

KINETIKA PERTUMBUHAN BEBERAPA MIKROBA PENGHASIL α – AMILASE MENGGUNAKAN MOLASE SEBAGAI SUMBER KARBON

Trismilah¹ dan Sumaryanto^{2,3}

¹Pusat Pengkajian Teknologi Bioindustri, BPPT

²Pusat Pengkajian Kebijakan Inovasi Teknologi, BPPT

³Pascasarjana Ilmu Kefarmasian, Universitas Pancasila

Fax / Telp. 7560562 Ext. 3298, 7560536, e-mail : trismilah_m@yahoo.com

Abstract

Molasse as a waste product in sugar industry can be used as alternative carbon source in fermentation, which influences the growth of microbes and production process. In this experiment 5% molasses was used as a medium for producing α – amylase using *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Streptomyces fradiae*, and *Aspergillus niger*. The experiment was done in an Erlenmeyer of 125 ml in a shaker incubator with 250 rpm agitation. The temperature was adjusted to 37°C and the initial pH for *Bacillus subtilis* ATCC 6633: waste pH=8; *Streptomyces fradiae*: pH=7, and *Aspergillus niger* : pH=5. The result showed, that the highest growth and enzyme activity were accomplished by *Bacillus subtilis* ATCC, while specific growth rate (μ max)= 0,1501 in 24 hours attained.

Key words: α -Amylase, *B. subtilis* ATCC 6633, *S. fradiae* dan *Aspergillus niger*, activity.

I. Pendahuluan

Enzim α -amilase (α -1,4-Glukan-Glukan hidrolase, EC 3.2.1.1) terdapat pada jaringan tanaman, mamalia dan mikroba, sehingga α -amilase dapat di isolasi atau diproduksi dari mikroba (bakteri dan kapang). Bakteri yang dapat memproduksi enzim α -amilase antara lain : *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* dan *Bacillus cereus*. Jenis kapang antara lain *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* dan *Penicillium* sp.¹⁾. Enzim yang berasal dari bakteri pada umumnya bersifat lebih stabil terhadap kalor daripada enzim yang diekstraksi dari jamur. α -Amilase yang berasal dari bakteri biasanya stabil pada pH 5,5-8 dengan aktivitas optimum pada pH 4,8-6,5, akan tetapi pH optimum dapat berbeda-beda tergantung dari sumber penghasil enzimnya. Tabel 1 memperlihatkan berbagai jenis mikroba penghasil amilase dengan pH, suhu optimumnya masing-masing.

Berdasarkan mekanisme kerjanya enzim α -amilase dapat dibagi dalam dua kelompok, yaitu endoamilase dan eksoamilase. Endoamilase tersebut menghidrolisis ikatan α -1,4-glukosidik, pada polisakarida menjadi amilosa, amilopektin dan glikogen. Hasil degradasinya adalah secara acak, dapat dibagian tengah atau bagian dalam molekul maupun diujung atau tepi, sedangkan α -1,6 yang merupakan titik percabangan amilopektin dan glikogen tidak dapat dihidrolisis oleh α -amilase²⁾.

Golongan enzim α -amilase yang tahan terhadap temperatur tinggi digunakan pada proses liquifikasi, sedangkan α -amilase yang bersifat labil digunakan dalam sakarifikasi

Tabel 1. Beberapa sifat stabilitas α -amilase dari berbagai mikroba³⁾

Jenis Mikroba	pH optimum	T ^o C optimum	EM x10 ³
<i>B. subtilis</i>	5,3 – 6,4	50	47
<i>B. licheniformis</i>	5 – 8	76	22
<i>B. stearothermophilus</i>	4,6 – 5,1	55 - 70	48
<i>B. coagulans</i>	7,5 – 8,5	85	-
<i>Mucor pusillus</i>	3,5 - 4	65-70	48
<i>Aspergillus oryzae</i>	5,5 – 5,9	40	52,6
<i>Aspergillus niger</i>			
1. Tahan asam	3,5 – 6,5	50	58
2. Tidak tahan asam	5 - 6	35	61

Enzim mempunyai nilai ekonomi tinggi dan banyak digunakan dalam industri pangan dan non pangan. Manfaat enzim dalam bidang pangan antara lain: memperbaiki tekstur adonan roti, menjemihkan bir,

melunakkan daging, menghidrolisis laktosa dalam susu skim yang menghasilkan produk bebas laktosa untuk konsumen penderita defisiensi dalam ususnya, mengubah air dadih laktosa menjadi sirup glukosa atau galaktosa, sedangkan dalam bidang non pangan enzim digunakan dalam industri tekstil, kulit dan deterjen^{4,5)}. Namun di Indonesia belum ada industri yang memproduksi enzim dalam skala besar sehingga penyediaan enzim masih harus di import.

Beberapa syarat telah dikelompokkan Frost dan Moss (1987)⁶⁾ untuk mikroorganisme yang digunakan dalam produksi enzim secara komersial antara lain : cukup stabil dan mempunyai kemampuan produksi yang tinggi, dapat tumbuh pada media yang relatif murah. Pada penelitian ini sebagai media fermentasi digunakan molase dari pabrik gula Subang. Molase atau tetes tebu mengandung gula sebanyak 50% baik dalam bentuk sukrosa 20-30% maupun dalam bentuk gula-gula pereduksi 10-30%. Selain mengandung karbohidrat dalam bentuk gula juga mengandung karbohidrat dalam bentuk lain seperti xilosa, arabinosa, pati, inositol, phitin dan D-manitol, asam urat serta antosianin. Kandungan protein kasar dalam molase sekitar 2,5-4,5% separuh dari protein ini merupakan protein yang mudah dicerna. Berbagai asam amino yang terdapat dalam molase antara lain aspartat, glutamat, pirolidinkarboksilat, asapragin, lisin dan alanin serta unsur mineral yang diperlukan untuk pertumbuhan mikroba. Mikroba yang digunakan pada penelitian ini *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Streptomyces fradiae* dan *Aspergillus niger*, karena menurut Suhartono (4), mikroba tersebut aman digunakan, mudah tumbuh kembang, tidak bersifat patogen serta tidak menghasilkan produk yang bersifat toksik.

II. Bahan Dan Metodologi

Untuk produksi enzim α -amilase dilakukan tahap demi tahap: Regenerasi mikroba menggunakan media Nutrien Agar (NA), selanjutnya media pertumbuhan untuk *B. subtilis* ATCC 6633 (Bs) dan *Aspergillus niger* (An) digunakan media Sabouraud Dextrose Broth (SDB) sedangkan untuk *Streptomyces fradiae* (Sf) digunakan media Luria Bertani (LB). Kemudian untuk fermentasi media digunakan Crueger dan Crueger (1984)⁷⁾ yang dimodifikasi yaitu mengganti bahan yang mahal seperti bacto pepton ekstrak ragi dan pati terlarut dengan molase 5%. Inokulum digunakan ($\pm 10^7$ sel/ml) sebanyak 10% selanjutnya fermentasi dilakukan di dalam Erlenmeyer 125 ml volume kerja 20ml, suhu 37°C menggunakan shaker inkubator agitasi 250 rpm. Pengamatan dilakukan pada jam (0, 6, 12, 18, 24, 30, 36,

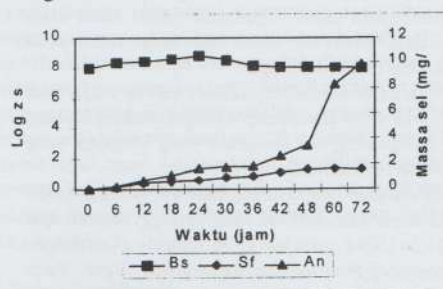
42, 48, 60, 72) meliputi jumlah sel, bobot kering sel, gula reduksi, aktivitas enzim.

Penghitungan populasi mikroba untuk memantau dan mengkaji fenomena pertumbuhan dilakukan dengan menghitung jumlah sel persatuan volume menggunakan alat *Haemacytometer* untuk *B. subtilis* ATCC 6633, sedangkan untuk *Streptomyces fradiae* dan *Aspergillus niger* dilakukan dengan konsentrasi biomassa (g massa sel kering per satuan volume kultur). Uji gula reduksi dan aktivitas enzim α -amilase dilakukan dengan metode DNS⁸⁾, aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah yang menyebabkan pengubahan 1,0 mikroMol substrat per menit pada 25°C. Sedangkan aktivitas spesifik adalah Unit/mg protein enzim.

III. Hasil Dan Pembahasan

Didalam fermentasi aerob untuk memproduksi metabolit sekunder (enzim) pertumbuhan mikroba ditentukan oleh adanya aerasi, agitasi, pH, temperatur dan komposisi media.

Pada Gambar-1 dapat dilihat bahwa pertumbuhan *B. subtilis* ATCC 6633 lebih cepat mengalami fasa penyesuaian, fasa logaritmik dan fasa stasioner dibandingkan dengan *Streptomyces fradiae* dan *Aspergillus niger*. Pertumbuhan tertinggi *B. subtilis* ATCC 6633 adalah $6,59 \times 10^8$ /ml ($\log z$ sel = 8,82) dicapai pada jam ke 24. Kemudian pertumbuhan tertinggi *Streptomyces fradiae* dicapai pada jam ke 60 dengan massa sel 1,31 mg/ml, sedangkan pertumbuhan *Aspergillus niger* masih naik terus pada akhir pengamatan proses fermentasi yaitu pada jam ke 72 dengan massa sel 9,93 mg/ml, hal ini dimungkinkan pembentukan hifa lebih banyak dibandingkan sporanya sehingga massa sel per volume kultur akan terus meningkat.



Gambar 1 : Pertumbuhan *B. subtilis* ATCC 6633 (Bs), *S. fradiae* (Sf), *A. niger* (An), dengan shaker inkubator, media molase 5%, masing-masing pada pH awal 8 (Bs), 7(Sf) dan 5 (An); T=37°C, agitasi 250 rpm.

Selanjutnya pengamatan pertumbuhan mikroba pada fase logaritmik di dalam media molase dilakukan untuk menentukan kecepatan pertumbuhan spesifik (μ_{max} /jam), waktu penggandaan (t_d jam) dan *growth yield* (Yx/s) atau nilai perbandingan sel yang terbentuk dari setiap satuan substrat dan hasilnya dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2 : Kecepatan pertumbuhan spesifik (μ_{max} /jam), waktu penggandaan (t_d jam), *growth yield* (Yx/s) dari berbagai mikroba untuk produksi α -amilase di dalam media molase 5%.

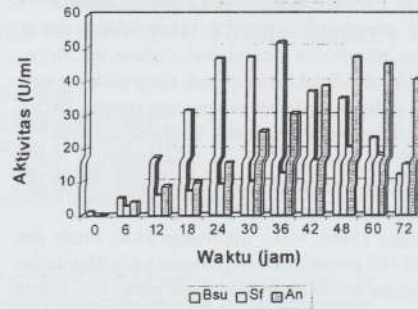
Mikroba	μ_{max} /jam	t_d jam	Yx/s
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0,1501	4,6169	0,0591
<i>Streptomyces fradiae</i>	0,0405	17,111	0,0438
<i>Aspergillus niger</i>	0,0708	9,7881	0,2779

Pada fasa logaritmik keadaan pertumbuhan sel mantap, dengan kecepatan pertumbuhan spesifik dan komposisi sel tetap, sedangkan komposisi kimiawi media biakan berubah akibat terjadinya sintesis produk dan penggunaan substrat. Menurut Wang *et al.*, 1979 pada temperatur 37°C bakteri memerlukan waktu penggandaan 20 menit sedangkan untuk jenis khamir dan kapang memerlukan 1,5 – 3 jam untuk waktu penggandaan.

Dari penelitian ini waktu penggandaan yang diperlukan oleh mikroba relatif besar karena pada penelitian ini dipakai *crude* (kasar) media sehingga mikroba memerlukan waktu yang lebih lama dibandingkan kalau fermentasi menggunakan *syntetic* (sintetis) media. Pada media sintesis setiap komponen dapat berupa senyawa yang relatif murni dan konsentrasi komponen-komponen serta strukturnya diketahui dengan pasti, sangat menguntungkan untuk digunakan dalam skala kecil namun tidak sesuai lagi untuk digunakan dalam skala besar karena mahal dan impor.

Media kasar banyak digunakan karena biaya jauh lebih murah untuk skala besar walaupun kadang-kadang tidak mengandung zat makanan yang lengkap yang dibutuhkan oleh mikroba.

Pada Gambar-2 dapat dilihat bahwa *B. subtilis* ATCC 6633 memberikan aktivitas yang tertinggi dan tercepat yaitu 51,54 UI/ml. pada jam ke 36 dibandingkan dengan *Streptomyces fradiae* dan *Aspergillus niger*. Pada kenyataannya untuk produksi enzim dengan fermentasi cair lebih sesuai menggunakan jenis bakteri daripada jenis kapang. Aktivitas enzim tertinggi dari *Streptomyces fradiae* dan *Aspergillus niger* dicapai pada jam ke 48 masing-masing adalah 20,618 UI/ml. dan 47,358 UI/ml.



Gambar 2 : Aktivitas α -amilase *B. subtilis* ATCC 6633 (Bs), *S. fradiae* (Sf), *A. niger* (An), dengan shaker inkubator, media molase 5%, masing-masing pada pH awal 8 (Bs), 7(Sf) dan 5 (An); T=37°C, agitasi 250 rpm.

IV. Kesimpulan

Dari penelitian produksi enzim α -amilase dari beberapa mikroba menggunakan molase 5%, diperoleh bahwa jenis bakteri *B. subtilis* ATCC 6633 memberikan aktivitas, kecepatan pertumbuhan spesifik, dan waktu penggandaan yang lebih tinggi dari pada *Streptomyces fradiae* dan *Aspergillus niger*

V. Daftar Pustaka

1. Priest and Sharp : Fermentation of bacilli In : Neway JO. Fermentation process development of industrial organism. New York and Basel : Marcel Dekker Inc;1989.
2. Windish WW, Mhatre NS. Microbial amylases In : Umbreit WW. Applied microbiology. Vol.7. New York and Basel : Academic Press ;1965.
3. Bull MJ. Progress in industrial microbiology. Vol.XV. Amsterdam Elsevier; 1979.
4. Suhartono MT. Enzim dan bioteknologi. Bogor PAU Bioteknologi , Institut Pertanian Bogor;1989.
5. Sardjoko. Bioteknologi, Latar Belakang dan Beberapa Penerapannya. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama; 1991.
6. Frost GM, Moss DA. Production of enzymes by fermentation. In : Rehm HJ, Reed G. Biotechnology Vol.7A; 1987.
7. Crueger W, Crueger A. A Textbook of industrial microbiology. Sunderland : Sinauer Associates; 1983.
8. Bernfeld P. Method in Enzymol. In : Stellmach B. A Bestimmungs Methoden Enzyme fur Pharmazie, Lebensmittelchemi, Technik Biochemie, Biologie, Medizin. Darmstadt : Steinkopff Verlag; 1955.