

BULETIN *AgroBio*

ISSN 0853-9022

Vol. 3, No. 2, 2000

JURNAL TINJAUAN ILMIAH RISET BIOLOGI DAN BIOTEKNOLOGI PERTANIAN

Identifikasi Bahan Makanan Alternatif dan Teknologi Pengolahannya untuk Ketahanan Pangan Nasional	Sri Widowati ...	45
Prospek dan Produksi Enzim α -amilase dari Mikroorganisme	Nur Richana	51
Protein Disulfida Isomerase: Pembentuk Ikatan Disulfida dan Pelipatan Protein	Jumiarti Agus ...	59
Kajian Metode Skrining Padi Tahan Kekeringan	Didi Suardi ...	67
Peranan dan Potensi <i>Dietary Insecticidal Protein</i> dalam Rekayasa Genetika Tanaman Tahan Hama	Bahagiawati Amirhusin	74



Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian

Penerbit

Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
Departemen Pertanian

Alamat Penerbit

Jalan Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111, Indonesia

E-mail: borif@indo.net.id & rifcb@indo.net.id

Telepon: (0251) 339793, 337975

Faksimile: (0251) 338820

Kala Terbit

Dua nomor per volume

Penanggung Jawab

Sugiono Moeljopawiro
Kepala Balai Penelitian
Bioteknologi Tanaman Pangan

Redaktur Teknis

Novianti Sunarlim
Sutrisno
Ida Hanarida Somantri
Sri Widowati

Redaktur Pelaksana

Suyono
Ida N. Orbani

Buletin AgroBio (dahulu bernama **Buletin Penelitian**) memuat artikel tinjauan ilmiah hasil riset dalam bidang biologi dan bioteknologi tanaman. Naskah (boleh ditulis dalam bahasa Indonesia atau Inggris) yang diajukan untuk diterbitkan hendaknya belum pernah dipublikasikan pada media cetak manapun dan ditulis sesuai dengan "Pedoman Bagi Penulis" (lihat sampul belakang bagian dalam). Dewan Redaksi berhak menyunting naskah tanpa mengubah isi dan makna tulisan atau menolak menerbitkan suatu naskah.

Naskah dapat bersifat tinjauan ilmiah (kritis) atau tinjauan informatif (anotasi) terhadap subjek tertentu, atau gabungan antara keduanya. Tinjauan ilmiah merupakan hasil evaluasi, sintesis, dan analisis kritis tentang riset bagi kepentingan ilmu pengetahuan dan teknologi, sedangkan tinjauan informatif merupakan hasil evaluasi bagi kepentingan pengguna.

Isi naskah dapat membahas salah satu dari butir-butir berikut, yaitu: (a) status riset pada subjek tertentu, baik yang telah, sedang, maupun yang akan dikerjakan, (b) pengungkapan masalah dan pemecahannya, (c) pengembangan suatu metode atau konsepsi, dan (d) gagasan dan pendekatan yang dapat dijadikan landasan bagi suatu usulan riset. Sumber bacaan seyogyanya meliputi bahan pustaka terbitan dalam dan luar negeri yang terkini dan relevan.

Prospek dan Produksi Enzim α -amilase dari Mikroorganisme

Nur Richana

Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor

ABSTRACT

Prospects of α -amylase Enzyme Production from Microorganisms. Nur Richana. Enzyme α -amylases is commonly used in various food, beverage, and textile industries. Indonesia is still importing these enzymes due to the lack of high yielding microorganism that produce these enzyme and poor technology in enzyme production. Therefore, Research on production of amylase enzymes by microorganisms is needed. The α -amylase enzymes from *Bacillus* spp. have been the subjects of many studies for several years. The investigations were done to gain a better understanding on production, regulation of synthesis, secretion, and properties of the enzymes. The extracellular α -amylases produced by *Bacillus coagulans* MII-10, *B. stearothermophilus* TII-12, and *B. licheniformis* TVII-6 strains have been isolated in the Research Institute for Food Crop Biotechnology, Bogor. A scale up technique of α -amylases production to an industrial level is needed. Knowledge on production, purification, and characterization of extra cellular amylase enzymes from microorganisms are reviewed in this paper.

Key words: Production of α -amylase enzymes, microorganisms, *Bacillus* spp.

Enzim adalah molekul biopolimer yang tersusun dari serangkaian asam amino dalam komposisi dan susunan rantai yang teratur dan tetap. Enzim memegang peranan penting dalam berbagai reaksi di dalam sel. Sebagai protein, enzim diproduksi dan digunakan oleh sel hidup untuk mengkatalisis reaksi, antara lain konversi energi dan metabolisme pertahanan sel.

Amilase mempunyai kemampuan untuk memecah molekul-molekul pati dan glikogen (Judoamidjojo *et al.*, 1992). Molekul pati yang merupakan polimer dari α -D-glikopiranosida akan dipecah oleh enzim pada ikatan α -1,4- dan α -1,6-glikosida. Secara umum, amilase dibedakan menjadi tiga berdasarkan hasil pemecahan dan letak ikatan yang dipecah, yaitu α -amilase, β -amilase, dan glukamilase.

Enzim α -amilase merupakan endoenzim yang memotong ikatan α -1,4 amilosa dan amilopektin dengan cepat pada larutan pati kental yang telah mengalami gelatinisasi. Proses ini juga dikenal dengan na-

ma proses likuifikasi pati. Produk akhir yang dihasilkan dari aktivitasnya adalah dekstrin beserta sejumlah kecil glukosa dan maltosa (Prave *et al.*, 1987). Menurut Fogarty (1983) dan Whitaker (1972), α -amilase akan menghidrolisis ikatan α -1-4 glikosida pada polisakarida dengan hasil degradasi secara acak di bagian tengah atau bagian dalam molekul.

Enzim β -amilase atau disebut juga α -1,4-glukanmaltotransferase E.C. 3.2.1.2. bekerja pada ikatan α -1,4-glikosida dengan menginversi konfigurasi posisi atom C(1) atau C nomor 1 molekul glukosa dari α menjadi β . Enzim ini memutus ikatan amilosa maupun amilopektin dari luar molekul dan menghasilkan unit-unit maltosa dari ujung nonpereduksi pada rantai polisakarida. Bila tiba pada ikatan α -1,6 glikosida aktivitas enzim ini akan berhenti.

Glukamilase dikenal dengan nama lain α -1,4- glukon glukohidrolase atau EC 3.2.1.3. Enzim ini menghidrolisis ikatan glukosida α -1,4, tetapi hasilnya β -glukosa yang mempunyai konfigurasi berlawanan dengan hasil hidrolisis oleh en-

zim α -amilase. Selain itu, enzim ini dapat pula menghidrolisis ikatan glikosida α -1,6 dan α -1,3 tetapi dengan laju yang lebih lambat dibandingkan dengan hidrolisis ikatan glikosida α -1,4 (Judoamidjojo *et al.*, 1992).

PROSPEK α -AMILASE DALAM BIOKONVERSI BAHAN BERPATI

Peranan enzim sebagai biokatalisator dalam berbagai bidang industri semakin penting. Dewasa ini, enzim yang diproduksi secara komersial banyak digunakan dalam bidang industri dan kedokteran. Konsumsi enzim bagi industri dalam negeri yang masih harus diimpor selama tahun 1996 sebanyak 2.490.396 kg, senilai US\$ 12.181.608. Di antara sekian banyak enzim yang digunakan dalam industri, enzim untuk industri pangan merupakan enzim yang menguasai pasar internasional. Pada saat ini, enzim yang sangat besar penggunaannya untuk konversi bahan berpati adalah amilase. Selain dimanfaatkan dalam industri pangan terutama gula cair, amilase juga digunakan dalam industri tekstil dan deterjen.

Pada awal tahun 1993, kebutuhan amilase di Jawa Barat, khususnya di Bandung sudah mencapai 40 t/bulan atau setara dengan US\$ 2.800.000 untuk keperluan industri tekstil (Rosalinda *et al.*, 1994). Kebutuhan untuk produksi gula cair di PT Puncak Gunung Mas setiap bulan di tahun 1999 bisa mencapai 750 kg. Sedangkan 3 perusahaan besar lainnya yang tercatat di Biro Pusat Statistik (1997), yaitu Indonesia Maltose Industry (Ciawi), Tambak Agung Abadi (Mojokerto), dan PT Raya Sugarindo Inti (Tasikmalaya). Apabila kebutuhan amilase ketiga perusahaan tersebut sama maka diperkirakan kebutuhan amilase untuk gula cair berkisar 4 t/bulan sedangkan kebutuhan glukosa di Indonesia baru terpenuhi 60%.

Oleh karena itu, pengembangan produksi glukosa di dalam negeri masih diperlukan, sejalan dengan kebutuhan amilase yang terus meningkat.

Penerapan bioteknologi melalui aplikasi amilase akan membantu usaha meningkatkan nilai ekonomi bahan berpati (*starchy material*). Perkembangan bioteknologi ini harus terus dipacu, karena Indonesia banyak menghasilkan substrat bahan berpati seperti singkong dan sagu. Produksi ubi kayu di Indonesia pada tahun 1997 mencapai 14,7 juta t dan diekspor dalam bentuk tapioka sebesar 82.803 t (BPS, 1998). Dilain pihak, produksi ubi kayu tidak pernah stabil, hal tersebut karena lemahnya posisi petani dalam menentukan harga jual produk. Oleh karena itu, pengolahan ubi kayu dalam bentuk yang lebih beragam, memungkinkan petani memproses ubi kayu sehingga mendapatkan harga yang lebih baik.

Sebagai negara yang banyak menghasilkan bahan berpati (ubi kayu, sagu, garut, dan sebagainya), Indonesia sangat berpotensi untuk mengembangkan industri penghasil enzim terutama amilase. Nilai ekonomi ubi kayu maupun tapioka akan dapat ditingkatkan apabila dihasilkan produk bernilai ekonomi tinggi seperti sirup glukosa, fruktosa, maltosa, dan pati termodifikasi lainnya. Produk tersebut dihasilkan melalui hidrolisis secara enzimatis menggunakan amilase. Proses pengembangan secara enzimatis pada bahan berpati tersebut akan sangat membantu usaha meningkatkan nilai ekonominya dan sekaligus meningkatkan pendapatan negara.

MIKROORGANISME PENGHASIL α -AMILASE

Beberapa mikroorganisme mampu mensekresikan enzim ekstraseluler dalam jumlah besar.

Enzim α -amilase merupakan enzim ekstraseluler, yaitu enzim yang dihasilkan di dalam sel, tetapi dikeluarkan ke media pertumbuhan selama fermentasi. Karena itu untuk mengisolasi bakteri yang dapat menghasilkan enzim tertentu diperlukan substrat yang mampu menginduksi enzim tersebut (Stanbury dan Whitaker, 1984).

Boing (1982) mengemukakan beberapa syarat mikroorganisme yang digunakan untuk produksi enzim secara komersial, yaitu

- Dapat menghasilkan enzim ekstraseluler.
- Cukup stabil dan mempunyai kemampuan produksi tinggi.
- Dapat tumbuh pada media yang relatif murah.
- Tidak membentuk produk fermentasi yang mengganggu pembentukan enzim.
- Pemanenan dan ekstraksi enzim dapat dilakukan dengan mudah.

Jenis mikroorganisme yang sudah umum menghasilkan α -amilase adalah *Bacillus* dan *Aspergillus* (Stanbury dan Whitaker, 1984). Contoh beberapa *Bacillus* penghasil amilase disajikan pada Tabel 1.

Beberapa peneliti melaporkan bahwa enzim α -amilase dapat dihasilkan melalui proses fermentasi media cair dari berbagai mikroorganisme seperti *Chlorefexus auranticus* untuk memproduksi amilase yang dapat menghidrolisis pati menjadi maltotetrosa dan maltopen-

tosa (Ratanakhanokchai *et al.*, 1992), *Bacillus subtilis* (Kimura dan Chiba, 1983), serta *Neocallimastix frontalis* (Mounthford dan Asher, 1988). Vihinen dan Manstala (1989) melaporkan bahwa beberapa jenis bakteri *Bacillus* diketahui mampu menghasilkan α -amilase antara lain *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus*, *B. coagulans*, dan sebagainya. Melliawati *et al.* (1995) memproduksi enzim amiloglukosidase dari kapang *Aspergillus* sp. KTII dan khamir *Saccharomycopsis* sp. TJ-1 yang menunjukkan kemampuan amilolitik yang tinggi.

Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan (Balitbio) telah berhasil mengisolasi bakteri penghasil α -amilase, dari zona bening yang dihasilkan diperoleh 37 isolat bakteri termofilik dari tanah kawah Dieng dan 56 isolat bakteri mesofil dari tanah ujung kulon. Dari seleksi isolat tersebut diperoleh dua isolat termofil dan satu isolat mesofil unggulan (Tabel 2). Isolat termofilik unggul tersebut jauh lebih aktif dibandingkan dengan strain pembanding ATCC 0079, demikian juga untuk isolat mesofilik unggul dibandingkan dengan ATCC 0060.

PRODUKSI ENZIM α -AMILASE

Fermentasi media pada kultur terendam banyak dipilih untuk memproduksi enzim, karena selain mudah dikontrol biaya pekerjaan relatif murah dan tidak memerlukan tempat luas. Produksi enzim

Tabel 1. Beberapa *Bacillus* penghasil α -amilase

Strain bakteri	Suhu tumbuh (°C)	Suhu optimum enzim (°C)
<i>Bacillus</i> sp. 11-15	65	70
<i>Bacillus</i> sp. AK-2	50	65
<i>Bacillus</i> sp. 26-15	50	82
<i>Bacillus</i> No. A-40-2	37	55
<i>B. acidocaldarius</i> 101	50	70
<i>B. amyloliquefaciens</i>	37	50-70
<i>B. coagulans</i> 43P	55	60-70
<i>B. coagulans</i> CUMC 512	53	85
<i>B. coagulans</i> CUMC	48	90
<i>B. licheniformis</i> FDO 2	37	93

Sumber: Vihinen dan Manstala, 1989

Tabel 2. Karakteristik isolat unggul bakteri termofil dan mesofil indigenous

Parameter	Isolat bakteri termofilik			Isolat bakteri mesofilik	
	<i>B. stearothermophilus</i> TII-12	<i>B. licheniformis</i> TVII-6	ATCC 0079	<i>B. coagulans</i> MII-10	ATCC 0060
OD ₆₀₀	1.800	1.919	1.876	1.720	2.690
Aktivitas enzim (U/ml)	2.207,69	1.786,94	901,50	746,30	759,80
Protein terlarut (mg/ml)	1,64	1,50	0,53	1,07	1,23
Aktivitas spesifik (U/mg protein)	1.346,15	1.191,29	1.700,90	697,48	617,72

Sumber: Richana *et al.*, 1999a; Pujoyuwono *et al.*, 1997

dengan cara tersebut dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain seleksi mikroorganisme, komposisi media, dan faktor lingkungan seperti pH, suhu, agitasi, dan aerasi (Ratledge, 1987).

Substrat yang digunakan dalam proses fermentasi berpengaruh terhadap aktivitas dan produktivitas enzim (Boing, 1982). Sebagai salah satu sumber karbon digunakan pati yang merupakan polimer dari monosakarida. Di samping sumber karbon media kultivasi juga membutuhkan unsur-unsur mineral seperti garam magnesium, fosfor, kalsium, kalium, natrium, sulfur, dan khlor (Stanbury dan Whitaker, 1984).

Secara umum fermentasi membutuhkan suatu kondisi lingkungan yang mendukung supaya prosesnya dapat berlangsung dengan baik. Faktor-faktor lingkungan fisik dan kimia perlu diatur selama proses fermentasi berlangsung. Penggunaan fermentor dapat membantu tercapainya kondisi pengaturan tersebut. Oleh karena itu, fermentor dapat diartikan sebagai alat yang dirancang untuk memberikan kondisi lingkungan terkontrol dengan baik bagi pertumbuhan mikroba yang akan menghasilkan biomassa atau produk metabolisme (Rachman, 1989). Faktor-faktor fisik yang berpengaruh antara lain suhu, tekanan, *power input* (masukan atau penggunaan tenaga), laju aliran gas, laju aliran cairan, viskositas, dan turbiditas. Empat faktor terakhir yang disebutkan hanya berperan pada fermentasi media cair. Sedangkan fak-

tor-faktor kimia yang berpengaruh adalah pH, enzim, potensial redoks, oksigen terlarut, gas lain terlarut, determinasi penggunaan gas, dan adanya ion. Faktor-faktor kimia ini terutama berperan pada fermentasi media cair.

Beberapa keuntungan yang dapat diperoleh melalui kultur media cair adalah komposisi dan komponen media dapat diatur dengan mudah, dapat memberikan kondisi yang optimal bagi pertumbuhan, penggunaan substrat efisien, aerasi dapat disesuaikan, laju pertumbuhan mikroba dapat diatur dan risiko kontaminasi kecil (Blevin dan Davis, 1979). Sementara menurut Suhartono (1989), melalui mekanisme pengadukan, oksigen, pH, nutrisi, dan faktor lingkungan lainnya dapat tersebar merata dalam fermentor.

Pada fermentasi media cair dikenal tiga metode pokok, yaitu fermentasi sistem curah (*batch*), sistem sinambung (*continue*), dan sistem semi sinambung (*fedbatch*). Fermentasi sistem *batch* adalah fermentasi sistem tertutup di mana inokulum ditumbuhkan dalam kondisi nutrisi yang terbatas. Dalam hal ini setelah inokulasi tidak dilakukan lagi penambahan substrat ke dalam media steril dalam fermentor, kecuali penambahan oksigen (udara steril), antibiuh, dan larutan asam basa untuk mengatur pH (Stanbury dan Whitaker, 1984).

Menurut Stredansky *et al.* (1993), produksi amilase menggunakan *B. licheniformis* dilakukan dengan bioreaktor tangki teraduk (*stirred tank bioreactor*) bervolume

kerja 1 liter dengan laju aerasi 0,8 vvm (*volume per vessel minute*). Yoo *et al.* (1988) melaporkan bakteri penghasil amilase tumbuh optimal pada suhu sekitar 37°C, pH sekitar 7, dan dalam kondisi aerob dengan laju alir udara 1 vvm, demikian juga Kim *et al.* (1995) melaporkan optimasi produksi α -amilase dalam bioreaktor, yaitu pada pH 10,5, suhu 50°C, kecepatan agitasi 200 rpm, laju alir udara 1 vvm.

Fermentasi sistem curah untuk produksi α -amilase telah dilakukan di Balitbio. Kondisi optimum untuk pertumbuhan bakteri mesofilik *B. coagulans* MII-10 di bioreaktor *Biostat*-21 adalah media yang berkeadahan pati 1%, pH 6,5, suhu 30°C, selama 48 jam, dengan laju aerasi 0,8 vvm, dan kecepatan agitasi 200 rpm. Laju pertumbuhan maksimum (μ_{maks}) hasil kultivasi sebesar 0,11. Sel mampu memperbanyak diri hingga 1,75 g sel/l di akhir fase eksponensial dan untuk mencapai dua kali jumlah sel semula diperlukan waktu 6,54 jam. Efisiensi penggunaan substrat untuk pembentukan produk ($Y_{p/s}$) sebesar 0,11 g protein/g substrat. Efisiensi pembentukan produk oleh biomassa ($Y_{p/s}$) sebesar 0,40 g protein/g biomassa, sedangkan efisiensi penggunaan substrat untuk produksi sel ($Y_{x/s}$) sebesar 0,27 g biomassa/g substrat (Tabel 3).

Parameter kinetika pembentukan produk p (faktor konversi produk dari biomassa yang berasosiasi dengan pertumbuhan) diperoleh sebesar 0,40. Sedangkan q (faktor konversi substrat untuk pembentukan produk) sebesar 7,54 (Richana *et al.*, 1999b).

PURIFIKASI ENZIM α -AMILASE

Purifikasi atau pemurnian dan pemisahan produk fermentasi merupakan tahap yang penting dalam bioproses. Beberapa tahap pemurnian enzim antara lain ekstraksi dan

isolasi, pemisahan enzim seperti presipitasi, penyaringan, sentrifugasi, dialisis, pengeringan beku, dan ultrafiltrasi (Bollag dan Edelstein, 1991). Pemurnian lebih lanjut dapat dilakukan dengan khromatografi (Somers *et al.*, 1989), adsorpsi melalui pertukaran ion serta elektroforesis (Kobayashi *et al.*, 1996). Prinsip masing-masing teknik pemurnian produk fermentasi dapat diklasifikasikan berdasarkan ukuran partikel (filtrasi, mikrofiltrasi), ukuran molekul dan berat molekul (ultrafiltrasi, khromatografi, filtrasi gel), suhu (kristalisasi), solubilitas (adsorpsi), muatan listrik (elektroforesis, penukaran ion), densitas (sedimentasi, dekantasi, sentrifugasi, ultrasentrifugasi).

Metode pemisahan yang sering digunakan dalam pemurnian enzim adalah sentrifugasi. Metode ini mencakup pemisahan sel dari cairan kultur, pemisahan kontaminan, pengumpulan endapan, dan pemulihan adsorben protein tambahan dari cairan protein yang lain (Wang *et al.*, 1979). Untuk mendapatkan fraksi protein ada dua metode, yaitu:

1. *Salting out* protein menggunakan garam anorganik, misalnya ammonium sulfat. Arima (1964) menyarankan penggunaan garam organik untuk mengendapkan protein enzim pada konsentrasi 70% jenuh. Untuk menghindari penambahan volume yang cukup besar biasanya ditambahkan dalam bentuk padatan. Waktu pengendapan minimal 15 menit, tetapi akan lebih efisien jika proses pengendapan dilakukan pada suhu 4°C. Setelah pengendapan diikuti dengan tahap yang akan menghilangkan sisa garam melalui membran semipermeabel. Metode pemekatan dengan dialisis menggunakan gaya osmotik. Dialisis digunakan untuk menghilangkan zat terlarut berbobot molekul rendah yang

berlebihan secara simultan dengan penambahan larutan bufer yang baru ke dalam sampel (Irawadi *et al.*, 1992).

2. Menambahkan pelarut organik ke dalam filtrat pada kondisi suhu 5°C. Pengendapan dengan pelarut organik antara lain aseton dan etanol. Aseton lebih sering digunakan untuk fraksinasi protein karena beberapa enzim sangat stabil dalam aseton. Namun untuk mencegah denaturasi protein, penggunaan aseton harus dilakukan pada suhu yang cukup rendah dengan waktu sesingkat mungkin. Manning dan Chambell (1961), menggunakan aseton dalam salah satu tahap pemurnian amilase pada suhu -10°C hingga dihasilkan endapan berwarna kecoklatan. Setelah mengendap secepatnya dilakukan pencucian dengan akuades agar konsentrasi bahan pengendap berkurang sehingga tidak merusak protein enzim. Dalam hal ini, yang perlu diperhatikan adalah cara penambahan pelarut organik tersebut, selain harus dilakukan pada suhu rendah, penambahannya harus dilakukan perlahan-lahan (Aunstrup, 1979).

Setelah dipisahkan kemudian enzim dipekatkan. Pemekatan ini selain untuk memekatkan enzim agar lebih stabil, juga bertujuan untuk fraksinasi komponen protein enzim berdasarkan sifat-sifat ioniknya.

Ultrafiltrasi dapat digunakan sebagai tahap pemurnian enzim, yang berguna untuk memekatkan enzim (Lillford, 1988). Prinsip pemisahan dengan ultra filtrasi adalah memisahkan komponen berdasarkan berat molekul (Bollag dan Edelstein, 1991). Ultrafiltrasi sebagai salah satu tahap pemurnian α -amilase telah dilakukan oleh Shih dan Labbe (1995), Lestari *et al.* (1999) telah melakukan penelitian pemurnian enzim α -amilase menggunakan sistem membran ultrafiltrasi (Tabel 4).

Kadar pemekatan enzim selama proses ultrafiltrasi berpengaruh terhadap aktivitas total α -amilase. Aktivitas spesifik tertinggi dicapai pada 10 kali pemekatan.

Sistem dua fase polietilen glikol (PEG)-dekstran (polimer-polimer) dan PEG-fosfat (polimer garam), dapat digunakan untuk menekan protein, memisahkan protein dari pecahan-pecahan sel. Pada kedua sistem tersebut PEG akan dominan di atas, yaitu fase ringan dan

Tabel 3. Nilai parameter kinetika kultivasi dalam bioreaktor-2l

Parameter kinetika	Isolat MII-10*	Isolat TII-12**
μ_{maks} (jam^{-1})	0,08	0,147
X maks (g/l)	1,75	1,23
$Y_{p/s}$ (g/g)	0,11	0,13
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,27	0,32
α	0,41	0,37

Sumber: *Richana *et al.*, 1999b; ** 1999a

Tabel 4. Pengaruh kadar pemekatan terhadap aktivitas dan konsentrasi protein α -amilase dari isolat *Bacillus* sp. TII-12 pada laju aliran 30 ml/menit

Kadar pemekatan	Volume (l)	Aktivitas total (U)	Protein total (mg)	Aktivitas spesifik (U/mg)	Kemurnian (kali)	Rendemen (%)
Supernatan	2.000	2.062.120	702,0	2.864,0	1,0	100
5 kali	400	1.645.396	311,2	5.287,9	1,8	80
10 kali	200	1.194.768	178,7	6.686,6	2,3	58
15 kali	133	678.646	142,8	4.752,4	1,7	33

Sumber: Lestari *et al.*, 1999

dekstran atau garam akan dominan di bawah (King, 1992). Metode ini memiliki proses yang lembut dan memurnikan protein sehingga denaturasi dan kehilangan aktivitas biologi protein jarang terjadi (Harris dan Angal, 1989).

Dalam banyak hal pemisahan sangat bergantung pada berat molekul polimer yang digunakan. Secara umum jika berat molekul satu polimer diturunkan, substansi cenderung terpartisi ke fasa yang mempunyai berat molekul kecil. Protein memiliki kecenderungan ke PEG jika berat molekulnya kecil. Beberapa percobaan menunjukkan bahwa koefisien partisi dapat ditingkatkan dengan menurunkan berat molekul dan konsentrasi PEG (Kula, 1997). Hal tersebut dibuktikan dengan hasil penelitian yang telah dilakukan di Balilbio (Tabel 5).

Fraksionasi protein dilakukan setelah proses pemekatan. Metode fraksionasi protein antara lain adalah khromatografi gel (gel filtrasi), yaitu teknik khromatografi yang unik sebab pemisahan terjadi berdasarkan ukuran relatif molekul protein. Kelebihan khromatografi gel ini adalah fungsi dari protein yang mudah pecah, tidak rusak dengan digunakannya berbagai penunjang kromatografi (Stellwagen, 1990).

Preperatif native-PAGE (*native polyacrilamide gel electrophoresis*) atau gel elektroforesis natif-poli akrilamida (nonSDS-PAGE), merupakan salah satu teknik untuk mendapatkan hasil yang tinggi pada pemurnian molekul biologi aktif seperti protein enzim. Perbedaannya dengan SDS-PAGE adalah migrasi protein yang terjadi hanya berdasarkan ukuran protein saja, sedangkan pada sistem native-PAGE migrasi yang terjadi didasarkan pada muatan dan ukurannya. Tidak ada satu sistem bufer elektroforesis tunggal yang mampu memurnikan semua native protein secara optimal.

Migrasi protein terbaik pada native-PAGE diperoleh dengan modifikasi sistem bufer pH. Dengan menggunakan bufer elektroforesis yang nilai pHnya mendekati nilai *pI* (*isoelectric poin*) dari protein yang dikehendaki secara teori akan menghasilkan resolusi terbaik, walaupun laju migrasi menjadi lambat untuk mencapai elusi akhir dibandingkan dengan penggunaan kolom khromatografi gel. Dengan mengubah nilai pH bufer menjauhi *pI* dari protein, menyebabkan laju migrasi protein yang lebih cepat, tetapi juga menyebabkan resolusinya berkurang. Sistem bufer gel elektroforesis konvensional dan media yang digunakan pada alat *Prep Cell Model 491* Bio Rad digunakan untuk memisahkan komponen protein dari protein kontaminannya (Bio Rad Laboratorium, 1991). Balitbio telah melakukan penelitian pemurnian α -amilase dari isolat *Bacillus* MII-10 menggunakan *Prep Cell Model 491* Bio Rad (Tabel 6).

Fraksi yang dihasilkan oleh kolom khromatografi diuji kemurniannya serta ditentukan bobot molekul dari setiap fraksi yang dihasilkan

dengan cara elektroforesis. Elektroforesis adalah suatu cara untuk memisahkan fraksi-fraksi suatu zat berdasarkan migrasi partikel bermuatan atau ion-ion makro molekul di bawah pengaruh medan listrik (Pomeranz dan Meloan, 1980). Migrasi dapat terjadi karena perbedaan ukuran, bentuk, muatan, atau sifat molekul tersebut. Dalam pemisahan berdasarkan muatan molekul-molekul protein yang mempunyai muatan berbeda akan terpisah selama bergerak ke arah elektroda polaritasnya berlawanan dengan muatan molekul tersebut (Boyer dan Hartman, 1971).

Teknik elektroforesis merupakan cara utama mengkarakterisasi makromolekul dan penetapan kemurniannya. Metode ini didasarkan pada suatu kenyataan bahwa molekul-molekul seperti DNA, RNA, dan protein memiliki muatan dan oleh karena itu, mampu bergerak apabila ditempatkan pada sebuah medan listrik (Irawadi *et al.*, 1992).

KARAKTERISAI ENZIM α -AMILASE

Karakterisasi enzim meliputi pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas dan stabilitas enzim, pe-

Tabel 5. Pengaruh berat molekul PEG (33,3%) dan fosfat (13,3%) terhadap aktivitas enzim dan analisis protein

Bahan	Aktivitas (U/ml)	Protein (mg/ml)	Aktivitas spesifik (U/mg)	Kemurnian (kali)	Rendemen (%)
Supernatan	771,92	0,112	6.892,14	1,0	100
PEG 8000	599,39	0,073	8.210,82	1,2	99
PEG 3350	693,64	0,081	8.563,46	1,2	82
PEG 600	820,56	0,086	9.541,39	1,4	92

Sumber: Thontowi *et al.*, 2000

Tabel 6. Hasil pemurnian α -amilase dari isolat *Bacillus* MII-10 menggunakan *Prep cell Model 491* Bio-Rad

Supernatan	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Aktivitas spesifik (U/mg)	Kemurnian (kali)	Rendemen (%)
Supernatan	3.000	0,29	11.186,39	-	100
Crude I	60	4,80	5.406,83	-	15,78
Crude II	12	12,40	4.343,60	1,00	41,51
Fraksi I	45	0,02	19.993,89	4,60	3,29
Fraksi II	45	0,05	10.891,09	2,51	3,75
Fraksi III	54	0,02	19.874,35	4,58	4,15

Sumber: Richana *et al.*, 2000

ngaruh inhibitor dan aktivator, jenis hidrolisatnya, dan konstanta kinetika enzim.

Kebanyakan α -amilase murni kehilangan aktivitas dengan cepat pada suhu 50°C, tetapi inaktivasi ini dapat diabaikan dengan adanya kalsium. Enzim α -amilase tidak memiliki koenzim tetapi dalam bentuk kalsium matalo-enzim dengan paling sedikit terdapat satu atom dari logam per mol enzim. Kekuatan logam ini untuk aktivitas katalik. Dengan adanya kalsium enzim menjadi sangat resisten terhadap suhu ekstrim, pH, penambahan urea atau penambahan protease seperti pepsin, tripsin, subtilin, dan papain. Kebalikannya, α -amilase bebas kalsium sangat mudah terdenaturasi oleh asam, panas, urea, dan dapat didegradasi oleh protease (Fogarty, 1983).

α -amilase pada umumnya stabil pada pH 5,5-8,0 dan pH ekstrim dalam bufer mengandung kalsium. Aktivitas optimal α -amilase pada keadaan normal terjadi pada pH 4,8-6,5. Terdapat perbedaan bentuk kurva pH aktivitas dan nilai pH optimal serta karakter lain amilase yang dihasilkan oleh mikroba (Fogarty, 1983).

Suhu terendah optimal amilase dicapai pada suhu 25-30°C, yaitu dihasilkan oleh *Fusarium oxysporum* dan yang tertinggi hampir mencapai 100°C yang dihasilkan oleh *B. licheniformis* termofil. Sedangkan pH optimum beberapa amilase bervariasi antara 2,0 sampai 10,5. Hal ini menunjukkan evolusi kemampuan adaptasi dengan lingkungan sekitar. Bobot molekul amilase bervariasi dari 10.000-139.000 Dalton, namun kebanyakan berkisar antara 50.000-60.000 Dalton. Sifat kinetika amilase juga bervariasi, sebagai contoh nilai amilase antara 0,65-6,9 mg/ml. Karakteristik α -amilase yang telah dihasilkan oleh Balitbio disajikan pada Tabel 7.

α -amilase dari *B. licheniformis* memiliki aktivitas optimal pada suhu 90°C, hal ini memungkinkan digunakan dalam industri pada suhu lebih dari 105°C. Keutamaan dari enzim ini adalah kestabilan relatif tidak dipengaruhi oleh ion kalsium. Cukup dengan 5 ppm kalsium, kestabilannya pada suhu 70°C dapat dipertahankan. Sedangkan yang dihasilkan *B. amyloliquefaciens* lebih tinggi, yaitu 150 ppm (Fogarty, 1983).

Pada saat α -amilase yang dihasilkan oleh *B. licheniformis* digunakan dalam industri, kalsium yang dibutuhkan untuk stabilitas penuh meningkat dengan 50 ppm kalsium. α -amilase dari *B. licheniformis* memiliki aktivitas dengan spektrum yang luas pada pH 5,0-9,0 dengan suhu optimal 76°C. Enzim ini stabil terhadap perlakuan EDTA, sehingga tidak tergantung oleh adanya kalsium.

Logam berat seperti tembaga (Cu), air raksa (Hg), perak (Ag), dan timbal (Pb) menghambat aktivitas α -amilase. Ion Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , dan Hg^{2+} hampir menghambat secara penuh aktivitas α -amilase pada konsentrasi 2 mM. Sedangkan ion Zn^{2+} , Pb^{2+} , Al^{3+} , Cd^{2+} , dan Ag^+ menghambat aktivitas α -amila-

se masing-masing pada tingkat 30,3; 38,0; 43,0; dan 61,2%. Ion Ba^{2+} , Fe^{2+} , Li^+ , Cs^{2+} , Co^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , dan Ca^{2+} tidak menghambat enzim, demikian halnya dengan iodoasetamida 0,1 mM. Berbeda dengan EDTA pada konsentrasi 0,1 mM mampu menghambat aktivitas enzim sebesar 61,3% dan ketika dilakukan dialisis tanpa Ca^{2+} enzim terinaktivasi total dan tidak dapat lagi dilihat aktivitasnya dengan dialisis ulang menggunakan CaCl_2 (Hayashida *et al.*, 1998).

KESIMPULAN

Produksi enzim α -amilase dari mikroorganisme terutama bakteri didominasi oleh *Bacillus* sp. Kultur media cair mempunyai keunggulan untuk produksi enzim. Fermentasi sistem curah lebih banyak digunakan dibandingkan dengan sistem kontingen. Kemurnian dapat dilakukan dengan cara *salting out*, menambah pelarut organik ke dalam filtrat, pemisahan dua fase, dan pemurnian menggunakan cara elektroforesis. Karakterisasi enzim α -amilase meliputi pH 5,5-8,0, suhu 25-30°C atau mencapai 100°C. Bobot makhluk bervariasi antara 10.000 sampai 139.000 Dalton. Sifat kinetika amilase 0,65-6,9 mg/ml.

Tabel 7. Karakteristik α -amilase dari isolat bakteri indigenous

Karakter	<i>B. coagulans</i> MII-10 ^a	<i>B. stearothermophilis</i> TII-12 ^b
pH optimum	7,0	7,0
Suhu optimum	50°C	90°C
Stabilitas pH	7,0/4°C/24 jam 6,0-8,0/4°C/18 jam	7,0/28°C/24 jam 6,0-9,0/28°C/24 jam
Stabilitas suhu	61,9%/70°C/5 menit 34,7%/70°C/15 menit	92-94%/90-100°C/15 menit 94-98%/90-100°C/20 menit
Kinetik amilase:		
Km	0,169% (1,69 mg/ml)	1,06 mg/ml
Vmaks	85,186 Mol/menit	1,21 Mol/menit
Bobot molekul	42 454,6 Dalton (monomer) 168 413,8 Dalton (tetramer)	192 932,8 Dalton
Pengaruh Ca^{2+} inhibitor	Positif Na_2CO_3 /82,5%/2 mM AgNO_3 /22,4%/1 mM EDTA/77,8%/0,5 mM	Positif, optimum 5 mM CaCl_2 EDTA 5mM/33,5% CuSO_4 1 mM/77,3%

Keterangan: Km = konstanta Michaelis, Vmaks = kecepatan maksimum, ^a isolat bakteri mesofilik indigenous, ^b isolat bakteri termofilik indigenous

Sumber: Richana *et al.*, 2000; Lestari *et al.*, 1999

DAFTAR PUSTAKA

- Arima, K. 1964. Microbial enzyme production in industrial and chemical microbiology. In Mortimer (Ed.). Global Impact of Applied Microbiology. John Wiley and Sons, New York. p. 112-159.
- Aunstrup, K. 1979. Enzyme of industrial interest: Traditional product. In Tsao (Eds.). Annual Reports on Fermentation Processes. Academic Press, New York. 6:234-285.
- Bio Rad Laboratorium. 1991. Manual Prep Cell Model 491. 35 p.
- Biro Pusat Statistik (BPS). 1997. Statistik Indonesia. Statistical Year Book of Indonesia. Jakarta.
- Biro Pusat Statistik (BPS). 1998. Statistik industri besar dan sedang. Biro Pusat Statistik, Jakarta.
- Blevin, W.T. and N.D. Davis. 1979. Methods for laboratory for mentation. In Peppler, H.J. and D. Perlman (Eds.). Microbial Technology, Microbial Proces. Academic Press, New York. 1:77-102.
- Boing J.T.P. 1982. Enzyme production. Avi Publishing Company Inc., West Port. p. 135-196.
- Bollag, D.M. and S.J. Edelstein. 1991. Protein methods. John Wiley and Sons, New York. p. 31-45.
- Boyer, E.W. and P.A. Hartman. 1971. Extracellular transglucocylase and α -amylase of *Streptococcus equinus*. J. Bacteriol. 106:561-570.
- Fogarty, W.M. 1983. Microbial enzyme and biotechnology. Applied Science Publisher, London. p. 56-96.
- Harris, E.L. and S. Angal. 1989. Protein purification methods a practical approach. Oxford University Press, Oxford. p. 61-82.
- Hayashida, S.Y. Teramoto, and T. Inoue. 1998. Production and characteristics of rawpotato-strach digesting α -amylase from *Bacillus subtilis* 65. J. Appl. Environ. Microbiol. 54:960-965.
- Irawadi, T.T., H.S. Rukmini, dan I. Mapiliandari. 1992. Teknik pemurnian selulase. Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor.
- Judoamidjojo, R.M., A.A. Darwis, dan E.G. Sa'id. 1992. Teknologi fermentasi. Rajawali Press, Jakarta.
- Kim, T.U., B.G. Gu, J.Y. Yeong, S.M. Byun, and Y.C. Shin. 1995. Purification and characterization of maltotriose-forming alkaline α -amylase from an alkalophilic *Bacillus* strain GM8901. J. Appl. and Environ. Microbiol. p. 3105-3112.
- Kimura, A. and Chiba. 1983. Quantitative study of numeric forms of maltose produced by α and β -amylase. Agric. Biol. Chem. 47:1747-1753.
- King, R.S. 1992. Aqueous two phase, partitioning in Biotechnology. Polymer Application for Biotechnology. p. 55-81.
- Kobayashi T, H. Kanai, T. Hayashi, T. Akiba, R. Akaboshi, and K. Horikoshi. 1996. Haloalkaliphilic maltotriose forming α -amylase from the archaeobacterium *Natronococcus* sp. strain Ah-36. J. Bacteriol. 174(11):3439-3444.
- Kula, M.K. 1997. Aqueous phase separation in bioactive microbial product. In Stower et al. (Ed.). Biotechnology. Academic Press. London p. 725-762.
- Lestari, P., N. Richana, dan U. Murdiyatmo. 1999. Pemurnian α -amilase *Bacillus stearothermophilus* dengan membran ultrafiltrasi. Dalam Moeljo-pawiro, S., T. Purwadaria, M. Herman., A. Rukyani, Sutrisno, H. Kasim, dan I.N. Orban (Eds.). Prosiding Ekspose Hasil Penelitian Bioteknologi Pertanian. Jakarta, 31 Agustus-1 September 1999.
- Lillford, P.J. 1988. Large scale method for protein separation and isolation. In Frank, F. (Ed.). Characterization of Protein. Humana Press, New York. p. 123-145.
- Manning, G.B. and L.L. Campbell. 1961. Thermostable α -amylase of *Bacillus stearothermophilus* I: Crystallization and general properties. Journal of Biological Chemistry 236:2957-2962.
- Melliawati R., N.R. Prayitno, R. Wiryosasmata, Yopi, J. Rachmat, A.M. Fuad, dan A. Purnawan. 1995. Produksi enzim amiloglukosidase melalui proses fermentasi substrat cair. Kabinawa et al. (Ed.). Laporan Hasil Penelitian Bioteknologi. Pusat Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi LIPI. hlm. 133-150.
- Mounthford, D.O. and R.A. Asher. 1988. Production of α -amylases by ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. Appl. Environ. Microbiol. 54:2293-2299.
- Prave, P., U. Faust, W. Sittig, and D.A. Sukatsch. 1987. Fundamentals of biotechnology. VCH Verlagsgesellschaft mbH. Weinheim.
- Pomeranz, Y. and C.L. Meloan. 1980. Food analysis: Theory and practice. AVI Pub. Co. Inc., Westport, Connecticut.
- Pujoyuwono, M., D. Trinovia, N. Richana, D.S. Damardjati, dan U. Murdiyatmo. 1997. Karakterisasi enzim amilase dari beberapa strain bakteri indigenous Indonesia. Prosiding Seminar Teknologi Pangan, Denpasar, Bali.
- Rachman, A. 1989. Pengantar teknologi fermentasi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor.
- Ratanakhanokchai, K., J. Kaneko, Y. Kamio, and K. Izaki. 1992. Purification and properties of maltotriose and maltotriose-producing α -amylase from *Chloroflexus auranticus*. Appl. Environ. Microbiol. 58:2490-2494.
- Ratledge, C. 1987. Biochemistry of growth and metabolism. In Bu'Lock and Kristiansen (Eds.). Basic Biotechnology. Acad. Press, New York. p. 11-39.
- Richana, N., N. Yusri, N. Azizah, D.S. Damardjati, dan U. Murdiyatmo. 1999a. Produksi amilase oleh isolat bakteri termofil indigenous. Penelitian Pertanian Tanaman Pangan. 18(2):39-45.
- Richana, N., A. Setyawan, L. Hartoto, dan D.S. Damardjati. 1999b. Kinetika kultivasi produksi α -amilase oleh isolat bakteri mesofilik MII-10. J. Bioteknologi Pertanian 4(2):41-48.

- Richana, N., M.D. Ahmadi, R. Masrina, D.S. Damardjati, dan U. Murdiyatmo. 2000. Purifikasi menggunakan Prep Cell dan karakterisasi α -amilase dari isolat *Bacillus* sp. MII-10. Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman I. Bogor, 29 Februari-1 Maret 2000.
- Rosalinda, P., N.S. Hartati, R. Melliawati, E. Sukara, dan R. Wiryasasmita. 1994. Teknologi enzim. Laporan Teknik Proyek Penelitian Bioteknologi. Pusat Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi LIPI.
- Shih, N.J. and R.G. Labbe. 1995. Purification and characterization of an extracellular α -amylase from *Clostridium perfringens* type A. J. Appl. Environ. Microbiol. 61:1776-1779.
- Somers, W., J. Visser, F.M. Rombouts, and K. Van't Riet. 1989. Developments in downstream processing of polysaccharide converting enzymes. J. Biotechnol. 11:199-222.
- Stanbury, P.F. and A. Whitaker. 1984. Principles of fermentation technology. Pergamon Press, London. p. 26-71.
- Stellwagen, E. 1990. Gel filtration. In Duetcher, M.P. (Ed.). Methods in Enzymology: Guide to Protein Purification. Academic Press Inc., Sandiego, California. 128:135-156.
- Stredansky, M., R. Svore, E. Sturdik, and K. Dercove. 1993. Repeated batch α -amylase production in aqueous two-phase system with *Bacillus* strain. J. Biotechnol. 27:181-190.
- Suhartono, M.T. 1989. Enzim dan bioteknologi. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi-Pusat Antar Universitas Institut Pertanian Bogor.
- Thontowi A., Y.F. Marni, dan N. Richana. 2000. Pemurnian α -amilase dari *Bacillus stearothermophilus* TII-12 dengan sistem dua fase polyethylene glycol (PEG)-garam fosfat. Seminar Ilmiah Tahunan PERMI. Denpasar, 27-28 Juni 2000.
- Vihinen M. and P. Manstala. 1989. Microbial amylolytic enzymes. Critic. Rev. Biochem. and Mol. Biol. 24(4):329-418.
- Wang, D.I.C., C.L. Cooney, A.L. Demain, P. Dunhill, A.E. Humphrey, and M.D. Lily. 1979. Fermentation and enzyme technology. John Wiley and Sons, New York. p. 72-81.
- Whitaker, J.R. 1972. Principles of enzymology for the food science. Marcel Dekker Inc., New York. p. 140-159.
- Yoo, Y.J., T.W. Cadman, J. Hong, and R.T. Hatch. 1988. Kinetics of α -amylase synthesis from *Bacillus amyloliquefaciens*. J. Biotechnol. and Bioengin. 31:357-365.