

PRODUKSI DAN PENGUJIAN AKTIVITAS AMILASE *Burkholderia cepacia* TERHADAP SUBSTRAT YANG BERBEDA

Melisha^{*†}, Esti Harpeni[‡], Supono²

ABSTRAK

Pati atau amilum merupakan bahan utama yang dihasilkan oleh tumbuhan untuk menyimpan kelebihan glukosa sebagai produk fotosintesis. *Burkholderia cepacia* merupakan bakteri yang mampu menghidrolisis pati, karena bakteri tersebut memiliki enzim amilase. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian substrat yang berbeda terhadap pertumbuhan, indeks amilolitik dan aktivitas enzim amilase bakteri *B. cepacia*. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan 3 perlakuan (substrat daun singkong, daun pepaya dan sente) dengan 3 ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri *B. cepacia* mampu hidup dengan baik pada substrat daun pepaya. Pemberian substrat daun sente memberikan pengaruh terhadap indeks amilolitik yang ditunjukkan dengan adanya zona bening sebesar 9,8 mm. Aktivitas enzim amilase pada penelitian ini adalah 101,8 unit dan konsentrasi protein sebesar 0,094 mg/ml.

Kata kunci: *Burkholderia cepacia*, Pati, Enzim, Amilase, Protein

Pendahuluan

Ikan gurame mempunyai sifat omnivora yang berkecenderungan herbivora sehingga pada pembudidayaannya biasanya diberikan asupan makanan bukan hanya dari pakan pellet tetapi dari dedaunan hijau yang mempunyai kandungan karbohidrat tinggi (Kusumah, 2010) seperti daun keladi, singkong dan daun pepaya (Susanto, 2001). Kemampuan ikan untuk memanfaatkan karbohidrat bergantung pada kemampuannya untuk menghasilkan enzim amilase (Mujiman, 1991). Karbohidrat merupakan salah satu komponen sumber energi dalam pakan. Selain itu berperan dalam menghemat penggunaan protein sebagai sumber energi (Afrianto dan Liviawaty, 2005). Enzim amilase merupakan enzim

yang menghidrolisis molekul pati untuk memberikan produk yang bervariasi termasuk dekstrin dan polimer-polimer kecil yang tersusun dari unit-unit glukosa (Windish dan Mhatre, 1965).

Salah satu mikroorganisme yang dapat menghasilkan enzim amilase adalah bakteri amilolitik. Bakteri amilolitik merupakan bakteri yang memproduksi enzim amilase dan memecah pati (Frazier dan Westhoff, 1988). *Burkholderia cepacia* merupakan mikroorganisme berupa bakteri yang dapat menghidrolisis substrat karbohidrat yang dibuktikan dengan adanya zona bening di sekitar isolat. Hal ini dapat diasumsikan bahwa *B. cepacia* mengandung enzim amilase yang mempunyai kemampuan menghidrolisis karbohidrat menjadi

^{*} Mahasiswa Jurusan Budidaya Perairan Fakultas Pertanian Universitas Lampung

[†] e-mail: melisha035@gmail.com

[‡] Dosen Jurusan Budidaya Perairan Fakultas Pertanian Universitas Lampung

senyawa yang lebih sederhana (Alfin *et al.*, 2014). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian substrat yang berbeda terhadap pertumbuhan, indeks amilolitik dan aktivitas enzim amilase *B. cepacia*.

Metode

Preparasi substrat menjadi tepung yaitu dengan cara daun singkong, daun pepaya dan daun sente diambil dan disortasi untuk memisahkan kotoran dengan cara membuang bagian-bagian pelepah daun dan tangkai daun. Kemudian pencucian dilakukan untuk menghilangkan kotoran yang masih melekat dengan menggunakan air mengalir, selanjutnya pengeringan dilakukan dengan cara dikeringanginkan atau tidak kena cahaya matahari langsung atau pada suhu kamar $\pm 25^{\circ}\text{C}$ sampai kadar air $\leq 10\%$. Proses selanjutnya yaitu penggilingan/penepungan yang dilakukan dengan menggunakan mesin penepung.

Analisis proksimat substrat daun singkong, daun pepaya dan daun sente dilakukan di Laboratorium Analisis Hasil Pertanian, Universitas Lampung. Analisa proksimat substrat mengacu pada Lestari *et al.* (2013) yang meliputi kadar air dengan metode thermogravimetri, kadar abu dengan metode pengabuan tanur, kadar protein dengan metode kjedahl, kadar lemak dengan metode soxhlet, kadar serat kasar dan pati dengan cara *by difference*.

Isolat bakteri *B. cepacia* diperoleh dari usus ikan gurame yang dipreparasi oleh Alfin *et al.* (2014). Inokulasi bakteri dilakukan dengan cara

menempatkan 1 ose biakan ke dalam tabung reaksi miring berisi nutrisi agar (NA) dan diinkubasi pada suhu $27-28^{\circ}\text{C}$ selama 24-48 jam. Isolat bakteri siap untuk produksi enzim. Ekstraksi isolat bakteri dilakukan dengan cara kultur cair bakteri disentrifuge selama 15 menit dengan kecepatan 8.000 rpm.

Metode produksi *B. cepacia* mengacu pada Chasanah *et al.* (2011) dengan menggunakan MSM cair (*minimal synthetic medium*) yang ditambahkan 0,5% sumber karbon (daun singkong, daun pepaya dan daun sente). Isolat bakteri diambil dan diinokulasi pada media awal berupa 20 ml MSM cair, kemudian *dishaker* dengan kecepatan 100 rpm dengan suhu $27-28^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam. Selanjutnya diambil 10% hasil kultur dipindahkan pada media produksi berupa 80 ml MSM cair, kemudian *dishaker* dengan kecepatan 100 rpm pada suhu $27-28^{\circ}\text{C}$. Kepadatan bakteri dihitung dengan mengukur absorbansi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm.

Indeks amilolitik diukur dengan menggunakan media MSM padat yang ditambahkan 1% substrat karbohidrat (daun singkong, daun pepaya dan daun sente). Potongan kertas cakram steril direndam pada biakan kultur bakteri selama 1 jam, kemudian potongan kertas cakram diletakkan di atas permukaan media MSM dan diinkubasi pada suhu $27-28^{\circ}\text{C}$ selama 66 jam. Setelah inkubasi, larutan lugol's iodine dituang di atas kultur. Adanya aktivitas enzim amilase ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni. Indeks amilolitik diukur dengan menggunakan rumus (Agustien, 2010):

$$\text{Indeks Amilolitik} = \frac{\bar{x} \text{ diameter zona bening} - \bar{x} \text{ diameter koloni}}{\bar{x} \text{ diameter koloni}} \dots\dots\dots(1)$$

Pengujian Aktifitas Enzim Amilase Kasar

Isolat bakteri dikultur pada MSM cair yang telah ditambahkan 0,5% substrat daun pepaya selama 66 jam. Kemudian kultur cair bakteri disentrifuse (*Hybrid Refrigerated Centrifuge* CAX-370) dengan kecepatan 8000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Sentrifugasi dilakukan di Laboratorium Biomass, Universitas Lampung. Supernatan yang dihasilkan kemudian diambil 3 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan dengan 1 ml larutan amilum 1% dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu 27-28°C. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 2 ml reagen DNS. Kemudian tabung dipanaskan hingga mendidih selama 5 menit, didinginkan dengan air mengalir selama 15 menit dan ditambahkan akuades sebanyak 20 ml. Pada larutan blanko ditambahkan larutan amilum 1% dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu 27-28°C, tanpa penambahan supernatan. Tiap larutan dideterminasi intensitas warnanya menggunakan spektrofotometer (*Thermo Scientific Genesys 20*) dengan panjang gelombang 540 nm.

Penentuan kadar protein dilakukan dengan cara ditambahkan 2 ml larutan ekstrak enzim pada tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2,75 ml pereaksi Lowry B dan dihomogenkan, dibiarkan selama 15 menit. Selanjutnya ditambahkan 0,25 ml pereaksi Lowry A dan dihomogenkan, lalu dibiarkan selama 30 menit agar reaksi berjalan sempurna. Absorbansi sampel diukur

menggunakan spektrofotometer (*Thermo Scientific Genesys 20*) pada panjang gelombang 750 nm. Kadar protein enzim yang diperoleh dari kurva tersebut, selanjutnya digunakan untuk menentukan aktivitas spesifik enzim (Page, 1989) yaitu :

$$As = \frac{\text{Aktivitas enzim}}{\text{Total protein}} \dots\dots\dots(2)$$

Keterangan:

As : aktivitas spesifik enzim
dalam mg protein
(U/mg)

AE : aktifitas enzim (U/ml)

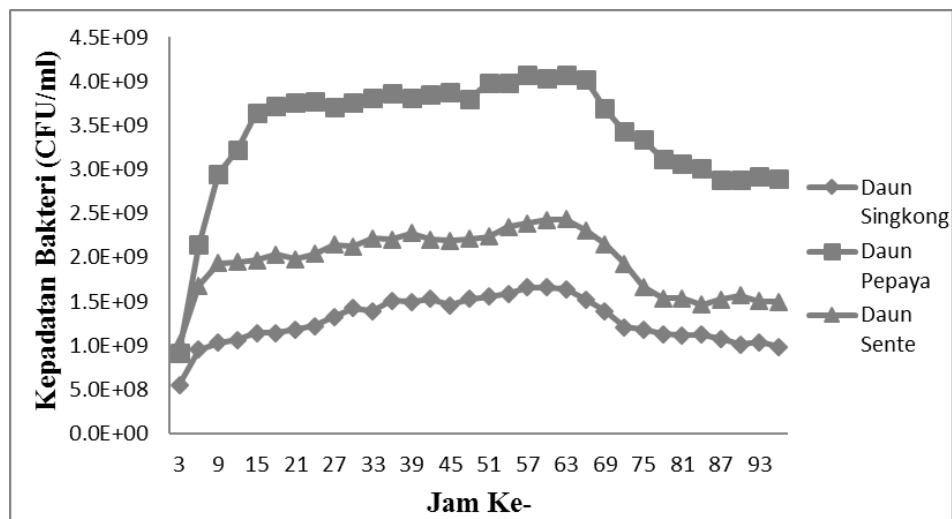
Total protein : mg protein (mg/ml)

Hasil dan Pembahasan

Pertumbuhan Bakteri

Bakteri *B. cepacia* mulai melakukan adaptasi selama ± 3 jam awal pengamatan pada ketiga substrat. Peningkatan jumlah sel tertinggi terdapat pada substrat daun sente sebesar $1,01554 \times 10^9$ CFU/ml dan peningkatan jumlah sel terendah terdapat pada substrat daun singkong sebesar $5,4918 \times 10^8$ CFU/ml.

Penurunan jumlah sel yang signifikan mulai terjadi setelah jam ke-18 hingga jam ke-66 untuk substrat daun pepaya, jam ke-12 hingga jam ke-63 untuk substrat daun sente dan jam ke-33 hingga jam ke-63 untuk substrat daun singkong (Gambar 1). Oleh karena itu dilakukan isolasi enzim amilase dengan substrat daun pepaya pada jam ke-66 sebagai akhir dari siklus pertumbuhan (fase stasioner).



Gambar 1. Kurva Pertumbuhan Bakteri *B. cepacia* yang dilakukan setiap 3 jam

Fase stasioner adalah fase dimana laju pertumbuhan bakteri sama dengan laju kematiannya, sehingga jumlah bakteri keseluruhan akan tetap karena adanya pengurangan derajat pembelahan sel. Hal ini disebabkan oleh kadar nutrisi yang berkurang dan terjadi akumulasi limbah metabolisme (Sugiri, 1992). Pada fase ini bakteri banyak memproduksi zat-zat metabolit sekunder yang dibutuhkan untuk mempertahankan kehidupannya, salah satunya adalah enzim (Fardiaz, 1992).

Kerapatan pertumbuhan sel menurun setelah jam ke-69 untuk substrat daun pepaya, jam ke-66 untuk substrat daun sente dan daun singkong sehingga pada fase ini bakteri memasuki fase kematian.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa ketiga kultur bakteri dengan masing-masing substrat yang digunakan membutuhkan waktu yang berbeda-beda untuk mencapai tiap fase. Perbedaan waktu untuk mencapai jumlah sel tertentu dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu sumber energi, sumber karbon, pH, suhu, lingkungan, oksigen dan masa inkubasi atau sifat mikroorganisme tersebut (Pelczar dan

Chan, 1986). Karena kondisi setiap isolat bakteri dibuat sama, maka perbedaan waktu untuk mencapai fase logaitmik dipengaruhi oleh sifat masing-masing substrat (sumber karbohidrat) (Tabel3).

Uji Kemampuan Amilolitik Isolat Bakteri

Isolat bakteri penghasil enzim amilase dapat dilihat aktivitasnya dengan mengukur diameter zona bening di sekitar isolat bakteri. Diameter zona bening terbentuk setelah isolat bakteri diinkubasi selama 66 jam pada suhu 27-28°C.

Pada pengujian indeks amilolitik, diameter koloni bakteri dibuat dengan ukuran yang sama menggunakan potongan kertas cakram steril berukuran 6 mm. Berdasarkan data diatas, bakteri *B. cepacia* memiliki kemampuan amilolitik yang berbeda-beda pada ketiga substrat sumber karbohidrat. Indeks amilolitik yang diperoleh dari ketiga substrat berturut-turut dari yang terbesar hingga terkecil yaitu 0,63 mm untuk substrat daun sente, 0,47 mm untuk substrat daun pepaya dan 0,12

mm untuk substrat daun singkong (Tabel 4).

Daya amilolitik bakteri *B. cepacia* terhadap ketiga substrat dapat dikatakan memiliki potensi yang rendah, hal ini sesuai dengan pernyataan Ochoa-Solano dan Olmos-Soto (2006) bahwa isolat bakteri yang menghasilkan diameter zona bening dua atau tiga kali diameter koloni merupakan produsen enzim yang potensial.

Analisis Anova menunjukkan bahwa hasil indeks amilolitik memiliki nilai signifikan sebesar 0,048 pada taraf nyata 95% ($\alpha=0,05$). Murdiyanto (2005) menyatakan bahwa, apabila nilai taraf nyata ($\alpha=0,05$) lebih kecil dari nilai signifikannya maka H_1 diterima, sehingga dapat dikatakan bahwa penambahan substrat yang berbeda berpengaruh nyata terhadap indeks amilolitik. Hasil uji sidik ragam memperlihatkan adanya perbedaan secara signifikan sehingga dilakukan uji lanjut BNT dengan tingkat kepercayaan 95%. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan substrat daun singkong dan substrat daun pepaya tidak memberikan pengaruh pada indeks amilolitik, sedangkan pemberian substrat daun sente memberikan pengaruh pada indeks amilolitik secara signifikan dibanding substrat daun singkong dan daun pepaya.

Alfin *et al.* (2014) menyatakan bahwa bakteri *B. cepacia* yang berasal dari usus ikan gurame juga diketahui dapat menghidrolisis karbohidrat pada media yang ditambahkan 10% tepung terigu dengan diameter zona bening yang diperoleh sebesar 4 mm. Adanya perbedaan zona bening pada masing-masing media disebabkan oleh jumlah dan aktivitas enzim dari bakteri yang disekresikan pada media berbeda.

Aktivitas enzim tersebut ditentukan oleh konsentrasi enzim, konformasi enzim, urutan asam amino pembentuk enzim dan macam asam amino pembentuk enzim (Agustien, 2005).

Indeks amilolitik tertinggi tidak selalu berbanding lurus dengan aktivitas enzim yang tinggi karena tidak selalu ada hubungan antara diameter zona bening pada medium agar-agar dengan kemampuan mikroorganisme memproduksi amilase pada kultur terendam (Ward, 1983). Hal ini karena nilai aktivitas enzim amilase ditunjukkan dengan semakin lebar zona bening tetapi besarnya aktivitas enzim amilase yang berperan merombak pati dalam medium padat tidak dapat diketahui. Indeks amilolitik merupakan seleksi awal secara kualitatif untuk menentukan adanya aktivitas enzim amilase. Hal ini sesuai dengan yang dinyatakan oleh Winarno (1983) yaitu pembentukan zona bening menunjukkan bahwa pati yang terdapat di dalam media, dihidrolisis oleh enzim amilase.

Pengujian Aktivitas Enzim Amilase Kasar

Pengujian aktivitas enzim amilase kasar dilakukan dengan cara mengkultur bakteri *B. cepacia* pada medium MSM cair yang ditambahkan 0,5% substrat daun pepaya sebagai sumber karbohidrat.

Persamaan regresi kurva kalibrasi yang diperoleh yaitu $y = 0,0003x - 0,081$ (Gambar 2). Perhitungan aktivitas enzim dilakukan dengan mensubstitusikan absorbansi larutan yang diperoleh pada pengujian aktivitas enzim ke dalam persamaan regresi kurva kalibrasi larutan standar glukosa (Tabel 1). Aktivitas enzim dari ekstrak

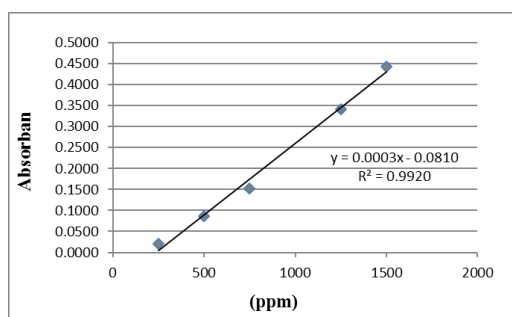
kasar enzim yaitu 101,853 Unit dengan konsentrasi glukosa sebesar 6111,18 μmol . Suarni dan Patong (2007) menyatakan bahwa 1 unit enzim amilase sama dengan besarnya aktivitas enzim yang dibutuhkan untuk membebaskan 1 μmol glukosa per menit per mL enzim.

Tabel 1. Data Pengukuran Standar Glukosa

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
250	0,0210
500	0,0870
750	0,1520
1250	0,3410
1500	0,4440

Penentuan Kadar Protein Enzim Amilase

Pengukuran kadar protein dalam enzim ditentukan dengan menggunakan metode Lowry dan larutan standar BSA (Bovine Serum Albumin) dengan variasi konsentrasi standar yang diukur pada panjang gelombang maksimum 750 nm sehingga diperoleh kurva standar. Dari kurva standar ini kemudian dibuat persamaan garis lurus untuk menghitung kadar protein amilase.



Gambar 2. Grafik Absorbansi Larutan Kurva Standar Glukosa

Persamaan regresi kurva kalibrasi yang diperoleh yaitu $y = 4,705x + 0,002$ (Gambar 2). Perhitungan kadar protein

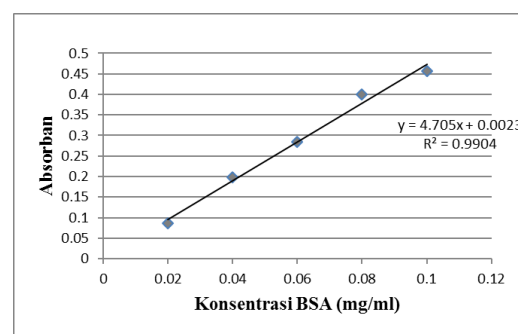
enzim amilase dilakukan dengan mensubstitusikan absorbansi larutan yang diperoleh pada penentuan kadar protein enzim ke dalam persamaan regresi kurva kalibrasi larutan standar protein (Tabel 2). Kadar protein enzim yang diperoleh dari kurva tersebut, selanjutnya digunakan untuk menentukan aktivitas spesifik enzim. Ekstrak kasar enzim amilase *B. cepacia* memiliki konsentrasi protein sebesar 0,0948 mg/ml dan aktivitas spesifiknya sebesar 537,199 U/mg.

Tabel 2. Data Pengukuran Larutan Standar BSA dan Larutan Enzim

Konsentrasi BSA (mg/ml)	Absorbansi
0,02	0,086
0,04	0,198
0,06	0,284
0,08	0,399
0,10	0,456
Sampel Enzim	0,448

Uji Proksimat

Analisis proksimat dilakukan untuk mengetahui komponen utama dari suatu bahan seperti air, abu, protein, karbohidrat, dan lemak yang terkandung pada daun tersebut. Uji proksimat dilakukan pada ketiga substrat yaitu daun singkong, daun pepaya dan daun sente yang menjadi sumber karbohidrat bagi bakteri *B. cepacia* (Tabel 3).



Gambar 3. Kurva Konsentrasi Larutan Standar BSA

Tabel 3. Uji Proksimat Substrat

Parameter	Daun singkong	Daun pepaya	Daun sente
Lemak (%)	2,6	2	0,3
Protein (%)	25,688	27,000	20,879
Abu (%)	7,125	10,686	11,940
Air (%)	7,934	7,427	8,078
Pati (%)	49,938	37,281	22,406
Serat kasar (%)	20,67	15,75	20,37

Tabel 4. Pengukuran indeks amilolitik *B. cepaci* berumur 66 jam

Substrat Daun	Diameter zona bening (mm)			Rata-rata	Indeks Amilolitik
	1	2	3		
Singkong	5,5	8	4,7	6,07	0,12
Pepaya	10,7	7	8,7	8,8	0,47
Sente	9,7	9,7	10	9,8	0,63

Berdasarkan hasil analisis proksimat terlihat bahwa pada ketiga substrat memiliki komponen terbesar berupa pati. Kadar pati berturut-turut dari nilai yang terbesar hingga terkecil yaitu daun singkong 49,938%, daun pepaya 37,281% dan daun sente 22,406%. Komponen terbesar kedua adalah protein. Kadar protein pada substrat tertinggi yaitu daun pepaya 27%, daun singkong 25,688% dan daun sente 20,879%. Protein merupakan salah satu kelompok bahan makronutrien. Protein berperan lebih penting dalam pembentukan biomolekul daripada sumber energi. Namun apabila organisme kekurangan energi, maka protein ini dapat juga di pakai sebagai sumber energi (Sudarmadji, 1989). Komponen terendah dari ketiga substrat adalah lemak. Kadar lemak pada daun singkong sebesar 2,6%, daun pepaya 2% dan daun sente 0,3%.

Simpulan

Bakteri *B. cepacia* mampu hidup pada ketiga substrat dengan

pertumbuhan sel tertinggi terdapat pada substrat daun pepaya dengan waktu produksi enzim selama 66 jam. Ketiga substrat secara keseluruhan menunjukkan bahwa bakteri mampu menghidrolisis masing-masing sumber karbohidrat, namun indeks amilolitiknya berpotensi rendah. Ekstrak kasar enzim memiliki nilai aktivitas enzim yang tinggi yaitu sebesar 101,853 unit dan konsentrasi protein sebesar 0,0948 mg/ml.

Daftar Pustaka

- Afrianto, E. dan Liviawaty, E. 2005. *Pakan Ikan*. Kanisius. Yogyakarta.
- Agustien, A. 2010. *Protease Bakteri Termofilik*. Universitas Padjajaran. Bandung.
- Alfin, G., Harpeni, E., Ali, M., dan Putri, B. 2014. Penapisan Bakteri Penghasil Enzim Amilase dari Usus Ikan Gurame (*Osphronemus gouramy*). Di dalam: *Seminar Indonesia Aquaculture*; Jakarta, 26-29 Agustus 2014. 218-225.

- Chasanah, E., Patantis, G., Zilda, D.S., Ali, M., dan Risjani, Y. 2011. Purification and Characterization of Aeromonas Media KLU 11.16 Chitosanase Isolated from Shrimp Waste. *Journal of Coastal Development*. 15 (1): 104-113.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan I*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Frazier, W. C. dan Westhoff. 1988. *Food Microbiology*. McGraw-Hill. New York.
- Kusumah, W. 2010. *Metabolisme Energi, Karbohidrat dan Lipid*. Skripsi. Institut Teknologi Bandung.
- Lestari, L.A., Fatma, Z.N. dan Sudarmanto. 2013. *Analisis Zat Gizi*. Univeriversitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Mujiman, A. 1991. *Makanan Ikan*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Murdiyanto, B. 2005. *Rancangan Percobaan*. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Ochoa-Solano, J. dan Olmos-Soto, J. 2006. The Functional Property of Bacillus for Shrimp Feeds. *Food Microbiology*. 23: 519–525.
- Page, D.S. 1989. *Prinsip-Prinsip Biokimia Edisi Kedua*. Erlangga. Jakarta.
- Pelczar, M.J.Jr. dan Chan, E.C.S. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi Jilid 1.*: Universitas Indonesia. Jakarta.
- Suarni dan Patong, R. 2007. Potensi Kecambah Kacang Hijau Sebagai Sumber Enzim α -Amilase. *Indo. J. Chem*. 7 (3); 332-336.
- Sudarmadji, S. 1989. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Liberty. Yogyakarta.
- Sugiri, N. 1992. *Biologi Sel*. Depdikbud Direktorat Jendral Pendidikan Pusat Antar Universitas Ilmu Hayati. Institut Pertanian Bogor.
- Susanto, H. 2001. *Budidaya Ikan di Pekarangan*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Ward, O.P. 1983. *Microbial and Enzyme Technology*. Applied Science Publishing 251- 305.
- Winarno, F.G. 1983. *Enzim Pangan*. Gramedia. Jakarta.
- Windish, W.W. dan Mhatre, N.S. 1965. *Microbial Amylases*. Academic Press. New York.