

Menentukan Aktivitas Amylase Bakteri B.01, B.02, dan B.03 Koleksi BPP Teknologi

Oleh : Nelson Simanungkalit.

The logo for BPPT (Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi) is displayed in a large, bold, grey font. The letters 'B', 'P', and 'T' have a red horizontal bar at their base, while the 'P' has a blue horizontal bar. A light blue, stylized swoosh or underline graphic curves around the bottom and right sides of the letters.

INTISARI.

Penelitian ini dimaksudkan dalam rangka mencari indigenous — mikroorganisme penghasil Amylase yang potensial manfaatnya untuk industri.

*Yang diteliti adalah 7 sampel bakteri berbentuk batang (basilus) asal kontaminasi udara. 3 di antaranya B.01, B.02 dan B.03 menunjukkan test amylase yang positif dengan aktivitas enzim masing-masing 2,07 U, 2,40 U dan 1,57 U. Aktivitas ini cukup tinggi bila dibandingkan dengan aktivitas enzim amylase yang dihasilkan oleh **Bacillus amyloliquefaciens** yang dengan perlakuan yang sama menunjukkan aktivitas enzim sebesar 1,57 U.*

PENDAHULUAN.

Di dalam setiap proses kehidupan, maka setiap makhluk hidup akan mensintesa berbagai macam enzim. Demikian juga halnya dengan mikroorganisme akan mensintesa berbagai macam enzim pula. Secara umum enzim dibutuhkan antara lain untuk pertumbuhan, metabolisme serta autolisa.

Berdasarkan tempat dimana enzim itu beroperasi, maka dibedakan

*) Penelitian ini dilakukan di Riken-Institute/ Jepang bersama-sama dengan Shigeru Kitayama dalam rangka: Joint research on Biotechnological Development of Tropical Microorganism and Plants dari tanggal 12.12.1984 s/d 29.3.1985.

ensim-ensim yang beroperasi di dalam sel dan ensim-ensim yang beroperasi di luar sel; extraselluler ensim.

Untuk dapat berfungsi dengan baik, extraselluler ensim memiliki "stabilitas" yang baik terhadap variasi kimia, phisika lingkungannya. Disamping stabilitas tadi, extraselluler ensim mempunyai keistimewaan lain yaitu dapat diproduksi dalam bentuk banyak, hal ini memberikan aspek positif terhadap dunia industri, khususnya industri makanan, minuman, enersi, detergent.

Hingga kini telah ada kurang lebih 23 perusahaan penghasil extraselluler ensim yang tersebar di 8 negara, terutama negara maju. Negara-negara tersebut adalah, Denmark, Prancis, Jerman Barat, Inggris, Belanda, Swiss, Jepang dan Amerika Serikat. Mengenai produksi ensim tersebut negara-negara Eropa Timur tidak disebutkan dalam literatur.

Extraselluler ensim yang mempunyai arti komersial berjumlah kurang lebih 13. Ensim-ensim tersebut adalah α -Amylase, B-Gluconase, Cellulase, Dextranase, Glucoamylase, Hemisellulase, Lactase, Lipase, Mutanase, Pactinase, Protease, Protease-mikrobial rennet dan Pullunase.

Penelitian ini menentukan aktivitas α -Amylase yang berasal dari biakan bakteri B.01, B.02 dan B.03. α -Amylase dikenal sebagai starch degrading ensim yang mempunyai arti komersial penting. α -Amylase menghidrolisa pati secara acak dengan memutuskan ikatan glikosida -1,4. Sebagai produk dari hidrolisa itu akan diperoleh olisakarida yang lebih pendek, dextrin, oligosakarida dengan 6-8 satuan glukosa dan apabila ensim bekerja lama akan diperoleh maltose atau glucosa.

α -Amylase banyak dipakai antara lain dalam industri makanan, minuman dan enersi seperti untuk pembuatan High Fructose Syrup (HFS), High Fructose Corn Syrup (HFCS), High Fructose Gulcose Syrup (HFGS), Etanol, bahan-bahan kimia organik, dll.

BAHAN DAN CARA KERJA.

Biakan bakteri yang diuji merupakan bakteri koleksi BPP Teknologi dengan Nomor Biakan B.01, B.02, B.03, B.04, B.05, B.06 dan B.07.

Dari biakan yang akan diuji dibuat kultur bakteri pada media G dan C pH 7 dan temperatur 37°C.

Inkubasi dilakukan selama 24 jam. Komposisi media G dan C adalah sebagai berikut: Asam Citrat 3,0 gram; Na_3 Citrat $2 \text{H}_2\text{O}$ 6,0 gram; KCl 1,5 gram; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,5 gram; Glutamat 8,0 gram; Alkohol 10,0 ml; Yeast extract 2,0 gram; Trace Element 1,0 ml; $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ 10,0 gram; Glucose 0,1% dan $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 1 %.

Screening Bakteri Penghasil Ensim Amilase.

Biakan bakteri yang akan diuji kemampuannya dalam menghasilkan

ensim amilase ditumbuhkan pada media amylase Selestion Medium dengan pH 7. Inkubasi dilakukan di dalam cawan petri selama 48 jam pada temperatur 37°C.

Koloni-koloni biakan yang tumbuh kemudian disemprot dengan larutan Lugol. Biakan mempunyai kemampuan menghasilkan ensim amilase bila terjadi warna terang di sekitar koloni. Biakan bakteri yang menghasilkan ensim amilase cukup tinggi diteliti lebih lanjut.

Penentuan Growth Rate dan Doubling Time.

Kultur biakan pada media G dan C dengan pH 7 diinkubasikan selama 1 malam pada temperatur 37°C untuk mendapatkan biakan yang seragam usianya (over night culture).

Kemudian dengan perbandingan 1 : 50 (kultur biakan dan media G dan C) diinkubasikan kembali di dalam shaker dengan temperatur 37°C selama 5 jam. Penentuan doubling time dibaca dari kurva Growth Rate.

Penentuan Aktivitas Enzim ~~Amilase~~ - Amilase.

Aktivitas enzim ~~Amilase~~ - Amilase ditentukan dengan metode Wohl-Gemuth yang telah dimodifikasi.

Biakan yang akan diuji diberi beberapa tetes Toluene dengan maksud agar pertumbuhan biakan terhenti.

Secara garis besar penentuannya adalah sebagai berikut: Larutan yang mempunyai komposisi 1% Soluble Starch sebanyak 2,5 ml; 0,1M CH_3COONa Buffer pH 6 sebanyak 2 ml; dipanaskan di dalam pemanas air bersuhu 37°C sampai dicapai temperatur yang konstan.

Masukkan 0,5 ml kultur biakan pada larutan tersebut di atas (larutan I). Sediakan masing-masing 0,5 ml larutan $\text{KI}-\text{I}_2$ pada beberapa tabung reaksi (larutan II). Kemudian masukkan 0,5 ml larutan I setiap 1 menit ke dalam setiap tabung reaksi yang berisi larutan II. Perubahan warna yang terjadi dibandingkan dengan larutan standard 0,1 N I_2 berwarna coklat.

Rumus yang digunakan adalah :

$$U = \frac{600 \cdot a}{t}$$

dimana,

a = factor dilution

t = waktu inkubasi dalam detik.

Pada pengujian ini digunakan strain *Bacillus amyloliquefaciens* (Strain

diperoleh dari koleksi laboratorium Radiobiology RIKEN, Jepang) sebagai pembanding. Dimana dengan menggunakan metode yang sama didapatkan "t" nya adalah 6' 30" dan $U = 1,54$.

Ekstraksi dan Purifikasi Enzim ✂ — Amilase.

Pemurnian dilakukan dengan reaksi pengendapan oleh senyawa organik Aseton dengan langkah-langkah sebagai berikut :

- Kultur biakan diinkubasikan pada media G dan C selama 1 malam (second culture), kemudian 10 ml biakan di atas diinkubasikan kembali selama 5 jam pada 100 ml G dan C dengan suhu $37^{\circ}C$. Bakteri berada pada phase stationer setelah inkubasi selama 5 jam.
- Larutan di atas disentrifugasikan selama 10 menit pada temperatur $0^{\circ}C$ pada 10.000 Rpm. Endapan yang terjadi dibuang.
- Supernatant ditambah Aceton ($-20^{\circ}C$) sebanyak 2 kali volume supernatant tersebut dan disimpan di dalam lemari pendingin ($-20^{\circ}C$), selama 48 jam.
- Dilakukan sentrifugasi kembali selama 10 menit pada temperatur $-20^{\circ}C$ dengan kecepatan 15.000 Rpm. Endapan yang terjadi dikeringkan dalam eksikator sampai terbentuk bubuk kering Aseton.

Penentuan Berat Molekul.

Berat molekul ditentukan dengan menggunakan Collum Chromatography Sephadex Gel Filtration, dimana digunakan Sephadex G—100 sebagai matrix; Buffer Tris—HCl $10^{-2}M$ pH 7,6; Myoglobin dengan berat molekul kira-kira 17.000; Ovalbumin dengan berat molekul kira-kira 45.000 dan Haemoglobin dengan berat molekul kira-kira 64.000.

Pada pengujian ini 0,5 gram bubuk Aceton dilarutkan dalam 3 ml Buffer, selanjutnya dimasukkan ke dalam collum. Setiap fraksi (masing-masing 4 ml) yang dikumpulkan dengan Fraction Collector diuji aktivitasnya, dan kemudian ditentukan V_e dari fraksi yang mempunyai aktivitas tertinggi. Besar V_e di sini adalah 104 ml. Rumus yang digunakan adalah:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

dimana,

V_o = Dead Volume

V_t = Volume Collum

Penentuan Jumlah Protein.

Ditentukan dengan cara/metoda Lowry et al. Untuk itu 0,2 gram ekstrak enzim dilarutkan dalam 2 ml 10^{-2} M Tris-HCl buffer pH 7,6 ditentukan Optical Density-nya dengan menggunakan Spectrophotometer pada 660 nm.

Pengaruh pH terhadap Aktivitas Ensim.

Pada pengujian ini sample yang digunakan adalah bubuk Aceton masing-masing sebanyak 100 mg per ml, untuk setiap pengujian. Sebagai pembanding digunakan Amilase Boehringer. Untuk menentukan pengaruh pH digunakan Buffer 0,1 M CH_3COONa pada temperatur 37°C . Sedangkan untuk pengujian sample pada pH 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 digunakan 0,5 M Tris-Malate Buffer.

HASIL DAN PEMBAHASAN.

Dari ke-7 biakan bakteri yang diuji aktivitas enzimnya hanya 3 biakan yang menunjukkan aktivitas amilase positif (lihat tb. 1). Dari tabel 2, kurva 1 dapat dilihat ketiga biakan mempunyai growth-rate yang hampir sama.

Doubling time ketiga biakan berkisar 42-60 menit (lihat tabel 3). Doubling time ini berada di antara doubling time yang dimiliki oleh *Escherichia coli* 15 - 30 menit, "soil-bacteria" 60-150 menit dan *Nitrosomonas*, *Nitrobacter* 5 - 10 jam.

Dari tabel 4 dapat dilihat biakan B.01 mempunyai aktivitas enzim sebesar 2.07 unit, biakan B.02 sebesar 2.40 Unit dan biakan B.03 mempunyai aktivitas enzim sebesar 1.54 Unit. Bila dibandingkan dengan kondisi yang sama dari *Bacillus amyloliquefaciens* yaitu sebesar 1.54 Unit, maka aktivitas enzim biakan-biakan tersebut adalah sama dan lebih besar. *Bacillus amyloliquefaciens* adalah bakteri penghasil amilase yang dikenal telah mempunyai arti komersial.

Isolasi enzim hanya dapat dilakukan sampai memperoleh acetone powder yang jumlahnya dapat dilihat dalam tabel 5. Dari jumlah protein perml. acetone powder seperti yang terlihat dalam tabel 6, 7 dan kurva 2 dapat diperoleh aktivitas spesifik masing-masing enzim yaitu 0.007 untuk B.01, 0.008 untuk B.02 dan 0.007 untuk B.03.

Berat molekul enzim ketiga biakan adalah kira-kira sebesar 23.000, lihat tabel 8, kurva 3. Berat molekul ini apabila dibandingkan dengan berat molekul α - Amylase lain yang telah diidentifikasi adalah mendekati α - Amylase yang berasal dari *Bacillus licheniformis*. Berat molekul α - Amylase lain yang dikenal adalah sebagai berikut: *Bacillus subtilis* 48.675, *Bacillus stearothermophilus* 15.600, *Bacillus caldolyticus* 10 - 30.000,

Bacillus acidocaldarius 68.000, *Aspergillus oryzae* 51.000, *Bacillus licheniformis* ± 22.500.

Uji pengaruh temperatur dilakukan pada biakan B.03. Pada temperatur 70°C aktifitas enzim setelah 10 menit adalah kecil sekali yaitu sebesar 0,13 Unit.

Pengujian pengaruh pH terhadap aktivitas enzim dilakukan pada pH sebagai berikut: pH 5,5, pH 6,0, pH 6,5, pH 7,0. Dari tabel 10 dapat dilihat aktivitas enzim tertinggi adalah pada pH 5,5. Semakin tinggi pH maka aktivitas enzim semakin menurun. Apabila dilihat dalam tabel perbandingan maka pH tersebut masih berada dalam range pH optimum — Amylase yaitu dari 4,6 sampai 8,0 hal ini tergantung kepada sumber enzim tersebut.

Sebagai perbandingan di bawah ini dituliskan tabel general properties of some Microbial — Amylase.

Enzyme Source	pH Optimum	Temp. Optimum
<i>B. subtilis</i> NRRL B3411	6,0	60
<i>A. oryzae</i>	5,5 — 9,5	40
<i>Ps. saccharophila</i>	5,25 — 5,75	40
<i>B. stearothermophilus</i>	4,6 — 5,1	55 — 70
<i>B. licheniformis</i>	5,0 — 8,0	76
<i>B. amyloliquefaciens</i>	5,9	65
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	5,5 — 6,5	60

KESIMPULAN.

Dibandingkan dengan aktivitas enzim asal *Bacillus amyloliquefaciens* maka ke-3 enzim yang diperoleh dari biakan B.01, B.02 dan B.03 menunjukkan aktivitas enzim — Amylase yang tinggi. Berat molekulnya hampir sama kurang lebih 23.000. Dari ke-4 tingkatan pH yang diuji, pH 5.5, pH 6.0, pH 6.5 dan pH 7.0 maka aktivitas enzim tertinggi untuk enzim asal biakan B.03 adalah pada pH 5.5. Pada temperatur 70°C enzim tersebut menunjukkan aktivitas enzim yang kecil yaitu 0,13 U.

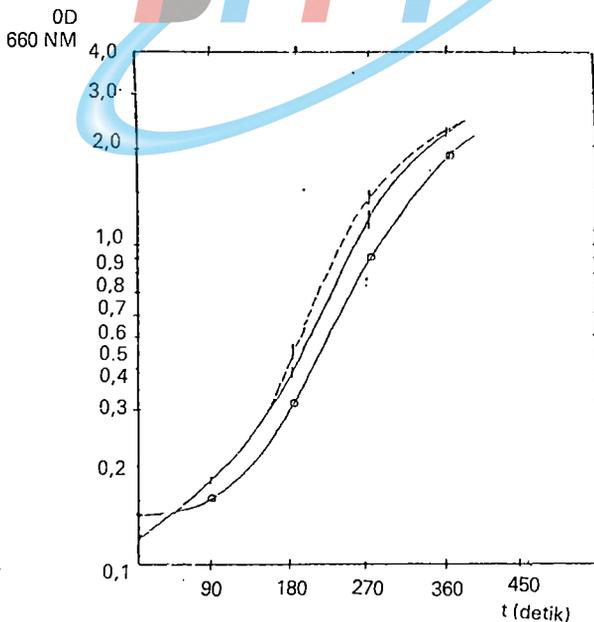
Tabel 1. Screening dan Seleksi Bakteri Penghasil Enzim Amilase.

No. Strain	B.01	B.02	B.03	B.04	B.05	B.06	B.07
Uji Amilase	+	+	+	-	-	-	-

Tabel 2. Growth Rate Bakteri B.01, B.02, B.03 (660 nm)

Strain	Waktu (menit)				
	0	90	180	270	360
Strain B.01	0,12	0,16	0,42	1,31	2,20
Strain B.02	0,12	0,18	0,40	1,24	2,20
Strain B.03	0,14	0,16	0,32	0,88	1,82

Kurva 1.



Kurva Growth Rate dari biakan bakteri B.01, B.02 dan B.03, dimana kurva untuk B.01 digambarkan sebagai berikut -----, untuk B.02 _____ dan untuk B.03 _____

Tabel 3. Doubling Time dari Bakteri B.01, B.02 dan B.03.

No. Strain	B.01	B.02	B.03
Doubling time (menit)	42	48	60

Tabel 4. Uji Aktifitas  – Amilase dengan Modifikasi Methode Wohl-Gemuth.

No strain	Aktivitas Ensim (unit)
B.01	2,07
B.02	2,40
B.03	1,54
<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>	1,54

Tabel 5. Hasil Bubuk Aceton per 100 ml Biakan Bakteri B.01, B.02 dan B.03.

No. Strain	Bubuk Aceton (gram)
B.01	2,1
B.02	2,5
B.03	2,5

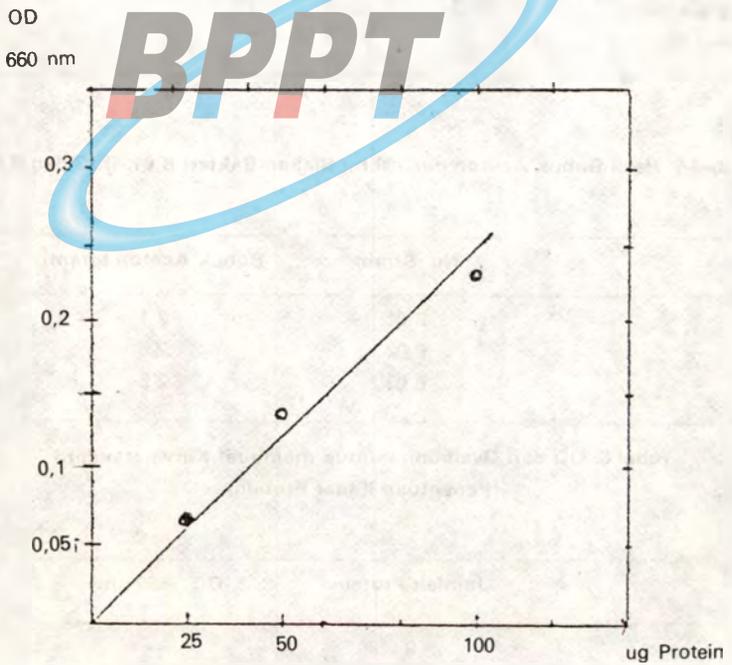
Tabel 6. OD dari Ovalbumin untuk membuat Kurva-standard (Penentuan Kadar Protein)

Jumlah Protein	OD. (660 nm)
0	—
25 μ g Protein	0,065
50 μ g Protein	0,134
100 μ g Protein	0,260

Tabel 7. OD. Dari Sample dan Kadar Protein per ml.

μ l Sample	OD (660)	μ g Protein per ml
50 μ l Sample B.01	0,043	320
50 μ l Sample B.02	0,046	360
50 μ l Sample B.03	0,029	220

Kurva 2. Penentuan Kadar Protein.

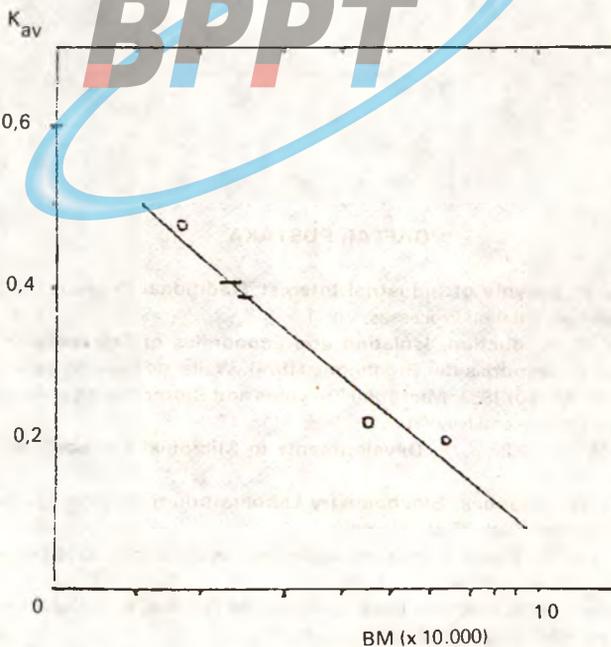


Tabel 8. Penentuan V_e untuk Menentukan Berat Molekul.

No. Fraksi	1/T (B.01)	1/T (B.02)	1/T (B.03)
22	—	—	0,03
23	0,07	—	0,06
24	0,14	0,07	0,09
25	0,20	0,12	0,16
26	0,23	0,11	0,18
27	0,19	0,08	0,15
28	0,10	0,06	0,11
29	0,04	0,04	0,06

Kurva 3.

Penentuan Berat Molekul dimana K_{av} untuk B.01 adalah 0,41, untuk B.02, 0,38 dan untuk B.03, 0,41.



Tabel 9. Berat Molekul Bakteri B.01, B.02 dan B.03.

No. Strain	Berat Molekul
B.01	± 23.000
B.02	± 23.000
B.03	± 23.000

Tabel 10. Pengaruh pH terhadap Aktifitas Ensim dari Bakteri B.03

pH	Aktivitas Ensim (unit)
5,5	1,85
6,0	1,62
6,5	1,54
7,0	1,35

DAFTAR PUSTAKA

1. Aunstrup, K. **Enzyme of Industrial Interest Traditional Product**, (1981). Annual Reports on Fermentation Processes, Vol. 1.
2. Aunstrup, K. **Production, Isolation and Economics of Extracellular Enzymes**.
3. Buddecke, E. **Grundriss der Biochemie** (1974). Walter de Gruyter, Berlin-New York.
4. Fogarty, W.M. (Ed) 1983, **Microbial Enzymes and Biotechnology**, Applied Science Publishers. London and New York.
5. Fogarty, W.M., Kelly, C.T. **Developments in Microbial Extracellular Enzymes**, (1981).
6. Fraiss, F. (1972) **Practical Biochemistry Laboaratorium Diagnostic**. Butterworths London University Park Press Baltimore.
7. Jauk, F. (1974), **Kurze Laboaratoriumsdiagnostik Urban & Schwarzenberg**, München, — Berlin — Wien.
8. Kark Othmer (1965), **Electron Tube Materials To Ferrites**, Encyclopedia of Chemical Technology, Sec. Ed. John Willey and Sons, Inc.
9. Lowry et. al (1951), Journal Biol. Chem.
10. Perlman, D. (Ed), (1978), **Annual Reports on Fermentation Proseses, Vol. 2**, Academic Press New York, San Francisco, London.
11. Schlegel, H., (1976), **Allgemeine Mikrobiologie**, Georg Thieme Verlag-Stuttgart.