

PRODUKSI ENZIM AMILOLITIK DARI *Bacillus megaterium* MENGGUNAKAN VARIASI KADAR PATI SAGU (*Metroxylon sp.*)

Sandra Madonna*

Program Studi Teknik Lingkungan, Universitas Bakrie, Jakarta

*Corresponding author: s_ramadonna@yahoo.com

Abstract

The application of enzymes as biocatalysts for the industries in Indonesia has increased. Among the enzymes that are needed in Indonesia, one of which amylolytic enzymes. Amylolytic enzymes constitute a group of enzymes that catalyze the hydrolysis of starch into simple sugars consisting of glucose units. In this study amylolytic enzyme isolated from the bacterium *Bacillus megaterium*. Enzyme production was submerged fermentation method for 14 hours using sago starch *Metroxylon sp.* varies. Measurement of enzyme activity was determined by the method amylolytik Somogy-Nelson. Research results showed that 2 % (w/v) of sago starch is the optimum concentration in media with highest amylolytic enzyme activity that is equal to 0.076 units/ml and sugar medium formed by 181.254 ug/ml in the fermentation medium.

Keywords: Amylolytic enzymes, *Bacillus megaterium*, enzyme activity, fermentation, sago starch

PENDAHULUAN

Aplikasi enzim amilolitik sebagai biokatalis mulai meningkat sejak beberapa tahun terakhir. Enzim amilolitik secara umum dikenal sebagai enzim-enzim yang mengkatalis suatu reaksi hidrolisis pati menjadi dextrin dan gula-gula sederhana yang terdiri dari unit-unit glukosa (Mhathre & Windish, 1965). Saat ini enzim amilolitik memegang banyak peranan dalam berbagai industri, seperti industri gula, minuman, perekat, tekstil, farmasi dan detergen (Doi & Martina, 1992). Enzim amilolitik telah lama menggeser peran asam dalam industri pengolahan pati sebab dirasakan lebih menguntungkan (Barfoed, 1976; Underkofler *et al.*, 1965 *cit.* Forgarthy, 1983).

Sampai saat ini kebutuhan enzim di Indonesia masih 99% tergantung dari import (Kemenristek, 2013). Enzim yang banyak dibutuhkan di Indonesia khususnya enzim penghidrolisa pati, antara lain; alpha amilase, glukamilase dan glukosa isomerase (Prayitno, *et al.*, 1994).

Enzim dapat diisolasi dari hewan, tumbuhan dan mikroorganisme seperti bakteri, jamur dan kapang. Enzim mikroba sangat banyak digunakan dalam industri yaitu sekitar

80% dari total industri enzim (Dordick, 1991). Enzim mikroba mempunyai beberapa kelebihan diantaranya yaitu dapat diproduksi dalam jumlah besar dan produktifitasnya lebih mudah ditingkatkan (Stanbury & Whitaker, 1984).

Bakteri dari genus *Bacillus* paling banyak digunakan untuk memproduksi enzim-enzim hidrolase dalam jumlah besar. *Bacillus megaterium* adalah salah satu dari sejumlah besar *Bacillus* yang memegang peran sangat baik bagi produksi industri enzim, dan bahan kimia lain seperti amilase, vitamin B₁₂, Penicilin amidase, dan glukosa dehidrogenase. *B. megaterium* dapat tumbuh pada substrat yang sederhana dan tidak bersifat patogen, menghasilkan enzim ekstraselluler sehingga berpotensi untuk digunakan dalam produksi amilase (Doi & Martina, 1992). Enzim yang diproduksi dalam skala industri hampir sebagian besar merupakan enzim ekstraselluler. Isolasi enzim ekstraselluler jauh lebih mudah daripada enzim intraselluler (Wang *et al.*, 1979).

Substrat yang digunakan dalam proses fermentasi berpengaruh terhadap produktifitas enzim. Adanya substrat tertentu di medium fermentasi dapat menginduksi mikroorganis-

me untuk mengsekresikan metabolitnya (Boing, 1982). Pati adalah salah satu induktor (pemacu) untuk pembentukan enzim amilolitik, karena keberadaannya di dalam medium diharapkan akan menjadi pemacu peningkatan produksi enzim (Forst dan Moss, 1987; Wang *et al.*, 1979). Pemilihan jenis dan konsentrasi substrat akan menentukan sintesa enzim oleh mikroorganisme.

Sagu merupakan salah satu substrat yang potensial digunakan sebagai inducer enzim amilolitik dari bakteri. Potensi sagu di Indonesia merupakan yang terbesar di ASEAN, namun demikian saat ini pemanfaatannya khususnya pati sagu masih rendah. Peran Bioteknologi dalam pemanfaatan sagu nampak cerah di masa datang, penggunaan aktivitas Biologi (enzim) dapat mengubah pati sagu menjadi beberapa macam dextrin (cyclodextrin dan glukosa (Sa'id, 1993).

Indonesia kaya akan biodiversitas mikroba dan biomasa. Sebagai upaya pemanfaatan mikroba yang ada, maka telah dilakukan penelitian yang bertujuan untuk memproduksi enzim amilolitik dari bakteri *B. megaterium* dengan mengetahui konsentrasi optimum dari pati sagu sebagai substrat, mendapatkan waktu fermentasi dan kondisi lingkungan yang optimum yang menghasilkan aktifitas enzim amilolitik yang tertinggi di dalam media fermentasi.

MATERIAL DAN METODE

Penelitian dilakukan menggunakan metode eksperimen dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 7 perlakuan variasi konsentrasi pati sagu yaitu: 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% dan 6% (b/v) dengan 4 ulangan pada masing-masing perlakuan. Bahan yang digunakan adalah; biakan murni *B. megaterium* koleksi Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA UNAND, batang Sagu, Medium Czapek (NaNO₃, MgSO₄. 7 H₂O, KCl, FeSO₄), *Nutrient Agar* (NA), *soluble starch*, buffer sitrat 0,1 M pH 6, pereaksi Somogyi-Nelson, glukosa monohidrat, alkohol, spirtus, NaOH, HCl, akuades.

Alat yang digunakan adalah tabung reaksi, botol gelap, erlenmeyer, cawan petri,

beker glass, gelas ukur, pipet takar, mikro pipet, jarum ose, *coloni counter*, autoklaf, neraca analitik, termometer, *incubator shaker*, sentrifus, Spectrofotometer (Spectronik 20), pH meter, mikroskop dan *freezer*.

Isolasi Pati Sagu

Empelur sagu sebanyak 300 g dilarutkan dengan 200 ml akuades kemudian dihaluskan menggunakan blender. Larutan yang jenuh didekantasi, kemudian sisanya ditambahkan dengan etanol 95 % lalu disaring. Pati yang didapat dikeringkan pada suhu kamar (Arbianto, 1990).

Pembuatan Medium Fermentasi

Medium yang digunakan dalam fermentasi adalah medium Czapek dengan komposisi 3 g NaNO₃, 1 g K₂HPO₄, 0,5 g MgSO₄.7 H₂O, 0,5 g KCl dan 0,01 FeSO₄ (Atlas, 1993) dengan konsentrasi pati sagu bervariasi sesuai dengan perlakuan yaitu 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4% 5% dan 6% (b/v) dalam 1 liter akuades. Kemudian medium disterilkan menggunakan autoklaf pada 121°C tekanan 15 lbs selama 15 menit.

Penyediaan Inokulum

Sebanyak 2 ose *Bacillus megaterium* dari biakan murni diinokulasikan ke dalam 50 ml kultur media, kemudian diinkubasikan pada inkubator shaker dengan kecepatan 180 rpm selama 14 jam pada suhu kamar.

Penentuan waktu fermentasi

Waktu fermentasi ditentukan berdasarkan kurva pertumbuhan *Bacillus megaterium*. Pembuatan kurva pertumbuhan berdasarkan perhitungan total koloni menggunakan metode *plate count* dan pengukuran *Optical Density* (OD) dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm. Sampling dan pengukuran dilakukan setiap 2 jam selama 24 jam. Sementara itu juga setiap 2 jam dilakukan pengukuran aktifitas enzim amilolitik.

Fermentasi

Fermentasi dilakukan dengan konsentrasi dosis inokulum sebesar 3% (v/v) dan konsentrasi pati sagu yang bervariasi sesuai dengan perlakuan yaitu 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4% 5% dan 6% (b/v), kemudian diinkubasikan pada inkubator shaker dengan kece-

patan 180 rpm pada suhu kamar, selama 14 jam (penetapan waktu panen, berdasarkan kurva pertumbuhan). Pada akhir fermentasi dilakukan pengujian aktifitas enzim amilolitik, konsentrasi gula media, total koloni bakteri dan pH media setelah fermentasi.

Isolasi Enzim

Larutan crude enzim dari media fermentasi diisolasi secara sentrifugasi dengan kecepatan 4500 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Kemudian supernatan yang terbentuk disimpan pada botol vial di dalam freezer untuk kemudian diukur aktivitas enzim amilolitik.

Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Dibuat larutan baku atau stok glukosa 1000 µg/ml, kemudian dibuat variasi kadar glukosa dengan metode pengenceran: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, dan 100 µg/ml. Masing-masing konsentrasi glukosa ditentukan absorbansi gula pereduksinya dengan metoda Somogyi-Nelson.

Penentuan Aktivitas Enzim Amilolitik

Larutan Pati 1% (b/v) sebanyak 1 ml dimasukkan kedalam tabung reaksi dan diinkubasi (prainkubasi) pada suhu 50°C selama 10 menit, lalu dimasukkan 0,1 ml ekstrak kasar enzim kemudian diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit, kemudian dipanaskan menggunakan penangas air pada suhu 100°C selama 15 menit. Selanjutnya campuran tersebut ditentukan kadar gulanya dengan metoda Somogyi-Nelson, dengan cara 1 ml campuran larutan tersebut ditambah pereaksi Somogyi 1 ml, kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 15 menit, lalu didinginkan dan ditambahkan 1 ml reagen Nelson dan akuades sebanyak 6,9 ml lalu dikocok dengan *vortex*. Setelah itu diukur serapan cahayanya dengan Spektrofotometer (Spectronik 20) pada panjang gelombang 660 nm. Untuk blanko caranya sama dengan perlakuan sampel, hanya pada blanko ekstrak kasar enzim yang digunakan terlebih dahulu dinonaktifkan dengan cara memanaskannya pada suhu 100°C selama 10 menit. Aktivitas enzim didapat dengan cara mengkonversikan absorbansi sampel dengan kurva standar glukosa. Satu unit aktivitas enzim meng-

andung pengertian jumlah enzim yang mampu mengkatalis perubahan satu mikromol substrat permenit (Ward, 1983)

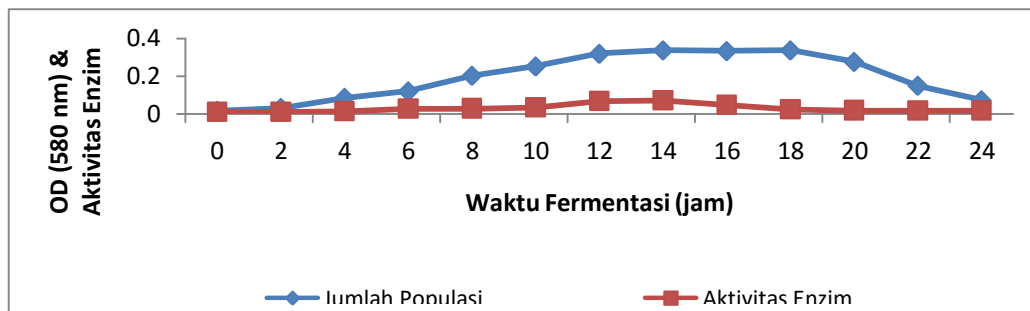
Analisis data dilakukan terhadap aktivitas enzim amilolitik pada masing-masing perlakuan dengan perbedaan kadar pati sagu, untuk mengetahui kadar pati sagu yang optimum dalam produksi enzim amilolitik dari *B. megaterium*, kadar gula media, jumlah populasi *B. megaterium* dan pH medium setelah fermentasi, apabila terdapat perbedaan yang nyata maka dilanjutkan dengan uji beda rata-rata menurut DMNRT pada taraf 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Waktu Fermentasi

Waktu fermentasi yang terbaik bagi *B. megaterium* dalam memproduksi enzim amilolitik adalah 14 jam berdasarkan kurva pertumbuhan. Kurva pertumbuhan dan aktivitas enzim amilolitik dapat digambarkan seperti Gambar 1. Dari Gambar 1 diketahui bahwa pertumbuhan *B. megaterium* terdiri atas fase lag atau fase adaptasi pada 0-2 jam pertama, selanjutnya diikuti oleh fase logaritmik antara 2-14 jam. Pada fase logaritmik ini pertumbuhan *B. Megaterium* meningkat dengan cepat, lalu diikuti dengan fase stasioner setelah 14 jam fermentasi, dan fase kematian terjadi setelah 18 jam fermentasi.

Aktivitas enzim amilolitik tertinggi yaitu sebesar 0,072 unit/ml dihasilkan pada 14 jam waktu fermentasi. Pada 14 jam waktu pertumbuhan ini *B. megaterium* berada pada akhir fase pertumbuhan logaritmik dan memasuki awal fase pertumbuhan stasioner. Pertumbuhan ini *B. megaterium* berada pada akhir fase pertumbuhan logaritmik dan memasuki awal fase pertumbuhan stasioner. Menurut Mhatre & Windish (1965) bahwa produksi amilase maksimum pada bakteri mesofil terjadi setelah populasi bakteri mencapai titik fase stasioner. Selanjutnya waktu fermentasi yang didapat digunakan untuk tahap penelitian berikutnya guna mengetahui kadar pati yang optimum terhadap produksi enzim amilolitik oleh *B. megaterium*.

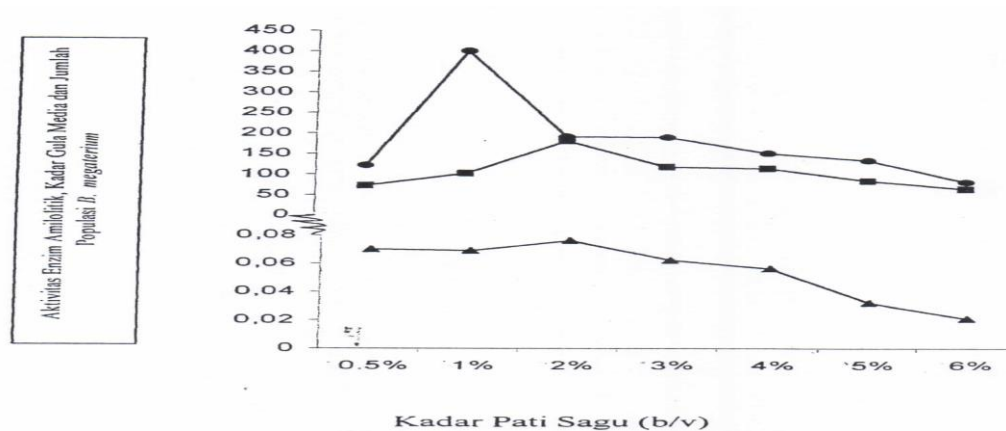


Gambar 1. Kurva pertumbuhan *Bacillus megaterium* dan aktivitas enzim amilolitik

Tabel 1. Rata-rata populasi *B. megaterium*, aktivitas enzim amilolitik, kadar gula media dan pH akhir media setelah 14 jam fermentasi

Perlakuan	Jumlah Populasi (x 10 ⁶) sel/ml	Aktivitas Enzim Amilolitik (unit/ml)	Kadar Gula Media (µg/ml)	pH akhir fermentasi
A (0,5% b/v)	122 ^{cd}	0,070 ^a	72,745 ^e	6,8 ^a
B (1% b/v)	401 ^a	0,069 ^a	102,515 ^c	6,8 ^a
C (2% b/v)	192 ^b	0,076 ^a	181,254 ^a	6,8 ^a
D (3% b/v)	190 ^b	0,062 ^{bc}	117,494 ^b	6,5 ^b
E (4% b/v)	151 ^{bc}	0,056 ^c	114,097 ^b	6,8 ^a
F (5% b/v)	134 ^{bc}	0,032 ^d	84,032 ^d	6,7 ^a
G (6% b/v)	81 ^d	0,021 ^e	63,411 ^f	6,8 ^a

Keterangan : Angka-angka pada lajur yang diikuti huruf kecil yang sama tidak berbeda nyata pada taraf DNMRT 5%.



Gambar 2. Pengaruh kadar pati sagu terhadap jumlah populasi *Bacillus megaterium*, *B. megaterium*, aktivitas enzim dan kadar gula media

Fermentasi

Hasil pengamatan dan analisis statistik terhadap jumlah populasi *B. megaterium*, aktivitas enzim amilolitik, kadar gula media dan pH akhir media setelah 14 jam fermentasi dengan perlakuan penambahan kadar pati sagu di dalam media fermentasi tertera pada Tabel 1. Dari Tabel 1. dapat dilihat bahwa kadar pati sagu yang berbeda di dalam media fermentasi memberikan pengaruh yang sangat nyata terhadap jumlah populasi *B. megaterium* pada masing-masing perlakuan. Populasi *B. megaterium* tertinggi terjadi pada medium dengan kadar pati 1% (b/v) dengan jumlah rata-rata populasi $401 (x10^6)$ sel/ml. Tingginya populasi pada medium dengan kadar pati sagu 1% diduga karena pada medium fermentasi tersebut telah cukup merangsang pertumbuhan *B. megaterium*. Pati sagu dalam medium fermentasi berperan sebagai sumber karbon dan energi bagi pertumbuhan *B. megaterium*. Menurut Cooney (1981) bahwa konsentrasi sumber karbon sangat berpengaruh terhadap laju pertumbuhan sel-sel mikroorganisme yang berarti pula turut mempengaruhi laju produksi enzim ekstrasellularnya.

Pada Gambar 2 terlihat bahwa aktivitas enzim amilolitik tertinggi yaitu sebesar 0,076 (unit/ml) terdapat pada perlakuan C yaitu medium fermentasi dengan kadar pati sagu 2% (b/v), yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan A kadar pati sagu 0,5% (b/v) dan perlakuan B kadar pati sagu 1% (b/v). Aktivitas enzim amilolitik semakin menurun pada kadar pati sagu diatas 2% (b/v) di dalam medium fermentasi. Kadar pati sagu 2% (b/v) di dalam medium fermentasi telah mampu menginduksi sintesa enzim amilolitik yang maksimum dari *B. megaterium* dengan aktivitas enzim yang tertinggi.

Dari Tabel 1 dapat dilihat bahwa pengaruh kadar pati sagu terhadap gula media berbeda sangat nyata. Kadar gula media yang tertinggi dihasilkan pada perlakuan C yaitu pada medium dengan kadar pati sagu 2% (b/v) dengan jumlah sebesar 181,254 $\mu\text{g/ml}$, hal ini sejalan dengan aktivitas enzim amilolitik yang mempunyai nilai tertinggi

pada medium tersebut. pH medium pada masing-masing perlakuan pada akhir fermentasi mengalami penurunan sekitar 0,2-0,5 unit, penurunan pH ini disebabkan karena selama proses fermentasi terjadi pembentukan asam-asam organik oleh aktivitas enzim. Menurut Suhartono (1989), bahwa aktivitas enzim dan pertumbuhan mikroba seringkali menghasilkan produk yang dapat mengubah pH. Aktivitas sel sangat mempengaruhi pH medium, karena sel dan aktivitasnya akan menghasilkan asam-asam organik selama proses metabolisme karbohidrat dan sintesa enzim.

Hasil Penelitian pH media diduga tidak mempengaruhi aktivitas enzim amilolitik hal ini dikarenakan pH media masih berada dalam batas pH optimum bagi aktivitas enzim amilolitik dari *B. megaterium*, menurut Thomas (1980) *cit.* Winkelman (1982), bahwa pH optimum bagi aktivitas enzim amilolitik dari *Bacillus megaterium* berkisar antara pH 6,5–7. Sebagian besar enzim amilolitik aktif pada kondisi netral dan sedikit asam.

KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini menunjukkan bahwa; waktu fermentasi yang terbaik untuk menghasilkan enzim amilolitik dari *Bacillus megaterium* adalah 14 jam fermentasi dan kadar pati sagu 2% (b/v) merupakan kadar yang optimum dalam memproduksi enzim amilolitik karena dihasilkan aktivitas enzim yang tertinggi yaitu 0,076 unit/ml dengan kadar gula media rata-rata yang tertinggi yaitu 181,254 $\mu\text{g/ml}$.

UCAPAN TERIMA KASIH

Melalui tulisan ini Penulis menghaturkan terima kasih yang tak terhingga kepada Rachmawati S, MS (alm.) dan Dr. Rer. nat. Nilla Djuwita Abbas untuk ilmu dan bimbingan selama menuntut ilmu dan penelitian. Semoga menjadi amal ibadah bagi Ibu.

DAFTAR PUSTAKA

Arbianto. (1990). *Petunjuk Laboratorium Biokimia I Karbohidrat dan Lipid.*

- Bandung: Pusat Antar Universitas Bioteknologi ITB.
- Atlas, R. M. (1993). *Hand Book of Microbiological Media*. London and Tokyo: CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor.
- Boing, J. T. P. (1982). *Enzyme Production*. In Reed, G. (ed.) 1982. Prescott and Dunns's Industrial.
- Cooney, C. L. (1981). *Growth of Microorganisms. Biotechnology* 1. 82-84.
- Doi, R. H. & McGloulin, M. (1992). *Biology of Bacilli Application to Industry*. U.S.A.: Butterworth-Heinemann.
- Dordick, J. S. (1991). *Biocatalysts for Industry*. New York and London: Plenum Press.
- Forgarty, W. M. & Kelly, C. T. (1983). *Microbial α -Glucosidase. J Process Biochemistry*. 18(3). 6.
- Forst, G. M. & Moss, D. A. (1987). *Production of Enzyme by Fermentation*. In Rehm, H. J. And Reed, G. (eds). *Biotechnology* vol. 7a. Germany: Weinheim.
- Mhathre, N. S. & Windish, W. W. (1965). *Microbial Amylases*, p. 273-304. In Umbreit, W. W. (ed.) *Advances in Applied Microbiology*, Vol. 7. New York: Academic Press.
- Prayitno, N. R., Meliawati, R., Wiryasmita, & Sukara, E. (1994). *Peningkatan Proses Produksi Amiloglukosidase dengan Menggunakan Serbuk Inokulum Aspergillus sp. KT-11 pada Medium Singkong Parut Segar*. Hal. 340. Dalam Prosiding Hasil Penelitian dan Pengembangan Biotek II. Puslitbang LIPI. Bogor.
- Sa'id, E. G. (1993). *Peluang Pemanfaatan Pati Sagu dengan Bioteknologi dan Kajian Khusus Mengenai Perkaya Protein Bahan Berpati dengan Kultivasi Media Padat dalam Prosiding Simpo-sium Sagu Nasional 12-13 Oktober 1992*. Ambon
- Stanbury, P. F. and Whitaker. (1984). *Prince of Fermentation Technology*. Oxford: Pergamon Press, Ltd.
- Suhartono, M. T. (1989). *Enzim dan Bioteknologi*. Kerjasama Depdikbud DIKTI dengan PAU Biotek. Bogor: IPB.
- Wang, D. I. C. *et al.* (1979). *Fermentation and Enzyme Technology*. New York: Jhon Willey and Sons.
- Ward, O. P. (1983). *Proteinase*. In *Microbial Enzymes and Biotechnology*. London: W.M. Forgaty (ed). Applied Science Publishing.
- Winkelman, G. (1982). *Microbial Degredation of Natural Products*. VCH. Wein-heim. New York: Basel. Cambridge.
- <http://www.ristek.go.id/index.php/module/News+News/id/13897>. Diakses pada tanggal 25 Oktober 2013 Pukul 19.12.