

**PRODUKSI DAN KARAKTERISASI ENZIM AMILASE
DARI *Bacillus amyloliquefaciens*, Fukumoto
PADA SUBSTRAT TAPIOKA**

TESIS

**Oleh :
MEILI HAYATI
06207055**



**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS ANDALAS
2008**

PRODUKSI DAN KARAKTERISASI ENZIM AMILASE DARI *Bacillus amyloliquefaciens* Fukumoto PADA SUBSTRAT TAPIOKA

**OLEH
MEILI HAYATI**

(Dibawah Bimbingan Abdi Dharma dan Periadnadi)

RINGKASAN

Bacillus amyloliquefaciens berasal dari dalam tanah yang ditemukan oleh seorang ahli dari Jepang bernama Fukumoto (1943) *Bacillus amyloliquefaciens* merupakan bakteri yang dapat menghasilkan berbagai jenis enzim yang dapat menguraikan zat makanan seperti karbohidrat, lemak dan protein menjadi senyawa yang lebih sederhana.

Salah satu enzim yang dihasilkan oleh *Bacillus* ini adalah enzim α -amilase yang digunakan untuk menghidrolisis pati atau amilum menjadi glukosa. Amilase ada tiga macam yaitu ; α -amilase, β -amilase dan glukoamilase, yang digunakan dalam skala yang luas dan diaplikasikan dibidang industri. Ketiga enzim tersebut merupakan dasar dalam proses industri pati yang menghasilkan gula, sirup, dan dekstrin. Hasil hidrolisisnya digunakan dalam industri produk makanan dan minuman.

Pada penelitian ini *Bacillus amyloliquefaciens* yang digunakan adalah *Bacillus* yang diisolasi oleh Wizna (2007) dari sarasah hutan gambut Pesisir Selatan dan Lembah Anai. Aktifitas enzim amilase dari *Bacillus* yang telah diisolasi ini belum diteliti aktivitasnya. Oleh sebab itu dalam penelitian ini diusahakan memproduksi enzim amilase dari *Bacillus amyloliquefaciens*, sekaligus melihat kemampuan

amilolitik dan kondisi optimum aktivitasnya antara lain yang diamati: kondisi pH, suhu, waktu inkubasi dan konsentrasi substrat. Jadi penelitian ini bertujuan untuk: menentukan kondisi optimum produksi dengan fermentasi tapioka oleh enzim amilase dari *Bacillus amyloliquefaciens*; menentukan kondisi optimum aktivitas enzim amilase (pH, suhu, waktu inkubasi dan konsentrasi substrat) dari *Bacillus amyloliquefaciens*; dan menentukan kemampuan amilolitik enzim amilase *Bacillus*.

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Unand dan Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Unand dari bulan Mei 2007 sampai Maret 2008. Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah biakan murni *Bacillus amyloliquefaciens* yang diperoleh dari laboratorium Teknologi Industri Pakan Faterna Unand, media nutrisi agar (NA), bufer pospat, reagen Nelson, reagen Lowry, glukosa standart, BSA standart, tapioka, larutan pospomolibdat, indikator lugol. Sedangkan alat yang digunakan adalah, Spectronic merk Genesis, vortex, inkubator, waterbath, coloni counter, neraca, sentrifuse, termometer, magnetik stirer, pH meter, autoclave, dan alat-alat dari gelas seperti petridisk, testube, pipet mikro, Erlenmeyer, gelas kimia, jarum ose.

Percobaan dimulai dari persiapan penelitian yaitu membuat reagen, antara lain; bufer pospat, reagen Nelson, larutan pospomolibdat, larutan standar glukosa, standar protein, reagen Lowry dan membuat medium miring. Dilanjutkan dengan penelitian pendahuluan atau prapenelitian, mempersiapkan substrat tapioka, menentukan konsentrasi substrat yang cocok untuk media tumbuh, dan didapatkan konsentrasi 2% b/v yang digunakan untuk media fermentasi. Kemudian dilanjutkan dengan perbanyakan *Bacillus amyloliquefaciens* dengan cara kultur murni *Bacillus*

amyloliquefaciens (didapat dari Wizna) serta diperbanyak dengan menanamkan pada media miring dan diinkubasi selama 48 jam, seterusnya dilakukan identifikasi aktifitas amilolitik dari *Bacillus amyloliquefaciens* dengan cara menggoreskan pada media pati agar yang sudah padat dan terdapat dalam petridish, kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Setelah 48 jam ditetesi dengan indikator lugol, setelah diamati ternyata terbentuk zona bening pada daerah yang digoreskan *Bacillus amyloliquefaciens*, hal ini menunjukkan terjadinya hidrolisis pati oleh enzim amilase *Bacillus amyloliquefaciens*.

Penelitian utama dimulai dengan perbanyakkan *Bacillus amyloliquefaciens* pada media miring sebanyak 30 buah testube. Optimasi pertumbuhan *Bacillus amyloliquefaciens* pada substrat tapioka dirancang dengan pola faktorial (3 x 2) dengan masing –masing perlakuan : faktor A (pH), 5,0; 5,5; dan 6,0; faktor B (suhu), suhu kamar dan suhu 40°C.

Kombinasi setiap perlakuan A1B1, A1B2, A2B1, A2B2, A3B1, dan A3B2 dilakukan tiga kali ulangan. Kedalam setiap botol perlakuan masing–masing ditambahkan 1 mL *Bacillus amyloliquefaciens* yang sudah disiapkan sebelumnya yang diperoleh dari laboratorium Teknologi Industri Pangan Faterna Unand dan diinkubasi selama 8 hari, setiap hari masing–masing perlakuan dilakukan pencuplikan untuk keperluan uji aktifitas dan untuk menghitung pertumbuhan populasi setiap hari dilakukan penanaman pada petridis dalam medium NA, dan setiap dua hari setelah penanaman populasi dihitung.

Tahap berikutnya dilakukan ekstraksi enzim amilase dengan jalan menyaring supernatan medium yang telah disentrifuse terlebih dahulu pada kecepatan 5000 rpm

selama 10 menit dengan kertas saring Whatman no 42. Untuk mempertahankan aktifitas enzim pekerjaan dilakukan dalam suasana dingin yaitu suhu 4°C, filtrat yang diperoleh adalah ekstrak kasar enzim amilase *Bacillus amyloliquefaciens*. Kemudian enzim yang didapat ini diuji aktifitasnya dengan mengukur gula hasil reaksi secara metoda Somogy Nelson dan kadar protein terlarut diuji dengan metode Lowry.

Dari hasil uji aktifitas ternyata diperoleh aktifitas enzim tertinggi adalah pada hari ketujuh pada kombinasi perlakuan A1B2 yaitu sebesar 0,0717 unit /ml dan aktifitas spesifik sebesar 6,6367 unit /mg protein. Dari hasil uji karakter enzim diperoleh kondisi optimum pada pH 6.0, suhu 45°C, waktu inkubasi 20 menit serta konsentrasi substrat 4,0 % b/v.

Pada bahagian akhir penelitian ini, aktifitas enzim selulase dan xylanase yang dihasilkan dari *Bacillus amyloliquefaciens* dengan substrat tapioka diuji dengan menggunakan substrat CMC dan xylan murni.

Ternyata hasil reaksi memperlihatkan adanya gula reduksi dengan metoda Somogy Nelson didapatkan nilai absorban 0,180 pada substrat CMC dan 0,254 untuk substrat xylan murni yang diukur menggunakan alat spektronik artinya *Bacillus amyloliquefaciens* juga menghasilkan enzim selulase dan xylanase walaupun aktifitas yang dihasilkan relatif kecil dibandingkan dengan jika diproduksi dengan substrat CMC dan xylan murni.

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Enzim merupakan molekul protein yang dihasilkan oleh sel hidup dan digunakan oleh sel-sel tersebut untuk mengkatalis reaksi biokimia secara spesifik. Sebagai katalisator biologis enzim mampu melakukan perubahan-perubahan sesuai dengan spesifikasi dan kondisi substrat yang akan dirombaknya. Dalam melakukan aktivitas enzim akan bekerja secara maksimum apabila kondisi proses berlangsung secara optimum antara lain, konsentrasi substrat, pH reaksi, suhu dan lain-lain. Dewasa ini enzim sudah banyak dimanfaatkan untuk berbagai keperluan komersial di dalam industri, karena efisiensi kerja yang tinggi dan dapat dihasilkan dari berbagai sumber dengan biaya yang lebih rendah karena dapat diproduksi dalam waktu cepat dan jumlah yang dapat dikendalikan.

Enzim amilase merupakan enzim yang dapat menghidrolisis makromolekul karbohidrat amilum menjadi produk yang lebih sederhana dan dapat dimanfaatkan untuk berbagai keperluan misalnya dapat menghidrolisis sumber pati / amilum menjadi bentuk yang lebih sederhana seperti glukosa. Sehingga enzim ini banyak digunakan untuk menghasilkan high glukosa atau fruktosa syrup atau dalam berbagai industri alkohol dan lain-lain.

Sejak tahun 70'an, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) telah menyadari, bahwa enzim akan memegang peranan penting dalam industri. Enzim adalah protein tidak beracun namun mampu mempercepat laju reaksi kimia dalam suhu dan derajat keasaman yang rendah. Produk yang dihasilkannya sangat spesifik sehingga dapat diperhitungkan dengan mudah. Enzim menjadi primadona

industri saat ini dan di masa yang akan datang karena melalui penggunaannya, energi dapat dihemat dan akrab dengan lingkungan. Saat ini penggunaan enzim dalam industri makanan dan minuman, industri tekstil, industri kulit dan kertas di Indonesia semakin meningkat. Dilaporkan, enzim amilase yang digunakan dalam industri tekstil di Bandung, jumlahnya tidak kurang dari 4 ton per bulan atau sekitar 2 – 3 juta dolar Amerika setiap bulannya dan semuanya diimpor.

Untuk menghasilkan enzim-enzim dengan spesifikasi tertentu dapat diproduksi dari berbagai sumber. Salah satu sumber enzim yang banyak dieksplorasi adalah yang berasal dari mikroba. Penggunaan mikroba ini banyak diusahakan karena mempunyai keunggulan kompetitif yaitu dapat diproduksi dalam waktu yang cepat dan dapat dikendalikan produksinya sesuai keperluan. Misalnya untuk menghasilkan enzim amilase dapat berasal dari golongan *Bacillus* dan *Aspergillus*, seperti *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* serta *Aspergillus niger* dan *Aspergillus orizae*.

Bacillus amyloliquefaciens dapat menghasilkan berbagai macam enzim seperti alfa amilase, selulase, hemiselulase, protease, urease, xylanase, dan khitinase (Wizna 2007). *B. amyloliquefaciens* ini telah ditemukan oleh Wizna (2007) dari **sarasah**, namun proses produksi serta kinerja optimum enzim yang dihasilkan belum dikenali, sehingga dalam penelitian ini penulis melakukan produksi enzim amilase dengan memanfaatkan inokulum *B. amyloliquefaciens* yang bersumber dari Wizna (2007) dan sekaligus menentukan kondisi optimum kinerja enzim yang dihasilkan dengan menggunakan substrat pati.

1.2. Perumusan Masalah

1. Bagaimana kondisi optimum produksi amilase dengan fermentasi amilum oleh *Bacillus amyloliquefaciens*.
2. Bagaimanakah kondisi pH optimum, suhu, waktu inkubasi dan konsentrasi substrat optimum dari enzim amilase yang dihasilkan *Bacillus amyloliquefaciens* pada substrat tapioka.
3. Apakah *Bacillus amyloliquefaciens* menghasilkan enzim selulase dan xylanase didalam substrat tapioka.

1.3. Tujuan dan Manfaat Penelitian:

1.3.1. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Menentukan kondisi optimum fermentasi produksi enzim amilase dari *Bacillus amyloliquefaciens*, pada pH, suhu dan lama fermentasi.
2. Menentukan kondisi optimum aktifitas enzim amilase yang dihasilkan diantaranya: pH, suhu, waktu inkubasi, dan konsentrasi substrat.
3. Menentukan kemampuan *Bacillus amyloliquefaciens* untuk memproduksi enzim selulase dan xylanase dengan menggunakan substrat tapioka.

1.3.2. Manfaat Penelitian

1. Diketuainya cara memproduksi dan karakteristik enzim amilase yang dihasilkan dari *Bacillus amyloliquefaciens*
2. Diharapkan enzim ini dapat diaplikasikan dalam mengolah bahan sumber karbohidrat.
3. Dapat dimanfaatkan dalam berbagai industri pengolahan karbohidrat menjadi produk seperti: alkohol, HFS/HGS, dan lainnya.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa *Bacillus amyloliquefaciens* isolat sarasah Lembah Anai dapat menghasilkan enzim amilase pada substrat tapioka. Pertumbuhan populasi maksimum *Bacillus amyloliquefaciens* diperoleh pada hari ke-6 fermentasi dengan pH 6,0 dan suhu pertumbuhan 37°C. Produksi enzim amilase optimum diperoleh pada hari ke-7 pada pH awal 5,0 dan suhu 40°C (A₁B₂).

Kondisi optimum aktivitas enzim amilase *Bacillus amyloliquefaciens* pada substrat tapioka diketahui: pH 6,0; suhu 45°C; waktu 20 menit dan konsentrasi substrat 4,0 % (b/v). Dari hasil perhitungan didapatkan nilai K_m 0,148 (mg/mL) dan nilai V_{maks} 0,0178 (mg/mL/menit).

Aktifitas optimum enzim amilase yang dihasilkan diperoleh 0,0717 Unit/mL dan aktivitas spesifik 6,6367 Unit/mg protein.

Dari hasil uji aktivitas selulase dan xylanase pada substrat tapioka, ternyata *Bacillus amyloliquefaciens* juga dapat menghasilkan enzim selulase dan xylanase dengan nilai aktivitas 0,016 Unit/mL dan aktivitas spesifik 0,0066 Unit/mg protein untuk selulase serta 0,0229 Unit/mL dan 0,00141 Unit/mg protein untuk xylanase.

5.2 Saran

Dengan diketahuinya kemampuan *Bacillus amyloliquefaciens* dapat menghasilkan enzim amilase serta karakteristik enzim yang dihasilkan, maka perlu diteliti/dikembangkan lebih lanjut untuk memproduksi, ekstraksi dan purifikasi enzim amilase dalam bentuk murni agar dapat dimanfaatkan pada keperluan yang lebih luas.

DAFTAR PUSTAKA

- Alberts. B, D.Bray. J.Lewis, M.Raff, K.Roberts,and J.D. Watwon. 1994. Molecular Biology of the Cell. Penerbit PT. Gramedia. Jakarta.
- Anwaralikhham. F.A.B, Awang. A.S, Awang. H. 2006. Biotechnology. Faculty of Resource and Technology University Malaysia Sarawak. Sarawak Malaysia.
- Bahagiawati. 2005. Isolasi dan Purifikasi Inhibitor Alfamilase dari Biji Kacang *Phaseolusvulgaris*. Jurnal Agrobiogen. Volume1.
- Belk.C, V. Borden. 1989. Biology Science for Live. Second Edition. University of Minnesota. Duluth.
- Bohinsky. R.C. 1987.Modern Concept in Biochemistry. Fifth Edition. London.
- Boyer. R, J. Wiley and Son. 2002. Concept in Biochemistry. Second Edition .New York..
- Boyer. R.F. 1993. Modern Experiment Biochemistry. 2 nd Edition. Benjamin Cumming. Redwood City.
- Case. C.L. T.R. Johnson. 2004. Laboratory Experiments In Microbiology. The Benjamin Cumming Publishing Company.Inc. London.
- Cristopher, K. Mathews, K.E.V. Holde, Kevin, G. Ahern. 1999. Biochemistri. Third Edition. Oregon State University.
- D.W. Martin. Jr. P.A. Mayes, V.W. Rodwell. 2000. Biokimia. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Fardiaz. S. 1983. Keamanan Pangan. Jurusan Ilmu dan teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Fardiaz. S. 1988. Fisiologi Fermentasi. Pusat Antar Universitas. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Fennema. O.R. 1985. Food Chemistry. New York and Basel.
- Hein. M, L.R. Best, S. Pattisaon, S. Arena. 1995. Introduction to Organic and Biochemistry. Books Cole Publishing Company Pacific Grove. California.
- Helianti, Is. 2006. *Katalase Ultrastabil Untuk Penguraian Limbah Bleaching*. Artikel Iptek – Bidang Biologi, Pangan, dan Kesehatan
- Hutagalung. H. 2004. Karbohidrat. Bagian Ilmu Gizi. Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara. Medan

[Http://www.Associated Content. Com/Pop-print.shtm](http://www.Associated Content. Com/Pop-print.shtm). 2007. The Effect of Temperatur on Amilase Activity.

http://www.science.smith.edu/departments/Biochem/Biochem_353/amylase.html

Kiram. O, U. Comiekclogh, B. Arikani. 2005. Effects of Carbon Spources and Various Chemicals on the Production of Novel Amylase From Thermophilic Bacillus. Turk Journal Biology. 29 (2005) 99-103. Turkey.

Marniati Salim, Abdi Dharma, Yopi Satika. 2000. *AKTIVITAS EKSO-GLUKOAMILASE DARI MUTAN Aspergillus niger LYD85 DENGAN SUBSTRAT AMPAS TAPIOKA, AMPAS TAHU DAN SAGU*. Jurnal Kimia Andalas : Padang

Murray. R.K, Gramer, D.K. Mayes, P.A. Rodwell, VW. 1999. Biokimia Harper Edisi ke 24. Terjemahan A Hartono. Penerbit Buku Kedokteran : Jakarta.

Page. D.S. R. Soendoro. 1985. Prinsip-prinsip Biokimia. Penerbit Erlangga. Jakarta.

Purkan. 2005. *UPAYA PENINGKATAN TRANSLOKASI AMILASE KE LINGKUNGAN EKSTRASELULER SELAMA PROSES FERMENTASI Endomy copsis fibuligera*. Faculty of Mathematics and Natural Science Airlangga University : Surabaya

Richana, Nur. 2005. *Produksi Enzim Alfa-Amilase dari Mikroorganisme*. Balai Penelitian Tanaman Pangan : Bogor

Ristanto. D.W. 1988. Petunjuk Khusus Deteksi Mikroba Pangan. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.

Supartini, Meila. 1995. Aktifitas Enzim Amilase dari Jamur *Aspergillus orizae* L 24 pada Media Padat Limbah Tapioka. Institut Teknologi Bandung : Bandung.

Winarno. F.G. 1983. Enzim Pangan. Penerbit PT. Gramedia : Jakarta.

Wizna. 2007. Potensi Amyloliguefacilus Selulolitik Sarasah Hutan dalam Peningkatan Kualitas Pakan Campuran Empelur sagu dan Isi Rumen dan Implikasinya terhadap Produktivitas Ternak Unggas. Disertasi. Program Pascasarjana, Universitas Andalas. Padang.