Efek Kondisi Lingkungan Kultur terhadap Produksi Amilase Termostabil oleh *Bacillus sphaericus* AK-1 Tanah Api Kayangan Bojonegoro Jawa Timur

Achmad Toto Poernomo*, Isnaeni
Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya

*Corresponding author: achmad.toto.p@gmail.com

Abstract

Background*: Amylase production has been investigated using bacteria isolated from soil Api Kayangan Bojonegoro, East Java. Objectives:* ***Objective****: This study aimed to isolate and identify the bacteria and investigate the effects of culture conditions on amylase activity.* ***Methods****: The bacteria were cultured in media containing soluble starch as carbon source. The addition of calcium (15 mM) or yeast extract (0.5%) and peptone (2%) to the media and the starch dissolved minerals will reduce the time lag phase and extend the growth and production of amylase. Glucose added to the culture reducing the production of amylase, so that the effect of glucose on these organisms.* ***Results****: Initial pH media and optimum temperature on amylase production by organisms respectively 7.0 and 50°C. The optimal temperature and pH for the activity of each 50°C and 6.0. Enzyme solution retained 100% activity when incubated at 90°C for one hour and 40% at 60°C for 24 hours.* ***Conlclusion****: Glucose in the culture will decrease the production of amylase.*

Keywords*: amylase, thermophilic bacterium, thermostable enzyme, Bacillus sphaericus ak-1*

Abstrak

Pendahuluan: Produksi amilase telah diteliti menggunakan bakteri yang diisolasi dari tanah Api Kayangan Bojonegoro Jawa Timur. **Tujuan**: Penelitian ini bertujuan mengisolasi dan identifikasi bakteri dan menggetahui efek kondisi kultur pada aktivitas amilase. **Metode**: Bakteri dikulturkan pada media yang mengandung pati terlarut sebagai sumber karbon tunggal. Penambahan kalsium (15 mM) atau ekstrak yeast (0,5%) dan pepton (2%) ke media pati terlarut dan mineral akan mengurangi waktu fase lag dan memperpanjang pertumbuhan dan produksi amilase. Pemberian glukosa pada kultur mengurangi produksi amilase, sehingga menunjukkan bahwa efek glukosa berpengaruh pada organisme ini. **Hasil**: pH media awal dan suhu optimum pada produksi amilase oleh organisme masing-masing 7,0 dan 50°C. Suhu dan pH optimal untuk aktivitas masing-masing 50°C dan 6,0. Larutan enzim dipertahankan aktivitasnya 100% saat diinkubasi pada suhu 90°C selama satu jam dan 40% pada suhu 60°C selama 24 jam. **Kesimpulan**: Pemberian glukosa pada kultur akan menurunkan produksi amilase.

Kata kunci: amilase, bakteri termofilik, enzim termostabil, *Bacillus sphaericus* Ak-1

PENDAHULUAN

Penemuan enzim pendegradasi pati telah menjadikan peningkatan aplikasi amilase dalam berbagai proses industri (Zaferanloo dkk., 2013). Amilase (1,4-α-D-glukan glukanohi drolase, EC 3.2.1.1) menghidrolisis ikatan α-1,4 glukosidik pada pati sebagai substrat amilase (Tymoczko dkk., 2013; Voet dkk., 2013). Amilase secara komersial memiliki aplikasi yang luas pada pembuatan minuman, industri tekstil, dan kertas serta deterjen (Zaferanloo dkk., 2013). Termostabilitas memegang peranan penting pada industri dan mikroorganisme termofilik sebagai sumber enzim termostabil baru. Penelitian terbaru bahwa amilase termostabil dapat dihasilkan dari mikroorganisme yang mempunyai sifat termofilik dan ekstratermofilik dan sedikit yang diketahui tentang sifat-sifat enzim yang dihasilkan oleh organisme ini. Penelitian ini berhubungan dengan isolasi dan identifikasi bakteri serta menggambarkan efek dari kondisi kultur pada aktivitas amilase.

P-ISSN: 2406-9388
E-ISSN: 2580-8303

BAHAN DAN METODE

Kultur media

Cawan petri agar A terdiri dari 2,0% *Bacto-tryptone*, 2,0% ekstrak *Bacto-yeast*, 2,0% NaCl dan 2% agar pada pH 7,0. Ini digunakan untuk seleksi bakteri termofilik.

Cawan petri agar B yang terdiri 2% pati terlarut, 0,2% ekstrak yeast, 0,5% pepton, 0,1% $MgSO_4$, 0,1% NaCl, 0,025% $CaCl_2$ dan agar 3% pada pH 7,0. Ini digunakan untuk skrining bakteri yang mampu menghasilkan amilase.

Media cair untuk produksi enzim (g/L): 10,0 pati terlarut, 1,56 $NaH_2PO_4.2H_2O$, 5,35 NH_4Cl, 0,745 KCl, 0,64 Na_2 $SO_4.10H_2O$, 0,42 asam sitrat, 0,25 $MgCl_2.6H_2O$, $2.0x10^{-3}$ $CaCl_2$, $2.0x10^{-3}$ ZnO, $2.5x10^{-2}$ $FeCl_3.6H_2O$, 1,5 x 10^{-2} $MnCl_2.4H_2O$, $8.0x10^{-4}$ $CuCl_2.2H_2O$, $2.5x10^{-3}$ $CoCl_2.6H2O$, $2.0x10^{-4}$ $NiCl_2.6H_2H_2O$, $2.0x10^{-4}$ H_3BO_4 , 1.5 x 10^{-3} Na_2Mo_4 dan $1.0x10^{-3}$ Biotin. pH diatur 7,2 dan media disterilkan dengan autoklaf pada 121^oC, 15 psi selama 30 menit.

Isolasi dan determinasi bakteri termofilik yang memproduksi amilase

Suspensi tanah Api Kayangan dalam akuades steril suhu 60^oC, dituangkan dan disebarkan ke cawan petri agar A. Cawan ini diinkubasi pada suhu 55°C selama 48 jam. Koloni yang ditemukan dipindahkan ke cawan petri agar B. Cawan petri ini diinkubasi pada 55°C selama 48 jam. Beberapa koloni bakteri yang memproduksi amilase dipilih setelah cawan petri dituangkan dengan larutan yodium. Strain yang menghasilkan amilase paling tinggi dipilih untuk uji lebih lanjut. Dilakukan karakterisasi fisiologi secara biokimia dan hasilnya akan di determinasi dengan acuan buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, dan diketahui genus dan spesies dari bakteri tersebut.

Kondisi lingkungan kultur

Bakteri akan tumbuh pada cawan petri agar B, seperti yang dijelaskan oleh Mukesh dkk. (2012), dan cawan petri diinkubasi pada suhu 55°C selama 18 jam. Media cair (sekitar 5 mL) dipipet ke dalam cawan petri agar B dan sel-sel diambil menggunakan pipet Pasteur steril. Media cair (sebanyak 50 mL dalam labu Erlenmeyer *ca* 250 mL) diinokulasi dengan suspensi ini untuk memberikan transmitan 25% pada 470 nm dan inokulum diinkubasi pada 50° C dengan aerasi yang kuat dalam *shaker incubator* kecepatan 250 rpm selama 96 jam. Sebelum uji, sel-sel dipisahkan dengan sentrifugasi 10000 rpm. Supernatan yang jernih digunakan untuki preparasi enzim kasar. Perlakuan untuk mengetahui pengaruh suhu dan pH pada pertumbuhan bakteri dan produksi amilase dilakukan pada suhu yang bervariasi dari 30° C hingga 60° C, dan pada berbagai nilai pH yang bervariasi 4,0 - 9,0 selama 40 jam.

Berat sel kering

Berat sel kering ditentukan dengan menggunakan metode Sreekanth dkk. (Sreekanth dkk., 2013). Lima mL Sampel (replikasi 3 kali) disentrifugasi pada 5000 rpm selama 10 menit dan dicuci sekali dalam akuades steril. Sel-sel disuspensikan kembali dalam akuades steril (2 mL) dan dituangkan ke dalam tabung sebelum ditimbang. Tambahan akuades steril (2x2 mL) untuk memastikan bahwa semua sel yang tersisa dicuci sudah keluar dari tabung. Dikeringkan sampai berat konstan dalam oven pada suhu 105° C. Tabung didinginkan dalam desikator dan ditimbang pada neraca analitik.

Prosedur analisis enzim

Uji amilase didasarkan pada pengurangan intensitas warna biru yang dihasilkan dari hidrolisis amilase pada substrat pati (Shaw dkk., 1995). Reaksi yang terkandung enzim 1 mL (sel bebas supernatan) dan 10 mL larutan kanji 1% diinkubasi pada 50°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 10 mL 0,1 N HCl. Satu mililiter larutan ini ditambahkan ke 10 mL 0,1 N HCl. Dari 1 mL ini ditambahkan ke 10 mL larutan yodium (0,05% yodium dalam 0,5% KI). Kerapatan optik (OD) larutan berwarna biru ditentukan pada panjang gelombang 660 nm. Prosedur yang sama diulangi menggunakan akuades 1 mL sebagai blanko. Satu unit aktivitas amilase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menyebabkan pengurangan 1% dari intensitas warna biru larutan pati-yodium pada suhu 50° C dalam 1 menit.

Pengaruh suhu pada aktivitas amilase

Profil aktivitas amilase diperoleh dengan mengukur aktivitas amilase dalam 0,1 M dapar asam sitrat-natrium fosfat, antara suhu 30° C dan 90 ° C. Dan pH 6,0,

Pengaruh pH pada aktivitas amilase

Pengaruh pH pada aktivitas amilase diukur pada suhu 50° C dalam larutan dapar yang berbeda.

P-ISSN: 2406-9388
E-ISSN: 2580-8303

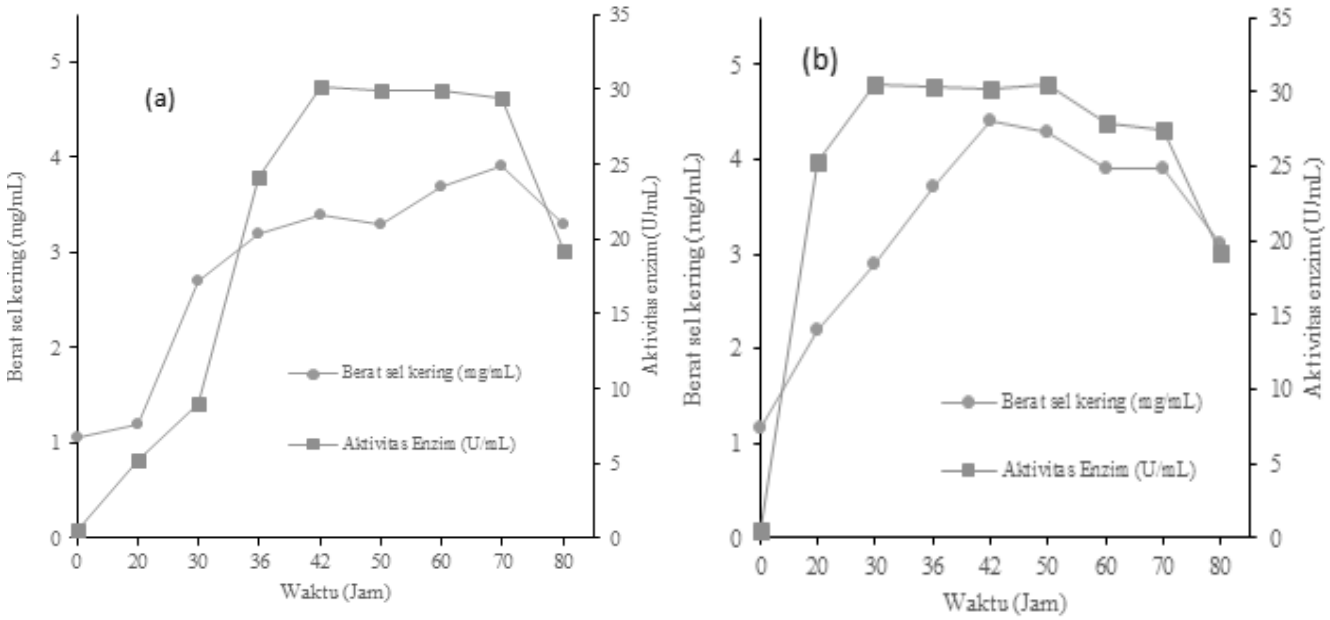
HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan determinasi bakteri termofilik yang memproduksi amilase

Strain basil Gram-positif, negatif pada tes Voges-Proskauer (pada pH 7,2), dan anaerob fakultatif. Motil aktif, panjang 2,5 - 3,0 um dan lebar sekitar 0,6 um, dengan spora terpusat dan didominasi sporangia silinder yang kecil. strain memiliki kemampuan untuk menghidrolisis baik pati dan gelatin. Katalase positif. Indole tidak dibentuk, dan pembentukan asetoin positif. Nitrat berubah menjadi nitrit. pH akhir setelah pertumbuhan pada larutan glukosa sekitar 5,5 dan pertumbuhan diperoleh dalam larutan nutrisi yang mengandung 7% NaCl. Sel akan tumbuh dalam nutrien broth pada 30° C hingga 60° C dan optimum pada suhu 50° C selama 24 jam. Dari hasil ini, strain diidentifikasi sebagai *Bacillus sphaericus* dengan kriteria yang dicantumkan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.

Produksi enzim

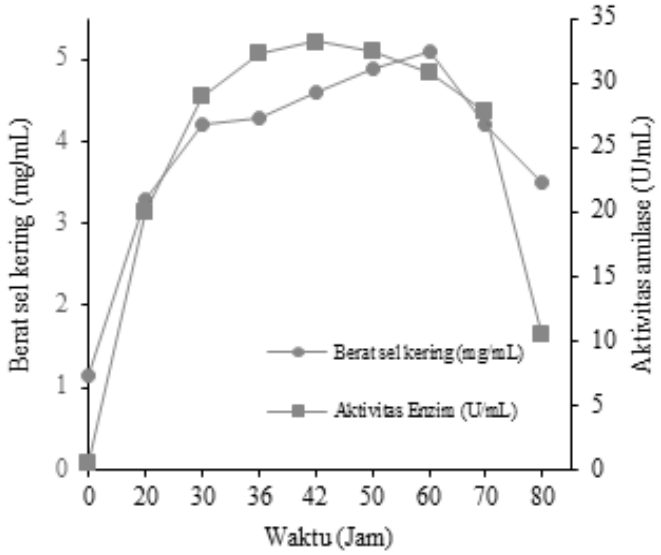
Pengukuran aktivitas amilase dan pertumbuhan sel *Bacillus sphaericus* di sejumlah interval waktu ditunjukkan pada Gambar 1. Awalnya, organisme ditumbuhkan dalam media cair (Gambar 1a) lalu, di media cair ditambah dengan garam kalsium (15 mM) (Gambar. 1b). Penambahan garam kalsium ke media cair dapat meningkatkan pertumbuhan dan produksi amilase. Karena enzim ini dikenal sebagai metalloenzim kalsium, ada kemungkinan hasil yang ditemukan adalah karena semakin tersedianya ion kalsium. Hasil ini mirip dengan temuan (Saha dkk., 2014), dengan kultur *Bacillus amyloliquefaciens*.



Gambar 1. Waktu pertumbuhan dan produksi amilase oleh *Bacillus sphaericus* AK-1 dalam media cair (a) dan dalam media cair ditambah dengan kalsium (b).

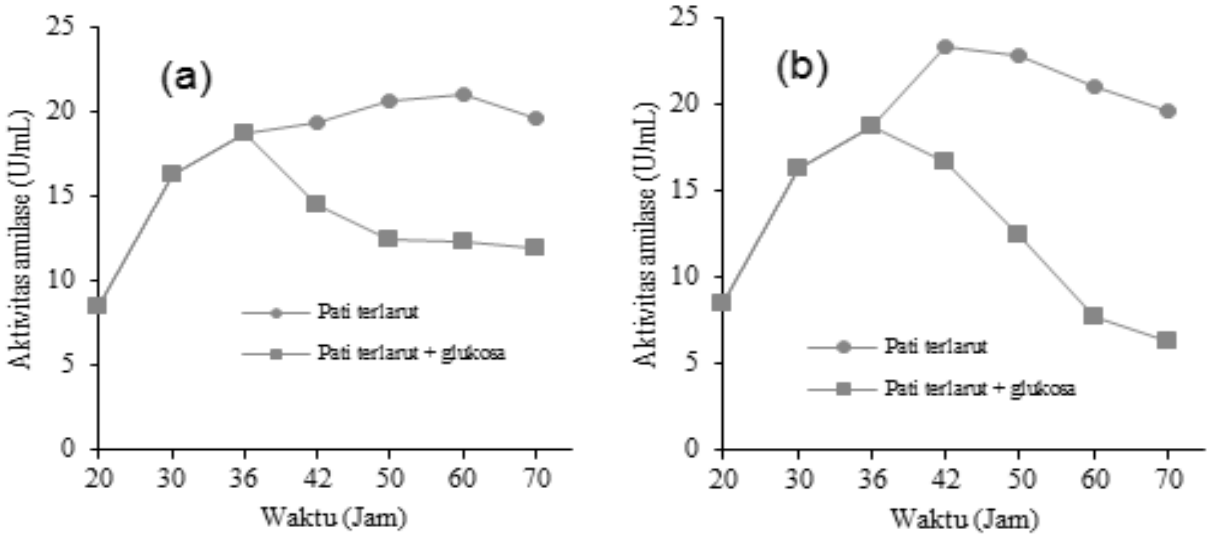
Produksi amilase oleh beberapa mikroorganisme telah berkaitan dengan ada tidaknya berbagai asam amino dan sumber nitrogen kompleks dalam media kultur (Saha dkk., 2014; Mukesh dkk., 2012). Pada penambahan ekstrak yeast (0,5%) dan pepton (2%) pada media cair akan memperpendek fase lag dan dapat meningkatkan baik berat kering sel dan produksi enzim (Gambar. 2).

P-ISSN: 2406-9388
E-ISSN: 2580-8303



Gambar 2. Waktu pertumbuhan dan produksi amilase oleh *Bacillus sphaericus* AK-1 dalam media cair yang ditambah ekstrak yeast dan pepton

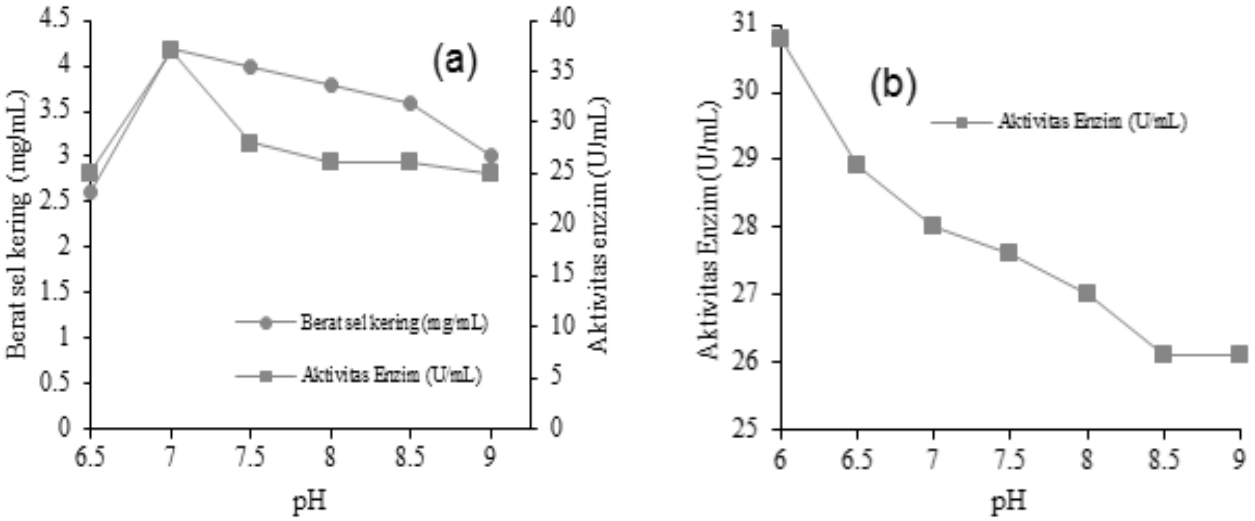
Oleh karena itu, hasilnya menunjukkan bahwa ekstrak *yeast* dan pepton disukai untuk pertumbuhan dan produksi amilase oleh bakteri ini. Telah dilaporkan bahwa produksi enzim pendegradasi karbohidrat di sebagian besar spesies genus Bacillus mengikuti represi katabolik oleh substrat seperti glukosa (Santos dkk., 2003). Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian tersebut. Penambahan glukosa (0,5%) pada kultur dapat menurunkan produksi amilase (Gambar. 3).



Gambar 3. Penekanan glukosa pada produksi amilas, sel tumbuh pada media cair dengan 0,5% (a) dan 1,0% (b) pati terlarut

Hasil ini mirip dengan temuan Sivakumar dkk. (Sivakumar dkk., 2012; Bini dkk., 2002), yang mengamati bahwa glukosa menekan produksi amilase pada *Bacillus cereus* dan *archaeon* hipermofilik *Sulfolobus solfataricus*. Dikatakan bahwa glukosa mencegah ekspresi gen amilase dan bukan hanya sekresi enzim yang terbentuk sebelumnya. Organisme tidak tumbuh pada media kultur yang telah diatur dengan pH 4.0, 5.0, 6.0 dan 10.0 (Gambar.4).

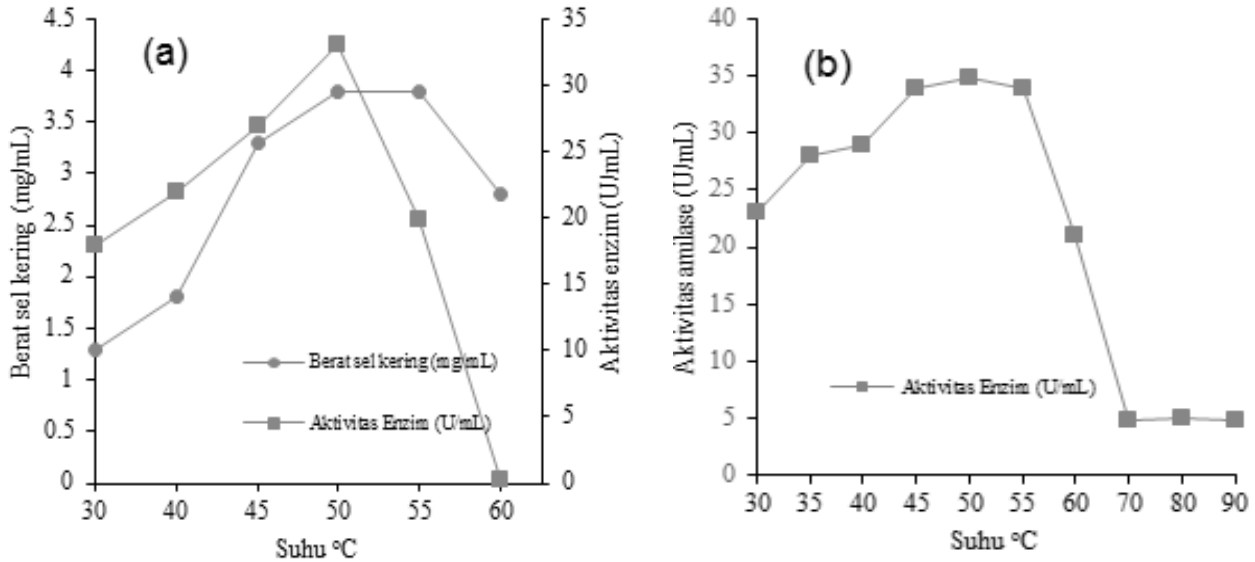
P-ISSN: 2406-9388
E-ISSN: 2580-8303



Gambar 4. Pengaruh pH awal medium kultur pada pertumbuhan dan produksi amilase oleh *Bacillus* AK-1 (a) dan pengaruh pH terhadap aktivitas amilase pada suhu 50 ° C (b)

Pada media dimana pertumbuhan bakteri terjadi, pH meningkat setelah 18 jam fermentasi, dan tidak pernah mencapai nilai lebih besar dari 9,0. Aktivitas amilase meningkat selama 72 jam inkubasi pada semua nilai pH. Hasil ini menunjukkan bahwa ada stimulasi sintesis enzim pada pH 7.0 dan bahwa produksi enzim yang lebih tinggi pada pH ini adalah hasil pertumbuhan sel yang meningkat. pH optimum untuk aktivitas amilase adalah antara 6,0 dan 6,5. Ada hampir 73% penurunan aktivitas maksimum pada pH 8,5 atau 9,0.

Genus *Bacillus* dapat menghasilkan enzim dengan aktivitas optimal pada nilai pH serendah 3,5 atau setinggi 10,6 (Dutta dkk., 2006). Pertumbuhan dan produksi enzim keduanya meningkat dengan suhu di kisaran 30°C hingga 50°C dengan optimal pada suhu 50°C (Gambar. 5a). Dengan demikian, hasil penelitian menunjukkan bahwa suhu optimum untuk produksi amilase dan pertumbuhan bakteri adalah sama. Peneliti lain juga melaporkan bahwa produksi amilase maksimum terjadi pada suhu pertumbuhan optimum (Saha dkk., 2014). Suhu optimum aktivitas amilase adalah antara 45°C dan 55°C. Penurunan aktivitas amilase diamati pada nilai di atas 60°C (Gambar. 5b).

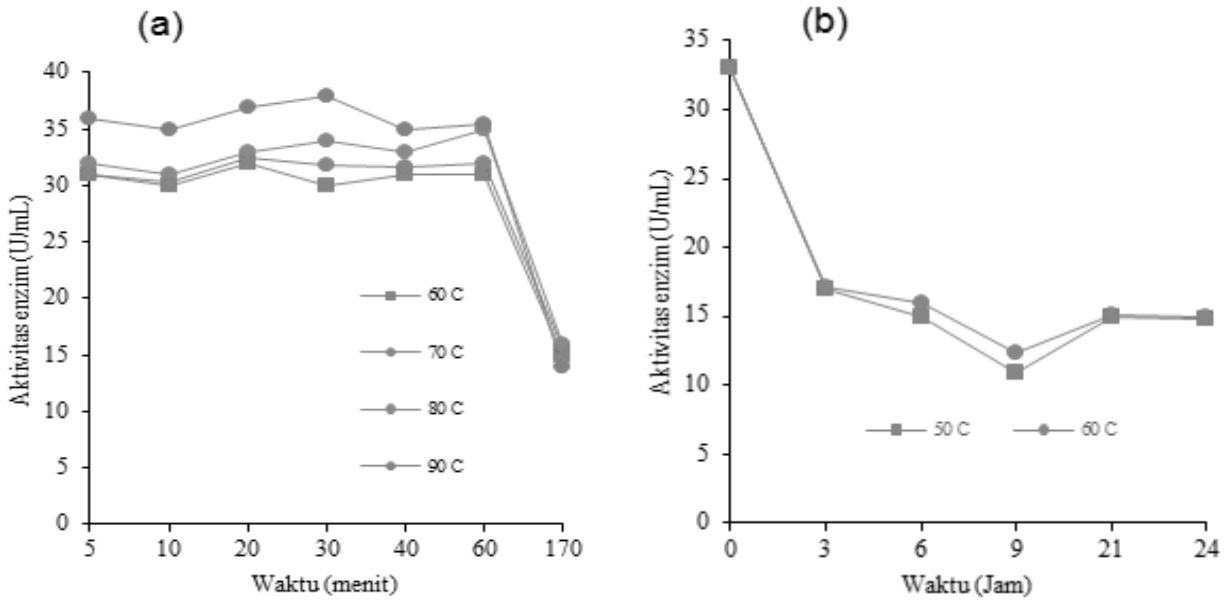


Gambar 5. Pengaruh suhu pada pertumbuhan dan produksi amilase *Bacillus sphaericus* AK-1 (a) dan pengaruh suhu terhadap aktivitas amilase (b)

P-ISSN: 2406-9388
E-ISSN: 2580-8303

Menurut hasil penelitian, kondisi yang optimal untuk pertumbuhan sel cukup memadai untuk produksi amilase. Hasil ini berbeda dengan peneltian Alberto dkk. (2002) untuk *Bacillus licheniformis.* Mikroorganisme ini tidak menghasilkan amilase pada 30° C meskipun tumbuh dengan baik pada suhu ini. Selain itu, (Saha dkk., (2014), mempelajari *B. amyloliquefaciens* yang menghasilkan amilase pada suhu sekitar 50° C dan tidak pernah menghasilkan enzim pada suhu lebih rendah dari 45°C (Alberto dkk. 2002). Ekstrak kasar enzim aktivitasnya dipertahankan 100% saat diinkubasi selama satu jam pada suhu 90°C (Gambar. 6a).

Setelah waktu ini aktivitasnya menurun drastis. Setelah 24 jam pada suhu 50°C dan 60°C, enzim dipertahankan 65% dan 62% dari aktivitas awalnya (Gambar. 6b) dan tidak aktif pada inkubasi suhu 95°C selama 10 menit. Stabilitas suhu amilase dari *Bacillus licheniformis* 584 telah dilaporkan oleh Saito (1973). Enzim ini cepat kehilangan aktivitas pada suhu di atas 76° C. Menurut hasil yang disajikan dalam artikel ini, amilase dari *Bacillus sphaericus* AK-1, bersifat thermo stabil.



Gambar 6 Pengaruh suhu pada stabilitas amilase diuji dengan rentang waktu sampai dengan 170 menit (a) rentang waktu sampai dengan 24 jam (b).

KESIMPULAN

pH media awal dan suhu optimum pada produksi amilase oleh organisme masing-masing 7,0 dan 50° C. Suhu dan pH optimal untuk aktivitas masing-masing 50°C dan 6,0. Larutan enzim dipertahankan aktivitasnya 100% saat diinkubasi pada suhu 90°C selama satu jam dan 40% pada suhu 60°C selama 24 jam. Pemberian glukosa pada kultur akan menurunkan produksi amilase.

DAFTAR PUSTAKA

Alberto, C., Cordeiro, M., Lelis, M., Martins, L. & Luciano, A. B. (2002). Production and Properties Of α-Amylase from Thermophilic Bacillus Sp. *Brazilian Journal of Microbiology; 33;* 57–61.

Bini, E., Dikshit, V., Dirksen, K., Drozda, M. & Blum, P. (2002). Stability of mRNA in the Hyperthermophilic Archaeon Sulfolobus Solfataricus. *RNA (New York, N.Y.)*; *8;* 1129–1136.

Dutta, T. K., Jana, M., Pahari, P. R. & Bhattacharya, T. (2006). The Effect of Temperature, pH, and Salt on Amylase in *Heliodiaptomus viduus* (Gurney) (Crustacea: Copepoda: Calanoida). *Turkish Journal of Zoology*; *30*; 187–195.

Mukesh, K., Andal, P., Suresh, K., Saranya, G., Rajendran, K. & Kalaichelvan, P. (2012). Production, Purification and Characterization of α-Amylase and Alkaline Protease by Bacillus sp . HPE 10 in a Concomitant Production Medium. *Pelagia Research Library*; *2*; 376–382.

Saha, K., Maity, S., Roy, S., Pahan, K., Pathak, R., Majumdar, S. & Gupta, S. (2014). Optimization of Amylase Production from B. amyloliquefaciens (MTCC 1270) using Solid State Fermentation. *International Journal of Microbiology*; *2014;* 1-7.

Saito, N. (1973). Thermophilic Extracellular Alfa-

Amylase from *Bacillus licheniformis*. *Arch Biochem Biophys*; *155;* 290–298.

Santos, E. D. O., Lelis, M. & Martins, L. (2003). Effect of the Medium Composition on Formation of Amylase by Bacillus sp. *Brazilian Archives Of Biology Technology; 46;* 129-134.

Shaw, J., Lin, F., Chen, S. & Chen, H. (1995). Purification and Properties of an Extracellular α-Amylase from Thermus sp. *Botanical Bulletin of Academia Sinica; 36;* 195-200.

Sivakumar, T., Shankar, T., Vijayabaskar, P., Muthukumar, J. & Nagendrakanna, E. (2012). Amylase Production using *Bacillus cereus* Isolated from a Vermicompost Site. *International Journal of Microbiological Research*; *10;* 55–64.

Sreekanth, M. S., Vijayendra, S. V. N., Joshi, G. J. & Shamala, T. R. (2013). Effect of Carbon and Nitrogen Sources on Simultaneous Production of Alpha-Amylase and Green Food Packaging Polymer by *Bacillus sp*. CFR 67. *Journal of Food Science and Technology*; *50;* 404–408.

Tymoczko, J. L., Berg, J. M. & Stryer, L. (2013). *Biochemistry A Short Course* (Third Ed.). New York: Kate Ahr Parker W. H. Freeman and Company 41 Madison.

Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2013). *Fundamentals of Biochemistry Life at the Molecular* (fourth). John Wiley & Sons, Inc.

Zaferanloo, B., Virkar, A., Mahon, P. J. & Palombo, E. A. (2013). Endophytes from an Australian Native Plant are a Promising Source of Industrially Useful Enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*; *29*; 335–345.

P-ISSN: 2406-9388
E-ISSN: 2580-8303