

PENGARUH CARA PENAMBAHAN ENZIM GLUKOAMILASE DAN ION LOGAM ALKALI DAN ALKALI TANAH PADA PROSES SAKARIFIKASI PATI SAGU

A.T. Karossi*, Agus Muchliawan**, Linar Z.Udin* dan A. Sidik**

* Laboratorium Biokimia, Balitbang Kimia Dasar, Puslitbang Kimia Terapan - LIPI Bandung.

** Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, FMIPA-UNPAD, Bandung

INTISARI

Pembuatan sirup glukosa dapat dilakukan dengan menggunakan enzim alfa-amilase dan enzim glukoamilase. Alfa-amilase berperan pada tahap likuifaksi, sedangkan glukoamilase pada tahap sakarifikasi. Glukoamilase yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari *Rhizopus oryzae* melalui fermentasi selama lima hari dengan menggunakan fermentor LKB skala empat liter. Penambahan enzim glukoamilase secara langsung dan bertahap, tidak memberikan perbedaan yang bermakna terhadap proses sakarifikasi. Ion-ion Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} dan Ba^{++} pada konsentrasi 0,2 - 0,8 mM, bertindak sebagai aktivator bagi enzim glukoamilase, sedangkan pada konsentrasi 1 mM ion-ion logam tersebut bersifat sebagai inhibitor. Dari hasil analisis dengan HPLC terbukti bahwa enzim glukoamilase menghasilkan glukosa pada proses sakarifikasi hingga derajat hidrolisis 83,3%.

ABSTRACT

Production of glucose syrup enzymatically employs both alpha-amylase and glucoamylase. Alpha amylase acts during liquifaction while glucoamylase in the saccharification process. In the present study the glucoamylase was obtained from *Rhizopus oryzae* fermentation for five days using 4 liter scale LKB fermentor. The influence of single stage and multiple stage additions of glucoamylase on alpha amylase liquified sago starch indicated no significant difference on the saccharification. The presence of 0.2 - 0.8 mM Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} and Ba^{++} salts enhanced the glucoamylase activity whereas at the level of 1 mM they acted as inhibitors. The results of HPLC analysis of the saccharification product showed that the glucoamylase hydrolysed 83.3% of the sago starch yielding free glucose.

PENDAHULUAN

Dalam pembuatan sirup glukosa dibutuhkan dua jenis enzim, yaitu alfa-amilase dan glukoamilase. Alfa-amilase (alfa-1, 4-glukan-4-glukohidrolase, EC 3.2.1.1.) adalah endo-enzim yang memecah ikatan alfa-(1,4) secara acak (1), sedangkan glukoamilase atau amilo-glukosidase (alfa-1,4-glukan glukohidrolase, EC 3.2.1.3.), merupakan ekso-

enzim yang dapat memecah ikatan alfa-1,4 dari ujung rantai non pereduksi dan juga ikatan alfa-1,6 (2).

Sagu sebagai substrat, merupakan polisakarida dengan fraksi amilopektin sekitar 73 % dan amilosa sebanyak 27% (3), dengan demikian sagu memiliki fraksi amilosa yang lebih besar atau amilopektin yang lebih sedikit, dibandingkan dengan beras, kentang, tapioka, gandum, maupun ubi jalar (4).

Penelitian mengenai proses likuifaksi dan sakarifikasi dengan menggunakan enzim alfa-amilase dan glukoamilase untuk substrat sagu, serta pengaruh logam terhadap aktivitas enzim glukoamilase belum banyak dilaporkan (3). Pada tulisan ini dilaporkan pengaruh cara penambahan enzim glukoamilase terhadap sakarifikasi pada substrat sagu dan pengaruh ion-ion logam Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} dan Ba^{++} pada aktivitas enzim glukoamilase.

MATERI DAN METODA

Rhizopus oryzae berasal dari koleksi mikroorganisme, Puslitbang Kimia Terapan-LIPI. Pati sagu dari jenis metoxylyon dan alfa-amilase dari Wako Pure Chemical Industries.

Produksi Glukoamilase

Produksi enzim dilakukan dengan menggunakan fermentor kapasitas 4 Liter dalam media yang mengandung pati sagu 2%, bungkil kedele 0,7% (kandungan nitrogen dalam media 0,05%) dan mineral, yang diinokulasikan dengan suspensi biakan murni *R. oryzae* yang berumur 7 hari. Proses fermentasi dilakukan pada suhu $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ dengan aerasi 3 L/menit dan agitasi 500 rpm.

Kaldu fermentasi disentrifuga pada 8000 rpm (2°C) selama 20 menit. Supernatan yang diperoleh digunakan sebagai enzim kasar (5). Aktivitas enzim ditentukan dengan menggunakan metoda yang telah dilaporkan oleh Karossi *et al* (6). Unit aktivitas ditentukan dengan menggunakan glukoamilase standar (SIGMA) sebagai pembanding. Kadar protein enzim ditentukan dengan metoda Lowry (7) dan menggunakan Bovine Serum Albumin sebagai standar protein.

Konstanta Michaelis (K_m)

Penentuan harga K_m dilakukan sama seperti pada penentuan aktivitas enzim. Pada penentuan ini konsentrasi soluble starch bervariasi. Harga K_m diperoleh dari kurva Lineweaver-Burk (8).

Hidrolisis total sagu

Hidrolisis total sagu dilakukan dengan merefluks sagu dalam 25 mL HCl 1 N dan air suling 100 mL, selama 32 jam. Kemudian larutan dinetralkan dengan 125 mL NaOH 0,2 N, dan diencerkan sampai 250 mL dengan air suling. Gula yang dihasilkan dianalisa dengan metoda Nelson-Somogyi (9). Dari hasil hidrolisis total ini diperoleh 989,91 mg glukosa dari 1000 mg sagu.

Likuifaksi

Likuifaksi pati sagu dilakukan pada pH 7 dan temperatur 95°C dengan menggunakan enzim alfa-amilase standar dari Wako, dengan aktivitas sebesar 20 U/mL selama 2 jam (10). Konsentrasi substrat pati sagu yang digunakan adalah 12,5% (berat/volume). Likuifaksi dilakukan dengan menggunakan variasi volume enzim (1-6 mL) alfa-amilase, kemudian gula pereduksi yang dihasilkan ditentukan dengan metoda Nelson-Somogyi.

Sakarifikasi

Sakarifikasi dilakukan pada temperatur 55°C dan pH 4,5 selama 20 jam dengan menggunakan enzim yang diperoleh dari hasil fermentasi 5 hari (Aktivitas 2,53 U/mL). Sakarifikasi berlangsung menggunakan pengocok 130 guncangan/menit dengan penangas air. Gula yang dihasilkan ditentukan dengan metoda Nelson-Somogyi, dan dengan HPLC (9).

Proses sakarifikasi berlangsung selama 6 jam dengan memvariasikan volume enzim (0-5 mL) dan gula yang dihasilkan ditentukan dengan metoda Nelson-Somogyi.

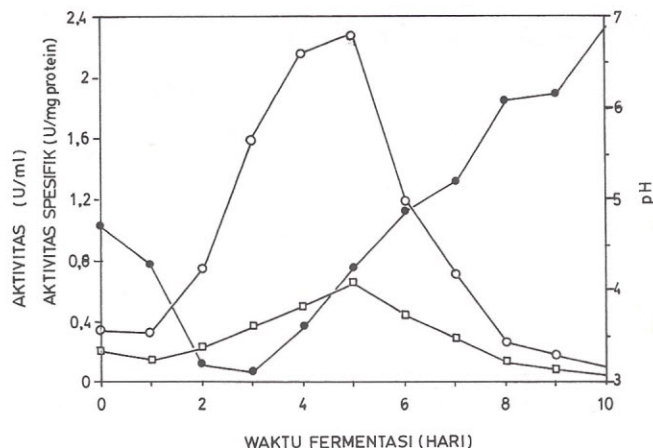
Cara penambahan enzim glukoamilase

Proses sakarifikasi dilakukan dengan menambahkan enzim secara langsung (5 mL, 2,53 U/mL) dan bertahap setiap tiga jam (masing-masing 1 mL). Selang 2 jam selama 20 jam sakarifikasi, jumlah gula yang dihasilkan diukur dengan metoda Nelson-Somogyi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

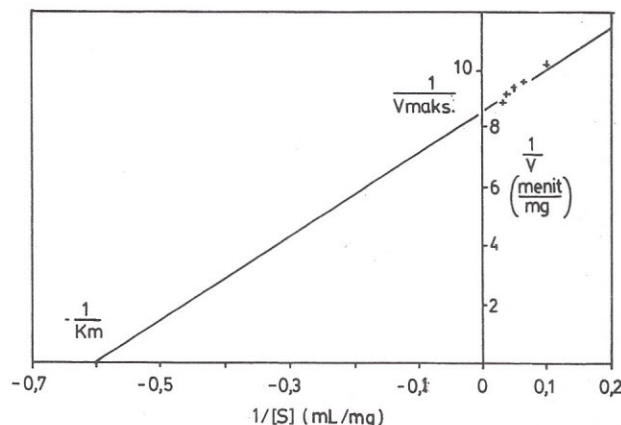
Fermentasi glukoamilase

Pada fermentasi yang dilakukan selama 10 hari dengan pengambilan contoh setiap 24 jam, pH terlihat menurun sampai hari ketiga (Gambar 1) mencapai pH 3,6 dan kemudian terjadi peningkatan yang dimulai pada hari keempat. Produksi enzim dengan aktivitas tertinggi terjadi pada hari kelima sebesar 0,654 U/mL atau aktivitas spesifik 2,29 U/mg protein, dan pH media mencapai pH 4,25.



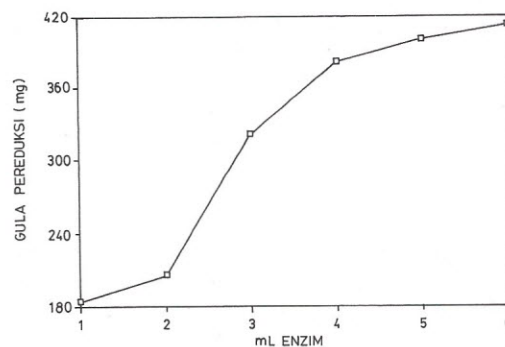
Gambar 1. Perubahan pH (●), aktivitas (□) dan aktivitas spesifik enzim (○) selama 10 hari fermentasi.

Harga K_m enzim kasar glukoamilase hasil fermentasi, yang digunakan dalam proses sakarifikasi pada penelitian ini (aktivitas 2,53 U/mL) ditentukan pada pH 4,5 dengan menggunakan soluble starch sebagai substrat. Hasil yang diperlihatkan dalam Gambar 2, menunjukkan harga K_m enzim 1,6526 mg/mL.



Gambar 2. Penentuan harga K_m .

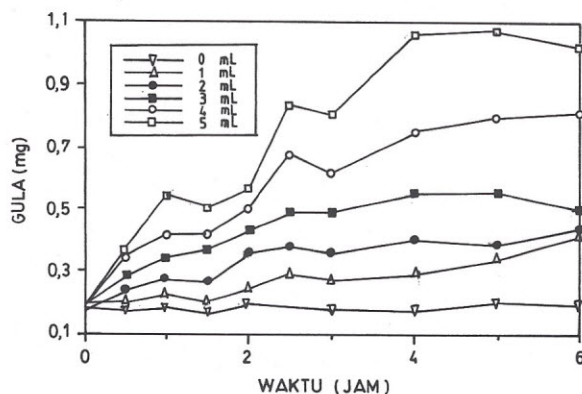
Sebelum tahap sakarifikasi menggunakan enzim glukoamilase, tahap yang dilakukan terlebih dahulu adalah likuifaksi dengan enzim alfa-amilase. Dari variasi volume enzim alfa-amilase yang digunakan (Gambar 3) terlihat bahwa mulai volume enzim 4 mL (1 mL = 20 Unit), jumlah gula pereduksi yang dihasilkan hampir sama.



Gambar 3. Pengaruh volume enzim alfa-amilase pada proses likuifaksi.

Dengan demikian jika ditinjau dari efisiensi penggunaan enzim alfa-amilase untuk likuifaksi selama 2 jam, dapat kita gunakan enzim sebanyak 4 mL. Waktu likuifaksi yang digunakan di sini sesuai dengan penelitian Lee *et al.*(10).

Likuifaksi sangat menentukan hasil sakarifikasi, dengan kata lain derajat likuifaksi berhubungan langsung dengan jumlah pati yang dikonversi menjadi glukosa selama proses sakarifikasi (11). Hal ini dapat dimengerti karena proses likuifaksi menyediakan substrat bagi proses sakarifikasi. Glukoamilase sebagai enzim yang mampu memecah ikatan alfa-1,6-glikosida (rantai cabang) tentu lebih menyukai substrat dengan bentuk yang lebih sederhana, misalnya jumlah rantai cabang yang lebih sedikit sehingga reaksi hidrolisis dapat berlangsung lebih cepat. Fujii *et al.* (12, 13) mendapatkan bahwa aktivitas enzim alfa-amilase mempengaruhi jumlah gula yang dihasilkan pada proses sakarifikasi. Dengan bertambahnya konsentrasi enzim alfa-amilase, maka kecepatan awal sakarifikasi meningkat.

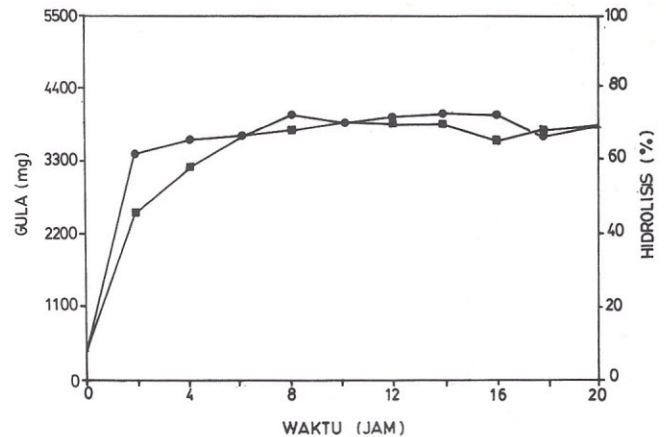


Gambar 4. Pengaruh variasi volume enzim glukoamilase pada proses sakarifikasi.

Pengaruh dari variasi volume enzim glukoamilase pada proses sakarifikasi dipelajari dengan menggunakan volume enzim 0 s/d 5 mL; 2,53 U/mL (Gambar 4). Dari Gambar 4 dapat kita lihat bahwa dengan bertambahnya volume enzim, kecepatan awal sakarifikasi meningkat pula. Hasil ini sesuai dengan yang dilakukan Lee *et al.*(10) dalam penelitian sakarifikasi pada pati kentang. Dari gambar di atas terlihat bahwa tanpa penambahan enzim dapat dikatakan bahwa jumlah gula yang dihasilkan tidak bertambah. Hal ini selain menunjukkan tidak ada aktivitas enzim alfa-amilase pada kondisi reaksi glukoamilase, juga meyakinkan kita bahwa gula yang dihasilkan bukan disebabkan kondisi asam pada reaksi enzimatis (pH 4,5), tetapi memang akibat adanya aktivitas enzim glukoamilase. Dari hasil ini maka untuk sakarifikasi selanjutnya enzim yang digunakan adalah 0,5 mL untuk 5 mL substrat.

Pengaruh cara penambahan enzim

Pada sakarifikasi digunakan enzim glukoamilase sebanyak 5 mL (11,65 Unit), dan diamati bagaimana pengaruh penambahan enzim secara langsung, dan bertahap dengan penambahan 1 mL setiap tiga jam, sebanyak 5 tahap.



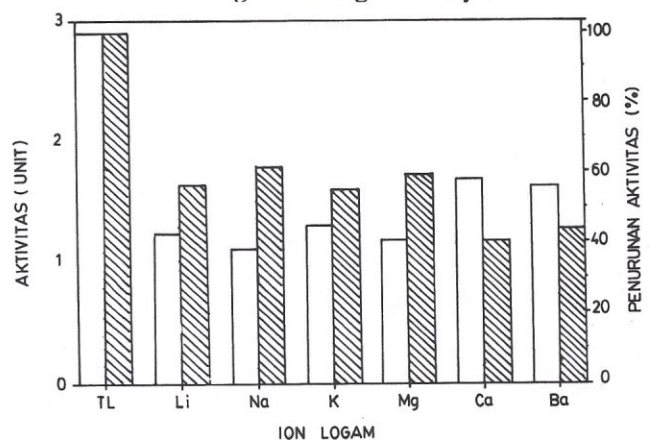
Gambar 5. Pengaruh cara penambahan enzim terhadap sakarifikasi digambarkan sebagai jumlah glukosa bebas yang terbentuk atau derajat hidrolisis
● Penambahan langsung ■ Penambahan bertahap

Hasil dari percobaan ini (Gambar 5), menunjukkan bahwa pada penambahan enzim secara langsung diperoleh kecepatan awal yang lebih tinggi. Penambahan enzim secara bertahap mampu menghidrolisis sagu hingga sekitar 70% pada jam ke-8 sedangkan pada penambahan enzim secara langsung baru dicapai pada jam ke-16. Namun setelah dilakukan uji statistik (t test) dimulai jam keenam sampai jam kedua puluh, ternyata kedua perlakuan ini tidak memberikan perbedaan yang berarti terhadap derajat hidrolisis pada tingkat kepercayaan 95%.

Pengaruh ion logam terhadap aktivitas glukoamilase

Ion-ion logam yang dipelajari pengaruhnya adalah Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} dan Ba^{++} . Pada penelitian ini diamati pengaruh variasi konsentrasi ion-ion logam tersebut terhadap aktivitas enzim glukoamilase.

Pada Gambar 6 dapat kita lihat bahwa pada konsentrasi 1 mM ion-ion tersebut bersifat inhibitor. Ion logam Na^+ menurunkan aktivitas hingga sekitar 60 %, sedangkan Ca^{++} merupakan inhibitor yang paling lemah, menurunkan aktivitas 40% dibandingkan ion logam lainnya.



Gambar 6. Pengaruh logam Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} dan Ba^{++} pada aktivitas glukoamilase.

□ Aktivitas (Unit) ▨ Penurunan aktivitas (%)
TL= Tanpa ion logam

Pada konsentrasi yang lebih rendah yaitu 0,2 mM sampai 0,8 mM, ion Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} dan Ba^{++} ternyata bersifat aktivator bagi enzim glukoamilase, dan untuk semua ion logam pada konsentrasi 0,2 mM memberikan sifat aktivator yang paling tinggi. Ion Ca^{++} ternyata paling besar pengaruhnya pada peningkatan aktivitas enzim glukoamilase (Tabel 2).

Tabel 2. Aktivasi glukoamilase oleh ion logam alkali dan alkali tanah

Konsentrasi	Aktivitas Enzim (Unit/mL)						
(mM)	Tl.	Li^+	Na^+	K^+	Mg^{++}	Ca^{++}	Ba^{++}
	2,431						
0,8		2,962	3,667	3,494	3,320	3,706	3,426
0,4		2,885	3,619	3,368	3,300	3,484	3,204
0,2		2,730	3,474	3,320	3,165	3,001	3,011

Keterangan:

Tl. Tanpa menggunakan ion logam.

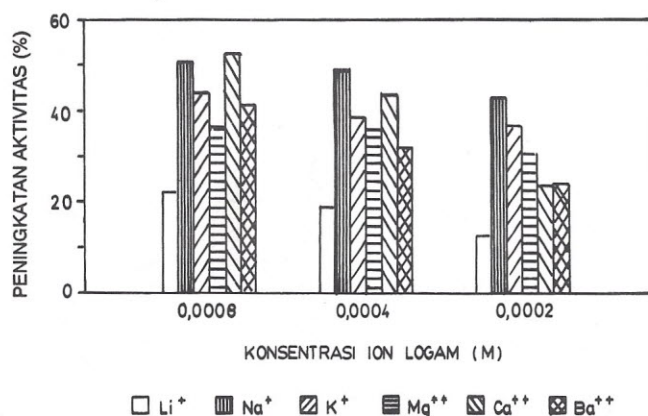
Logam-logam diatas dalam bentuk kation dan anionnya berturut-turut OH^- , Cl^- , Cl^- , Cl^- , Cl^- , OH^-

Penggunaan ion logam Ca^{++} dalam sakarifikasi

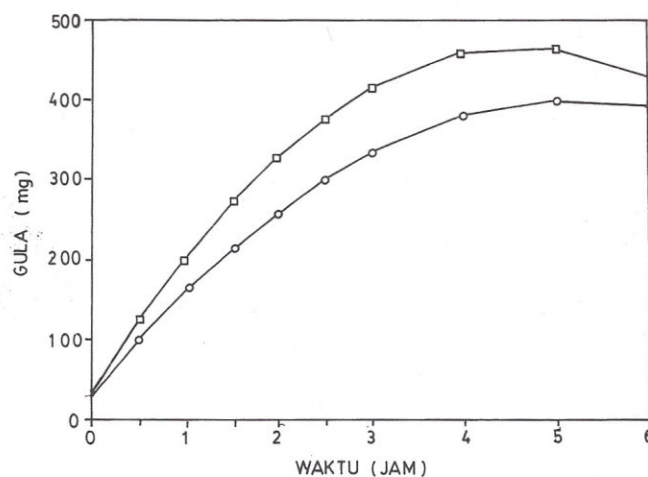
Dari pengamatan mengenai pengaruh ion logam Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} dan Ba^{++} , diperoleh bahwa ion logam Ca^{++} menunjukkan sifat aktivator yang paling besar pada konsentrasi 0,2 mM. Hasil ini dicoba untuk diterapkan pada proses sakarifikasi, namun dengan konsentrasi ion Ca^{++} 0,8 mM. Hal ini untuk melihat aktivasi minimal yang dapat diperoleh dengan penambahan ion Ca^{++} . Aktivasi ini meningkat dengan turunnya konsentrasi ion Ca^{++} .

Dengan menggunakan kondisi yang sama seperti proses sakarifikasi sebelumnya, yaitu melalui likuifaksi menggunakan alfa-amilase selama 2 jam, maka selanjutnya sebelum dilangsungkan proses sakarifikasi, ditambahkan ion logam Ca^{++} ke dalam substrat sehingga konsentrasi Ca^{++} di dalamnya adalah 0,8 mM.

Dari hasil yang diperoleh (Gambar 8), ternyata bahwa adanya ion Ca^{++} meningkatkan kecepatan awal reaksi sakarifikasi.



Gambar 7. Peningkatan aktivitas enzim glukoamilase dengan adanya ion-ion logam Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} dan Ba^{++} pada konsentrasi 0,2 - 0,8 mM

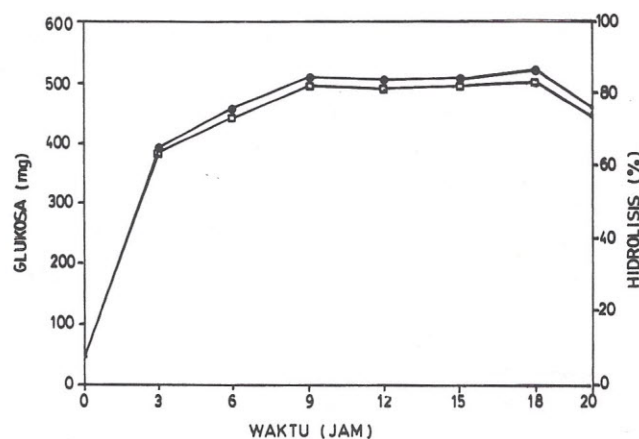


Gambar 8. Pengaruh ion logam Ca^{++} pada sakarifikasi

□ Penambahan ion Ca^{++}
○ Tanpa ion Ca^{++}

Analisa hasil sakarifikasi dengan HPLC

Untuk memastikan bahwa dalam proses sakarifikasi dengan menggunakan enzim glukoamilase hasil fermentasi yang dihasilkannya adalah glukosa, maka dilakukan analisa dengan menggunakan HPLC. Analisa dilakukan dengan membandingkan waktu retensi glukosa pada standar dan sekaligus membandingkan luas puncak spektrum, untuk mengetahui jumlah glukosa secara kuantitatif.



Gambar 9. Proses sakarifikasi yang dipantau dengan metoda HPLC.

● Hidrolisis (%)
□ Jumlah glukosa yang dibebaskan

Pada analisis dengan HPLC ini, sakarifikasi dilakukan dengan menambahkan enzim secara bertahap seperti pada percobaan sebelumnya. Dari hasil analisa dengan HPLC ini dapat kita lihat (Gambar 9) bahwa proses sakarifikasi dengan menggunakan enzim glukoamilase mampu menghidrolisis 83,3% sagu menjadi glukosa.

REFERENCES

1. A.L. Stuijts, *New Fabrication Methods for Advanced Electronic Materials Science of Ceramics*, 5, pp. 335 (1970).
2. J.V. Biggers and S. Venkataramani, Preparation and Reactivity of Lead Zirconate Titanate Solid Solutions Produced by Precipitation from Aqueous Solutions, *Mat. Res. Bull.*, 13, 717-722, (1978).
3. S.H. Cho and J.V. Biggers, Characterization and Sintering of Lead Zirconate Titanate Powders. *J. Am. Ceram. Soc.* 66 (10), 743 (1983).
4. K.S. Mazdhyasni, R.T. Dolloff and J.S. Smith, Preparation of High Purity Submicron Barium Titanate Powders. *J. Am. Ceram. Soc.* 52(10), 523(1969).
5. E. Wu, K.C. Chen. and J.D Mackenzie, *Ferroelectric Ceramics The Sol Gel Method Versus Conventional Processing*, *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* Vol.32, pp 169 (1984).
6. B. Jaffe, W.R. Cook and H. Jaffe, *Piezoelectric Ceramics*, (Academic Press, London, 1971)
7. K. Kakegawa, J. Mohri, K. Takahashi, H. Yamamura and S. Shirashaki, A compositional Fluctuation and Properties of $Pb(Zr,Ti)O_3$, *Solid State Commun.* 24, 769-772 (1977).
8. B.V. Hiremath, A.I. Kingon and J.V. Biggers, Reaction Sequence in the Formation of Lead Zirconate-Lead Titanate Solid Solution : Role of Raw Materials. *J. Am. Ceram. Soc.*, 66, 790-793 (1983).
9. Chi Kong Kwok and Seshu B. Desu, Low temperature perovskite formation of lead zirconate titanate thin films by a seeding process. *J. Mater. Res.* 8(2) 339-344 (1993).
10. O. Yamaguchi, F. Fukuoka and Y. Kawakami, Formation of alkoxy-derived $PbZrO_3$. *J. Mater. Sci. Lett.*, 9, 958-959 (1990).
11. M. Kosec, D. Kolar, *Ceramic Powder*, edited by P. Vincenzini, Elsevier, Scientific Publishing Company, Amsterdam Printed in The Netherlands, pp 421-427 (1983).
12. R. Anthony West. *Solid State Chemistry and Its Applications*. (John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 1984).
13. Shu. Winlock, "Preparation of $PbTiO_3$ and PZT Powders by Hydrolysis of Metal Alkoxides", (Master's Thesis, Fac. of Sci. and Techn. Keio University, Japan 1995).
14. B. Jaffe, R.S. Roth, and S. Marzullo, Properties of piezoelectric ceramics in the solid-solution series lead titanate-lead zirconate-lead oxide : tin oxide and lead titanate-lead hafnate. *J. Res. Nat. Bur. Stand.*, 55(5) 239-254 (1955).
15. Yukata Ohya, Toshimasa Tanaka and Yasutaka Takahashi, Dielectric properties of lead zirconate titanate thin films fabricated on In O : Sn substrate by sol-gel method., *Jpn. J. Appl. Phys.*, 32, 4163-4167 (1993).
16. H. Hirashima, E. Onishi and M. Nakagawa, Preparation of PZT Powders From Metal Alkoxides. *J. Non-Crystalline Solids*, 121, 404-406 (1990).
17. R.A. Lipeles, N.A. Ives, and M.S. Leung, *Science of Ceramic Chemical Processing*, edited by Larry L. Hench and Donald R. Ulrich, (John Wiley & Sons, New York, pp 320-326), 1986.

Proceedings berikut ini dapat dipesan pada Rosidin d/a HKI, Puslitbang Kimia Terapan-LIPI

DAFTAR HARGA PROCEEDINGS DI UNION SHOP HKI

No.	NAMA	HARGA JUAL
1.	Proceedings of the ASEAN-EC workshop on the scale up, cost evaluation and technology transfer of biotechnological processes _____	Rp 12.500,-
2.	Proceedings on the first ASEAN workshop on biochemical engineering _____	Rp 12.500,-
3.	Proceedings lokakarya pertama evaluasi biologi kimia dan fisika limbah lignosellulosa _____	Rp 7.500,-
4.	Proceedings of the first ASEAN workshop on the technology of animal feed production utilising foodwaste materials _____	Rp 7.500,-
5.	Proceedings of the second ASEAN workshop on the technology of animal feed production utilising foodwaste materials _____	Rp 12.500,-
6.	Proceedings of the first ASEAN seminar workshop on biogas technology (+ supplementary information) _____	Rp 12.500,-
7.	Proceedings of the First ASEAN workshop on solid substrate fermentation _____	Rp 7.500,-
8.	Proceedings of the second ASEAN workshop on food analytical techniques _____	Rp 3.500,-