

**LAPORAN PRAKTIKUM
MIKROB DAN POTENSINYA**

PRODUKSI ENZIM AMILASE



**KHAIRUL ANAM
P051090031/BTK**

**BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
2010**

PRODUKSI ENZIM AMILASE

Pendahuluan

Amilase merupakan enzim yang penting dalam bidang pangan dan bioteknologi. Amilase merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis pati menjadi gula-gula sederhana. Amilase mengubah karbohidrat yang merupakan polisakarida menjadi maltosa (alfa dan beta) ataupun glukosa (gluko amilase). Amilase dapat diperoleh dari berbagai sumber seperti tanaman, binatang dan mikroorganisme. saat ini sejumlah enzim amilase telah diproduksi secara komersial. Penggunaan mikroba dianggap lebih prosepaktif karena mudah tumbuh, cepat menghasilkan dan kondisi lingkungan dapat dikendalikan (wordpress.com, 2010). Produksi enzim amilase dapat menggunakan berbagai sumber karbon. Contoh-contoh sumber karbon molase, tepung jagung, tepung tapioka, dan sebagainya. Dalam produksi enzim amilase dengan menggunakan mikroba, pengendalian terhadap faktor lingkungan adalah sangat penting karena dalam produksinya, mikroba dipengaruhi berbagai hal, seperti suhu dan lama inkubasi, pH awal, jumlah inokulum dan faktor yang berpengaruh lainnya yang dapat diperoleh melalui eksperimen. Jenis mikroba juga berpengaruh terhadap jumlah enzim yang dihasilkan. Oleh karena itu untuk menghasilkan produk enzim amilase dengan kualitas dan kuantitas yang memuaskan perlu dilakukan optimasi kondisi dan karakterisasi dari bakteri yang digunakan.

Dalam percobaan praktikum kali ini digunakan dua jenis bakteri sebagai penghasil enzim amilase yaitu *Bacillus subtilis* dan *Bacillus sp.* sumber karbon yang digunakan adalah pati tapioka dengan konsentrasi 1% (b/v). tujuan dari praktikum kali ini adalah untuk mengetahui jenis bakteri mana yang dapat menghasilkan aktivitas enzim amilase lebih baik.

Bahan dan Metode

Bahan yang digunakan adalah biakan bakteri *Bacillus subtilis* dan *Bacillus sp.* umur 24 jam dalam larutan kaldu nutrient yang ditambahkan 1% pati tapioka yang kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. diperoleh supernatant yang kemudian disebut dengan ekstrak enzim kasar (EEK)

Reagen DNS dibuat dengan cara menimbang 5 g NaOH, 91 g Kalium Natrium Tartrat, 5 g Na₂SO₃ dan DNS (dinitro salisilic acid) 5 g dan dilarutkan ke dalam air sampai dengan volume 500 ml. Campuran dihomogenkan dengan menggunakan *magnetic stirrer*. Larutan yang sudah jadi disimpan dalam botol gelap dan suhu rendah (Bernfeld, 1955).

Substrat dibuat dengan melarutkan 1 gram *soluble starch* (Merck) ke dalam 100 ml air. Aduk dan panaskan larutan hingga kelihatan jernih dan bercampur.

Larutan standar maltosa dibuat dengan melarutkan 50 mg maltosa dalam 50 ml buffer HCl. Larutan tersebut kemudian diencerkan sehingga diperoleh stok standar dengan konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan stok tersebut dilakukan seri pengenceran sehingga diperoleh konsentrasi larutan standar maltosa 0 ppm, 100 ppm; 200 ppm; 300 ppm; 400 ppm; 500 ppm; 600 ppm. 1 ml larutan stok standar maltosa ditambah dengan 3 ml DNS, kemudian campuran larutan tersebut di inkubasi pada water bath dengan suhu 40°C selama 15 menit. Larutan didinginkan lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 550 nm. Dengan regresi linear, dari hasil absorbansi dan konsentrasi maltose, maka akan didapatkan persamaan matematik untuk standar maltosa, yang akan digunakan dalam pengukuran kadar enzim.

Pengukuran aktivitas enzim. Pengukuran sampel dilakukan dengan cara melarutkan 1,0 ml ekstrak enzim kasar, baik *Bacillus subtilis* dan *Bacillus sp.*, ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 1,0 ml substrat *soluble starch* lalu divortex. Kemudian di inkubasi pada water bath dengan suhu 40°C selama 15 menit. Setelah di inkubasi, larutan ditambahkan 3,0 ml DNS, lalu di vortex, kemudian dipanaskan dengan air mendidih, pada suhu 100°C selama 10 menit. Larutan didinginkan, lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 550 nm.

Pengukuran kontrol dilakukan dengan menambahkan 1,0 ml substrat *soluble starch* dan 3,0 ml larutan DNS, kemudian di inkubasi dalam water bath dengan suhu 40°C selama 15 menit. Setelah di inkubasi, larutan ditambahkan 1,0 ml ekstrak enzim kasar, lalu di vortex, kemudian dipanaskan dengan air mendidih, pada suhu 100°C selama 10 menit. **Pengukuran blanko** dilakukan dengan penambahan 1,0 ml ekstrak enzim kasar pada 3,0 ml DNS dan 1,0 ml H₂O steril. Larutan di vortex, lalu di inkubasi dalam water bath dengan suhu 40°C selama 15 menit. Kemudian larutan dipanaskan pada air mendidih pada suhu 100°C selama 15 menit. Larutan didinginkan lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 550 nm. Dengan persamaan matematik dari kurva standar maltosa, maka akan didapatkan kadar enzim yang terkandung dalam masing-masing larutan. Dari kadar maltose yang diperoleh dari sampel, maka dapat dicari aktivitas dari enzim amylase dengan menggunakan rumus:

Aktivitas α -Amilase (U/ml): $[\text{maltosa}] \times \text{Fp}/\text{BM} \times \text{V} \times \text{t}$, dimana [maltosa]: konsentrasi/kadar maltose (ppm), Fp: faktor pengenceran (5x dan 10x), BM: bobot molekul maltose (360.31 dalton), V: volume enzim yang digunakan (1 ml), t: waktu inkubasi (15 menit).

Satu unit enzim amilase adalah jumlah enzim yang diperlukan yang diperlukan untuk menghasilkan 1 umol gula tereduksi (maltosa) per menit pada suhu 40°C.

Tujuan digunakan kontrol adalah untuk mengkoreksi kadar maltosa dimana diasumsikan telah terdapat maltosa pada larutan substrat, mungkin karena pengaruh pemanasan ketika melarutkan substrat atau sebab lainnya, sebelum ditambahkan enzim sehingga kadar maltosa sampel yang diberi enzim terkoreksi dengan kadar maltosa kontrol tanpa pengaruh enzim.

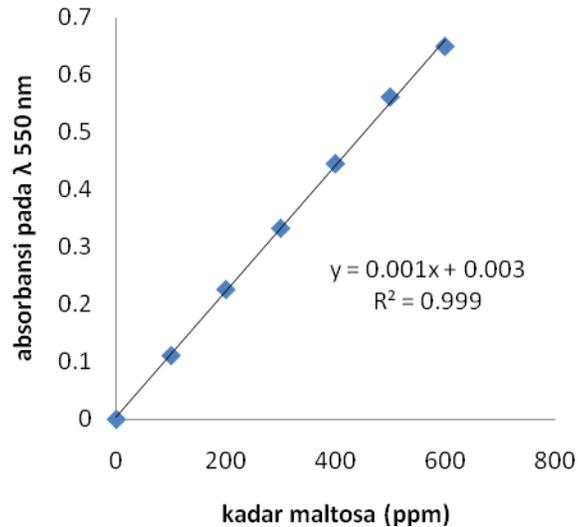
Hasil dan Pembahasan

Hasil

Pada pemeriksaan aktivitas enzim dilakukan pengukuran kadar maltosa untuk pembuatan kurva standar dengan menggunakan *soluble starch* sebagai substrat. Dari pengukuran secara spektrofotometri diperoleh data sebagai berikut.

Tabel 1. Nilai absorbansi standar maltosa

ppm	absorbansi
0.0	0
100	0.111
200	0.226
300	0.332
400	0.445
500	0.561
600	0.649



Gambar 1. Kurva standar maltosa

Dari gambar 1. Diperoleh persamaan matematis $x = (y + 0.007)/0.001$ dimana x adalah konsentrasi maltosa dan y merupakan nilai absorbansi dari maltosa pada panjang gelombang 550 nm. Dari persamaan ini, maka diperoleh data sebagai berikut.

Tabel 2. Nilai absorbansi dari sampel, kontrol dan blanko serta nilai unit aktivitas enzim dari ekstrak enzim kasar α amilase pada substrat *soluble starch* pada *Bacillus subtilis* dan *Bacillus sp.*

Strain	Fp	s	k	B	s-b	k-b	Xs	Xk	U/ml
<i>Bacillus subtilis</i>	5	0.785	0.716	0	0.785	0.716	788	719	0.064
	10	0.220	0.192	0	0.220	0.192	222	195	0.051
<i>Bacillus sp.</i>	5	0.718	0.769	0	0.718	0.769	720	772	0
	10	0.222	0.263	0	0.222	0.263	224	265	0

Dimana Fp adalah faktor pengenceran, s adalah nilai absorbansi dari sampel, k adalah kontrol, b adalah blanko, s-b adalah nilai absorbansi sampel dikurangi blanko, k-b adalah nilai absorbansi kontrol dikurangi blanko sedangkan Xs dan Xk dan Xb adalah nilai dari konsentrasi maltosa dalam ppm yang diperoleh dengan

memasukkan nilai s-b dan k-b ke dalam persamaan $x = (y + 0.007)/0.001$, sedangkan U/ml adalah unit aktivitas enzim dimana nilainya diperoleh dengan mengubahnya menjadi satuan unit per ml dengan BM maltosa sebesar 360.31 dan waktu inkubasi adalah 15 menit.

Selain itu diukur pula konsentrasi protein terlarut pada ekstrak enzim kasar dengan menggunakan larutan bovine serum albumin sebagai standar untuk pengukuran protein terlarut. Data yang diperoleh (laporan minggu lalu) adalah sebagai berikut: untuk biakan *Bacillus subtilis* diperoleh rata-rata kadar protein adalah 0.063 mg/ml larutan EEK atau 63 ppm, sedangkan untuk biakan *Bacillus sp.*, rata-rata kadar proteinnya adalah 0.074 mg/ml atau 74 ppm larutan EEK.

Dari pengukuran nilai aktivitas enzim dan protein terlarut, maka dapat diperoleh nilai aktivitas enzim spesifik dari masing-masing biakan. Akan tetapi, untuk biakan *Bacillus sp.* karena tidak mempunyai aktivitas maka aktivitas spesifiknya tidak dapat dihitung. Dengan membagi rata-rata nilai aktivitas enzim dari pengenceran 5 dan 10 x dan kadar protein terlarut, maka diperoleh aktivitas enzim spesifik untuk biakan *Bacillus subtilis* adalah **0.91 U/mg protein**.

Pembahasan

Enzim amilase dapat dihasilkan oleh berbagai mikroba dimana salah satunya adalah bakteri dari jenis *Bacillus*. Pada percobaan praktikum kali ini, untuk memproduksi enzim amilase digunakan pati tapioka sebagai substrat. Penggunaan substrat bertujuan untuk dapat menginduksi bakteri untuk menghasilkan enzim amilase. Karena substrat diperlukan dalam proses produksi enzim, maka enzim amilase yang diproduksi dari bakteri jenis *Bacillus* dapat dikatakan sebagai *inducible enzyme*.

Dalam praktikum kali ini, dua jenis bakteri yaitu *Bacillus subtilis* dan *Bacillus sp.* digunakan dalam produksi enzim amilase dimana *Bacillus subtilis* dapat menghasilkan enzim amilase apabila dilihat dari aktivitas enzimnya, sedangkan *Bacillus sp.* tidak. Tidak dihasilkannya enzim amilase dari biakan *Bacillus sp.* dapat dipengaruhi beberapa hal, diantaranya suhu dan lama inkubasi dan substrat yang digunakan. Pada umumnya enzim amilase secara optimum dihasilkan di titik tertentu pada fase logaritmik dari kurva pertumbuhan mikroba, akan tetapi ada mikroba tertentu dimana fase logaritmiknya lebih panjang sehingga enzim amilase tidak diproduksi karena titik tersebut belum tercapai sehingga lama inkubasi berpengaruh dalam hal ini. Adapun suhu dapat berpengaruh karena ada beberapa bakteri yang bersifat *thermophilic* yaitu bakteri yang lebih optimum dalam produksi enzim amilase dalam kondisi suhu yang lebih tinggi.

Untuk lebih mengetahui karakter *Bacillus sp.* maka diperlukan percobaan lanjutan seperti pengaruh lamanya inkubasi, sampel ekstrak enzim kasar diambil pada selang waktu-waktu tertentu sehingga dapat diketahui berapa lama bakteri tersebut mulai memproduksi enzim amilase dan dapat diketahui juga waktu

optimum produksi. Selain itu dapat dilakukan inkubasi pada suhu-suhu tertentu sehingga diperoleh pada suhu berapa enzim tersebut optimum memproduksi enzim amilase.

Aktivitas enzim spesifik yang diperoleh dari jenis *Bacillus subtilis* adalah sebesar 0.91 U/mg protein dari larutan EEK, nilai ini sangat kecil apabila dibandingkan dengan hasil yang diperoleh Dheeran dkk yaitu 14.5 U/mg, Marlida dkk yaitu 86 U/mg dan Chakraborty dkk yaitu 11.5 U/mg. hal ini dapat dikarenakan belum ditentukannya waktu optimum, suhu, dan kondisi yang dapat meningkatkan hasil enzim dalam pemanenan ekstrak enzim kasar seperti penambahan vitamin dan suplemen untuk bakteri.

Apabila telah dilakukan optimasi dan produksi enzim yang dihasilkan meningkat sampai pada level tertentu, protein terlarut yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim spesifik dapat dikurangi dengan cara pemurnian enzim yaitu bisa dengan dialysis, kromatografi penukar ion atau dengan ultra filtrasi sehingga aktivitas enzim spesifik dari produk yang dihasilkan dapat ditingkatkan.

Kesimpulan

1. *Bacillus subtilis* menghasilkan aktivitas enzim spesifik sebesar 0.91 U/mg protein dengan menggunakan substrat *soluble starch*.
2. *Bacillus sp.tidak* menghasilkan aktivitas enzim pada percobaan ini.

Daftar Pustaka

1. <http://ptp2007.wordpress.com/2008/05/15/amilase/>. diunduh pada tanggal 8 April 2010
2. Bernfeld P. 1955. *Amylases α and β : Methods in Enzymology I*. New York: Academic Pr.
3. Dheeran, P., Kumar, S., Jaiswal JY., Adhikari, DK. 2009. *Characterization of hyperthermostable α -amylase*. from *Geobacillus* sp. IIPTN. Appl Microbiol Biotechnol
4. Marlida, Y., Saari, N., Radu, S., Abu Bakar, F. 2000. *Production of an amylase-degrading raw starch by Gibberella pulicaris*. Biotechnology Letters 22: 95–97
5. Chakraborty, K., Bhattacharyya, B.K., Sen, S.K. 2000. *Purification and Characterization of a Thermostable α -Amylase from Bacillus stearothermophilus*. Folia Microbiol 45 (3). 207 210