

**OPTIMALISASI pH PRODUKSI ENZIM AMILASE BAKTERI ENDOFITIK
Pseudomonas stutzeri LBKURCC53**

Fitriyanti¹, Silvera Devi², Saryono²

¹Mahasiswa Progam Studi S1 Kimia

²Bidang Biokimia Jurusan Kimia

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau

Kampus Bina Widya Pekanbaru, 28293, Indonesia

yanti92_fitri@yahoo.com

ABSTRACT

Pseudomonas stutzeri LBKURCC49, LBKURCC51 and LBKURCC53 are local endofitic bacteria that can produce amylase. Amylase is an enzyme which hydrolyze amilum into maltose and glucose by breaking down the α -1,4 glycosidic linkages. The production of amylase enzyme from microorganisms can be optimized by adjusting the fermentation conditions. The activity of amylase enzyme was determined with the DNS (*dinitrosalicylic*) methods. The highest amylase enzyme activity at pH 6.0, 40°C and 120 rpm was shown by *Pseudomonas stutzeri* LBKURCC53. Furthermore, optimalization of amylase production by LBKURCC53 was conducted performed at various pHs (6.5; 7.0; 6.0; 7.5). The results showed that the optimum amylase enzyme activity was 66.173×10^{-3} U/mL at pH 6.0.

Keywords : Amylase, DNS, *Pseudomonas stutzeri*.

ABSTRAK

Pseudomonas stutzeri LBKURCC49, LBKURCC51 dan LBKURCC53 merupakan bakteri endofitik strain lokal yang dapat menghasilkan enzim amilase. Amilase adalah enzim yang menghidrolisis amilum dengan cara memotong ikatan α -1,4 glikosida pada amilum sehingga terbentuk maltosa dan glukosa. Produksi enzim amilase suatu mikroorganisme dapat dioptimalisasi dengan mengatur kondisi fermentasinya. Aktivitas enzim amilase ditentukan dengan metode DNS (*Dinitrosalisilat*). Aktivitas enzim amilase tertinggi yang diproduksi pada pH 7,0, suhu 40°C dan agitasi 120 rpm diperoleh *Pseudomonas stutzeri* LBKURCC53. Selanjutnya produksi enzim amilase dari bakteri LBKURCC53 dioptimalisasi dengan variasi pH (6,0; 6,5; 7,0; 7,5). Hasil optimalisasi menunjukkan bahwa aktivitas enzim amilase optimum diperoleh pada pH 6,0 sebesar $66,173 \times 10^{-3}$ U/mL.

Kata kunci : Amilase, DNS, *Pseudomonas stutzeri*



PENDAHULUAN

Bakteri endofitik adalah bakteri yang hidup dalam jaringan tanaman tanpa membahayakan tanaman inangnya (Radji, 2005), yang dapat masuk ke jaringan melalui akar, bunga, daun, dan stomata serta melalui kerusakan bagian tanaman (Zinniel *et al.*, 2002). Bakteri endofitik selain memiliki kemampuan untuk menghasilkan enzim selulase juga dapat menghasilkan enzim amilase (Robi'a *et al.*, 2012).

Amilase merupakan enzim pemecah amilum yang diperoleh dari berbagai jenis makhluk hidup seperti hewan, tumbuhan dan mikroorganisme (Arunsasi *et al.*, 2010). Amilase dapat memecah amilum yang terdiri dari amilosa dan amilopektin menghasilkan maltosa, glukosa, dan dekstrin. Produksi enzim amilase umumnya menggunakan mikroorganisme karena lebih murah dan cepat tumbuh dengan pH, suhu dan agitasi tertentu (Aiyer, 2005). Produksi enzim dari suatu mikroorganisme sangat dipengaruhi oleh faktor eksternal (faktor fermentasi) dan faktor internal (faktor genetik). Faktor eksternal dipengaruhi antara lain faktor suhu, pH, sumber karbon, waktu produksi dan agitasi, sedangkan faktor internal dipengaruhi oleh DNA dari masing-masing mikroorganisme. Penelitian ini dimulai dengan seleksi bakteri berdasarkan aktivitas enzim amilase yang diproduksi dari bakteri endofitik yang telah diisolasi dari bunga dahlia yaitu *Pseudomonas stutzeri* LBKURCC49, LBKURCC51 dan LBKURCC53. Ketiga isolat bakteri ini mampu menghasilkan enzim amilase (Robi'a *et al.*, 2012), menghasilkan enzim inulinase (Purba *et al.*, 2012) dan khusus untuk LBKURCC53 juga mampu menghasilkan enzim selulase (Marlinda, 2013). *Pseudomonas stutzeri*

dengan aktivitas enzim amilase tertinggi dilakukan optimalisasi suhu produksi enzim amilase.

METODE PENELITIAN

a. Alat yang digunakan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain timbangan analitik, jarum ose, *vortex mixer*, autoklaf, *waterbath*, *shaker inkubator* dan spektrofotometer UV-Vis (*Thermo Scientific Model Genesys 10S*), pH meter (*Hanna Instrument H18014*) dan peralatan gelas lain sesuai dengan prosedur kerja.

b. Bahan yang digunakan

Bahan-bahan kimia yang digunakan yaitu glukosa, *Nutrient Agar*, *Nutrient Broth*, *filter glass fiber* (Whatman GF/C), NaN_3 , amilum, buffer fosfat 0.05 M pH 7, Asam Dinitrosalisilat, NaOH dan bahan kimia lain sesuai dengan metode kerja. Isolat yang digunakan adalah *Pseudomonas Stutzeri* LBKURCC49, LBKURCC51, dan LBKURCC53 dari koleksi Laboratorium Enzim, Fermentasi dan Bio Molekuler FMIPA UR.

METODE PENELITIAN

a. Peremajaan *Pseudomonas stutzeri* dan penyediaan inokulum

Media *nutrien agar* (NA) miring disterilisasi menggunakan autoklaf dengan tekanan 15 lb, suhu 121°C selama 20 menit. Kemudian masing-masing kultur stok *Pseudomonas Stutzeri* LBKURCC49, LBKURCC51, dan LBKURCC53 diambil satu ose secara aseptis dan diinokulasikan

kedalam media NA lalu diinkubasi didalam *incubator* pada suhu 37°C selama 24 jam.

Pseudomonas stutzeri hasil peremajaan ini diinokulasikan kembali ke dalam media cair NB dengan cara mengambil satu ose secara aseptis dan dimasukkan ke dalam 50 mL media NB dan diinkubasi dalam *shaker incubator* pada 120 rpm suhu 40°C selama 12 jam dan diukur OD nya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 660 nm. Pengukuran OD ini untuk mengetahui perkiraan jumlah sel dalam media inokulum. Masing-masing inokulum dimasukkan dengan jumlah sel yang relatif sama kedalam media produksi.

b. Produksi enzim amilase

Produksi enzim amilase adalah media NB mengandung amilum 1% (w/v). Isolat *Pseudomonas stutzeri* dari kultur yang telah diremajakan, diambil 10% kemudian diinokulasi dalam 100 mL media produksi NB mengandung amilum 1% (w/v). Sel *Pseudomonas stutzeri* ini diinkubasi dalam *shaking incubator* pada 120 rpm dan temperatur 40°C selama 12 jam (Sarah *et al.*, 2010).

Setelah diinkubasi 12 jam, media kultur yang berisi ekstrak kasar enzim didinginkan pada suhu 4°C selama kurang lebih 1 jam, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 9500 rpm selama 15 menit (Sumrin *et al.*, 2011). Ekstrak kasar enzim disaring dengan *filter glass fiber* (Whatman GF/C). Ekstrak kasar yang diperoleh diambil dengan mikropipet untuk di uji aktivitas enzimnya. Jika enzim tidak langsung digunakan untuk analisis aktivitas enzim, maka ditambahkan NaN_3 hingga konsentrasi larutan 0,02 %

(w/v) kedalam setiap larutan ekstrak kasar enzim amilase.

c. Penentuan aktivitas enzim amilase menggunakan metode DNS

Aktivitas enzim amilase yang dihasilkan ditentukan dengan metode Dinitrosalisilat (DNS) menggunakan substrat amilum. Intensitas warna yang dihasilkan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Absorbansi yang terukur ekuivalen dengan aktivitas enzim amilase.

Tabung sampel, kontrol dan blanko dilakukan secara bersamaan. Tabung sampel diisi 1 mL amilum 1%, tabung kontrol dibiarkan kosong sedangkan tabung blanko diisi dengan 2 mL buffer fosfat 0,05 M pH 7. Ketiga tabung dimasukkan kedalam *waterbath* dan diinkubasi pada suhu 40°C selama 5 menit. Setelah diinkubasi 5 menit, tabung sampel dan kontrol masing-masing ditambahkan 1mL ekstrak kasar enzim dan diinkubasi kembali dalam *waterbath* dengan suhu 40°C selama 15 menit.

Setelah diinkubasi selama 15 menit, masing-masing tabung (sampel, kontrol, blanko) ditambahkan 2mL DNS dan pada tabung kontrol ditambahkan 1mL amilum, kemudian ketiga tabung ini dimasukkan kedalam *waterbath* pada suhu 100°C selama 10 menit. Selanjutnya larutan didinginkan, dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm (Anam, 2010).

d. Optimalisasi pH Produksi Enzim

Inokulum yang menghasilkan aktivitas enzim amilase tertinggi sebanyak 10% dimasukkan kedalam 50mL media produksi enzim dengan variasi pH media (6,0; 6,5; 7,0 dan 7,5).

Kemudian diinkubasi dalam *shaking incubator* pada 120 rpm, suhu 40°C selama 12 jam. Selanjutnya media kultur yang berisi ekstrak kasar enzim tersebut didinginkan pada suhu 4°C ± 1 jam, kemudian disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 9500 rpm (Sumrin *et al.*, 2011). Ekstrak kasar enzim disaring dengan *filter glass fiber* (Whatman GF/C). Selanjutnya ekstrak kasar enzim ini ditentukan aktivitas enzim amilasena.

HASIL DAN PEMBAHASAN

a. Penentuan aktivitas enzim amilase tertinggi *Pseudomonas stutzeri* LBKURCC49, LBKURCC51 dan LBKURCC53

Aktivitas enzim amilase yang dihasilkan ditentukan dengan metode

Dinitrosalisilat (DNS) menggunakan substrat amilum. Amilum akan dihidrolisis oleh amilase menghasilkan maltosa atau gula pereduksi dan gula pereduksi ini akan mereduksi asam 3,5 Dinitrosalisilat menjadi asam 3 amino 5 nitrosalisilat yang berwarna orange kemerahan. Intensitas warna orange kemerahan ini diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Absorbansi yang terukur ekuivalen dengan aktivitas enzim amilase.

Data aktivitas ekstrak kasar enzim amilase pada tabel 1 menunjukkan bahwa rata-rata aktivitas enzim amilase tertinggi diproduksi oleh bakteri *Pseudomonas stutzeri* LBKURCC53 sebesar 19,5062 x 10⁻³ U/mL. Analisis berikutnya untuk optimalisasi pH produksi enzim amilase adalah menggunakan *Pseudomonas stutzeri* LBKURCC53.

Tabel 1. Aktivitas ekstrak kasar enzim amilase yang dihasilkan dari ketiga isolat *Pseudomonas stutzeri* pada pH 7,0, 40°C dan 120 rpm

Kode Isolat	Aktivitas Enzim Amilase x 10 ⁻³ U/mL
LBKURCC49	10,7407
LBKURCC51	6,5432
LBKURCC53	19,5062

b. Optimalisasi pH produksi enzim amilase

Hasil penelitian pada tabel 2 menunjukkan bahwa rata-rata aktivitas enzim amilase tertinggi dari *Pseudomonas stutzeri* LBKURCC53 pada pH 6,0 sebesar 66,173 x 10⁻³ U/mL. Tabel 2 Juga menunjukkan bahwa aktivitas enzim amilase meningkat hingga optimum pada pH 6,0 dan semakin menurun jika pH semakin tinggi.

Produksi enzim dari suatu mikroorganisme sangat dipengaruhi oleh

gen dari mikroorganisme tersebut. Selain itu, produksi enzim juga dipengaruhi oleh pH, suhu dan agitasi produksi. pH merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri. Bakteri memerlukan suatu pH optimum untuk tumbuh optimal. Pengaruh pH terhadap pertumbuhan bakteri berkaitan dengan aktivitas enzim. Enzim dibutuhkan oleh beberapa bakteri untuk mengkatalis reaksi-reaksi yang berhubungan dengan pertumbuhan bakteri. Apabila pH dalam suatu medium atau lingkungan tidak optimal maka akan mengganggu kerja enzim-enzim tersebut

dan mengganggu pertumbuhan bakteri itu sendiri (Pelczar dan Chan, 1986). Buffer yang digunakan dalam penelitian ini adalah buffer fosfat 0,05 M. Penambahan buffer dalam media produksi berfungsi untuk mempertahankan pH lingkungan produksi supaya enzim yang dihasilkan

tidak terdenaturasi dan menjaga kestabilan enzim yang dihasilkan agar tidak rusak.

Hasil penelitian Helen., *et al* (2014) aktivitas ekstrak kasar enzim amilase yang diproduksi *Bacillus cereus* juga optimal pada pH 6,0 dengan aktivitas amilase sebesar dan 1,06 U/mL.

Tabel 2. Aktivitas ekstrak kasar enzim amilase yang dihasilkan *Pseudomonas stutzeri* LBKURCC53 pada variasi pH media produksi

Variasi pH	Aktivitas Enzim Amilase x 10 ⁻³ U/mL
6,0	66,173
6,5	39,012
7,0	19,506
7,5	12,716

KESIMPULAN

Isolat *Pseudomonas stutzeri* LBKURCC49, LBKURCC51 dan LBKURCC53 memiliki aktivitas enzim amilase masing-masing secara berurutan pada pH 7,0, suhu 40°C dan agitasi 120 rpm yaitu 10,7407 x 10⁻³ U/mL, 6,5432 x 10⁻³ U/mL, dan 19,5062 x 10⁻³ U/mL. Jadi yang memiliki aktivitas tertinggi adalah *Pseudomonas stutzeri* LBKURCC53.

Optimalisasi pH untuk produksi enzim amilase *Pseudomonas stutzeri* LBKURCC53 diperoleh pada pH 6,0. Hal ini menunjukkan bahwa pH 6,0 adalah pH terbaik untuk pertumbuhan *Pseudomonas stutzeri* LBKURCC53 untuk menghasilkan enzim amilase.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dra. Silvera devi Sy, MSi dan Prof. Dr. Saryono, MSi yang telah membimbing dan memotivasi serta membantu penelitian dan penulisan karya ilmiah ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Aiyer, P.V. 2005. Amylases and Their Applications. *African Journal of Biotechnology*, 4:125–1529.
- Anam, K. 2010. Laporan Praktikum Mikrob dan Potensinya, Produksi Enzim Amilase. *Bioteknologi Sekolah Pascasarjana*. Institut Pertanian Bogor, Bandung.
- Arunsasi, ManthiriKani S, Jegadeesh G and Ravikumar M. 2010. Submerged Fermentation Of Amylase Enzyme *Byaspergillus Flavus* Using Cocos Nucifera Meal. *Kathmandu University Journal Of Science, Engineering And Technology*. Department of plant biology and plant biotechnology Govt. Arts College for men's, Nandanam, Chennai. 6(2). 75-87.
- Helen H.H., Peter O.O., Chrinius H., Matthew O. I., Judy I. A and Evelyn H. O. 2014. Production of Alpha Amylase by *Bavillus cereus* in

- Submerged Fermentation. *Aceh International Journal of Science and Technology* 3(3) (124-130).
- Marlinda, S. 2013. Uji Aktivitas Spesifik Enzim Selulolitik dari Beberapa Bakteri Endofitik Umbi Tanaman Dahlia (*Dahlia variabilis*). *Skripsi FMIPA UR*. Pekanbaru.
- Pelczar, M. J. and E. C. S. Chan. 1986. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Penerjemah: Hadi, R. S. Jakarta: UI Press. 443 pp.
- Purba, T. M., Saryono., & Puspita, F. 2012. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Endofitik dari Umbi Tanaman Dahlia (*Dahlia variabilis*). *Jurnal Ilmiah Sains Terapan*. 3(2): 91-95.
- Radji, M. 2005. *Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal*. *Majalah Ilmu Kefarmasian II*. Vol 3 (113-126).
- Robi'a., Saryono., & Puspita, F. 2012. Skrining Bakteri Endofitik dari Umbi Tanaman Dahlia (*Dahlia variabilis*). *Jurnal Ilmiah Sains Terapan*. 3(2): 153-158.
- Sarah., Surya, R.P., dan Herdayanto, S.P., 2010. Isolasi α -Amilase Termotabil dari Bakteri Termofilik *Bacillus stearothermophilus*. *Prosiding Kimia FMIPA*. Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya.
- Sumrin, A., Ahmad, W., Ijaz, B., Sarwar, M.T., Gull, S., Kausar, H., Shahid, I., Jahan, S., Hussain, M & Riazuddin, S.. 2011. Purification and medium optimization of α -amilase from *Bacillus subtilis* 168. *African Journal of Biotechnology*. 2119-2129.
- Zinniel DK, P Lambrecht, NB Harris, Z Feng, D Kuczarski, P Higley, CA Ishimaru, A Arunakumari, RG Barletta and AK Vidaver. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2198-2208.