Jurnal Kimia Andalas, ISSN : 0853-8018
Vol. 2, No. 1, 1995 (53-58)

FERMENTASI ENZIM PENISILIN ASILASE DARI *Bacillus megaterium* NRLL B-1368 DENGAN MEMAKAI ASAM FENIL ASETAT SEBAGAI INDUSER

Elida Mardiah

Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Andalas

INTISARI

Enzim Penisilin asilase dapat dihasilkan dari bakteri Bacillus megaterium NRLL-B-1368 dengan menumbuhkannya pada media cair. Untuk memperoleh cairan enzim, kedalam media fermentasi diberikan induser asam fenil asetat. Bakteri yang tumbuh dipisahkan dari media cairnya dengan sentrifuga dingin. Kondisi fermentasi terbaik untuk menghasilkan enzim penisilin asilase ditentukan dengan menguji aktifitas enzim selama fermentasi berlangsung. Penambahan asam fenil asetat yang tepat dilakukan setelah 12 jam fermentasi dengan jumlah 1,5 gram perliter medium. Lama fermentasi yang optimal adalah 48 jam, diperoleh aktifitas dari cairan enzim penisilin asilase sebesar 9,978 unit/ml dan aktifitas spesifiknya 1,2316 unit/mg protein.

ABSTRACT

Penicilin asilase enzym was produced from Bacillus megaterium NRLL-B-1368 bacteria by incubation in liquid medium. To produce the liquid enzym, into the fermentation medium the phenil acetic inducer was added. The incubated bacteria was separated from its liquid medium by cool centrifugation. The best fermentation condition in producing the penicilin asilase enzym was determined by enzym activity testing during the fermentation period. The accurate enzym addition of the acetic acid was done after 12 hours fermentation as 1.5 gram/l medium. The optimum fermentation time is 48 hours, the activity obtained was 9.978 unit/ml and the specific activity was 1.2316 unit/mg protein.

PENDAHULUAN

Enzim penisilin asilase yang dikenal juga dengan nama lain penisilin amidase atau amido hidrolase dengan nomor kode enzim E.C-3.5.1.11 adalah enzim yang mampu menghidrolisis penisilin menjadi asam 6-amino penisilanat (6-amino penicillanic acid, 6-APA). 6-APA merupakan suatu senyawa yang penting dalam pembuatan turunan penisilin [1,3].

Dalam pengembangan obat-obatan yang digunakan untuk menerangi penyakit infeksi pada manusia, penelitian dan penemuan antibiotik berjalan terus. Untuk tujuan khemotrapi modifikasi struktur terus dikembangkan pada masing-masing kerangka dasar antibiotik, disamping ditumbuhkannya kembali kombinasi antibiotik yang akan digunakan dimasa mendatang. Penelitian untuk mencari antibiotik-antibiotik baru bertujuan untuk memperoleh antibiotik yang lebih efektif, mempu-nyai aktifitas anti mikroba yang tinggi, stabil dalam asam, tahan ß-laktamase dan tidak menimbulkan reaksi alergi. Antibiotik baru yang dimaksud adalah antibiotik yang dibuat dari asam 6-amino penisilanat yang dikenal sebagai inti penisilin. Cara yang sedang dikembangkan untuk memperoleh 6-APA adalah dengan jalan memecahkan jenis penisinlin lain, misalnya penisilin G dengan menggunakan enzim penisilin asilase [3].

Enzim penisilin asilase yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus megaterium* bersifat induktif. Keluarnya enzim harus dirangsang dengan adanya suatu induser di dalam media fermentasi [2]. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui banyaknya induser asam fenil asetat yang tepat untuk ditam-bahkan kedalam media fermentasi agar diperoleh enzim penisilin asilase maksimal. Kemudian juga mengamati pengaruh waktu penambahan asam fenil asetat selama fermentasi berlangsung. Fermentasi dilakukan pada media cair dan enzim penisilin asilase yang dihasilkan ditentukan aktifitasnya dengan menghitung konsentrasi produk 6 APA yang terbentuk dari penguraian substrat benzilpenisilin.

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan

Bahan yang digunakan dalam peneltian ini bakteri *Bacillus megaterium NRLL-B-1368*, nutrien agar, ekstrak daging, NaCl, asam fenil asetat, kalium benzilpenisilin, 6-APA, para dimetil amino benzaldehid dan lain-lain.

Alat

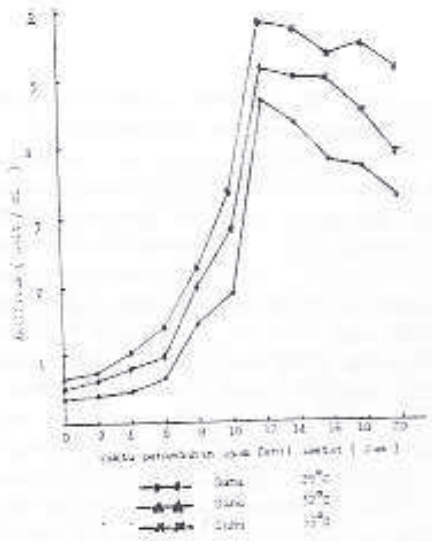
Alat yang digunakan meliputi, alat-alat gelas yang umum digunakan dilaboratorium kimia serta instrumen penunjang lainnya, seperti : sentrifuga, shaker incubator, pH meter, autoklaf, neraca analitik, spektrofotometer.

Cara Kerja

Bakteri *Bacillus megaterium NRLL-B-1368* diperbanyak pada media padat nutrien agar. Inokulum diperoleh dengan memasukkan 10 ml aquades steril kedalam tabung agar miringberisi biakan yang siap dipindahkan. Kemudian diisikan kedalam labu erlenmeyer yang telah berisi medium fermentasi steril. Medium fermentasi yang digunakan terdiri dari glukosa, ekstrak daging, NaCl, gliserin, pepton dan asam fenil asetat. Penambahan asam fenil asetat dilakukan dengan variasi waktu mulai dari awal fermentasi kemudian berturut-turut setiap 2 jam fermentasi berlangsung kedalam masing-masing medium. Perlakuan ini dikerjakan pada suhu 29°, 32° dan 35° C. Untuk mengetahui konsentrasi asam fenil asetat yang tepat dalam medium, asam fenil asetat diisikan kedalam medium dengan variasi 0 s/d 2,5 g perliter medium. Lama fermentasi optimal dalam menghasilkan enzim penisilin asilase ditentukan dengan melakukan uji aktifitas enzim penisilin asilase yang diproduksi oleh *Basillus megaterium NRLL-B-1368* pada masing-masing waktu perlakuan fermentasi. Sel Bakteri dan medium dipisahkan dengan sentrifuga dingin kecepatan 4500 rpm selama 20 menit, 1 ml cairan enzim yang telah dipisahkan dari sel ditambahkan 1 ml benzil penisilin dan 1 ml buffer posfat pH 7,5. Campuran diinkubasi 30 menit pada 55°C. Produk 6-APA yang terbentuk dari hasil hidrolisis enzim terhadap substrat benzil penisilin direaksikan dengan para dimetilaminobenzaldehid menghasilkan larutan berwarna ku-ning, absorbannya diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum 415 nm [4], kadar protein dari cairan enzim ditentukan dengan metoda Lowry.

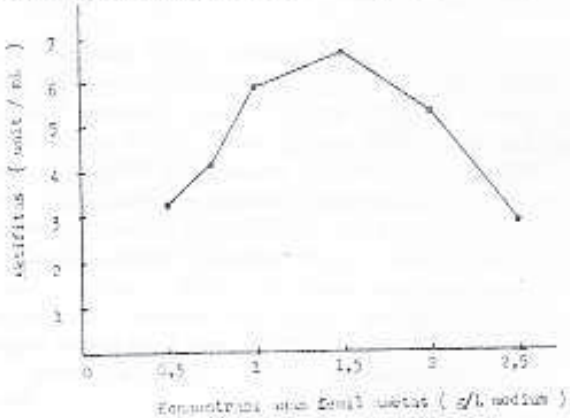
HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari ketiga variasi suhu yang dilakukan seperti terlihat pada gambar 1, ternyata aktifitas enzim penisilin asilase yang dihasilkan paling tinggi pada saat penambahan asam fenil asetat setelah 12 jam fermentasi berlangsung. Suhu 32°C merupakan suhu yang paling cocok untuk pertumbuhan *Bacillus megaterium NRLL-B-1368* sehingga enzim yang dihasilkan paling banyak. Penambahan asam fenil asetat yang dilakukan sebelum 12 jam fermentasi akan memberikan aktifitas enzim yang rendah karena enzim yang dihasilkan sedikit. Asam fenil asetat bersifat toksik terhadap bakteri *Bacillus megaterium NRLL-B-1368*, jika asam fenil asetat ditambahkan dari awal fermentasi atau selama fasa lag berlangsung maka pertumbuhan mikroorganisme akan terhambat [1]. Jika pemberian induser asam fenil asetat melewati 12 jam fermentasi, enzim yang dihasilkan juga berkurang, kelihatan dari aktifitasnya yang menurun, karena pemberian induser yang terlambat akan mengurangi enzim yang ..... Pada waktu fermentasi 12 jam, pemberian induser pada saat ini akan menghasilkan enzim penisilin asilase yang banyak sehingga aktifitasnya tinggi.



Gambar 1. Pengaruh waktu penambahan asam fenil asetat terhadap aktivitas enzim penisilin asilase pada suhu yang bervariasi

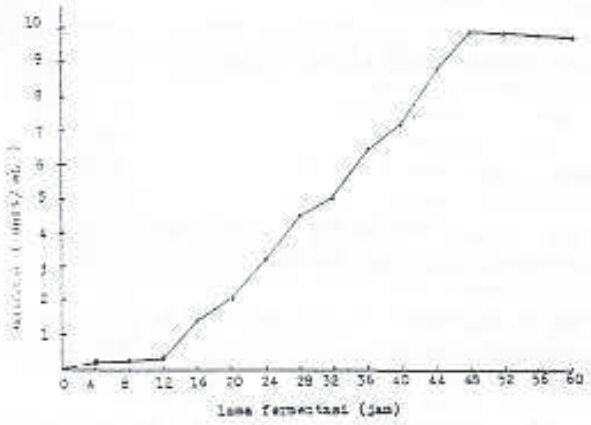
Dari Gambar 2 terlihat aktifitas enzim meningkat pada penambahan asam fenil asetat dari 0,5 s/d 1,5 g perliter medium. Semakin banyak asam fenil asetat yang diberikan maka aktifitas enzim semakin naik, berarti enzim yang terangsang untuk keluar semakin banyak. Tetapi bila konsentrasi asam fenil asetat ditingkatkan lagi ternyata aktifitas enzim penisilin asilase tidak lagi bertambah. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan asam fenil asetat 1,5 g perliter medium sudah optimal untuk merangsang keluarnya enzim.



Gambar 2. Pengaruh asam fenil asetat yang ditimbulkan terhadap aktivitas enzim penisilin asilase

Jumlah enzim yang diproduksi oleh bakteri tidak lagi bertambah. Asam fenil asetat pad fermentasi rendah merangsang pertumbuhan dan menginduksi sintesis enzim penisilin asilase. Jika konsentrasi tinggi, asam fenil asetat akan menghambat pertumbuhan dan juga menghambat sintesis enzim penisilin asilase [1].

Aktifitas enzim yang dihasilkan pada variasi lama fermentasi dapat dilihat pada Gambar 3. Aktifitas enzim penisilin asilase maksimum setelah fermentasi 48 jam, yaitu 9,978 unit/ml dan aktifitas spesifiknya 1,2316 unit/mg protein. Dari awal sampai 12 jam fementasi kelihatan aktifitas enzim sedikit sekali. Setelah fermentasi berlangsung selama 12 jam terjadi kenaikan aktifitas dan mencapai maksimum setelah 48 jam. Hal ini disebabkan karena induser asam fenil asetat ditambahkan setelah 12 jam fermentasi.



Gambar 3. Kurva variasi lama fermentasi terhadap aktivitas enzim penisilin asilase

Chiang dan Bennet telah memurnikan enzim penisilin asilase dari Bacillus megaterium ATCC 14945 dengan menggunakan media fermentasi yang terdiri dari kasein, ucon lubrican LB 625, glukosa dan asam fenil asetat. Lama fermentasi yang dibutuhkan untuk mencapai hasil enzim penisilin asilase maksimum adalah 70 jam (2). Bila dibandingkan dengan pema-kaian media fermentasi yang mengandung ekstrak daging , glukosa, NaCl, gliserin dan pepton ternyata pemakaian media yang megandung ekstrak daging ini membutuhkan waktu fermentasi yang lebih cepat dimana aktifitas enzim penisilin asilase yang dihasilkan mencapai maksimum setelah fermentasi 48 jam.

Pada media yang berisi ekstrak daging terdapat sumber nitrogen yang lebih banyak yaitu ekstrak daging dan pepton yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroorganisme dan sintesis enzim. Sedangkan pada media yang berisi kasein, sumber nitrogen hanya terdapat pada kasein saja. Enzim merupakan protein yang disintesis dari rangkaian asam-asam amino yang mengandung nitrogen, karena media yang berisi ekstrak daging lebih banyak mengandung nitrogen, maka sintesis protein enzim terjadi lebih cepat pada mikroorganisme yang tumbuh pada media fermentasi berisi ekstrak daging tersebut sehingga lama fermentasi yang dibutuhkannya lebih cepat.

KESIMPULAN

Untuk memproduksi enzim penisilin asilase maksimum dari bakteri *Basillus megaterium NRLL-B-1368* dibutuhkan.

- Induser asam fenil asetat sebanyak 1,5 gr perliter medium fermentasi.
- Pemberian asam fenil asetat yang tepat adalah setelah 12 jam fermentasi berlangsung.
- Suhu fermentasi untuk pertumbuhan bakteri *Basillus megaterium NRLL-B-1368* adalah 32°C dan lama fermentasi optimum 48 jam.

DAFTAR PUSTAKA

1. Accevedo and Cooney, " Penicillin Amidase Production by *Basillus megaterium* ", Biotechnologi and Bioenginering, vol 15, 1973, 493 - 503.

2. Chiang c and Bennet R.E, " Purification and Propesties of Penicillin Amidase from *Bacillus megaterium*, J. of Bacteriology vol 93, 1, 1970, 302 - 308.

3. Deulin T.M, " Text book of Biochemistry with Chemical Correlation John Willey & Sons, New York, 1978, 179-183.

4. Kornfeld J.M " A New calorimetric Method for Determination of 6- Amino Penicillanic Acid", Analitical Biochemistry, 1978, 118 - 126.

5. Mahajan P.B.. " Review Penicillin Acylases ", Applied Environmental Microbiology, vol 46, 1983, 1227-1229.

6. Schewale J.G and Sivaraman H," Penicillin Acylase : enzyme production and Its Application in the manufacture of 6-APA", Process Biochem, 1989, 146-154.