

## Karakterisasi $\alpha$ -Amilase *Bacillus firmus* KH.9.4 Alkalotoleran dari Limbah Cair Tapioka

### Characterization of $\alpha$ -Amylase Producing *Bacillus firmus* KH.9.4 Alkalotolerant Isolated from Tapioka Liquid Waste

Nisa Rachmania<sup>1\*</sup>, Ruma Iswati<sup>1</sup>, Tedja Imas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144, Tel./Fax. +62-251-345011, e-mail: riknisa@telkom.net. \*penulis untuk korespondensi

#### Abstract

Alkalotolerant bacteria identified as *Bacillus firmus* KH.9.4 was isolated from tapioca liquid waste from Kedung Halang, Bogor. The isolate showed optimum  $\alpha$ -amylase activity after 15 hours of cultivation on liquid media. Optimum enzyme activity occurred at pH 6.0 and temperature 80°C. Upon heat treatment at pH 6.0 and 80°C the enzyme was still 100% active after 6 hours incubation without substrate. The enzyme activity was enhanced by supplement 10 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. The presence of 1, 5, and 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid demonstrated the inhibitory effect to this enzyme. Zymogram analysis revealed one translucent zone corresponding to soluble starch activities after 60 minutes of incubation at 40°C in the 0.05 M phosphate buffer pH 7.0. Whereas SDS-PAGE analysis showed that there are 5 bands of proteins.

Key words:  $\alpha$ -amylase activity, *Bacillus firmus*, tapioka liquid waste

Diterima: 30 Oktober 2003, disetujui: 31 Maret 2004

## Pendahuluan

Indonesia merupakan negara penghasil tapioka terbesar ke-2 dunia setelah Thailand (Veltlamp dan Bruijn, 1996). Di beberapa daerah Indonesia dijumpai industri pengolahan pati tapioka baik industri besar maupun rumah tangga. Pengolahan ubi kayu menjadi pati tapioka menghasilkan limbah berkadar pati hingga 50% (Nishise *et al.*, 1988) yang dapat dimanfaatkan oleh mikroorganisme pengurai pati.

$\alpha$ -Amilase (1,4- $\alpha$ -D-glucan glucanohydrolase, EC 3.2.1.1) merupakan salah satu enzim amilolitik yang mempunyai kemampuan untuk menghidrolisis pati pada ikatan  $\alpha$ -1,4 glukosidik menjadi monosakarida dan disakarida (Fogarty, 1983). Dalam industri pangan,  $\alpha$ -amilase berperan dalam mempercepat proses hidrolisis dengan menurunkan viskositas pati (Nigam dan Singh,

1995).  $\alpha$ -amilase yang biasa digunakan berasal dari bakteri *Bacillus licheniformis* dan *B. subtilis* yang mempunyai aktivitas optimum pada pH 6,0-7,0 (McTigue *et al.*, 1995). Kroll (1990) mengatakan bahwa beberapa amilase telah diisolasi dari bakteri alkalofilik dan mampu menghidrolisis 30-70% pati menjadi glukosa, maltosa, dan oligosakarida.

Salah satu bakteri amilolitik koleksi biakan laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, FMIPA, IPB adalah *B. firmus* KH.9.4 (Mubarik *et al.*, 2001). Isolat ini diisolasi dari limbah cair pengolahan pati tapioka di Kedung Halang (KH), Bogor dan diberikan kode 9.4. *B. firmus* KH.9.4 mampu tumbuh serta menghasilkan zona amilolitik pada pH 6,0-10,0 pada media padat yang mengandung pati tapioka 2%. Informasi dari Claus dan Berkely (1986) menyebutkan bahwa *B. firmus*, selain bersifat amilolitik juga proteolitik karena dapat menghidrolisis gelatin dan kasein. Penelitian

ini bertujuan untuk melakukan karakterisasi  $\alpha$ -amilase yang berasal dari bakteri *B. firmus* KH.9.4.

## Metode Penelitian

### Pertumbuhan Bakteri dan Produksi $\alpha$ -Amilase *Bacillus firmus* KH.9.4

Isolat bakteri ditumbuhkan di dalam media Lin *et al.*, termodifikasi (1998) yang mengandung 10 g ekstrak khamir, 10 g pati tapioka, 0,5 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , dan 0,13 g  $K_2HPO_4$  untuk 1 liter media, pH 9,0. Pengaturan pH media menggunakan larutan  $NaHCO_3$  10% steril. Sebanyak 2% inokulum cair ( $\pm 10^8$  sel/ml) umur 6 jam diinokulasikan ke dalam 100 ml media produksi. Biakan diinkubasi dalam penggojong dengan kecepatan 160 rpm suhu  $30^\circ C$ . Pertumbuhan bakteri diukur berdasarkan perubahan kekeruhan media produksi setiap 3 jam pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 620 nm. Setiap selang waktu 3 jam bersamaan dengan pengukuran turbiditas pertumbuhan, kultur bakteri disentrifugasi pada kecepatan 5000 g dengan menggunakan sentrifuse dingin (suhu  $4^\circ C$ ) selama 15 menit. Supernatan yang mengandung amilase ekstrak kasar diambil dan digunakan untuk uji enzim.

### Produksi dan Pengukuran Aktivitas $\alpha$ -Amilase

Enzim dipanen pada saat waktu pertumbuhan optimum berdasarkan kurva pertumbuhan yang telah diperoleh. Produksi enzim pada media cair yang berkomposisi sama dengan metode *batch* menggunakan Erlenmeyer. Media produksi diinkubasi selama 15 jam pada pH 9,0 dan suhu  $30^\circ C$ . Aktivitas  $\alpha$ -amilase diukur dengan metode Bernfeld (1955), yaitu sebanyak 1 ml filtrat enzim ditambahkan ke dalam 1 ml larutan 1% pati terlarut. Campuran diinkubasi selama 15 menit suhu  $30^\circ C$ , dilanjutkan dengan penambahan 2 ml asam dinitrosalisilat (DNS). Campuran diinkubasi selama 5 menit pada  $100^\circ C$ , dan setelah dingin absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada  $\lambda$  550 nm. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah

enzim yang diperlukan untuk melepaskan 1  $\mu$ mol gula pereduksi per menit atau setara dengan 1  $\mu$ mol maltosa/menit. Kurva standar maltosa diukur pada kisaran konsentrasi 0-400 ppm dengan selang 50 ppm. Kadar protein ditentukan dengan metode Bradford (1976). Sebanyak 60  $\mu$ l filtrat enzim direaksikan dengan 3 ml preaksi Bradford. Absorbansi dibaca pada  $\lambda$  595 nm. Bovine serum albumin (BSA) dengan kisaran konsentrasi 0-2,0 mg/ml digunakan sebagai standar.

### Karakterisasi Aktivitas $\alpha$ -Amilase

Aktivitas  $\alpha$ -amilase diukur pada pH 5 - 10 (dengan selang satu unit) pada suhu  $30^\circ C$ . Untuk menentukan pH optimum, yaitu pH yang memiliki aktivitas  $\alpha$ -amilase tertinggi, substrat pati dilarutkan dalam bufer asam sitrat 0,05 M (pH 5,0 dan 6,0), bufer Tris HCl 0,05 M (pH 7,0 dan 8,0), dan bufer glisin-NaOH 0,05 M (pH 9,0 dan 10,0). Penentuan suhu optimum aktivitas  $\alpha$ -amilase dilakukan dengan cara mengukur aktivitas enzim pada kisaran suhu  $20^\circ C$  -  $80^\circ C$  dengan selang  $10^\circ C$ . Kestabilan panas enzim diukur dengan cara menginkubasi enzim pada pH dan suhu optimumnya selama 6 jam inkubasi. Kemudian setiap 1 jam sekali dilakukan pengukuran aktivitas enzim.

Pengaruh penambahan kation terhadap aktivitas  $\alpha$ -amilase diujikan dengan menggunakan senyawa kation divalen yang digunakan ialah:  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $CuSO_4$ ,  $FeSO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , dan  $ZnCl_2$  hingga mencapai konsentrasi akhir 10 mM. Selain itu diuji pengaruh penambahan senyawa pengkelat logam etilendiamintetraasetat (EDTA) dengan konsentrasi akhir 10 mM. Konsentrasi akhir adalah konsentrasi senyawa kation divalen atau EDTA dalam campuran filtrat enzim dan bufer. Aktivitas  $\alpha$ -amilase diukur pada pH dan suhu optimum.

Elektroforesis menggunakan gel poliakrilamida-sodium dodesil sulfat (SDS-PAGE). Berat molekul protein diukur dengan standar berat molekul tinggi (*Pharmacia*). Elektroforesis protein menggunakan gel pemisah 8% poliakrilamida dan gel penahan (*stacking gel*) 4% poliakrilamida (Bollag and Edelstein, 1991). Gel pemisah (*separating gel*)

pada zimogram mengandung 1% pati terlarut. Sebelum dimasukkan ke dalam sumur, sampel protein yang telah ditambah bufer (1:1) diinkubasi dalam air mendidih selama 1 menit, kecuali untuk zimogram tidak dipanaskan. Volume sampel yang dimasukkan ke dalam sumur berkisar 10-20  $\mu$ l. Proses elektroforesis berlangsung selama 1 jam dengan kondisi 100 mv dan 50 mA. Larutan pewarna gel mengandung perak nitrat 0,1%. Setelah direndam 30 menit dalam larutan pewarna, gel dicuci dengan aquades dan *developer*, reaksi dihentikan dengan larutan asam sitrat 2,3 M. Gel untuk zimogram diberi perlakuan setelah elektroforesis direndam dalam Triton X-100 2,5 % selama satu jam. Kemudian cairan dibuang dan diganti dengan bufer fosfat 0,05 M pH 7,0 selama 1 jam sambil digoyang konstan pada suhu 40°C. Larutan tersebut diganti dengan larutan pewarna KI 0,01 N. Molekul protein yang bersifat amilolitik akan tampak berwarna bening, sedangkan pati yang tidak terhidrolisis berwarna biru.

## Hasil dan Pembahasan

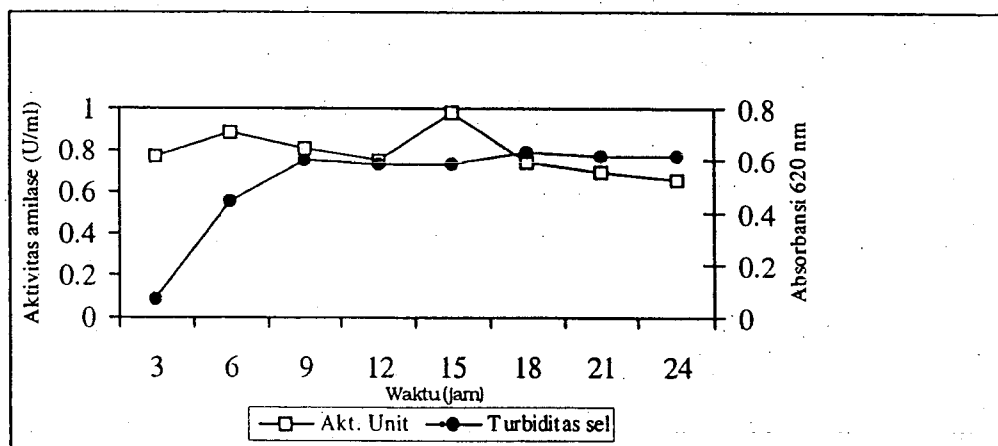
### Pertumbuhan Bakteri dan Produksi $\alpha$ -Amilase *Bacillus firmus* KH.9.4.

Aktivitas  $\alpha$ -amilase *B. firmus* KH.9.4 mencapai nilai maksimum pada jam ke-15 pertumbuhan dengan nilai aktivitas sebesar 0,84 U/ml, kadar proteinnya sebesar 0,80

mg/ml, dan aktivitas spesifik 1,05 U/mg (Gambar 1). Hingga 9 jam pertumbuhan, turbiditas sel meningkat cepat, dan setelahnya relatif statis hingga jam ke-24. Dengan demikian pada saat aktivitas maksimum tercapai diduga sel berada pada fase stasioner pertumbuhan. *Bacillus* sp. IMD 370 (McTigue *et al.*, 1995) dan *Lactobacillus cellobiosus* D-39 (Sen and Chakrabarty, 1984) juga menghasilkan aktivitas amilase yang maksimum pada fase stasioner.

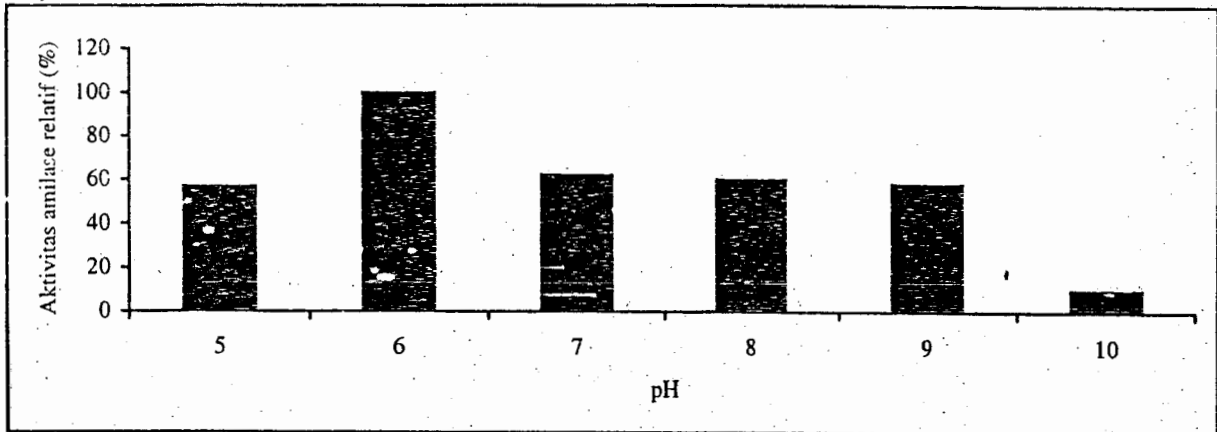
### Karakterisasi $\alpha$ -Amilase Ekstraseluler

$\alpha$ -amilase *B. firmus* KH.9.4 mencapai aktivitas optimum pada pH 6,0 (Gambar 2) dan suhu 80°C (Gambar 3). Meskipun biakan ini ditumbuhkan pada media dengan pH 9,0, namun ternyata memiliki pH optimum seperti sebagian besar  $\alpha$ -amilase bakteri lainnya sekitar 5-6 (Freer, 1993; Mc Tigue *et al.*, 1995). Uji kestabilan suhu  $\alpha$ -amilase *B. firmus* KH.9.4 menunjukkan aktivitas yang relatif stabil selama 6 jam inkubasi pada suhu 80°C dan pH 6,0 (Gambar 4). Kestabilan aktivitas dari satu hingga lima jam inkubasi menunjukkan  $\alpha$ -amilase *B. firmus* KH.9.4 berpotensi sebagai enzim termotabil. Salah satu definisi enzim termotabil seperti yang dikemukakan Ng and Kenealy (1986) memiliki suhu aktivitas enzim optimum di atas suhu pertumbuhan isolate penghasilnya.

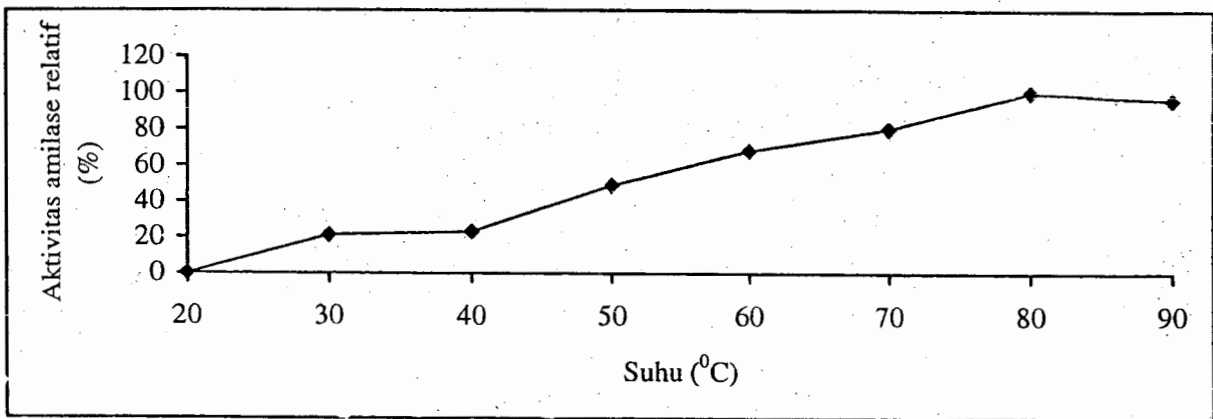


Gambar 1. Kurva pertumbuhan *B. firmus* KH.9.4 dan aktivitas  $\alpha$ -amilase.

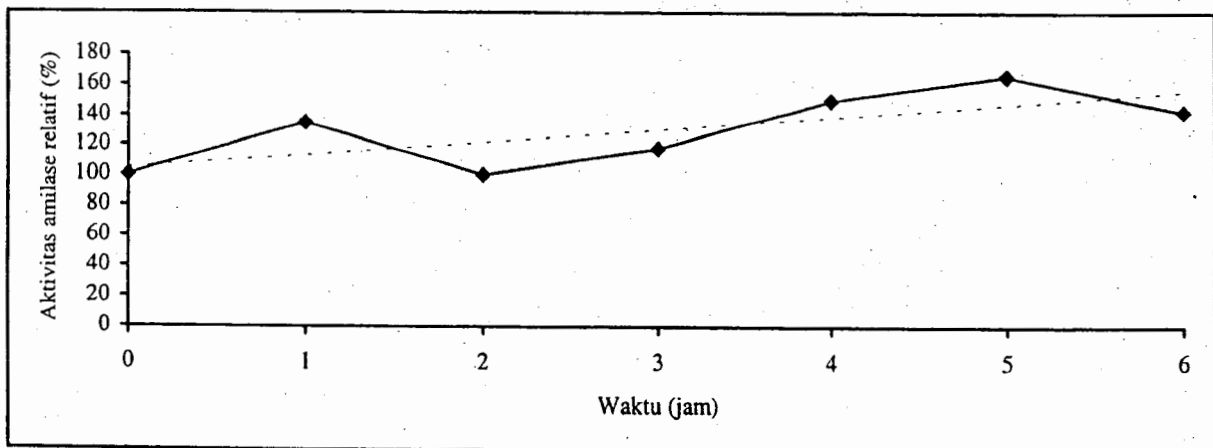
$\alpha$ -Amilase dari *Bacillus firmus* KH.9.4



Gambar 2. Pengaruh pH terhadap aktivitas  $\alpha$ -amilase *B. firmus* KH.9.4 pada suhu 30°C.



Gambar 3. Pengaruh suhu terhadap aktivitas  $\alpha$ -amilase *B. firmus* KH.9.4 pada pH 6,0.

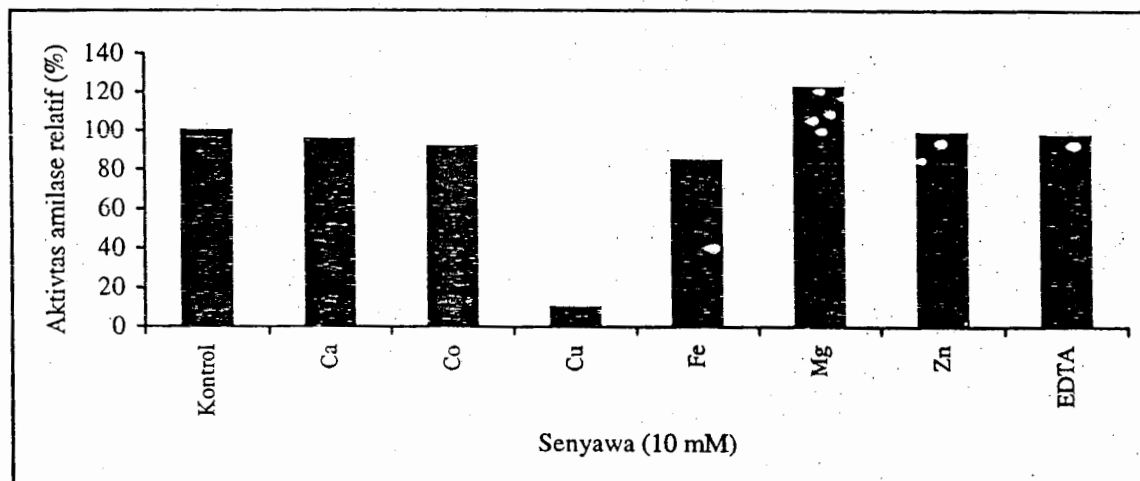


Gambar 4. Stabilitas aktivitas  $\alpha$ -amilase *B. firmus* KH.9.4 pada suhu 80°C pH 6,0.

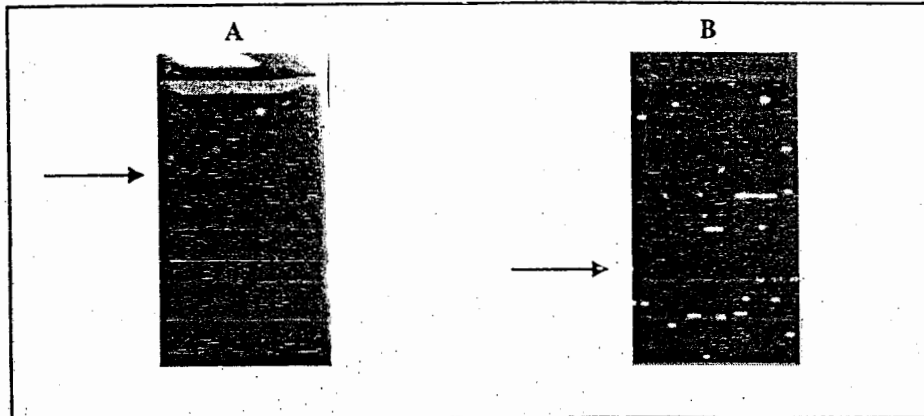
Setiap  $\alpha$ -amilase dari sumber yang berbeda memberikan respons yang berbeda terhadap penambahan senyawa kation divalen (Lin et al., 1998). Penambahan 10 mM kation divalen  $Mg^{2+}$  meningkatkan aktivitas  $\alpha$ -amilase *B. firmus* KH.9.4 hingga 122,6 %. Penambahan 10 mM  $Cu^{2+}$  menurunkan aktivitasnya hingga tersisa 9,9 % (Gambar 5). Lin et al., (1998) menyebutkan  $Cu^{2+}$  merupakan salah satu kation yang menghambat kuat aktivitas  $\alpha$ -amilase asal mikroba di samping  $Pb^{2+}$  dan  $Hg^{2+}$ . Ion kalsium mempunyai peranan penting bagi struktur enzim terutama dalam mempertahankan kestabilan enzim terhadap panas. Sebagian besar  $\alpha$ -amilase tetap stabil pada suhu tinggi karena kehadiran  $Ca^{2+}$  (Ng and Kenealy, 1986). Namun penambahan ion  $Ca^{2+}$  10 mM menurunkan aktivitas  $\alpha$ -amilase *B. firmus* KH.9.4 sebesar 4,5% dibandingkan kontrol. Senyawa pengkelat EDTA dikenal sebagai penghambat metaloenzim. Penurunan aktivitas  $\alpha$ -amilase setelah direaksikan dengan EDTA

menunjukkan bahwa enzim tersebut membutuhkan ion logam untuk aktivitasnya. Aktivitas  $\alpha$ -amilase *B. firmus* KH.9.4 menurun setelah direaksikan 10 mM senyawa EDTA. Hal seperti ini ditunjukkan pula oleh  $\alpha$ -amilase *Bacillus* sp. TS-23 (Lin et al., 1998) dan *Bacillus* sp. IMD 370 dengan menggunakan konsentrasi EDTA 1 mM dan 10 mM (McTigue et al., 1995).

Hasil SDS-PAGE  $\alpha$ -amilase *B. firmus* KH.9.4 menunjukkan terdapat 1 pita protein yang tebal berukuran 32,1 kD dan 4 pita protein yang tipis. Hasil zimogram dijumpai 1 pita protein yang menunjukkan aktivitas amilolitik yang terdapat di atas gel pemisah dengan berat molekul yang belum diketahui. Berdasarkan hasil ini perlu digunakan penanda berat molekul yang lebih besar dan perlu dilakukan kembali optimisasi proses zimogram untuk dapat menentukan pita protein yang memiliki aktivitas amilolitik tersebut (Gambar 6).



Gambar 5. Pengaruh penambahan senyawa kation dan EDTA terhadap aktivitas  $\alpha$ -amilase *B. firmus* KH.9.4 pada suhu 80<sup>o</sup> pH 6.0.



Gambar 6. (A) Hasil zimogram pita protein *B. firmus* KH.9.4 yang memiliki aktivitas amilolitik (bertanda panah) dan (B) Hasil SDS-PAGE pita berukuran 32,1 kDa (bertanda panah).

## Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini isolat *B. firmus* KH.9.4 yang diisolasi dari limbah cair tapioka berpotensi sebagai penghasil enzim  $\alpha$ -amilase. Aktivitas  $\alpha$ -amilase yang dihasilkannya relatif stabil pada suhu 80°C di atas suhu pertumbuhan isolat penghasilnya (suhu 30°C).

## Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didanai oleh Project Grant QUE Tahun 1999-2000. Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor dan Penelitian Dasar Tahun 2003, Ditjen Dikti, Depdiknas.

## Daftar Pustaka

- Bernfeld, P. 1955. Amylases  $\alpha$ - and  $\beta$ -. In: Colowick, S.P., N.O. Kaplan (Eds). *Methods in Enzymology*. pp. 149-150. Academic Pr. New York.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microorganisms quantities of protein in utilizing the principle dye-binding. *Anal. Biochem.* 17:570-573.
- Bollag, D.M. and Edelman, S.J. 1991. *Protein Methods*. Wiley-Liss. New York.

- Claus, D. and Berkely, W. 1986. *Bacillus*. In: Buttler, J.P. (Ed). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 2. pp. 1105-1113. Waverley Press. New York.
- Fogarty, W.M. 1983. Microbial amylases. In: Fogarty, W.M. (Ed). *Microbial Enzymes and Biotechnology*. pp. 1-92. Applied Science. London.
- Freer, S.N. 1993. Purification and characterization of the extracellular  $\alpha$ -amylase from *Streptococcus bovis* JB1. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1398-1402.
- Kroll, R.G. 1990. Alkaliphiles. In: Edwards, C. (Ed). *Microbiology of Extreme Environments*. pp. 55-92. McGraw Pub. New York.
- Lin, L-L., Chyaw, C-C and Hsu, W-H 1998. Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. TS-23. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 28:61-68.
- McTigue, M.A., Kelly, C.T., Doyle, E.M. and Fogarty, W.M. 1995. The alkaline amylase of the alkaliphilic *Bacillus* sp. IMD 370 *Enzyme Microb. Technol.* 17:570-573
- Mubarik, N.R., Listyowati, S., Imas, T., Purnama, R.D., Iswati, R., Damayanti, E. and Handayani, D. 2001. *Isolasi dan Karakterisasi Enzim Amilolitik dari Mikrob Limbah Cair Tapioka*. Laporan Akhir Penelitian Proyek QUE Jurusan Biologi Tahun 1999-2000. IPB. FMIPA. Jurusan Biologi. Bogor.

Ng, T.K. and Kenealy, W.R. 1986. Industrial applications of thermostable enzymes. In: Brock, T.D. (Ed). *Thermophiles. General, Molecular and Applied Microbiology*. 197-215 pp. Wiley. New York.

Nigam, P. and Singh, D. 1995. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme. Microb. Technol.* 17:770-778.

Nishise, H., Fuji, A., Ueno, M., Vongsuvanlert, V. and Tani, Y. 1988. Production of raw cassava starch-digestive glucoamylase by *Rhizopus* sp. in liquid culture. *J. Ferment. Technol.* 66:397-402.

Sen, S. and Chakrabarty, L. 1984. Amylase from *Lactobacillus cellobiosus* isolated from vegetable wastes. *J. Ferment. Technol.* 62:407-413.

Veitkamp, H.J. and de Bruijn, G.H. 1996. Plant resources of South-East Asia No. 9. In: Flach, M., Rumawas, F. (Eds). *Plant Yielding Non-seed Carbohydrates*. pp. 55-92. Buchny Pub. Leiden.