AKTIVITAS AMILASE BAKTERI YANG DIISOLASI DARI SUMBER AIR PANAS CISEENG BOGOR

Erismar Amri¹, Nunuk Widhyastuti², I Made Artika³

¹ Program Studi Pendidikan Biologi STKIP PGRI Padang - Sumatera Barat, Email: erismar_amri@yahoo.co.id ² Laboratorium Mikrobiologi LIPI Bogor ³ Departemen Biokimia Institut Pertanian Bogor

ABSTRACT

This research was aimed at studying the activities of amylase produced by isolate bacteria which were isolated from hot water resource, Ciseeng Bogor. Four among the nine isolate bacteria grown on NA media showed the activities of amylase. The character of Amylase was analyzed in 2 isolates, A1 and A3. Isolate A1 was optimally active at pH 3, 55 C, meanwhile isolate A3 was optimally active at pH 4, 50 C. The amylase resulted from either isolate A1 or isolate A3 was acid amylase. Both of the isolates were relatively stable at pH acid, whereas the amylase resulted from A3 was not stable on pemanasan in 30 minutes, and the amylase from A1 increased after being incubated at more than 60 C in 30 minutes. In conclusion, isolate A1 identified as Bacillus Coagulans indicated the optimal activities when it was grown at pH 6 and at the 14th hour of incubation.

Key words: amylase, isolation, enzyme

PENDAHULUAN

Pada abad ke-20 ini, pengetahuan mengenai enzim sudah sangat maju. Enzim disintesis dalam sel, dapat mempercepat suatu reaksi termodinamika sedemikian rupa sehingga kecepatan reaksi dapat berjalan sesuai dengan proses biokimia yang dibutuhkan untuk mengatur kehidupan (Girindra, 1990). Enzim merupakan protein yang paling menonjol dan amat khusus yang memiliki aktivitas katalitik. Enzim memiliki tenaga katalitik yang luar biasa, yang biasanya jauh lebih besar dari katalisator sintetik. Spesifisitas enzim terhadap substratnya amat tinggi, mempercepat reaksi kimia spesifik tanpa pembentukan produk samping. Molekul ini berfungsi di dalam larutan encer pada keadaan suhu dan pH normal. Hanya sedikit katalisator non biologi yang dilengkapi dengan sifat-sifat ini (Lehninger, 1990).

Kini bidang yang menggunakan jasa enzim sebagai katalis sangat dan semakin luas, yaitu mulai dari industri pembuatan keju, sirup, bir, sari buah, gula pasir, asam amino, kertas, detergen, sampai pada terapi berbagai penyakit sebagai komponen perangkat analisis dan masih banyak lagi. Jika dibandingkan dengan katalis anorganik enzim memang memiliki beberapa keunggulan yaitu bersifat spesifik (tidak menimbulkan reaksi sampingan) serta tidak memerlukan suhu maupun tekanan tinggi atau pH ekstrim (Artika, 1993).

Enzim dihasilkan oleh makhluk hidup tetapi dalam pemanfaatannya, enzim dapat digunakan tanpa adanya sel makhluk hidup yang menghasilkannya. Ada tiga sumber utama enzim yaitu tanaman, hewan dan mikroba. Proporsi jumlah enzim yang berasal dari tanaman maupun hewan terus menurun, sebaliknya yang diperoleh dari mikroba terus meningkat. Sebagai sumber enzim, mikroba memang memiliki beberapa keunggulan, yaitu mu-rah, mudah ditumbuhkan, cepat tumbuh serta skala produksinya mudah ditingkatkan. Selain itu, enzim mikroba ada yang disekresikan keluar sel sehingga memudahkan proses isolasi dan pemurniannya (Artika, 1993).

Salah satu dari sekitar 2000 jenis enzim yang telah diketahui saat ini adalah amilase (Lehninger, 1988). Enzim yang bekerja menghidrolisis pati ini telah diketahui peranannya dalam industri makanan, tekstil, farmasi, dan detergen (Smith, 1996). Amilase dapat dihasilkan baik oleh sel hewan, tumbuhan maupun mikroba. Apalagi diketahui bahwa mikroba seperti bakteri mampu memproduksi enzim ini

Amilase yang dihasilkan bakteri, terutama α-amilase, telah banyak digunakan dalam pembuatan bir untuk menghasilkan dekstrin dengan fermentasi yang rendah dan juga untuk menjernihkan bir. Seperti halnya glukosa isomerase, enzim α-amilase (α-1,4 glukosa 4-glukanhidrolase) mempunyai arti bioteknologi penting yaitu memegang peranan penting di dalam industri gula cair sebagai katalisator pengubah pati menjadi gula sederhana (Suhartono, 1989).

Amilase yang dihasilkan oleh bakteri, terutama α-amilase banyak dimanfaatkan untuk industri gula cair seperti glukosa, maltosa, dekstrosa, alkohol, dan proses biokonversi pati menjadi monomernya. Alfa amilase umumnya digunakan pada tahap likuifikasi pati pada proses pembuatan gula cair. Proses likuifikasi berlangsung pada suhu sekitar 90°C sehingga α-amilase termostabil sangat tepat untuk proses ini (Lestari, 2001). Usaha untuk mendapatkan enzim α-amilase yang bersifat termofil dilakukan dengan mengisolasi bakteri dari tempat-tempat yang bersuhu tinggi seperti kawah gunung berapi dan sumber air panas. Penelitan ini bertujuan untuk mendapatkan amilase yang mempunyai aktifitas tinggi.

METODE PENELITIAN

Alat yang digunakan pada proses isolasi, karakterisasi dan optimasi enzim ialah: alat-alat gelas, spektrofotometer UV-Vis, sentrifuse, laminar airflow, vortex, waterbath, mikropipet (1 ml dan 5 ml), pengaduk bermagnet, kompor listrik, bunsen, autoklaf, neraca/timbangan, sudip, spatula, ose, pH meter dan stop watch.

Bahan yang dipergunakan ialah: sampel, akuades, alkohol, agar, pep-ton, yeast ekstrak, KH₂PO₄, MgSO₄.7H₂O, CaCl₂.2H₂O, Soluble starch, larut-an iod, 3,5 asam Dinitrosalisilat, NaOH 2,0 N, garam Rochella (KNa Tar-tart), buffer sitrat, buffer fosfat, buffer tris-HCl, dan es batu.

Media Nutrien Agar (NA)

Di dalam 1 liter akuades dimasukkan 3,0 g beef ekstrak, 5,0 g bacto pepton, dan 20,0 g bacto agar, kemudian dipanaskan sambil diaduk menggunakan pengaduk bermagnet. Larutan yang sudah homogen diautoklaf pada suhu 121°C, 15 atm selama 15 menit. Setelah agak dingin larutan dituang kira-kira 15 mL ke dalam cawan petri atau 5 mL ke dalam tabung reaksi kecil untuk media NA miring. Biasanya disimpan dalam suhu kamar 1-2 hari untuk melihat kemungkinan adanya kontaminasi.

Media Yeast Pepton Soluble starch (YPSs)

Sebanyak 1,0 g yeast extract, 2,5 g pepton, 1,5 g KH₂PO₄, 0,25 g MgSO₄.7H₂O, 0,05 g CaCl₂.2H₂O dan 10,0 g soluble starch dilarutkan dalam 500 ml akuades, kemudian ditambahkan 10,0 g bacto agar untuk media agar, sedangkan untuk media cair tidak ditambah agar. Larutan dipanaskan sambil diaduk menggunakan pengaduk bermagnet sampai homogen, kemudian diautoklaf. Setelah larutan dingin larutan yang berisi agar dituang kedalam cawan petri sebanyak 15 ml.

Isolasi Bakteri

Sampel air dihomogenkan lalu diencerkan dalam akuades dengan pengenceran
10, 100, dan 1000 kali. Sampel air, baik yang
tidak diencerkan maupun hasil pengenceran
dipindahkan sebanyak 0,1 ml ke dalam media
NA dalam cawan petri dan diratakan menggunakan spatula yang sudah disterilkan, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 1
hari. Koloni bakteri yang tumbuh diambil
sebanyak satu ose dan dipindahkan kedalam
media NA baru dengan metode cawan gores
agar untuk mendapatkan isolat bakteri yang
murni. Koloni tunggal yang terbentuk diambil
sebanyak satu ose dan dipindahkan kedalam
media NA miring.

Uji Aktivitas Amilase Secara Kualitatif

Sebanyak satu ose bakteri berumur 2 hari yang ditumbuhkan pada NA agar miring dipindahkan ke media YPSs agar dan dibiarkan tumbuh. Setelah satu atau dua hari inkubasi pada suhu kamar, media selektif yang telah ditumbuhi bakteri itu diuji dengan meneteskan larutan iod. Apabila bakteri mempunyai aktivitas amilase maka akan terlihat zona bening di sekitar koloni bakteri sedangkan pada bakteri yang tidak memiliki aktifitas amilase, media disekitarnya akan terlihat berwarna biru.

Produksi Amilase

Inokulum bakteri untuk produksi amilase dibuat dengan cara sebagai berikut: isolat bakteri yang telah diremajakan pada media NA miring (berumur 1-2 hari) diambil secukupnya dengan ose, dimasukkan ke dalam 10 ml akuades steril, kemudian dihomogenkan dengan vortex dan di ukur kerapatannya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm sampai mencapai Absorbansi = 0,5.

Sebanyak 2,5% (v/v) inokulum bakteri diinokulasikan ke dalam 100 ml medium YPSs cair yang mengandung sumber pati dalam erlenmeyer 250 ml. Kemudian diinkubasi pada suhu kamar dengan pengocokan (shaker) selama 2-3 hari. Setelah inkubasi selesai, disentifugasi pada kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 5 menit. Endapan sedangkan supernatan (cairan) disimpan dan dipergunakan sebagai larutan enzim (amilase). Pada endapan yang dibuang terdapat sel bakteri, sehingga sebelum dibuang sel tersebut dibunuh dulu dengan cara direbus dengan air sampai mendidih.

Pereaksi Asam Dinitrosalisilat (DNS)

Satu gram 3.5 asam Dinitrosalisilat dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml, kemudian ditambahkan akuades 50 ml, dibiarkan selama satu malam (karena sukar larut) sampai larut sama sekali. Kemudian ditambahkan 20 ml NaOH 2 N dan 30g garam Rochella dan diaduk homogen. Lalu ditera sampai tanda tera dengan akuades.

Uji Aktivitas Amilase Secara Kuantitatif

Pengujian aktivitas amilase dilakukan dengan cara sebagai berikutr 0,25 ml buffer fosfat 0,05M pH 7,0 ditambah larutan substrat (4% pati dalam buffer fosfat 0,05 M pH 7,0) sebanyak 0,25 ml, diinkubasi selama 3-5 menit pada suhu 40°C. Kemudian ditambahkan 0,5 ml iarutan enzim dan diinkubasi selama 10 menit tepat pada suhu 40°C, setelah itu ditambahkan 1 ml larutan DNS, divortex, dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit, lalu didinginkan selama 10 menit pada air mengalir. Ditambah 20 ml akuades, dihomogenkan dengan vortex dan dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Dipergunakan 2 macam blanko yaitu blanko enzim (BE) dan blanko substrat (BS) yang diberi perlakuan sama dengan cara pengujian. Pada blanko enzim, substrat diganti dengan larutan buffer. sedangkan padá blanko substrat, larutan enzim diganti dengan larutan buffer. Aktivitas amilase ditentukan dengan cara menghitung nilai absorbansi terkoreksi yaitu nilai absorbansi sampel dikurangi nilai absorbansi blanko, kemudian membandingkan nilai absorban yang didapat dengan nilai absorbansi pada kurva standar glukosa sehingga didapat nilai konsentrasi glukosa pada sampel.

Standar Glukosa

D(+)-Glukosa-Monohidrat dikeringkan dalam oven selama satu hari, kemudian didinginkan dalam eksikator. Ditimbang sebanyak 1,9817 g dan dilarutkan dalam 100 ml akuades sehingga konsentrasinya menjadi 100 mM. Larutan ini diencerkan menjadi 10 mM, lalu diambil sebanyak 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; dan 5,0 ml dan ditepatkan menjadi 5,0 ml dengan akuades. Masingmasing larutan diambil sebanyak 1 ml, ditambah 1 ml larutan DNS, dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit, didinginkan pada air mengalir selama 10 menit, ditambahkan 20 ml akuades dan diukur kerapatan optiknya pada panjang gelombang 540 nm. Kemudian dibuat kurva standar glukosa yang menghubungkan antara konsentrasi dan nilai absorbansi.

Karakterisasi Aktivitas Amilase

Untuk mengetahui pH optimum amilase, aktivitas amilase diukur pada pH yang bervariasi mulai dari pH 3,0 sampai 9,0 (selang 0.5 unit) pada suhu 40°C. Larutan buffer yang dipakai ialah buffer sitrat 0,1 M (pH 3,0-6,0), buffer fosfat 0,1 M (pH 6,0-8,0) dan buffer tris-HCl 0,1 M (pH 7,5-9,0). Penentuan suhu optimum aktivitas amilase dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim pada kisaran suhu 40-70°C dengan selang 5°C.

Uji kestabilan enzim terhadap pH dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim yang telah diinkubasi pada pH 3,0-9,0 selama 1 jam dengan cara: 2 ml buffer 0,01M ditambah 2 ml larutan enzim, didiamkan di atas penangas es selama 1 jam, larutan dipindahkan sebanyak 2 ml ke dalam 2 ml buffer 0,1M pH 3,0 (aktivitas enzim optimum pada pH ini). Kemudian diambil larutan sebanyak 0,5 ml dan diuji aktivitasnya. Selain itu juga diuji kestabilan enzim pada berbagai suhu dengan cara menginkubasi larutan enzim pada suhu 40-70°C (selang 10°C) selama 30 menit. Setelah inkubasi selesai larutan enzim dengan cepat dipindahkan pada penangas es, kemudian diuji aktivitasnya pada suhu 40°C, pH 3,0 selama 10 menit.

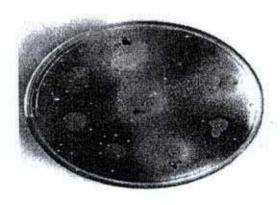
Optimasi Amilase

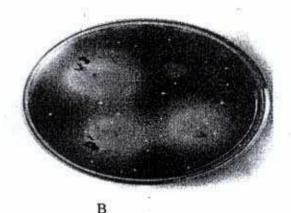
Kondisi optimal produksi amilase diuji dengan menumbuhkan bakteri pada media YPSs cair dengan pH 2,0-6,0 (dengan selang I unit), diinkubasi pada suhu kamar selama 2 hari dengan pengocokan (100 rpm), disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 5-10 menit, filtrat diambil dan diuji aktivitasnya. Sedangkan untuk menentukan waktu optimum produksi amilase dilakukan dengan cara menumbuhkan bakteri pada media YPSs cair, diinkubasi pada suhu kamar sambil dikocok. Selama inkubasi larutan diambil sebanyak 6 ml setiap 2 jam sekali selama 48 jam, disentrifugasi dan diuji aktivitasnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat Bakteri Penghasil Amilase

Sebanyak 9 isolat bakteri yang ditumbuhkan pada media NA berhasil diisolasi dari sampel air panas. Setelah dilakukan pengujian aktivitas amilase secara kualitatif terhadap isolat tersebut, diketahui 4 isolat bakteri memperlihatkan aktivitas amilase pada media agar selektif YPSs sedangkan 5 isolat yang lain tidak memperlihatkan aktivitas amilase. Aktivitas amilase ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri setelah media uji ditetesi larutan iod (Gambar 1). Zona bening disekitar koloni bakteri menunjukkan bahwa pati dalam media telah didegradasi oleh enzim (amilase) ekstraseluler yang dihasilkan oleh bakteri menjadi senyawa gula sederhana yang tidak menunjukkan reaksi warna dengan iod. Menurut Winarno (1989), larutan iod tidak memberikan warna dengan polimer karbolima hidrat yang kurang dari monosakarida, misalnya glukosa.





Gambar 1A. Uji Kualitatif terhadap bakteri: B. Pembentukan Zona Bening 9 Isolat Bakteri oleh Isolat Bakteri A1, A3 dan B1.

Media di sekitar koloni bakteri yang tidak menghasilkan amilase akan berwarna biru apabila ditetesi larutan iod. Hal ini menunjukkan bahwa pati didalam media tidak terdegradasi menjadi gula sederhana yang berarti bahwa bakteri tidak menghasilkan amilase. Menurut Winarno (1989), larutan iod akan bereaksi dengan karbohidrat yang mengandung lebih dari 20 gugus glukosa (gula kompleks atau polisakarida) dengan membentuk warna biru. Meskipun tidak menghasilkan amilase, tetapi bakteri ini masih bisa tumbuh pada media YPSs. Hal ini dimungkinkan karena terjadinya bakteri tersebut menggunakan gula sederhana yang

merupakan hasil pemecahan pati karena pemanasan selama pembuatan media YPSs.

Kemampuan suatu bakteri dalam menghasilkan amilase ditentukan oleh ada atau tidaknya gen struktural yang mengatur sintesa protein amilase didalam sel bakteri. Selain itu, ekspresi gen struktural yang mengkode pembentukan protein amilase juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Adanya glukosa dalam medium pada konsentrasi tertentu dapat menghambat pem-bentukan protein amilase.

Tabel 1. Hasil Pengujian Aktivitas Amilase secara Kualitatif

Kode isolat	Diameter koloni bakteri (mm)	Diameter zona bening (mm)	Indeks amilase	
A1	1,5	4,0		
A3	2,0	4,5	1,25	
A5	2,5	4,0	0,60	
B1	1,5	3,5 .	1.33	

Besarnya diameter zona bening dibagi dengan besarnya diameter koloni bakteri menunjukkan aktivitas amilase relatif. Hasil pengujian aktivitas amilase secara kualitatif terhadap isolat bakteri diperlihatkan pada Tabel 1. Dari hasil pengujian aktivitas secara kualitatif juga dapat diketahui bahwa isolat A1 memiliki aktivitas amilase relatif yang terbesar, yaitu 1,67.

Berdasarkan karakteristik fisiologi dan morfologinya isolat A1 diidentifikasi sebagai Bacillus coagulans. (Tabel 2). Bacillus coagulans termasuk famili Bacillaceae, tumbuh optimum pada suhu 45°C, menghidrolisis pati, memproduksi asetilmetilkarbinol. Sumber karbon tidak bisa hanya berasal dari sitrat, biasanya tidak membentuk nitrit dari nitrat, dan bersifat aerobik, fakultatif. Bakteri ini diperkirakan tersebar luas di alam.

Produksi Amilase

Inokulum yang digunakan untuk produksi amilase adalah sel bakteri dalam akuades steril yang memiliki kerapatan optik (OD) 0,5 yang diukur pada panjang gelombang 600 nm. Jumlah sel bakteri yang memiliki kerapatan optik 0,5 kurang lebih sebanyak 10⁸ sel. Sebanyak 2,5% inokulum bakteri diinokulasikan ke dalam media produksi, diinkubasi pada suhu kamar selama 2 hari dengan pengocokan. Pengocokan media selama fermentasi berfungsi untuk meningkat-

kan difusi oksigen dari udara ke dalam media karena pada kultur yang sedang tumbuh dibutuhkan oksigen terlarut yang cukup.

Pada penelitian ini, media YPSs yang mengandung pati (amilum) sebagai sumber karbon dipergunakan sebagai media produksi. makanan utama bagi pertumbuhan mikroba adalah sumber karbon, nitrogen, dan mineral, terutama fosfat. Karbon sangat diperlukan dalam fermentasi karena dapat meningkatkan energi biosintesis, sehingga dapat menghasilkan produk fermentasi yang tinggi. Pati merupakan karbohidrat kompleks (polimer) yang tidak dapat memasuki sel mikroba karena ukurannya, sehingga pati harus dihidrolisa menjadi gula sederhana terlebih dahulu agar dapat diangkut melalui membran sel dan dipergunakan sebagai sumber energi di dalam sel (Suhartono, 1989). Selain sebagai sumber karbon, pati juga berfungsi sebagai induktor untuk sekresi amilase. Mekanisme induksi amilase oleh pati masih belum jelas diketahui mengingat ukuran dari pati yang cukup besar.

Setelah fermentasi selesai, media disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 5 menit untuk memisahakan larutan enzim dari sel bakteri. Sentrifugasi dilakukan pada suhu 4°C untuk mencegah terjadinya autolisis, yaitu terdegradasinya protein enzim oleh protease yang ada dalam cairan hasil fermentasi yang dihasilkan isolat bakteri A1. Pada suhu 4°C, tidak terjadi autolisis. aktivitas protease menjadi terhambat sehingga

Tabel 2. Morfologi dan Fisiologi Bacillus coagulans Al

	37543	
V	Jenis Uji	Hasil
Pewarnaan G	ram	+
Bentuk		Batang
Katalase		×± - 2
Oksidase		N 22
Asam Glukosa		Gas +
Indola		±.
Merah Metil		
VP		+
Sitrat		+
Reduksi Nitrat		Gas +
Arabinose		₩
Manitol		¥
Xilose		<u> </u>
Gelatin		+

Ket: -: negatif, +: positif

Cairan yang diperoleh dipergunakan sebagai larutan enzim kasar dan diukur aktivitasnya. Hasil pengujian aktivitas amilase pada suhu 40°C terhadap larutan hasil fermentasi dari 4 isolat bakteri amilolitik menunjukkan bahwa larutan enzim kasar dari 3 isolat (A1, A3 dan B1) memiliki aktivitas amilase yang besarnya berturut-turut adalah 93,224; 90,122; dan 55,509 Unit/ml. Pengujian aktivitas amilase juga dilakukan pada suhu 60°C untuk mengetahui amilase dari isolat bakteri yang relatif tahan terhadap suhu panas.

Hasil pengujian aktivitas amilase pada suhu 40°C dan 60°C diperlihatkan pada Tabel 3. Meskipun larutan enzim dari semua isolat masih menunjukkan aktivitas amilase pada suhu 60°C akan tetapi penurunan aktiv-itas amilase yang tajam terjadi pada larutan enzim yang dihasilkan oleh isolat B1. Sedangkan larutan enzim dari isolat A1 dan A3 memiliki aktivitas yang relatif masih cukup tinggi pada suhu suhu 60°C yaitu masing-masing 110,591 U/ml dan 79,889 U/ml.

Tabel 3. Aktivitas Amilase secara Kuantitatif

Isolat	Sisa Pati *		Aktivitas Amilase (Unit/ml)	Aktivitas Amilase
	1 hari	2 hari	pada suhu 40°C	(Unit/ml) pada suhu 60°C
A1	++	2/	93,224	110,591
A3	+++	+	90,122	79,889
A5	++++	++++	0,000	7,008
B1	++		55,509	12,902

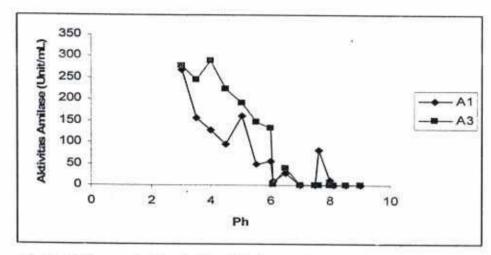
Ket: * ++++ : biru, +++ : biru keunguan, ++ : coklat, + : coklat muda, - : kuning

Dari tabel 3 tersebut juga dapat diketahui bahwa pada hari kedua inkubasi pati pada media telah terhidrolisis seluruhnya oleh amilase yang dihasilkan isolat A1 dan B1.

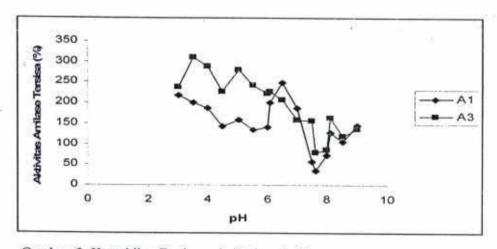
Karakterisasi Amilase

Karakter enzim yang diukur adalah pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas dan bahwa amilase yang dihasilkan oleh isolat A1 mencapai aktivitas optimum pada pH 3,0, sedangkan isolat A3 pada pH 4,0. Di atas pH tersebut, aktivitas amilase mengalami penurunan dan pada pH 6,0 larutan enzim ke-

hilangan aktivitasnya. Berdasarkan hasil tersebut dapat dikatakan bahwa amilase yang dihasilkan baik oleh isolat bakteri A1 maupun A3 merupakan amilase asam.



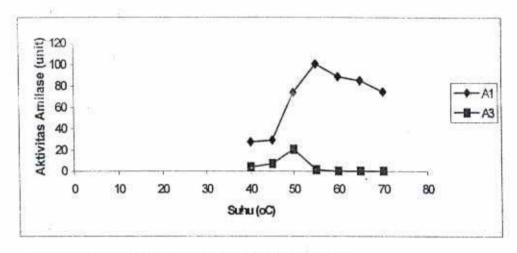
Gambar 2. Pengaruh pH terhadap Aktivitas Amilase



Gambar 3. Kestabilan Enzim pada Berbagai pH

Dari gambar 3 dapat diketahui bahwa larutan enzim yang diinkubasikan pada berbagai pH selama 30 menit relatif stabil pada pH 3,0-6,0. Menurut Palmer (1981), menurunnya aktivitas enzim karena perubahan pH yang tidak terlalu besar (masih disekitar pH optimalnya) disebabkan oleh berubahnya keadaan ion enzim dan seringkali juga keadaan ion substrat. Perubahan kondisi ion enzim dapat terjadi pada residu asam amino yang berfungsi katalitik mengikat substrat

maupun pada residu asam amino yang berfungsi untuk mempertahankan struktur tersier dan kwartener enzim yang aktif. Aktivitas enzim yang mengalami penurunan tersebut dapat dipulihkan kembali dengan merubah kondisi reaksi enzimatis pada pH optimalnya. Pada pH tertentu perubahan muatan ion pada rantai samping yang dapat terionisasi dari residu asam amino enzim menjadi terlalu besar sehingga mengakibatkan terjadinya denaturasi enzim yang disertai dengan hilangnya aktivitas katalitik enzim. Disamping itu, perubahan struktur tersier menyebabkan kelompok hidrofobik (yang pada mulanya tersembunyi dibagian dalam molekul enzim) kontak dengan air sehingga solubilitas enzim menjadi berkurang. Berkurangnya solubilitas enzim dapat mengakibatkan turunnya aktivitas enzim secara bertahap.

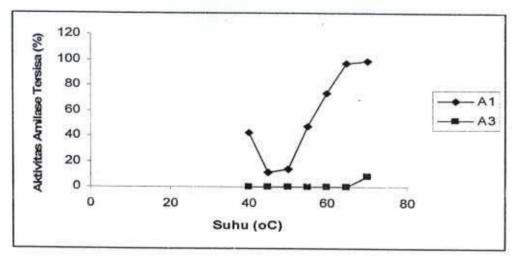


Gambar 4. Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Amilase

Pengaruh suhu terhadap aktivitas dan stabilitas amilase ditunjukkan pada Gambar 4 dan 5. Aktivitas amilase mengalami peningkatan seiring dengan meningkatnya suhu reaksi dan mencapai optimal pada suhu 50°C untuk amilase yang dihasilkan oleh isolat A3 dan pada suhu 55°C untuk amilase dari isolat A1. Di atas suhu tersebut aktivitas amilase mengalami penurunan. Dari hasil pengujian stabilitas amilase terhadap suhu diketahui bahwa amilase yang dihasilkan oleh isolat A3 tidak stabil jika dipanaskan selama 30 menit pada berbagai suhu uji (40-70°C). Hasil yang menarik ditunjukkan oleh amilase dari isolat A1. Aktivitas amilase meningkat setelah dipanaskan selama 30 menit pada suhu di atas 60°C (Gambar 4).

Menurut Harper et al. (1984), peningkatan aktivitas enzim di bawah suhu optimum disebabkan oleh meningkatnya energi kinetika dari molekul-molekul yang bereaksi (meningkatnya frekuensi tumbukan) karena pengaruh kenaikan suhu reaksi. Sedangkan menurunnya aktivitas enzim di atas suhu optimal disebabkan oleh terputusnya ikatan-ikatan sekunder enzim karena besarnya energi kinctika dari molekul-molekul enzim melampaui penghalang energi yang mempertahankan ikatan tersebut.

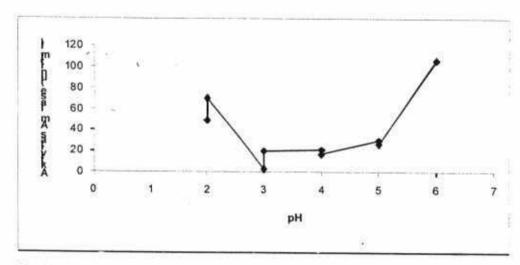
Putusnya ikatan sekunder vang struktur mempertahankan enzim dalam keadaan katalitik aktif ini mengakibatkan hilangnya struktur sekunder dan tersier dari enzim yang disertai dengan berkurangnya atau hilangnya aktivitas enzimatisnya. Di samping itu pada suhu yang tinggi substrat juga dapat mengalami perubahan konformasi sehingga tidak dapat lagi, atau mengalami hambatan dalam memasuki sisi aktif enzim (Suhartono, 1989).



Gambar 5. Kestabilan Enzim pada Berbagai Suhu

Optimasi Amilase

Nilai pH awal media adalah salah satu faktor yang penting untuk pertumbuhan dan pembentukan produk. Oleh karena itu perlu dilakukan uji aktivitas amilase yang dihasilkan oleh bakteri yang ditumbuhkan pada pH media yang berbeda untuk mendapatkan enzim amilase yang mempunyai aktivitas maksimum. Pada Gambar 6 terlihat bahwa aktivitas amilase tertinggi dihasilkan oleh bakteri yang ditumbuhkan pada pH 6,0.

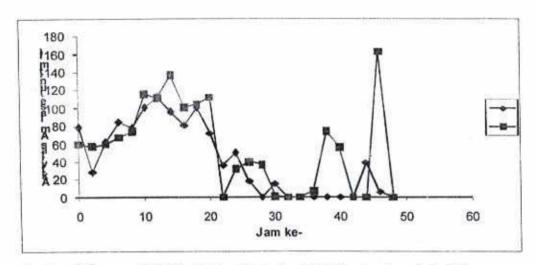


Gambar 6. Pengaruh pH Awal Media terhadap Aktivitas Amilase Isolat A1

Selain pH awal media, waktu inkubasi juga mempengaruhi produksi amilase. Dari gambar dapat dilihat bahwa aktivitas amilase semakin meningkat pada awal fermentasi sampai sekitar 14-16 jam inkubasi, kemudian aktivitas amilase mengalami penurunan secara bertahap sampai kurang lebih 20 jam inkubasi. Setelah itu aktivitas amilase mengalami fluktuasi meningkat dan menurun. Seperti telah diketahui bahwa sintesa amilase oleh

mikroba dipengaruhi oleh represi katabolik, yaitu tersedianya gula sederhana (yang lebih mudah digunakan) pada konsentrasi yang tinggi dalam media akan menghambat terbentuknya amilase. Filtrat enzim yang dianalisa mengandung glukosa dengan konsentrasi yang cukup tinggi sehingga penurunan aktivitas amilase mungkin disebabkan oleh adanya glukosa dalam media. Apabila gula

sederhana tersebut berkurang dari media maka amilase akan disintesa kembali oleh bakteri.



Gambar 7. Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Aktivitas Amilase Isolat Al

KESIMPULAN

Sebanyak 9 isolat bakteri berhasil diisolasi dari sumber air Ciseeng, Bogor. Sebanyak 4 isolat bakteri menunjukkan adanya aktivitas amilase. Pada pengujian aktivitas amilase secara kualitatif diperoleh isolat A1 yang memiliki aktivitas amilase tertinggi dengan nilai indeks amilase 1,67.

Pengujian aktivitas amilase dilakukan pada 4 isolat bakteri. Isolat yang menunjukkan aktivitas amilase yang tinggi dihasilkan oleh isolat A1 yaitu sebesar 93,224 Unit/ml pada suhu 40°C dan 110,591 Unit/ml pada suhu 60°C serta isolat A3 yaitu sebesar 90,122 unit/ml pada suhu 40°C dan 79,889 unit/ml pada suhu 60°C. Karakter amilase diamati pada 2 isolat yaitu isolat A1 dan A3. Isolat A1 mempunyai aktivitas optimum pada pH 3, suhu 55°C dan isolat A3 mem-punyai aktivitas optimum pada pH 4, suhu 50°C. Amilase yang dihasilkan baik oleh isolat A1 maupun isolat A3 adalah amilase asam. Amilase yang dihasilkan oleh isolat A1 dan A3 relatif stabil terhadap pH asam akan tetapi amilase yang dihasilkan oleh isolat A3 tidak stabil terhadap pemanasan selama 30 menit sedangkan amilase yang dihasilkan oleh isolat A1 mengalami peningkatan setelah diinkubasi pada suhu diatas 60°C selama 30 menit.

Produksi amilase dipengaruhi oleh pH awal media dan waktu inkubasi. Isolat Al yang diidentifikasi sebagai Bacillus coaguians menunjukkan aktivitas optimum pada saat ditumbuhkan pada pH 6 dan pada jam ke 14 inkubasi.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

Artika IM. 1 Juli 1993. Menjadikan Mikroba Sebagai Pabrik Enzim. Kompas Kolom (1-6).

Bernfield P. 1955. Amilase α and β. Dalam Colowick, S.P. and N.D. Kaplan (eds). New York: Methode in Enzimology and Related of Biochemistry. Academic Press.

Breed RS, Murray EGD, Hitchens AP. 1948.

Bergey's Manual of determinative

Bacteriology. The Williams & Wlkins

Company.

Cruerger W, Cruerger A. 1984. Biotechnolgy:

A text Book of Industrial Microbiology.
USA: Sience tech.

Girindra A. 1990. Biokimia 1. Jakarta: Gramedia.

Harper HA, Rodwel VW, Mayer PA. 1984.
Review of Physiological Chemistry.
Lange Medical Publication, California USA.

Lehninger AL. 1995. Dasar-dasar Biokimia. Terjemahan Meggy Thenawijaya. Jakarta: Erlangga.

- Lestari P, Darwis AA, Syamsu K, Richana N Damardjati DS. 2001. Analisis Gula Reduksi Hasil Hidrolisis Enzimatik pati Ubi Kayu oleh α-amilase Termostabil dari Bacillus stearothermophilus TII12. Jurnal Mikrobiologi Indonesia.
- Nuraida FR. 2001. Isolasi dan Seleksi Bakteri Amilolitik. Laporan Kerja Praktik. Jurusan Biologi FMIPA. Bandung: Universitas Padjadjaran.
- Palmer T. 1981. Understanding Enzymes. Ellis Horwood. Ltd, England.
- Pelczar MJ, Chan ECS. 1988. Dasar-dasar Mikrobiologi. Terjemahan Ratna Siri, dkk. Jakarta: UI Press.
- Suhartono MT. 1989. Enzim dan Bioteknologi. Bogor: PAU. Bioteknologi.
- Tauber H. 1950. Chemistry and Technology of Enzyme. New York: John wiley and Sons.