

Pencirian Produksi Amilase oleh *Saccharomyces cerevisiae* W303A Rekombinan

Ahmad Thontowi^{✉1)}, Ni Nyoman Tri Puspaningsih²⁾, Sofjan Hadi²⁾, Purkan²⁾,
Ni' mahtuzahroh²⁾ & Bambang Irawan²⁾

¹⁾ Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI, Cibinong

²⁾ FMIPA-Universitas Airlangga, Surabaya

ABSTRACT

Characterization of Amylase Production by *Saccharomyces cerevisiae* W303A Recombinants. Cloning of amylase gene from *Endomycopsis fibuligera* ITB.R.cc.64 into *S. cerevisiae* W303a can effectively increase the yeast function to digest starch directly into ethanol. Production of amylase by *S. cerevisiae* W303a recombinants (I and P) were done by growing in yeast peptone starch (YPS) medium. The result showed that the recombinants could be produced of amylase by gave clear zone after staining by iodium vapor. The optimum condition of production of amylase by *S. cerevisiae* W303a recombinants were pH 7.0, 40°C temperature incubation, and gave maximum activity after 36 hours incubation. Amylase activity of I was higher than P recombinant for these condition respectively.

Key words: Characterization, amylase, *S. cerevisiae* W303a

PENDAHULUAN

Proses biokonversi pati menjadi etanol memerlukan dua tahap reaksi. Tahap pertama pati dihidrolisis menjadi glukosa oleh enzim amilase, dan tahap kedua glukosa difermentasi menjadi etanol.

Saccharomyces cerevisiae merupakan salah satu mikroba penting yang mampu memproduksi etanol, tetapi tidak dapat memproduksi enzim amilase (Godfrey & Reichett, 1985). Penyisipan gen amilase ke dalam sel *S. cerevisiae* akan meningkatkan efektivitasnya sebagai sel inang yang mampu mencerna pati menjadi etanol secara langsung melalui dua tahap reaksi di atas.

Produksi amilase dari beberapa mikroba oleh *S. cerevisiae* telah banyak

dilaporkan, beberapa diantaranya ialah *Aspergillus oryzae* (Randez *et al.*, 1993), α -amilase dan glukamilase dari *A. niger* (Tamp *et al.*, 1994), α -amilase dari *Bacillus licheniformis* (Luo *et al.*, 1994), α -amilase dari *B. subtilis* dan *Saccharomycopsis fibuligera* (Pandey *et al.*, 2000).

Puspaningsih *et al.* (2001) telah berhasil mengisolasi gen amilase dari *Endomycopsis fibuligera* ITB.R.cc.64, meligasinya dengan plasmid YCp50, dan mentransformasikannya ke dalam *S. cerevisiae* W303a. Hasil yang diperoleh ialah dua sel rekombinan *S. cerevisiae* W303a (rekombinan I dan P). Analisis nukleotida dari kedua rekombinan tersebut mengindikasikan bahwa gen amilase telah berhasil disisipkan ke dalam

✉ Jln. Raya Bogor-Jakarta Km 46, Cibinong, Bogor 16911

Thontowi *et al.*

S. cerevisiae W303A melalui plasmid YCp50. Untuk mengetahui produksi amilase dari kedua sel rekombinan tersebut telah dilakukan uji produksi serta penentuan kondisi optimumnya. Dalam makalah ini dilaporkan tentang uji produksi amilase oleh *S. cerevisiae* W303a rekombinan pada media *yeast peptone starch* (YPS) yang mengandung pewarna iodium serta menentukan waktu inkubasi, suhu, serta pH optimumnya.

BAHAN DAN CARA KERJA

Mikroorganisme

S. cerevisiae W303a rekombinan (I dan P) merupakan isolat hasil rekayasa yang telah disisipi gen amilase dari *Endomycopsis fibuligera* ITB.R.cc.64 (Puspaningsih *et al.*, 2001). Genotip dari strain ini ialah Mata, ade2-1, can1-100, his3-11-15, trp1-1, ura3-1.

Uji Produksi Amilase oleh *S. cerevisiae* W303a Rekombinan

Produksi amilase oleh *S. cerevisiae* W303a rekombinan diketahui melalui pertumbuhan sel tersebut dalam media YPS (1% yeast extract, 2% pepton, 3% pati, dan 2% agar). Setelah 2 hari inkubasi pada suhu ruang akan terbentuk daerah bening di sekitar sel dengan pewarnaan iodium.

Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Penentuan waktu inkubasi optimum dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim kasar pada berbagai waktu inkubasi, yaitu 0, 12, 24, 36, dan 48 jam pada suhu ruang serta pH reaksi 7.0.

Penentuan Suhu Optimum

Penentuan suhu optimum dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim kasar pada berbagai suhu, yaitu 30,

40, 50, 60, 70, dan 80°C dengan masa inkubasi 30 menit dan pH reaksi 7.0.

Penentuan pH Optimum

Penentuan pH optimum dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim kasar pada berbagai kondisi pH. Kondisi pH katalitik optimum diperoleh dengan melarutkan enzim dalam buffer fosfat sitrat (BFS) pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, dan 9.0 dengan masa inkubasi 30 menit dan suhu 40°C.

Pengujian Enzim

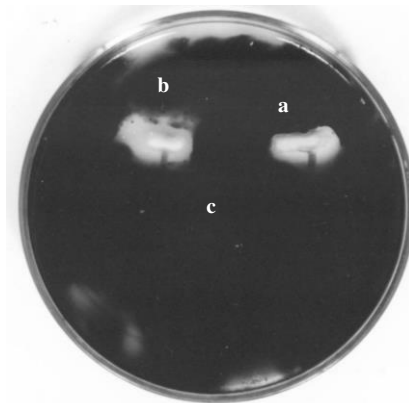
Aktivitas amilase ditentukan dengan cara mengukur banyaknya gula reduksi yang dihasilkan dari hidrolisis pati terlarut oleh enzim yang terdapat dalam supernatan. Aktivitas amilase diukur dengan menggunakan metode Bernfeld (1995). Satu unit aktivitas amilase ialah sejumlah enzim yang dapat menghasilkan gula reduksi sebanyak 1 µmol/menit pada kondisi pengujian. Sedangkan konsentrasi protein diukur dengan menggunakan metode Bradford (Kruger, 1991).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi Amilase oleh *S. cerevisiae* W303a Rekombinan

Uji produksi amilase oleh dua sel *S. cerevisiae* W303a rekombinan dilakukan dengan menumbuhkannya dalam media YPS. Hasil uji ditampilkan pada Gambar 1.

Gambar 1 menunjukkan terbentuknya zona bening di sekitar *S. cerevisiae* W303a rekombinan. Hal ini menunjukkan bahwa kedua rekombinan (I dan P) mampu memproduksi amilase, sedangkan pada kontrol *S. cerevisiae* W303a tidak terbentuk zona bening. Kedua rekombinan yang mengandung sisipan gen amilase akan menyebabkan



Gambar 1. Produksi amilase oleh *S. cerevisiae* W303a rekombinan pada media YPS. (a) rekombinan P, (b) rekombinan I, dan (c) kontrol *S. cerevisiae* W303a

S. cerevisiae W303a mampu menghidrolisis pati yang ada pada media YPS menjadi glukosa. Adanya aktivitas hidrolisis ini dapat diketahui dengan cara pewarnaan iodium. Pati akan membentuk kompleks berwarna biru tua dengan iodium, sedangkan glukosa tidak. Sehingga hidrolisis pati menjadi glukosa oleh kedua rekombinan tersebut menghasilkan zona bening.

Waktu Inkubasi Optimum

Aktivitas enzim amilase meningkat seiring dengan bertambah lamanya waktu inkubasi (Gambar 2). Aktivitas tertinggi dari kedua rekombinan (I dan P) diperoleh setelah 36 jam fermentasi. Sehingga waktu inkubasi terbaik untuk kedua rekombinan ialah selama 36 jam. Rekombinan I mempunyai aktivitas dan aktivitas spesifik lebih tinggi dibandingkan rekombinan P, yaitu sebesar 360 U/ml dan 45.6 U/mg.

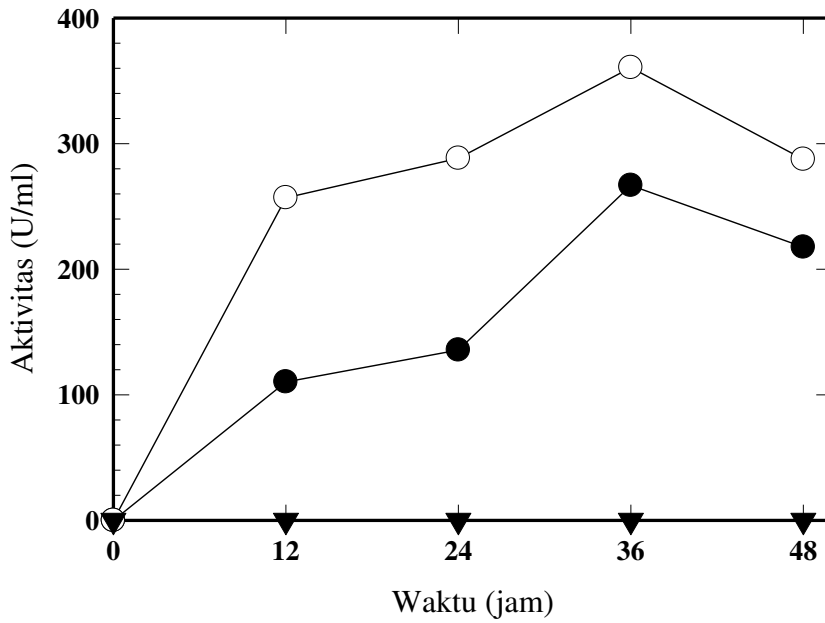
Suhu Optimum

Seperti terlihat pada gambar 3, aktivitas amilase tertinggi untuk masing-masing rekombinan ialah pada suhu 40°C. Seiring bertambahnya suhu maka aktivitas justru turun. Hal ini menunjukkan bahwa

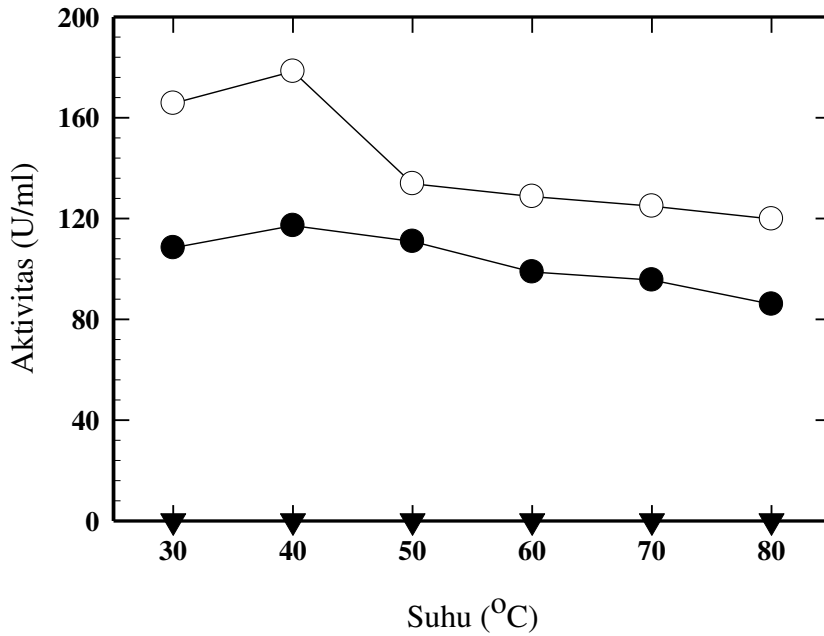
enzim amilase yang tersisipkan adalah bersifat mesofil. Aktivitas enzim dari rekombinan I pada suhu 40°C lebih tinggi dibandingkan rekombinan P, yaitu masing-masing sebesar 178.4 dan 117.2 U/ml. Hal ini berbeda dengan suhu asal amilase *Endomycopsis fibuligera* ITB.R.cc.64 yang mempunyai aktivitas tertinggi pada suhu 60°C. Perbedaan ini diduga karena perbedaan kondisi sel inangnya (Baktir, 1991). Sedangkan suhu optimum ekspresi α -amilase dari jamur *Aspergillus* sp. dan *A. fumigatus* juga pada suhu 40°C. Sedangkan α -amilase pada mikroba lainnya menunjukkan adanya variasi suhu optimumnya (Pandey *et al.*, 2000).

pH Optimum

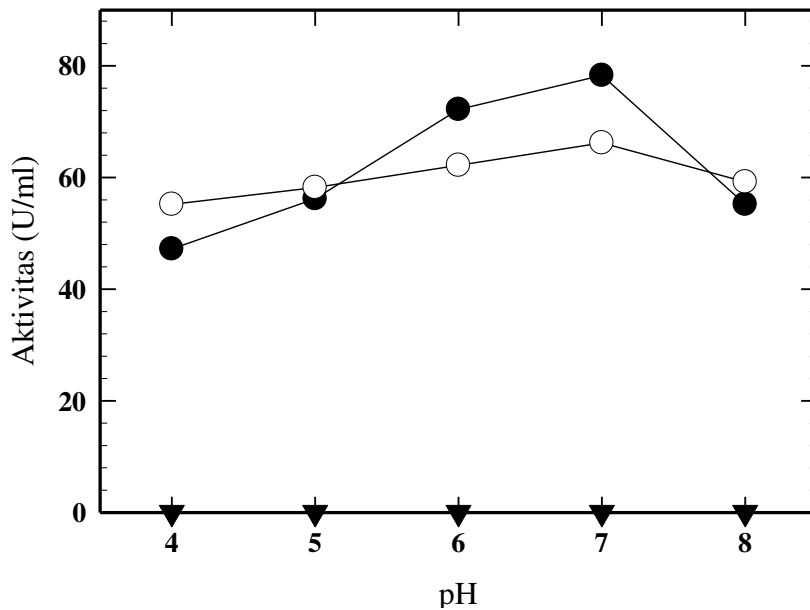
Pengujian pengaruh pH terhadap aktivitas enzim amilase menunjukkan bahwa aktivitas semakin tinggi seiring dengan meningkatnya pH (Gambar 4). Aktivitas maksimum untuk kedua rekombinan dicapai pada pH 7.0, di atas pH tersebut aktivitas menurun drastis. Hasil ini juga diperoleh oleh α -amilase dari beberapa mikroba, diantaranya *Micrococcus varians* pada golongan bakteri dan *A. flavus* dari golongan jamur



Gambar 2. Aktivitas amilase *S. cerevisiae* W303a rekombinan pada beberapa waktu inkubasi. (○) rekombinan I (●) rekombinan P, dan (▼) kontrol *S. cerevisiae* W303a



Gambar 3. Aktivitas amilase *S. cerevisiae* W303a rekombinan pada beberapa suhu inkubasi. (○) rekombinan I (●) rekombinan P, dan (▼) kontrol *S. cerevisiae* W303a



Gambar 4. Aktivitas amilase *S. cerevisiae* W303a rekombinan pada beberapa pH inkubasi. (○) rekombinan I (●) rekombinan P, dan (▼) kontrol *S. cerevisiae* W303a

yang mempunyai pH optimum 7.0 (Pandey *et al.*, 2000). Begitu pula menurut Vihinen & Manstala (1989) bahwa pH optimum amilase bervariasi dari 2-10.5, namun sebagian besar aktif dengan baik pada pH 5-8.

KESIMPULAN

S. cerevisiae W303a rekombinan (I dan P) mampu memproduksi amilase ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni saat keduanya ditumbuhkan pada media YPS dan pewarnaan iodium. Kondisi optimum produksi amilase di *S. cerevisiae* W303a rekombinan ialah pH 7.0, suhu 40°C, dan lama inkubasi selama 36 jam. Aktivitas amilase rekombinan I lebih tinggi dibandingkan rekombinan P pada masing-masing kondisi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Riset Hibah Bersaing (IX/1, 2001) atas bantuan dananya.

DAFTAR PUSTAKA

- Baktir, A. 1991. Produksi dan Amobilisasi Amilase dari *Endomycopsis Fibuligera* untuk Proses Sakarifikasi dalam Produksi Sirup Glukosa dari Pati Sago. Tesis. ITB-Bandung.
- Bernfeld, P. 1995. Amylase α & β . Di Dalam: Collowick & Kaplan (eds.). *Method in Enzymology and Related of Biochemistry 1*. New York: Academic Press.
- Godfrey, T & Reichett, J. 1985. *Industrial enzymology*. England: Macmillan Publish.

- Kruger, N.J. 1991. The Bradford Method for protein Quantitation. Dalam: Walker (ed). *The Protein Protocols Handbook*. New Jersey: Humana Press.
- Luo, J., He, M., Li, W., & T. Zhang. 1994. Expression and secretion of α -amylase and glucoamylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chin J Biotech*.
- Martin, D.W. 1981. *Harper's Review of Biochemistry*. LANGE Medical Publication, California.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., D. Singh, & R. Mohan. 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31:135-152.
- Puspaningsih, N.N.T., Hadi, S., Purkan, Ni'mahtuzahroh, & B. Irawan, 2001. Produksi Amilase (ALP1) Hasil Rekombinasi Galur Lokal di *Saccharomyces cerevisiae* untuk Produksi Etanol. [Laporan Penelitian]. Surabaya: Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.
- Puspaningsih, N.N.T., Hadi, S., Purkan, Ni'mahtuzahroh, B. Irawan, & A. Thontowi. 2002. Expression of amylase gene from *Endomycopsis fibuligera* ITB.R.cc.64 in *Saccharomycopsis cerevisiae* W303a. Dalam: Koesnandar *et al.* (Eds). *Proceedings of The 2nd Indonesian Biotechnology Conference 2001*. Yogyakarta, 23-26 Oktober 2001. 720-724.
- Randez, G.F. & P. Sanz. 1993. Expression of *Aspergillus oryzae* α -amylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Letter.* h. 112.
- Tamp, G., H. Gong, L. Zhong, & K. Yang. 1994. Expression and Secretion of Glucoamylase Gene of *Aspergillus niger* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chin J Biotech* 10.
- Vihinen, M. & P. Manstala. 1989. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. Vol. 24, issue 4. Department of Biochemistry. University of Turku. Turku.