

## ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM AMILASE TERMOSTABIL DARI BAKTERI ISOLAT SUMBAR

Anthoni Agustien

### ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian mengenai isolasi dan karakterisasi enzim amilase termostabil dari bakteri isolat sumbar. Pengisolasian bakteri termofilik dari sumber air panas Rimbo Parti dan Kili-kili, provinsi Sumatera Barat, dilakukan metoda total plate count (TPC), Seleksi bakteri termofilik penghasil enzim amilase termostabil dilakukan dengan metoda Benson, isolasi enzim dengan metoda sentrifuga dan uji aktivitas enzim amilase dengan metoda Somogy-Nelson. Dari penelitian diperoleh 32 koloni bakteri termofilik dengan 12 isolat bakteri yang bersifat amilolitik dan yang potensial penghasil enzim amilase 6 isolat bakteri. Bakteri yang paling besar zona beningnya adalah isolat AT-5 dengan zona bening 3,6 cm. Aktivitas enzim tertinggi ditunjukkan dari isolat bakteri AT-5 sebesar 102,0 unit/ml. Karakterisasi enzim amilase termostabil dari isolat AT-10 dan AT-12 isolat adalah pH 7, suhu 50° C dan waktu interaksi enzim-substrat selama 60 menit. Sedangkan isolat AT-2, AT-5 dan AT-6 karakterisasi enzimnya adalah pH 5, suhu 60° C dan waktu interaksi enzim-substrat selama 60 menit. Isolat AT-8 mempunyai karakterisasi enzim amilase pada pH 6, suhu 50° C dan waktu interaksi enzim-substrat 60 menit.

**Kata kunci :** isolasi, karakterisasi, amilase, termostabil, unit

## A. PENDAHULUAN

Semenjak ditemukannya organisme yang dapat hidup pada lingkungan yang mempunyai suhu ekstrim, pH ekstrim, tekanan tinggi dan salinitas yang tinggi hal ini sangat menarik perhatian pada bidang bioteknologi khususnya tentang potensi enzim yang dihasilkan oleh organisme tersebut (Adam dan Kelly, 1995). Aplikasi enzim dalam bioteknologi memerlukan enzim yang tahan terhadap suhu tinggi, sehingga hal ini akan meningkatkan penggunaan bakteri termofilik dalam bidang industri (Suhartono, 1989). Menurut Edwards (1990), penggunaan mikroba yang tahan terhadap suhu tinggi memiliki beberapa kelebihan daripada mikroba lainnya seperti laju pertumbuhan sel yang tinggi, mengurangi biaya pendinginan pada penyimpanan dan mengurangi resiko kontaminasi dari mikroba lainnya. Menurut Suharto (1995), keuntungan menggunakan enzim yang bersifat termostabil dalam dunia industri adalah enzim mempunyai aktivitas yang tinggi pada suhu tinggi dan protein enzim yang tahan terhadap denaturasi kimia. Menurut Seliek dan Chaudhuri (1999), enzim dari organisme yang hidup pada lingkungan ekstrim menunjukkan aktivitas enzim dan stabil pada suhu yang ekstrim. Menurut Suharto (1995), untuk mendapatkan enzim yang tahan suhu tinggi perlu dilakukan penapisan mikroorganisme yang dapat menghasilkan enzim termostabil dari berbagai sumber alam seperti pada sumber air panas.

Indonesia merupakan negara agraris yang kaya akan sumber daya alam karbohidrat, khususnya pati. Penggunaan pati sebagai bahan baku industri baik pangan maupun non pangan sangat nyata misalnya dalam industri sirup glukosa, sirup fruktosa, amilodekstrin dan alkohol. Proses hidrolisa pati menjadi produk tersebut umumnya menggunakan enzim sebagai biokatalis dalam proses biokonversi pati menjadi produk-produk tersebut. Menurut (Fogarty, 1983), enzim amilase telah lama mengeser peran asam dalam pengolahan industri pati karena lebih menguntungkan.

Daerah Sumatera Barat merupakan daerah pengunungan Bukit Barisan yang banyak memiliki Gunung Berapi, hal ini tentunya banyak memiliki sumber- sumber air panas, dan dari survey lapangan yang telah dilakukan ternyata sumber air panas di kawasan hutan Rimbo Panti, Pasaman mempunyai suhu air yang paling tinggi sekitar 99° C dan sumber air panas di Kili-kili Solok yang masih alami dengan suhu airnya sekitar 60° C. Disamping itu dari kedua sumber air panas tersebut belum adanya informasi mengenai isolasi serta karakterisasi enzim amilase termostabil dari bakteri yang berasal dari sumber air panas tersebut.

Bertitik tolak dari uraian di atas maka perlu untuk dilakukan penelitian mengenai isolasi dan karakterisasi enzim amilase termostabil dari bakteri isolat Sunbar.

## **B. TUJUAN PENELITIAN**

Tujuan Penelitian ini adalah :

1. Untuk mendapatkan enzim amilase termostabil dari bakteri isolat Sunbar yang berasal dari sumber air panas
2. Untuk mengetahui karakterisasi dari enzim amilase termostabil yang dihasilkan oleh bakteri isolat Sunbar

## **C. METODE PENELITIAN**

### **1. Pengambilan sample air**

Pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan botol sampel pada dua sumber air panas, yakni di Rimbo Panti Pasaman dan Kili-Kili Solok. Dicatat juga sifat fisik air lainnya seperti: pH, bau, rasa dan warna air.



## 2. Isolasi bakteri termofilik

Botol yang berisi sampel air dipanaskan terlebih dahulu sampai suhunya mencapai 60° dan 99° C. Kemudian dilakukan pengenceran masing-masing sampai 10<sup>4</sup> kali dengan akuades steril yang bersuhu masing-masingnya 60° dan 99° C. Selanjutnya dipipet 1 ml sampel dan dituangkan pada petridish kemudian dituangkan 15 ml medium NA. Diinkubasi pada suhu 50° C selama 24 jam.

## 3. Skrining bakteri penghasil amilase

Dinokulasikan masing-masing biakan miring bakteri pada medium pati agar. Diinkubasi pada suhu 50° C, selama 24 jam dan kemudian dituangkan Lugol. Jika disekitar koloni bakteri terbentuk zona bening, hal ini berindikasi bakteri menghasilkan enzim amilase ekstraseluler. Diukur dan dicatat diameter zona bening yang terbentuk disekitar koloni bakteri tersebut.

## 4. Produksi enzim amilase

Untuk pertumbuhan bakteri dan menghasilkan enzim amilase digunakan media produksi enzim amilase (g/liter): 3 g NaNO<sub>3</sub>, 5 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 5 g KCl, 0,1 g FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O dan 10 g pati. Sebanyak 1% (v/v) inokulum masing-masing bakteri yang berindikasi menghasilkan enzim amilase, diinokulasikan pada masing-masing erlenmeyer yang berisi 100 ml media produksi enzim. Diinkubasi pada 180 rpm, suhu 50° C selama 24 jam.

## 5. Isolasi dan uji aktivitas enzim amilase

Isolasi enzim dilakukan dengan cara mensentrifuga media produksi enzim pada 4500 rpm selama 15 menit. Kemudian diambil dan dicatat volume supernatan yang merupakan larutan crude enzim amilase ekstraseluler dan dilakukan uji aktivitas enzim amylase menurut metode Somogy-Nelson.

## 6. Karakterisasi enzim amilase

### 6.1 Penentuan pH optimum

Penentuan pH optimum dilakukan dengan cara membuat variasi pH substrat yang bervariasi masing-masing : 5,0; 6,0; 7,0 dan 8,0 pada suhu 50° C dan waktu inkubasi 60 menit, kemudian ditentukan aktivitas enzim.

### 6.2 Penentuan suhu optimum

Penentuan pH suhu dilakukan dengan cara membuat substrat pada pH optimum dan dengan memvariasikan suhu inkubasi : 40, 50, 60, 70, 80 dan 90° C dengan waktu inkubasi 60 menit pada uji aktivitas enzim.

### 6.3 Penentuan waktu inkubasi enzim-substrat optimum

Penentuan waktu inkubasi enzim-substrat optimum dilakukan dengan cara mevariasikan waktu inkubasi enzim-substrat: 40, 50, 60, 70, 80 dan 90 menit, pada pH substrat optimum dan suhu optimum.

## D. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1. Fisis dan Kimia Sumber air panas

Sumber air panas Rimbo Panti dan Kili-Kili mempunyai kondisi fisis dan kimia seperti pada tabel 1. yang dapat dilihat bahwa kondisi fisis dan kimia air pada sumber air panas Rimbo Panti, mempunyai kondisi pH 5; suhu 95-99° C, tidak berwarna dan berbau belerang, Sedangkan sumber air panas di Kili-kili mempunyai kondisi : pH 5; suhu 55-60° C, tidak berwarna dan berbau belerang. Dengan kondisi tersebut dapat diprediksi bahwa mikroorganisme yang hidup adalah kelompok bakteri termofilik dan hipertermofilik. Menurut Madigan *et al.* (2000), bakteri yang hidup pada kisaran suhu diatas 40° C – 75° C yang termasuk pada kelompok mikroorganisme termofilik dan diatas suhu 75° C termasuk bakteri yang bersifat hipertemofilik.



## 2. Seleksi bakteri termofilik penghasil enzim amilase

Dari 32 koloni bakteri termofilik, yang berhasil diisolasi dari sumber air panas Rimbo Panti dan Kili-kili, setelah dilakukan seleksi, diperoleh 12 koloni bakteri bersifat amilolitik, yakni dengan terbentuknya zona bening antara 1,0 sampai 3,6 cm disekitar koloni bakteri. Hal ini membuktikan bahwa bakteri tersebut dapat menghasilkan enzim amilase ekstraseluler yang bersifat termostabil. Dari tabel 2 juga dapat dilihat bahwa dari 12 isolat bakteri asal sumber air panas penghasil enzim amilase termostabil, ternyata terdapat 6 isolat yang potensial menghasilkan enzim amilase, yakni isolat AT-2, AT-5, AT-6, AT-8, AT-10 dan AT-12 dengan isolat AT-5 mempunyai zona bening yang paling besar (3,6 cm). Adanya perbedaan zona bening dari masing isolat hal ini disebabkan jumlah dan aktivitas enzim dari masing-masing isolat yang disekresikan pada medium berbeda. Aktivitas enzim tersebut ditentukan oleh konsentrasi enzim, konformasi enzim, urutan asam amino pembentuk enzim dan macam asam amino pembentuk enzim.

## 3. Aktivitas enzim amilase termostabil dari bakteri asal sumber air panas

Aktivitas enzim amilase termostabil dari masing isolat bakteri asal sumber air panas yang potensial dapat dilihat pada tabel 3. Aktivitas enzim amilase termostabil dari masing isolat bakteri yang potensial berkisar antara 40,2 sampai dengan 102,0 unit/ml. Isolat bakteri AT-5 yang diisolasi dari sumber air panas Rimbo Panti mempunyai aktivitas tertinggi, sebesar 102,0 unit/ml.

## 4. Karakterisasi enzim amilase termostabil dari bakteri asal sumber air panas

Karakterisasi enzim amilase termostabil dari masing-masing isolat dapat dilihat pada tabel 4, 5 dan 6. Dari tabel 4 dapat dilihat bahwa kondisi pH optimum enzim amilase termostabil dari masing isolat, kondisi optimum pH ini ditentukan berdasarkan pada pH berapa aktivitas enzim tersebut yang

tertinggi. Isolat AT-2, AT-5 dan AT-6 mempunyai pH optimum pada pH 5, sedangkan isolat AT-8 pH optimumnya 6,0 dan isolat AT-10 dan AT-12 menghasilkan enzim amilase termostabil yang mempunyai pH optimum pada pH 7. Dari tabel dapat dilihat enzim termostabil mempunyai aktivitas pada pH 5, 6 dan 7; tetapi pada pH 8, enzim mempunyai aktivitas yang sangat kecil. Hal ini disebabkan pada pH yang terlalu basa akan mempengaruhi sisi aktif enzim yang terdiri atas asam-asam amino sehingga enzim menjadi kurang aktif untuk menghidrolisis ikatan pada molekul pati menjadi monosakarida.

Dari tabel 5, dapat dilihat pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim amilase dari masing isolat bakteri, dimana isolat AT-2, AT-5 dan AT-6 mempunyai aktivitas enzim yang tertinggi pada suhu 60° C, yakni masing-masing 30,5; 102,0 dan 71,8 unit/ml. Sehingga suhu optimum dari enzim amilase termostabil dari isolat AT-2, AT-5 dan AT-6 adalah 60° C. Sedangkan suhu optimum enzim amilase termostabil dari isolat AT-8, AT-10 dan AT-12 adalah pada suhu 50° C. Dari tabel juga dapat dilihat bahwa enzim termostabil dari seluruh isolat mempunyai aktivitas enzim yang sangat kecil pada suhu 90° C. Hal ini disebabkan pada suhu tersebut enzim sudah kurang aktif, kemungkinan enzim yang merupakan protein telah mengalami denaturasi.

Dari tabel 6 dapat dilihat bahwa pengaruh waktu interaksi enzim-substrat terhadap aktivitas enzim amilase dari masing isolat bakteri, dimana isolat AT-2, AT-5, AT-6, AT-8, AT-10 dan AT-12 mempunyai aktivitas enzim yang tertinggi pada waktu interaksi enzim-substrat selama 60 menit. Sehingga waktu interaksi enzim-substrat optimum dari enzim amilase termostabil dari semua isolat adalah 60 menit. Dari tabel juga dapat dilihat bahwa waktu interaksi enzim-substrat diatas dan dibawah 60 menit aktivitas enzim mengalami penurunan, hal ini berarti sebelum dan setelah 60 menit kemungkinan dari hasil kerja enzim, produk yang terbentuk sedikit sekali ataupun sudah tidak ada lagi produk yang dihasilkan.



## E. KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan :

1. Diperoleh 12 isolat bakteri asal sumber air panas Rimbo Panti dan Kili-kili yang menghasilkan enzim amilase termostabil dengan 6 isolat yang potensial
2. Isolat bakteri AT-5 mempunyai zona bening terbesar (3,6 cm) dan Aktivitas enzim tertinggi (102,0 unit/ml)
3. Karakterisasi enzim dari isolat AT-2, AT-5 dan AT-6 adalah : pH 5, suhu 60° C dan waktu interaksi E-S selama 60 menit. Sedangkan isolat AT-8 karakterisasi enzimnya pada pH 6,0; suhu 50° C dan interaksi E-S selama 60 menit dan isolat AT-10 dan AT-12 karakterisasi enzimnya pada pH 7,0; suhu 50° C dan interaksi E-S selama 60 menit.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adam, M.W.W dan R.M. Kelly, 1995, Enzymes from organism in extreme environments. *Chem. Eng. News.*, 32-42
- Antranikian, G., 1992, Microbial degradation of starch. In Winkelmann, Microbial degradation of natural products. VCH Publisher, New York
- Edwards, C., 1990, Thermophiles in: Microbiology of extreme environments. Graw Hill Publ. Company.
- Fogarty, W.M., 1983, Microbial enzymes and biotechnology, Appl. Science. Publ. London
- Madigan, M.T; J.M. Martinko and J. Parker. Biology of Microorganisms. Eighth edition. Prentice Hall International, Inc. 2000