadi secara acak, dengan produk hidrolisis beragam menunjukkan α -amilase *B. stearothermophilus* TII₁₂ merupakan endoenzim. Hal ini

Tabel 1. Nilai faktor retensi (Rf) dari produk hidrolisis oleh α -amilase *Bacillus stearothermophilus* TII₁₂.

Perlakuan	Rf			
	Glukosa	Maltosa	Dekstrin	Dekstrin
Standar glukosa	0.807			
maltosa		0.758		
dekstrin			0.075	
dekstrin				0.025
α -amilase	0.819	0.731	0.074	0.050
Hidrolisis oleh:				
α -amilase TII ₁₂				
0 jam	-	0.751	0.079	0.038
0.5 jam	-	0.747	0.066	0.056
1.0 jam	-	0.741	0.088	0.047
1.5 jam	-	0.753	0.088	0.051
2.0 jam	-	0.741	0.069	0.051
24.0 jam	0.801	0.744	0.083	0.031

Tabel 2. Hasil analisis produk akhir hidrolisis pati umbi kayu oleh α -amilase *Bacillus stearothermophilus* TII₁₂ dengan HPLC.

Perlakuan	Glukosa (ppm)	Maltosa (ppm)
Standar α -amilase	81 050	11 040
Hidrolisis 1 jam	27 530	4 870
Hidrolisis 24 jam	51 970	10 090

didukung oleh Kim *et al.* (1995) bahwa α -amilase adalah endoenzim meskipun ditemukan ekso- α -amilase seperti yang dihasilkan oleh *Bacillus* galur GM 8901. Sesuai jenis α -amilase TII₁₂ yang termostabil, α -amilase TII₁₂ ini perlu dicobakan untuk tahap likuifikasi pati yang memerlukan suhu tinggi dalam prosesnya.

Analisis Produk Hidrolisis dengan HPLC. Produk akhir hidrolisis oleh α -amilase *B. stearothermophilus* TII₁₂ yaitu glukosa dan maltosa disajikan pada Tabel 2.

Hidrolisis pati oleh α -amilase TII₁₂ selama satu jam menghasilkan glukosa lebih rendah (37 530 ppm) dibandingkan 24 jam (51 970 ppm). Demikian juga maltosa, pada hidrolisis 1 jam sebanyak 4 870 ppm dan meningkat menjadi 10 090 ppm setelah 24 jam hidrolisis. Kandungan glukosa dan maltosa hasil hidrolisis α -amilase standar dari *B. licheniformis* selama dua jam lebih tinggi dibandingkan hasil hidrolisis α -amilase TII₁₂ selama 24 jam. Hal ini membuktikan bahwa produk akhir hidrolisis α -amilase *B. stearothermophilus* TII₁₂ terhadap pati ubi kayu ialah glukosa dan maltosa, dan sebagian maltosa masih merupakan produk intermediet sebelum menjadi glukosa. Hasil ini ternyata tidak berbeda jauh dengan hasil Kim *et al.* (1995) bahwa glukosa hasil hidrolisis α -amilase dari *Bacillus* galur GM 8901 terhadap pati terlarut juga diperoleh setelah 24 jam hidrolisis.

DAFTAR PUSTAKA

- Bernfeld P. 1955. Amylases α - and β . Di dalam: Colowick SP, Kaplan NO (ed). *Methods in Enzymology and Related of Biochemistry*. Vol. 1. New York: Acad Pr. hlm 149-155.
- Bollag DM, Edelstein SJ. 1991. *Protein Methods*. New York: J Wiley.
- Galabova D. 1982. Isolation, purification and characterization of α -amylase from *Bacillus stearothermophilus*. *Acta Microbiol Bulg* 1:24.
- Gao XL, Yu Y, Linko P. 1984. Glucoamylase and α -amylase production by immobilized. *Biotech* 6:645-650.
- Howling D. 1979. The general science and technology of glucose syrups. Di dalam: Borch GG, Parker KJ (ed). *Sugar: Science and Technology*. London: Appl. Sci. Publ.
- Ivanova VN, Dobrova EP, Emanuilova EI. 1993. Purification and characterization of a thermostable alpha amylase from *Bacillus licheniformis*. *J Biotechnol* 28:277-289.
- Kim TV, Gu BG, Jeong JY, Byun SM, Shin YC. 1995. Purification and characterization of maltotetraose-forming alkaline α -amylase from an alkalophilic *Bacillus* strain GM 8901. *Appl Environ Microbiol* 61:3105-3112.
- Manning GB, Campbell LL. 1981. Thermostable α -amylase of *Bacillus stearothermophilus*. *J Biol Chem* 263:2957-2962.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426-428.
- Ogasahara K, Imanishi A, Isemura T. 1970. Studies on thermophilic α -amylase from *Bacillus stearothermophilus*. I. Some general and physico-chemical properties of thermophilic α -amylase. *J Biochem* 67:65.
- Ratanakhanokchai K, Kaneko J, Kamio Y, Izaki K. 1992. Purification and properties of maltotetraose and maltotriose-producing amylase from *Chloroflexus auranticus*. *Appl Environ Microbiol* 58:2490-2494.
- Scragg AH. 1991. *Bioreactors in Biotechnology: A Practical Approach*. New York: Ellis Horwood.
- Shih NJ, Labbe RG. 1995. Purification and characterization of an extracellular α -amylase from *Clostridium perfringens* Tipe A. *Appl Environ Microbiol* 61:1776-1779.
- Srivastava RAK. 1984. Studies on extracellular and intracellular purified amylases from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus*. *Enzyme Microb Technol* 6:422.
- Suzuki Y, Chisiro M. 1983. Production of extracellular pullulanase by an amyolytic obligately thermophilic soil bacterium. *Bacillus stearothermophilus* KP 1064. *J Appl Microbiol Biotechnol* 17:24.
- Suzuki Y, Imai T. 1985. *Bacillus stearothermophilus* KP 1064 pullulan hydrolase. Its assignment to a unique type of maltogenic α -amylase but to neither pullulanase nor isopullulanase. *Appl Microbiol Biotechnol* 21:20.
- Touchstone JC. 1973. *Quantitative Thin Layer Chromatography*. New York: J Wiley.
- Vihinen M, Mantsala P. 1989. Microbial amyolytic enzymes. *Critical Rev. Biochem Molec Biol* 24:329-418.