

LAPORAN PENELITIAN

DANA SPP/DPP UNAND 1995/1996

KOTRAK NO. 08/LP-UA/SPP/DPP/04-1995

4B

EKSTRAKSI DAN PENGUJIAN AKTIFITAS ENZIM PENISILIN AGILASE  
DARI BEBERAPA MIKROBA

Oleh :

Dra. Elida Mardiah, MS

FAKULTAS MATEMATIKAN DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM



DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN  
LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS ANDALAS  
PADANG. 1995

## ABSTRAK

Penisilin asilase adalah enzim yang mampu menghidrolisis penisilin menjadi asam 6-amino penisilanst yang penting dalam pembuatan senyawa turunan penisilin.

Untuk memperoleh ekstrak enzim, percobaan dimulai dengan menumbuhkan mikroorganisme dalam media cair, dilanjutkan dengan pekerjaan fermentasi. Mikroba yang tumbuh dipisahkan dari media cairnya dengan cara sentrifuga pada suhu dingin. Untuk mengetahui apakah enzim yang dihasilkan bersifat intraselular atau ekstraselular maka pengujian aktivitas dilakukan terhadap media cair dan terhadap sel mikroba sendiri. Supaya diperoleh hasil yang lebih teliti, pengujian aktivitas dilakukan dengan dua metoda yaitu menghitung banyaknya substrat benzil penisilin yang berkurang dan menghitung jumlah produk 6-APA yang terbentuk. Metoda pertama berdasarkan kepada pembentukan kompleks berwarna merah antara benzil penisilin dengan hidroksilamin hidroklorida dan ion feri. Metoda kedua berdasarkan kepada pembentukan kompleks berwarna kuning antara 6-APA dengan para dimetilaminobenzaldehid. Kedua macam kompleks yang berbentuk itu diukur serapannya dengan spektrofotometer. Enzim penisilin asilase diperoleh dengan cara pengendapan menggunakan garam amonium sulfat sampai kejenuhan 80 %.

Hasil percobaan menunjukkan bahwa enzim penisilin asilase dari *Bacillus megaterium* adalah enzim ekstraselular sedangkan enzim penisilin asilase yang diproduksi dari *Fusarium semitectum* dan *Fusarium oxysporum* adalah intraselular. Dari 50 ml ekstrak enzim yang diperoleh dari *Bacillus megaterium*, didapatkan endapan enzim 4.0507 gram.

sedangkan endapan enzim dari *Fusarium semitectum* dan *Fusarium oxysporum* sangat sedikit sekali sehingga sulit untuk dipisahkan. Dari kedua metoda pengujian aktivitas didapatkan aktivitas enzim penisilin asilase dari *Bacillus megaterium* 10,501 unit/ml dengan metoda pengurangan substratbenzil penisilin dan 9,978 unit/ml dengan metodapengukuran produk 6-APA. Dengan metoda pengukuran produk 6-APA ini didapatkan aktivitas enzim penisilin asilase dari *Fusarium semitectum* 8,837 unit/ml. dan dari *Fusarium oxysporum* 6,315 unit/ml.

## I. PENDAHULUAN

Penisilin adalah salah satu golongan antibiotik yang secara klinis paling luas digunakan, oleh karena selain efektif juga relatif aman dan toksik, terkecuali beberapa reaksi alergi karena hasil degradasinya dalam tubuh. Pada mulanya penisilin dihasilkan dengan cara fermentasi (12).

Dalam pengembangan obat-obatan yang digunakan untuk memerangi penyakit infeksi pada manusia, penelitian dan pencarian antibiotik berjalan terus untuk tujuan khemoterapi, modifikasi struktur terus dikembangkan pada masing-masing kerangka dasar antibiotik yang akan digunakan pada masa mendatang. Pada beberapa negara sudah melakukan produksi beberapa jenis antibiotik baru dan ada pula yang sedang mencoba melakukan studi produksi antibiotik (8,10).

Penelitian untuk mencari antibiotik-antibiotik baru bertujuan untuk memperoleh antibiotik yang lebih efektif, mempunyai aktivitas antimikroba yang tinggi, stabil dalam asam, tahan  $\beta$ -laktam dan tidak menimbulkan reaksi alergi. Antibiotik baru yang dimaksud adalah antibiotik yang dibuat dari asam 6-amino penisilinat (6-amino penicillanic acid, 6-APA) yang dikenal sebagai inti penisilin. Cara yang sedang dikembangkan untuk memperoleh 6-APA adalah dengan jalan memecahkan jenis penisilin lain, misalnya penisilin G dengan menggunakan suatu enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme tertentu. Penisilin asilase adalah enzim yang berfungsi menghidrolisis penisilin menjadi 6-APA tersebut. Enzim penisilin asilase dikenal juga dengan nama lain penisilin amidase atau amido hidrolase dengan nomor kode enzim EC.3.5.1.11 dapat dihasilkan dari mikroba, baik dari golongan bakteri maupun fungi (4,5).

Kameda dan kawan-kawan (3) mengisolasi enzim penisilin asilase dari beberapa strain bakteri. Chiang dan Bennet pada tahun 1967 (3) telah melakukan ekstraksi enzim penisilin asilase dari *Bacillus megaterium* ATCC 14945 yang ditumbuhkan dalam media berisi kasein dan asam fenil asetat sebagai

induser. Pemakaian media ini membutuhkan waktu fermentasi yang panjang yaitu kira-kira 70 sampai 72 jam. Menurut Sakaguchi dan Murao penggunaan media yang berisi ekstrak daging, glukosa dan garam NaCl akan membutuhkan waktu fermentasi yang lebih pendek. Vander haege dan kawan-kawan (17) melaporkan pula dalam tulisannya bahwa enzim penisilin asilase juga dapat dihasilkan dari jamur *Fusarium avenaceum*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium moniliforme* dan *Fusarium oxysporum*.

Bakteri *Bacillus megaterium* HRL-1368, jamur *Fusarium semitectum* dan *Fusarium oxysporum* termasuk jenis mikroorganisme yang mudah didapatkan. Maka pada penelitian ini dicoba untuk menguji aktivitas enzim penisilin asilase yang dihasilkan oleh mikroba-mikroba tersebut dan mengekstraksi enzim penisilin asilase itu sendiri.

## II. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Data yang diperoleh dari hasil percobaan diharapkan dapat bermanfaat memberikan informasi tentang kemampuan enzim penisilin asilase yang dihasilkan ketiga jenis mikroba tersebut untuk merubah penisilin menjadi 6-APA, yang merupakan bahan baku utama pembuatan antibiotik baru. Disamping itu juga memberikan informasi berapa jumlah enzim penisilin asilase yang dihasilkan dengan menggunakan amonium sulfat sebagai pengisolasi dari masing-masing mikroba yang digunakan sebagai sampel. Sekiranya data yang diperoleh cukup meyakinkan tentu penggunaan *Bacillus megaterium* HRL-1368, *Fusarium semitectum* dan *Fusarium oxysporum* merupakan suatu alternatif yang dapat diandalkan untuk menghasilkan enzim penisilin asilase.

aseton dingin. Kemudian miselium dibiarkan sebentar hingga kering dan bau asetonnya hilang. Miselium yang telah kering ditimbang dan ditambah buffer asetat pH 6. volume buffer diambil 100 ml untuk 3 gram miselium. lalu dihancurkan dengan sonikator pada suhu rendah. Setelah miselium hancur, suspensi yang terbentuk disentrifuga 4500 rpm selama 30 menit pada keadaan dingin sehingga seluruh miselium mengendap. Supernatannya diambil sebagai ekstrak enzim. ekstrak enzim *Furarium semitectum* dan *Furarium oxysporum* dalam keadaan dingin ditambah garam amonium sulfat sampai kejenuhan 80 %. Supaya pengendapan sempurna, larutan ini dibiarkan 1 jam, baru disentrifuga selama 30 menit pada 4500 rpm.

## V. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1. Pengujian Aktivitas Enzim Penisilin Asilase

Pengujian ekstrakelular enzim penisilin asilase dari bakteri *Bacillus megaterium* NRLL-B-1368 dilakukan setiap 4 jam fermentasi dengan dua macam metoda yaitu metoda menghitung pengurangan konsentrasi substrat benzil penisilin dan menghitung konsentrasi produk 6-APA yang terbentuk.

Dari kedua metoda diperoleh aktivitas enzim penisilin asilase maksimum setelah fermentasi 48 jam. Dari awal sampai 12 jam fermentasi kelihatan aktivitas enzim hanya sedikit sekali. setelah fermentasi berlangsung 12 jam terjadi kenaikan aktivitas dan mencapai maksimum setelah 48 jam. Hal ini disebabkan karena penambahan induser asam fenilasetat dilakukan setelah 12 jam fermentasi. Asam fenilasetat bersifat toksik terhadap bakteri dan jamur. jika asam fenilasetat ditambahkan dari permulaan fermentasi maka pertumbuhan awal dari mikroorganisme akan terhambat.

Menurut Acevedo dan Cooney (1) konsentrasi asam fenilasetat yang paling baik digunakan untuk memperoleh enzim penisilin asilase maksimum dan tidak menghambat

sempurna, kemudian disentrifuga 4500 rpm suhu rendah selama 30 menit. Ternyata endapan yang terjadi sedikit sekali sehingga sulit untuk dipisahkan. Hal ini mungkin disebabkan karena jamur *Fusarium semitectum* dan *Fusarium oxysporum* yang digunakan mempunyai kemampuan kecil untuk menghasilkan enzim penisilin asilase. Karena enzim yang dihasilkan sedikit, maka terjadi kesulitan dalam penimbangan protein yang diperoleh sehingga aktivitas spesifik enzim penisilin asilase dari kedua jamur *Fusarium* ini sulit untuk dihitung.

## VI. KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat diambil beberapa kesimpulan :

1. Dari hasil pengujian aktivitas yang dilakukan terhadap media cair dan sel mikroba itu sendiri ternyata enzim penisilin asilase yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus megaterium* NRRL-B-1368 adalah enzim ekstraselular, sedangkan enzim penisilin asilase yang dihasilkan oleh jamur *Fusarium semitectum* dan *Fusarium oxysporum* adalah enzim intraselular.
2. *Bacillus megaterium* NRRL-B-1368 dapat digunakan sebagai penghasil penisilin asilase yang mampu menghidrolisis benzil penisilin menjadi 6-APA, dari 500 ml ekstrak enzim didapatkan endapan enzim 4.0507 gram.
3. Enzim penisilin asilase yang dihasilkan oleh jamur *Fusarium semitectum* dan *Fusarium oxysporum* sulit untuk diekstraksi dan diendapkan karena kandungan enzim yang dihasilkan oleh kedua jenis jamur ini sangat sedikit.
4. Metoda pengujian aktivitas enzim penisilin asilase yang diperoleh dari *Bacillus megaterium* NRRL-B-1368, *Fusarium semitectum* dan *Fusarium oxysporum* melalui reaksi 6-APA dengan para dimetilaminobenzaldehid baik digunakan, karena kestabilan kompleks yang berwarna kuning antara

6-APA dengan dimetilaminobenzaldehid tahan lama. Dengan metoda 6-APA ini didapatkan aktivitas enzim penisilin asilase dari *Bacillus megaterium* NRLL-B-1368 sebesar 9.978 unit/ml, aktivitas enzim penisilin asilase dari *Fusarium semitectum* 6.837 unit/ml dan aktivitas enzim penisilin asilase dari *Fusarium oxysporum* 6.315 unit/ml.

## 6.2. Saran

Dari hasil yang diperoleh pada penelitian ini, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk enzim penisilin asilase yang dihasilkan oleh *Bacillus megaterium* NRLL-B-1368. Supaya didapatkan enzim penisilin asilase dengan stabilitas yang tinggi maka disarankan untuk mengamobilisasi enzim penisilin asilase ini sehingga dalam penggunaannya, enzim penisilin asilase dapat dipakai berulang kali.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Acevedo and Cooney, Penicillin Amidase Production by *Bacillus megaterium*, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 15, 1973, pp. 493-503.
2. Bauman, F. et al. Die Substrat Spezifitat der Penicillin Amidase aus *Fusarium semitectum*. Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 352, 1971, pp. 853-858.
3. Chiang, C. and Bennet, R.E., Purification and Properties of Penicillin Amidase from *Bacillus megaterium*, J. of Bacteriology, Vol. 93, 1, 1967 pp. 302-308.
4. Chibata, et al. "Enzyme Engineering", 6<sup>th</sup> ed., Plenum Press, New York, 1974, pp. 81-308.
5. Collowick and Kaplan, "Methods in Enzymology", Vol. XLIII, Academic Press, Inc Publisher, New York, 1975, pp. 698-727.
6. Crueger, W. and Crueger, A., "Biotechnology A Text Book of Industrial Microbiology", Science Tech. Inc. Madison WI 53705, 1984, pp. 178-180.