



KARAKTERISASI ENZIM AMILASE DARI BAKTERI *Bacillus amyloliquefaciens*

Dian Riana Ningsih¹, Undri Rastuti¹, Ridlwan Kamaludin²

¹Program Studi Kimia MIPA FST UNSOED

²Jurusan Keperawatan FKIK UNSOED

deeyan_bik@yahoo.com

ABSTRAK

Enzim Amilase merupakan salah satu jenis enzim yang berperan penting dalam industri. Enzim amilase digunakan untuk menghidrolisis pati menjadi molekul karbohidrat yang lebih sederhana, yaitu dekstrin, maltosa dan glukosa. Industri yang menggunakan amilase antara lain: dalam industri kertas, industry detergen, industry tekstil, industry obat dan industri roti dan kue. *Bacillus amyloliquefacien* merupakan salah satu bakteri yang dapat menghasilkan amilase. Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan aktivitas enzim amylase dan mengkarakterisasi sifat biokimia enzim amylase dari *B. amyloliquefaciens*. Tahapan penelitian ini adalah penentuan waktu produksi optimum enzim amylase, produksi amylase dan penentuan aktivitas enzim amylase pada berbagai suhu dan pH. Penentuan aktivitas amylase menggunakan metode Nelson Somogyi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa enzim amylase yang dihasilkan oleh *B. amyloliquefaciens* mempunyai waktu produksi optimum pada jam ke 24 (1.4986 U/ml), temperature optimum 30-60 °C dan pH optimum 6-7.

Kata kunci : enzim amilase, bakteri *Bacillus amyloliquefaciens*, karakterisasi biokimia

ABSTRACT

Amylase is one of enzyme that plays an important role in the industrial . Amylase enzyme is used to hydrolyze starch into simpler molecules such as dextrin, maltosa and glucose. Amylase enzyme is widely used in paper, detergent, textile, drug and bakery and pastry. industries. Amylase can be isolated from the bacterium Bacillus amyloliquefaciens. The purpose of this study was to characterize some biochemical properties of the enzyme amylase crude extract from B. amyloliquefaciens. Stages of this study are: determination of optimum production time amylase, amylase enzyme extraction and determination of amylase enzyme activity at various temperatures and pH. Amylase activity is determined by Nelson-Somogyi method. The results of this study indicated that the amylase enzymes produced from bacterium B. amyloliquefaciens have the time of optimum production at the 24th hour (1.4986 unit / ml), optimum temperature at 30-60 °C and pH optimum at pH 6-7.

Key words : biochemical properties, amylase activity, *Bacillus amyloliquefaciens* bacteria

PENDAHULUAN

Enzim dihasilkan oleh semua makhluk hidup untuk mengkatalis reaksi biokimia dalam tubuh mahluk hidup tersebut sehingga reaksi-reaksi itu dapat berlangsung lebih cepat. Produksi dan perdagangan enzim didominasi oleh kelompok enzim hidrolitik seperti amilase, protease, katalase dan lipase. Enzim untuk kebutuhan industri diekstraksi dari berbagai jenis sel mahluk hidup, tetapi pada saat ini enzim lebih banyak diekstraksi dari berbagai jenis mikroorganisma, sebab mikroorganisma menghasilkan enzim yang dapat dimanfaatkan manusia dalam jumlah dan jenis yang sangat bervariasi selain mikroorganismanya sendiri dapat dikulturkan untuk memperoleh enzim yang dihasilkannya (Palmer, 1985).

Salah satu jenis enzim yang mempunyai peranan penting dalam industri adalah amilase. Enzim amilase digunakan untuk menghidrolisis pati menjadi molekul karbohidrat yang lebih sederhana, yaitu maltosa dan glukosa (Reddy *et. al.*, 2003). Pati yang belum terhidrolisis



sempurna menjadi glukosa juga menghasilkan produk berupa dekstrin. Saat ini produksi enzim amilase mencapai skala yang tinggi yaitu menguasai sekitar 25% perdagangan enzim (Reddy, *et al* 2003). Industri yang menggunakan amilase antara lain: dalam industri kertas untuk modifikasi pati menjadi lem dan melepaskan kertas dinding; dalam industri detergen untuk mendegradasi kotoran yang bersifat karbohidrat; dalam industri tekstil untuk memperhalus tekstur; dalam industri pengobatan untuk membantu pencernaan., dan dalam industri roti dan kue untuk mendegrasi pati menjadi gula sederhana yang menunjang pertumbuhan ragi.

Enzim amilase dapat diperoleh dari berbagai sumber seperti tanaman, binatang dan mikroorganisme. Penggunaan enzim dari mikroorganisme memiliki beberapa kelebihan diantaranya: lebih mudah isolasinya, lebih sederhana dibandingkan enzim yang berasal dari tumbuhan maupun hewan dan dapat dikendalikan dengan baik pada proses pembuatannya (Wang, 1979).

Bacillus amyloliquefacien merupakan salah satu bakteri yang dapat menghasilkan amilase. Alpha amilase dapat disolasi dari bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* yang mempunyai berat molekul kira-kira 50 kDa. *Bacillus amyloliquefaciens* merupakan bakteri yang termasuk dalam golongan spesies *Bacillus*. *B. amyloliquefaciens* banyak dikenal karena memiliki sifat katabolik dan kemampuannya dalam mendegradasi makromolekul yang kompleks (Gangadharan *et. al* (2006). Bakteri ini mempunyai sifat yang termofilik (tahan terhadap suhu yang tinggi).

METODE ANALISIS

Alat dan Bahan Penelitian

Alat-alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah alat gelas, termometer, jarum ose, pH meter "Hanna instrument", eppendorf, pipet mikro otomatis merk *Wheaton Soccorex*, sentrifuge "Heraeus", shaker bath merk "Memmert", water bath merk "Memmert", incubator merk "Venticell", autoklaf, timbangan analitik, oven merk "Memmert", hot plate stirrer, magnetic stirrer kompor listrik merk "Maspion", pembakar spirtus, Spektrofotometer UV-Vis merk "Shimidzu UV-1601."

Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat *Bacillus Amyloliquefaciens* koleksi Laboratorium Pascasarjana Universitas Gajah Mada, medium NA (*Nutrient Agar*), medium inokulum dan medium produksi, akuades, yeast extract, pepton, amilum, agar, NaCl 1%, EDTA dalam 1% (b/v) Na₂CO₃, larutan buffer sitrat, larutan buffer asetat, larutan buffer fosfat, larutan buffer Tris-HCl, larutan NaCl 0,85% (b/v), larutan Na-Wolframat 10% (b/v), larutan asam sulfat 2/3 N, larutan glukosa standar, reagen Cu-tartrat alkalis, reagen arsenomolibdat, NaOH, wrapping, parafilm, dan label.

Peremajaan Isolat

Isolat bakteri tumbuh dengan cepat, sehingga harus diremajakan di dalam suatu medium yang mengandung nutrisi untuk kebutuhan pertumbuhannya. Caranya dengan memindah ulang isolat ke dalam medium agar miring steril secara aseptis dengan jarum ose kemudian diinkubasi pada suhu sesuai habitat asal selama 2x24 jam.

Penentuan umur inokulum (Adinaraya, *et al.*, 2003)

Inokulum dibuat dengan cara memindahkan bakteri yang mampu menghasilkan enzim amilase dari medium pertumbuhan agar miring menggunakan jarum ose secara aseptis ke dalam 100 mL medium inokulum. Larutan diinkubasi dalam shakerbath selama umur inokulum yang ditentukan berdasarkan nilai OD (*Optical Density*) pada suhu dan pH sesuai habitat asal hingga inokulum menjadi keruh.

Penentuan waktu produksi optimum (Adinaraya, *et al.*, 2003)



Inokulum sebanyak 10% dimasukkan ke dalam medium produksi dan diinkubasi. Waktu produksi optimum enzim ditentukan dengan melakukan uji aktivitas ekstrak medium setiap 3 jam pada jam ke-0 sampai 48. Waktu produksi optimum yang diperoleh digunakan untuk produksi enzim amilase.

Produksi Amilase (Shaw *et. al.*, 1995)

Produksi amilase dilakukan dengan memindahkan 10% biakan bakteri dari medium inokulum ke dalam 100 mL medium produksi. Medium produksi yang sudah ditanami bakteri dari medium inokulum selanjutnya dikocok dengan *shakerbath* (200 rpm) selama waktu produksi optimum pada suhu sesuai dengan habitat asalnya. Biakan bakteri dari medium produksi kemudian dipanen dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada keadaan dingin (4°C). Supernatan yang merupakan ekstrak kasar medium ditampung, sedangkan pelet dibuang.

Uji Aktifitas Amilase (Metode Nelson-Somogyi, dalam Alexander dan Joan, 1993)

Sebanyak 0,1 g serbuk pati dilarutkan dalam 10 mL bufer fosfat pH 8 masing-masing duplo. Larutan ini disebut larutan pati 1%. Tabung kontrol dimasukkan 0,5 mL larutan enzim dan 0,5 mL NaCl 0,85%, ke dalam tabung sampel dimasukkan 5 mL substrat pati 1%, pada tabung kontrol ditambahkan 1 mL larutan Na-Wolframat 10% dan 1 mL asam sulfat 2/3 N. Kedua tabung selanjutnya diinkubasi pada suhu sesuai habitat asalnya selama 5 menit. Tabung reaksi sampel ditambahkan 0,5 mL larutan enzim dan 0,5 mL NaCl 0,85%, kemudian inkubasi dilanjutkan selama 30 menit. Aktivitas enzim dihentikan dengan menambahkan ke dalam tabung sampel 1 mL larutan Na-Wolframat 10% dan 1 mL asam sulfat 2/3 N. Tabung kontrol ditambahkan 5 mL substrat pati 1%.

Aktivitas amilase ditentukan dengan cara mengukur terbentuknya gula pereduksi menurut metode Nelson-Somogyi yaitu ke dalam tabung dimasukkan masing-masing 0,1 mL larutan sampel, 0,1 mL larutan kontrol, dan 0,1 mL larutan glukosa standar 100; 200; 300; 400; 500 µg/mL. Masing-masing larutan ditambahkan 0,2 mL reagen Cu-tartrat alkalis, kemudian diaduk. Tabung reaksi ditutup dan dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 30 menit, kemudian didinginkan dalam air dan ditambahkan 0,2 mL reagen arsenomolibdat. Campuran dihomogenkan lalu diencerkan dengan menambahkan 7,5 mL akuades.

Serapan diukur pada panjang gelombang 660 nm, lalu dihitung dengan rumus berikut:

$$\text{Aktivitas} = \frac{\text{Konsentrasi glukosa sampel} - \text{konsentrasi glukosa}}{0,18} \times \text{fp}$$

Satu unit aktivitas amilase didefinisikan sebanyak 0,18 mg gula pereduksi (1µmol) yang dibebaskan per mL enzim pada kondisi percobaan.

Penentuan suhu optimum enzim

Prosedur kerja penetapan suhu optimum enzim sama seperti pada uji aktivitas. Pengujian dilakukan pada pH optimum yang telah ditentukan sebelumnya dengan variasi suhu inkubasi pada 35°C, 40°C, 50°C, 55°C dan 60°C.

Penentuan pH optimum enzim

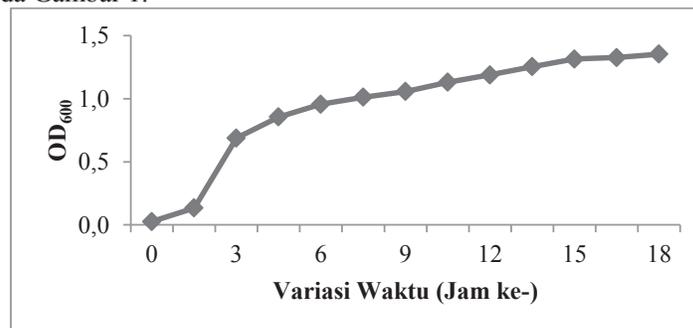
Prosedur kerja penetapan pH optimum enzim sama seperti pada uji aktivitas, tetapi dengan variasi pH. Variasi pH yang dilakukan adalah 5; 6; 7; 8 dan 9. Buffer pH yang digunakan adalah buffer natrium asetat pH 5, buffer Na-fosfat pH 6-7, buffer Tris-HCl pH 8-9.



HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Umur Inokulum Enzim Amilase dari Isolat Bakteri *Bacillus amyloliquefaciens*

Penentuan umur inokulum didasarkan pada pengukuran tingkat kekeruhan (*Optical Density*) medium inokulum menggunakan spektrofotometer UV-Visible pada panjang gelombang 600 nm. Kurva penentuan umur inokulum isolat bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Penentuan umur inokulum isolat bakteri *B. amyloliquefaciens*

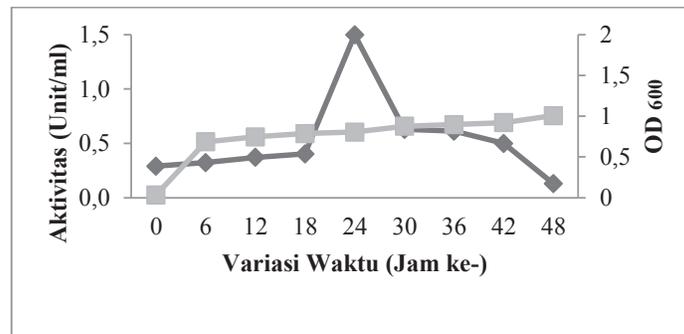
Berdasarkan hasil penelitian yang terlihat pada Gambar 1, dapat diketahui bahwa seiring bertambahnya waktu medium inokulum semakin keruh. Hal ini sesuai dengan pernyataan Prazeres (2006) bahwa pertumbuhan koloni ditandai dengan adanya kekeruhan pada medium dan dapat diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Gambar 1 di atas menunjukkan bahwa bakteri *B. amyloliquefaciens* pada jam ke-0 sampai jam ke-1,5 mengalami fase adaptasi yang ditandai oleh pertumbuhan bakteri yang masih sedikit. Fase adaptasi (fase lag) merupakan suatu periode dimana sel beradaptasi pada lingkungan baru dan menyiapkan untuk pertumbuhan reproduksi, biasanya dengan mensintesis komponen sel baru (Pelczar dan Chan, 1988). Pertumbuhan bakteri mengalami fase eksponensial (fase logaritmik) pada jam ke-1,5 sampai jam ke-18, dan meningkat tajam pada jam ke-3. Hal ini ditandai dengan densitas kultur bakteri yang mengalami kenaikan karena sel bakteri mengalami pembelahan dengan laju yang cepat (Pelczar dan Chan, 1988)

Hasil pengukuran *Optical Density* selama 18 jam, diperoleh waktu pertumbuhan optimum bakteri *B. amyloliquefaciens* adalah pada jam ke-3 dengan absorbansi sebesar 0,6885 dimana pada waktu tersebut bakteri mengalami pembelahan sel dengan laju yang paling pesat. Waktu pertumbuhan optimum yang telah diperoleh kemudian digunakan untuk menentukan waktu produksi optimum enzim amilase.

Waktu Produksi Optimum Enzim Amilase dari Isolat Bakteri *B. amyloliquefaciens*

Penentuan waktu produksi optimum dan aktivitas enzim amilase dari bakteri *B. amyloliquefaciens* dilakukan dengan cara memindahkan inokulum yang telah diinkubasi selama 3 jam ke dalam medium produksi sebesar 10% (v/v), kemudian diinkubasi selama 48 jam dan diukur aktivitasnya setiap 6 jam sekali. Aktivitas enzim amilase ditentukan berdasarkan konsentrasi gula pereduksi yang dihasilkan dari proses hidrolisis substrat amilum oleh enzim amilase dari bakteri *B. amyloliquefaciens*. Metode yang digunakan dalam penentuan aktivitas enzim amilase adalah metode Nelson-Somogyi yang didasarkan atas pengukuran absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm. Pertumbuhan dan aktivitas amilase dari isolat bakteri *B. amyloliquefaciens* dapat dilihat pada Gambar 2.

Berdasarkan hasil penelitian yang terlihat pada Gambar 2, dapat diketahui bahwa waktu produksi optimum enzim amilase dari isolat bakteri *B. amyloliquefaciens* berada pada jam ke-24 dengan nilai aktivitas sebesar 1,4986 U/ml, dan berada pada fase eksponensial. Waktu produksi optimum yang didapatkan selanjutnya digunakan untuk produksi enzim amilase dari bakteri *B. amyloliquefaciens*.



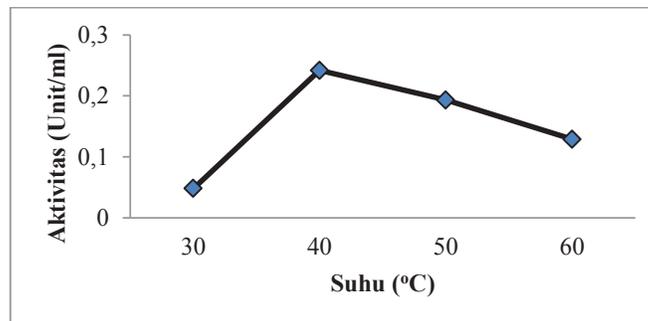
Gambar 2. Penentuan waktu produksi enzim amilase isolat bakteri *B. amyloliquefaciens*

Produksi enzim amilase dari bakteri *B. amyloliquefaciens* dilakukan dengan cara sentrifugasi, yaitu mengekstraksi medium produksi bakteri yang telah diinkubasi selama waktu produksi optimum yaitu 24 jam. Sel akan mengendap dengan adanya gaya gravitasi, sedangkan supernatannya merupakan ekstrak kasar amilase. Ekstrak kasar enzim amilase yang telah diperoleh selanjutnya dikarakterisasi meliputi suhu, pH, dan konsentrasi substrat optimumnya.

Karakterisasi Enzim Amilase dari Bakteri *B. amyloliquefaciens*

Karakterisasi suhu optimum enzim amilase

Suhu optimum dilakukan dengan melakukan pengukuran aktivitas enzim amilase dalam menghidrolisis substrat amilum menjadi glukosa. Perlakuan pada penentuan suhu optimum enzim amilase sama seperti perlakuan pada uji aktivitas enzim amilase, namun diberikan variasi suhu pada saat inkubasi selama 30 menit. Variasi suhu yang digunakan adalah 30 °C, 40 °C, 50 °C, dan 60 °C. Penentuan suhu optimum enzim amilase dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Pengaruh variasi suhu terhadap aktivitas amilase isolat bakteri *B. amyloliquefaciens*

Berdasarkan hasil penelitian yang terlihat pada Gambar 3 menunjukkan bahwa aktivitas enzim amilase dari isolat bakteri *B. amyloliquefaciens* optimum pada rentang suhu 30-60 °C, dengan nilai aktivitas berkisar antara 0,0483 U/ml sampai dengan 0,2417 U/ml. Hasil yang didapatkan didukung dengan analisis ANOVA (*one-way*) yang menunjukkan nilai aktivitas amilase dari isolat bakteri *B. amyloliquefaciens* pada rentang suhu 30-60 °C tidak berbeda nyata. Hal tersebut menunjukkan bahwa setiap perlakuan yang diberikan tidak memberikan pengaruh yang nyata. Berdasarkan hasil yang didapatkan disarankan untuk pembuatan dekstrin dalam bidang industri dengan bantuan bakteri *B. amyloliquefaciens* dapat dilakukan pada suhu ruang.

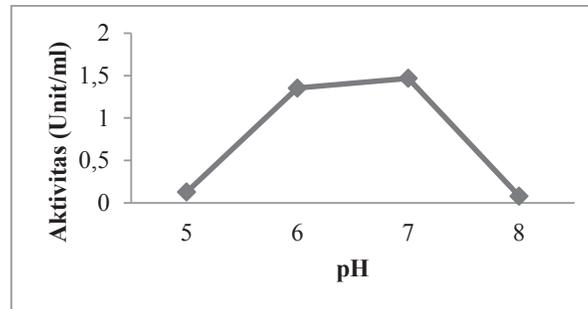
Peningkatan suhu hingga dicapai suhu optimum dapat meningkatkan aktivitas enzim karena semakin banyak tumbukan antara enzim dengan substrat membentuk kompleks enzim-substrat (ES). Suhu yang melebihi suhu optimum akan menyebabkan molekul protein enzim mengalami denaturasi sehingga struktur tiga dimensi enzim berubah-ubah secara bertahap. Hal tersebut menyebabkan substrat akan sulit berikatan dengan sisi aktif enzim sehingga kompleks ES yang terbentuk semakin sedikit (Sadikin, 2002). Aktivitas optimum amilase yang dihasilkan



dari bakteri lain seperti *Bacillus* sp AB 04 berada pada suhu 50-80 °C (Behal, *et al.*, 2006), sedangkan *Bacillus subtilis* berada pada suhu 60 °C (Asgher, *et al.*, 2004).

Penentuan pH optimum enzim amilase

Enzim mempunyai aktivitas maksimal pada kisaran pH tertentu yang disebut pH optimum. Prosedur penentuan pH optimum enzim amilase dari bakteri *B. amyloliquefaciens* sama seperti prosedur pada uji aktivitas, namun suhu yang digunakan adalah suhu optimum enzim amilase dari bakteri *B. amyloliquefaciens* yaitu suhu 40 °C. Variasi pH substrat yang digunakan yaitu pH 5, 6, 7, dan 8. Penentuan pH optimum enzim amilase dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Pengaruh variasi pH terhadap aktivitas amilase isolat bakteri *B. amyloliquefaciens*

Berdasarkan hasil penelitian yang terlihat pada Gambar 4 menunjukkan bahwa aktivitas enzim amilase dari isolat bakteri *B. amyloliquefaciens* optimum pada pH 6-7 dengan nilai aktivitas berkisar antara 1,3535 U/ml sampai dengan 1,4986 U/ml. Hal tersebut didukung dengan analisis ANOVA (*one-way*) yang menunjukkan nilai aktivitas amilase dari isolat bakteri *B. amyloliquefaciens* pada pH 7 tidak berbeda nyata dengan aktivitas pada pH 6, namun nilai aktivitas pH 7 berbeda nyata dengan nilai aktivitas pada pH 5 dan pH 8. Aktivitas enzim akan optimum jika terdapat kesetimbangan antara kedua muatannya dan enzim akan terdenaturasi jika berada pada pH yang jauh dari pH optimumnya, karena adanya perubahan struktur dari enzim yang akan mempengaruhi aktivitas enzim (Bollag, 1996). Enzim amilase yang berasal dari substrat pati akan bekerja secara optimum pada pH 5-7 (Winarno, 1988). Aktivitas optimum amilase yang dihasilkan dari bakteri lain seperti *Bacillus* sp AB 04 berada pada pH 7-10 (Behal, *et al.*, 2006), sedangkan bakteri *B. subtilis* optimum pada pH 8 (Asgher, *et al.*, 2004).

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Waktu produksi optimum enzim amilase pada jam ke 24 dengan aktivitas sebesar 1.4986 U/ml
2. Karakterisasi biokimiawi ekstrak kasar amilase yaitu suhu optimum 30-60 °C, pH 6-7

DAFTAR PUSTAKA

- Adinaraya, K., P. Ellaiah., dan D. S. Prasad. 2003. *Purification and Partial Characterization of Thermostable Serine Alkaline Protease from a Newly Bacillus subtilis PE-11*. AAPS PharmScitech 2003;4 artikel 56 (<http://aapspharmscitech.org>).
- Alexander, R. and M. G. Joan. 1993. *Basic Biochemical Methods Second Edition*. A John Willey and Sons. INC Publication.



- Asgher, M., M. Javaid Asad, S. U. Rahman and R. L. Legge, 2004, A Thermostable α -Amylase from a Moderately Thermophilic *Bacillus subtilis* Strain for Starch Processing, *Journal of Food Engineering*, 79(2007): 950-955.
- Behal, A., J. Singh, M. K. Sharma, P. Puri and N. Batra, 2006, Characterization of Alkaline α -Amylase from *Bacillus* sp. AB 04, *International Journal of Agriculture and Biology*, 8(1).
- Bollag, D. M., M. D. Rozyeki, and S. I. Edelstein, 1996, *Protein Methode 2th Ed*, John Willey and Sons, New York.
- Gangadharan D, S. Sivaramakrishnan, K. M Nampoothiri dan A. Pandey. 2006. Solid Culturing of *Bacillus amyloliquefaciens* for Alpha Amylase Production. *Biotechnol.* 44 (2)269–274. Trivandrum, India.
- Palmer T. 1985. Understanding Enzyme. Ellishorwood Publisher.
- Pelczar, M. J. dan E. C. S. Chan, 1988, *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, UI-Press, Jakarta.
- Prazeres, M. A., 2006, *Enzim Berperan Penting dalam Makanan*, <http://peranenzim.com>, (online), Diakses tanggal 5 Desember 2011.
- Reddy NS, Nimmagadda A & Rao KR. 2003. An overview of the microbial α -Amylase family. *African Journal of Biotechnology*. 2: 645–648.
- Shaw, Jei-Fu, Fu-Pang Lin, Su-Chiu Chen, and Hsing-Chen Chen. 1995. Purification and Properties of an Extracellular α -Amylase from *Thermus* sp. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, vol. 36, pp. 195-200.
- Wang, D.I.C, C.L. Conney, A.L. Demain, P. Dunhill, A.E, Humprey and M.D. Lily, 1979, *Fermentation and Enzyme Technology*, John Willey and Sons, New York, pp: 46.
- Winarno, P. S., 1988, *Kimia Pangan dan Gizi*, PT Gramedia, Jakarta.