

KHARAKTERISASI ENZIM KASAR GLUKOAMILASE DARI *Saccharomycopsis* sp. [Characterization of Crude Glucoamylase from *Saccharomycopsis* sp.]

ElidarNaiola

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI
Jin Ir. H Juanda 18, PO Box 208, Bogor

ABSTRACT

Saccharomycopsis sp. produced glucoamylase (α -1,4 glucanglucohydrolase; EC 3.2.1.3) shown by the presence of clear zone on media containing 0.2% yeast extract, 0.5% pepton, 0.3% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2% agar and 2% soluble starch. In liquid media containing soluble starch glucoamylase production reached a maximum at 2 days fermentation, with levels of $4.2 \times 10^2 \text{U/ml}$ (one unit activity is define as micromoles of glucose produce per ml per minute). Studies on the glucoamylase characterization revealed that the optimum temperature for activity was $40^\circ\text{C} - 50^\circ\text{C}$. The enzyme was stable for 1h at $45^\circ\text{C} - 55^\circ\text{C}$, while at 60°C to 65°C , 40% of the original activities were lost. The optimum pH of the enzyme was 6.0. After incubation of crude enzyme solution for 1 h at pH 8.0, a decrease of about 40% of its original activity was observed. *Saccharomycopsis* sp. produced high glucoamylase when it was grown in media containing rice flour as carbon source with the glucoamylase activity at $9,28 \times 10^2 \text{U/ml}$.

Kata Kunci: Aktivitas, fermentasi, glukoamilase, karakterisasi.

PENDAHULUAN

Enzim glukoamilase atau amiloglukosidase (α -1,4 glukon glukohidrolase EC 3.2.1.3) adalah eksoamilase yang menghidrolisa ikatan α -1,4 secara berurutan dari ujung nonreduksi rantai amilosa, amilopektin dan glikogen dengan melepaskan glukosa (Fogarty dan Kelly, 1979). Enzim ini juga menghidrolisa ikatan α -1,6 dan α -1-3, kecepatannya bekerja dengan ikatan α -1,4 jauh lebih tinggi. Glukoamilase dapat dihasilkan oleh kapang, khamir maupun bakteri. *Aspergillus oryzae* adalah salah satu jenis kapang yang sangat penting peranannya dalam industri makanan seperti sake, kecap dan sebagai penghasil hidrolitik enzim seperti α -amylase, glukoamilase dan proteinase. Dalam industri sake glukoamilase sangat penting keberadaannya dan tingkat keberhasilannya fermentasinya sangat tergantung pada aktivitas glukoamilase (Nukowaka dalam Dae-Hee Ee *et al.*, 1995).

Masalah yang sering timbul dalam industri minuman beralkohol adalah terdapatnya endapan selama proses penyimpanan. Salah satu penyebabnya adalah karena dalam minuman tersebut terdapat karbohidrat. Adanya khamir yang mempunyai aktivitas glukoamilase diharapkan dapat menghidrolisa karbohidrat yang ada didalamnya sehingga minuman beralkohol tersebut akan menjadikernih.

Pada umumnya khamir tidak dapat menggunakan pati sebagai sumber karbon untuk

pertumbuhannya, akan tetapi beberapa khamir dilaporkan mampu menggunakan pati sebagai sumber karbon salah satu diantaranya adalah *Saccharomycopsis fibuligera* (Futatsugi *et al.*, 1980) merupakan penghasil glukoamilase.

Dewasa ini glukoamilase komersial yang banyak digunakan dalam industri pembuatan gula cair (proses sakarifikasi) diproduksi dari jamur.

Mikroba pada substrat alami dapat diisolasi dan diskriminasi kemampuan enzim yang dimilikinya. Isolat-isolat terseleksi dapat dimanfaatkan secara langsung untuk meningkatkan kualitas produk fermentasi yang bersangkutan atau dapat digunakan untuk berbagai keperluan industri, diantaranya sebagai penghasil enzim. Seleksi isolat mikroba yang mempunyai aktivitas glukoamilase dari beberapa makanan fermentasi di Indonesia telah dilakukan oleh Sukara *et al.* (1992), dilaporkan bahwa *Saccharomycopsis* sp. Tj-I yang terbaik di antara beberapa jenis khamir yang diuji.

Tujuan dari penelitian ini adalah mempelajari beberapa karakter dari enzim glukoamilase yang dihasilkan oleh *Saccharomycopsis* sp yang diisolasi dari ragi tape, Lampung.

BAHAN DAN METODE

Mikroorganisme

Saccharomycopsis sp. yang digunakan dalam penelitian ini merupakan salah satu jenis khamir yang

diisolasi dari ragi tape, Lampung.

Media

Media PDA dari Difco. Ltd. digunakan untuk memelihara isolat.

Media YPSs padat dan cair digunakan sebagai media tumbuh dan produksi enzim kasar glukoamilase. Komposisi media YPSs: 0,2% ekstrak khamir, 0,5% pepton, 0,3% KH_2PO_4 , 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2% agar dan 2% pati terlarut sebagai sumber C (Mangunwardoyo *et al.*, 1982).

Beberapa jenis tepung digunakan untuk melihat pengaruh berbagai sumber karbon terhadap aktivitas enzim adalah tepung beras, tepung ketan, tepung singkong dan tepung jagung. Tepung-tepung tersebut dipersiapkan dari bahan dasar yang sebelumnya dicuci, dikeringkan dalam oven suhu 104°C selama kurang lebih 12 jam selanjutnya digiling/ blender dan diayak.

Aktivitas glukoamilase secara kualitatif diuji dengan cara menumbuhkan satu ose biakan *Saccharomycopsis* sp. yang berumur 3 hari pada permukaan media agar YPSs selanjutnya diinkubasikan selama 4-7 hari pada suhu kamar. Adanya aktivitas glukoamilase terlihat dengan adanya zona bening disekitar koloni setelah dituang dengan larutan iodine (1 gr I_2 , 2 gr KJ /300 ml akuadest) atau setelah disimpan selama 1-2 hari didalam lemari pendingin. Hasil bagi antara diameter zona bening dan diameter koloni dinyatakan sebagai aktivitas enzim secara relatif.

Secara kuantitatif aktivitas enzim glukoamilase dalam filtrat (enzim kasar) diukur dengan 3 kali ulangan.

Enzim kasar dipersiapkan dengan menumbuhkan isolat pada media produksi yaitu YPSs cair. Satu persen v/v suspensi (kepekatan optik 0,5 pada panjang gelombang 630 nm dari biakan berumur 1 hari diinokulasikan pada 20 ml media produksi dalam erlenmeyer 100 ml, inkubasikan pada suhu kamar selama 4 hari diatas alat pengocok dengan kecepatan 100 rpm. Sentrifugasi pada kecepatan 15.880 g selama 5 menit. Aktivitas glukoamilase dalam filtrat diuji dengan mengukur jumlah gula pereduksi yang dihasilkan oleh aktivitas hidrolisis enzim terhadap substrat pati. Cara lengkapnya; setengah ml larutan enzim ditambahkan ke dalam 0,5 ml substrat (2% pati terlarut dalam 0,05 M larutan bufer fosfat, pH 7), kemudian diinkubasikan pada suhu 40°C selama 10 menit. Produk yang terbentuk

berupa gula produksi (glukosa) diukur dengan menggunakan asam 3,5 dinitrosalisilat (DNS) dan konsentrasinya dikonversikan dengan standar glukosa. Satu unit aktivitas glukoamilase adalah banyaknya enzim yang dapat menghasilkan satu μg glukosa per menit per ml larutan enzim pada kondisi pengujian yang dilakukan (Kinoshita *et al.*, 1982).

Produk yang terbentuk sebagai akibat aktivitas enzim diamati dengan khromatografi lapis tipis. Sebanyak 1,5 ml larutan 0,2 M buffer fosfat pH7, 0,1 gr pati dan 0,05 gr resorsinol ditambah 0,5 ml larutan enzim kasar. Inkubasikan pada suhu 40°C selama 24 jam dengan menggunakan eluen 3-propanol. Plate dikeringkan selama 1 jam, selanjutnya disemprot dengan pengembang warna 20% H_2SO_4 dalam metanol, panaskan 150°C selama 5-10 menit.

Penentuan kondisi optimum aktivitas glukoamilase kasar

Pengaruh suhu terhadap enzim glukoamilase diuji dengan cara mengukur aktivitasnya pada berbagai macam suhu yang berkisar antara $35 - 65^\circ\text{C}$. Stabilitas enzim glukoamilase terhadap suhu diukur dengan cara menginkubasikan larutan enzim selama 10 menit pada suhu yang bervariasi ($35-65^\circ\text{C}$), segera setelah inkubasi larutan enzim didinginkan dengan cepat dan aktivitas enzim yang tersisa diukur dengan cara yang sama dan nilainya dinyatakan dalam persen terhadap aktivitas enzim tanpa perlakuan.

Pengaruh pH terhadap aktivitas glukoamilase diukur menurut cara yang sama, tetapi pengujian dilakukan dalam larutan bufer pada pH(4-9). Larutan bufer yang digunakan 0,05 M bufer asetat pH(4-6), 0,05 M bufer fosfat pH(6-8) dan 0,05 M bufer Atkins & Pantin pH(8-9). Stabilitas enzim terhadap pH ditentukan dengan cara menginkubasikan larutan enzim selama 1 jam dalam larutan buffer pada pH yang bervariasi (4-9). Sebanyak 0,25 ml larutan enzim ditambahkan kedalam 0,25 ml bufer dengan pH(4-9), inkubasikan pada suhu 4°C selama 1 jam, selanjutnya tambah dengan 0,5 ml substrat (2% pati terlarut dalam 0,05 M buffer fosfat pH 7). Aktivitas enzim tersisa diuji sesuai dengan standar pengujian yang dilakukan sebelumnya dan nilainya dinyatakan dalam persen terhadap aktivitas enzim tanpa perlakuan.

HASIL

Aktivitas relatif glukoamilase ditentukan berdasarkan besarnya zona bening yang terbentuk disekitar koloni setelah disiram dengan larutan iodium. Zona bening tersebut menandakan bahwa pati yang terdapat dalam media telah diubah menjadi gula sederhana karena adanya aktivitas glukoamilase. Di sekitar koloni yang tidak menghasilkan glukoamilase akan terbentuk warna biru akibat reaksi amilum dengan iod. Aktivitas relatif amilase ditunjukkan dalam Foto 1.

Aktivitas relatif glukoamilase yang dihasilkan cukup tinggi (nilai relatif >2).

Uji aktivitas secara kuantitatif dilakukan untuk mengetahui aktivitas enzim glukoamilase pada filtrat (enzim kasar) yang dihasilkan dalam media produksi YPSs cair yang menggunakan 2% pati terlarut sebagai sumber karbon.

Pertumbuhan serta produksi glukoamilase dari *Sacharomycopsis* sp dalam media produksi YPSs cair ditampilkan pada Gambar 1.

Data pada Gambar 1 menunjukkan produksi enzim tertinggi oleh *Sacharomycopsis* sp dalam media

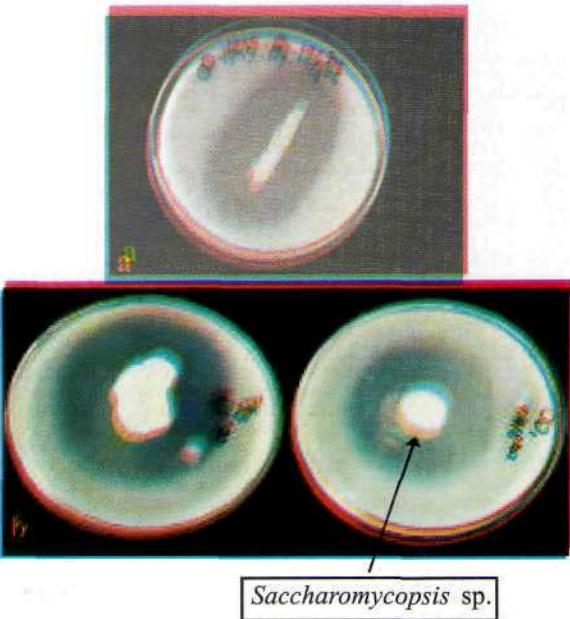
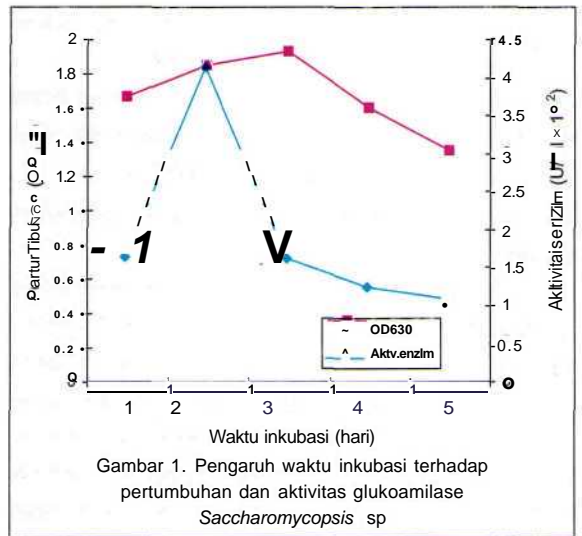


Foto 1. Aktivitas relative glukoamilase *Sacharomycopsis* sp. pada media padat YPSs.

- a. Setelah disimpan satu hari dalam lemari pendingin (tanpa dituang larutan Iod)
- b. Setelah dituang larutan Iod.

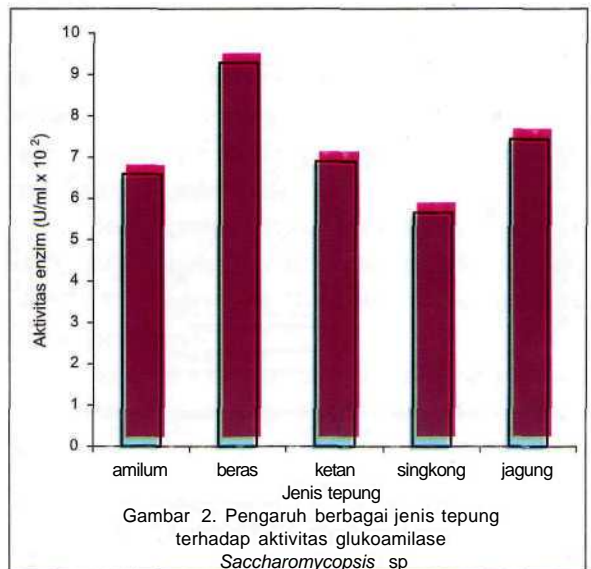


Gambar 1. Pengaruh waktu inkubasi terhadap pertumbuhan dan aktivitas glukoamilase *Sacharomycopsis* sp

produksi yang mengandung 2% pati (inkubasi diatas alat pengocok dengan kecepatan 100 rpm pada suhu kamar) adalah pada hari ke 2. Pada hari ke 2 pati yang tersisa dalam medium sudah habis ditandai dengan reaksi yang negative terhadap larutan Iod.

Hasil pengamatan dengan khromatografi lapis tipis menunjukkan bahwa produk yang terbentuk sebagai akibat adanya aktivitas enzim atau dalam medium bebas sel adalah glukosa. Hal ini menunjukkan bahwa enzim yang dihasilkan isolat tersebut adalah glukoamilase.

Pengaruh berbagai jenis tepung terhadap produksi enzim glukoamilase ditunjukkan pada Gambar 2. Data pada Gambar 2 menunjukkan bahwa tepung



Gambar 2. Pengaruh berbagai jenis tepung terhadap aktivitas glukoamilase *Sacharomycopsis* sp

beras merupakan sumber C yang baik digunakan sebagai media produksi enzim glukoamilase.

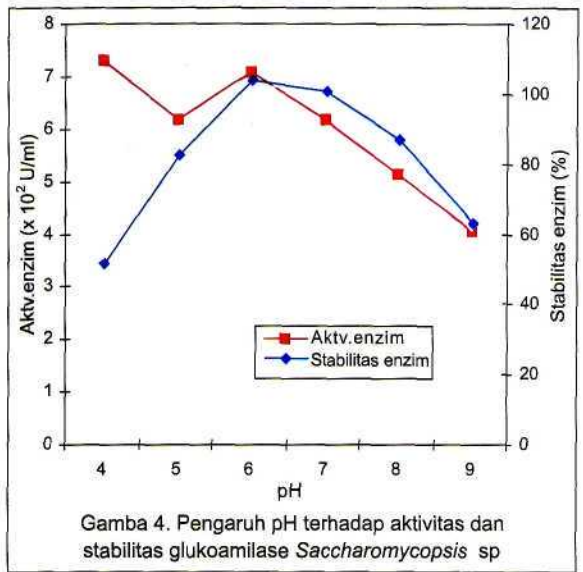
Dalam media yang mengandung tepung beras sebagai sumber C aktivitas enzim glukoamilase yang dihasilkan paling tinggi yaitu $9,28 \times 10^2$ U/ml.

Hasil penentuan kondisi optimum aktivitas glukoamilase kasar.

Aktivitas glukoamilase dari *Sacharomycopsis* sp. mencapai nilai maksimal yaitu sebesar $7,77 \times 10^2$ U/ml pada suhu 40°C , selanjutnya aktivitas tersebut menurun apabila suhu reaksi enzimatis dinaikkan dan pada suhu 65°C aktivitas amilase hanya $3,41 \times 10^2$ U/ml. Kelihatannya suhu optimum untuk berlansungnya reaksi enzimatis adalah pada kisaran suhu 45 s/d 55°C , enzim relatif stabil setelah diinkubasikan selama 1 jam pada kisaran suhu $45 - 55^\circ\text{C}$ tersebut (Gambar 3).

Pengaruh pH terhadap aktivitas dan stabilitas glukoamilase kasar diuji dengan cara mereaksikan larutan enzim pada berbagai pH selama 1 jam dan hasilnya ditunjukkan pada Gambar 4.

Data pada Gambar 4 menunjukkan bahwa aktivitas glukoamilase tertinggi yaitu sebesar $7,30 \times 10^2$ U/ml diperoleh apabila reaksi enzimatis dilakukan pada pH 4,0, namun pada pH tersebut enzim kelihatannya tidak stabil. Aktivitas optimum reaksi enzimatis berada pada kisaran pH 6,0, yaitu pada suasana sedikit asam. Enzim glukoamilase relatif stabil pada pH pada kisaran 6,0-7,0.

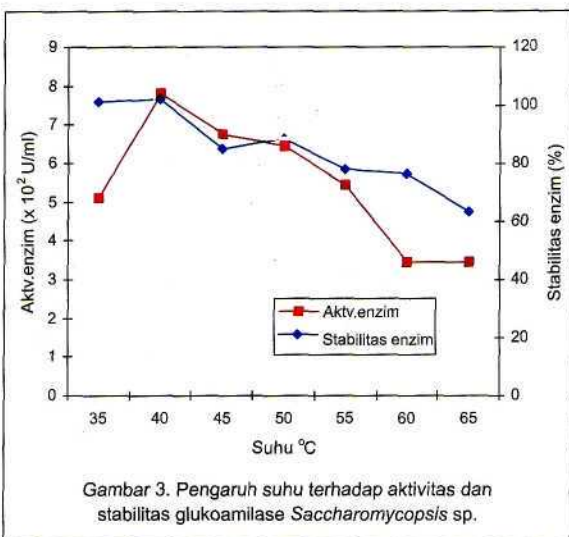


Gambar 4. Pengaruh pH terhadap aktivitas dan stabilitas glukoamilase *Saccharomycopsis* sp

PEMBAHASAN

Sacharomycopsis sp. merupakan salah satu jenis khamir yang sudah diketahui berperan dalam pembuatan beberapa produk makanan fermentasi di daerah Asia, diantaranya banh men (sejenis produk hasil fermentasi dari Vietnam) dan di Indonesia merupakan mikroba yang terdapat dalam ragi. Dilaporkan ragi mengandung kapang dan khamir salah satu diantaranya *Sacharomycopsis* sp. (Hadisepoetro *et al.*, 1979). *Sacharomycopsis fibuligera* yang diisolasi dari *banh men* dilaporkan mempunyai aktivitas α -amilase yang tinggi dan aktivitas glukoamilase yang lemah (Hattori, 1962). *Sacharomycopsis* sp Tj-I merupakan khamir *indigenous* yang diisolasi dari tape memiliki aktivitas glukoamilase cukup tinggi (Sukara *et al.*, 1992), namun belumbegitu dikenal.

Dalam penelitian ini *Sacharomycopsis* sp yang dteliti diisolasi dari ragi tapai asal daerah Lampung. Aktivitas relatif glukoamilase (perbandingan antara \emptyset zona bening dengan \emptyset zona pertumbuhan pada media padat yang mengandung 2% pati sumber karbon) yang dimilikinya cukup tinggi yaitu >2 . Besarnya zona bening yang dimiliki menunjukkan bahwa aktivitas enzim yang dimiliki cukup tinggi. (Foto 1 .a dan 1 ,b). Berdasarkan hasil analisis dengan khromatografi lapis tipis (TLC) diketahui *Sacharomycopsis* sp mempunyai aktivitas hidrolisis dan produk yang dihasilkan adalah



Gambar 3. Pengaruh suhu terhadap aktivitas dan stabilitas glukoamilase *Saccharomycopsis* sp.

glukosa. Hal ini menunjukkan bahwa enzim yang dihasilkan isolat tersebut adalah glukoamilase.

Salah satu faktor yang sangat berpengaruh terhadap aktivitas enzim adalah suhu reaksi enzimatik. Dalam penelitian ini aktivitas glukoamilase dari *Sacharomycopsis* sp. mencapai maksimal pada suhu reaksi 40°C, yaitu sebesar $7,77 \times 10^2$ U/ml. Pada suhu reaksi yang lebih tinggi aktivitas glukoamilase mengalami penurunan. Setelah diinkubasikan pada suhu 45°C selama 1 jam enzim masih menyisakan sekitar 80% aktivitas awalnya. Enzim masih relatif stabil terhadap kisaran suhu 45°C - 55°C. Inkubasi pada suhu yang lebih tinggi menyebabkan menurunnya aktivitas dan pada suhu 60°C - 65°C aktivitas glukoamilase menurun sekitar 40%. Menurunnya aktivitas glukoamilase pada suhu tersebut kemungkinan disebabkan energi kinetika molekul-molekul enzim telah melampaui penghalang energi yang diperlukan untuk memecah ikatan sekunder untuk mempertahankan kondisi katalitik enzim. Hal tersebut akan mengakibatkan menurunnya aktivitas biologis enzim (Harper *et al.*, 1979).

Pengaruh pH terhadap aktivitas dan stabilitas glukoamilase diperlihatkan dalam Gambar 4. Aktivitas glukoamilase lebih tinggi pada kisaran pH 4,0-6,0 atau pada suasana asam. Dengan semakin meningkatnya pH aktivitas glukoamilase cenderung menurun. Tampaknya enzim relatif stabil pada kisaran pH yang cukup lebar yaitu pH 6,0-7,0 dan setelah diinkubasikan selama 1 jam pada pH 8,0 enzim kehilangan sekitar 40% aktivitasnya. Menurunnya aktivitas enzim karena perubahan pH kemungkinan karena berubahnya keadaan ion enzim dan struktur atau muatan pada residu asam amino, yang berfungsi untuk mengikat substrat. Menurut Mangunwardoyo, 1982 pada kisaran pH tertentu, aktivitas enzim dapat hilang karena protein enzim mengalami denaturasi akibat berubahnya konformasi rantai polipeptida.

Pemilihan sumber karbon yang tepat untuk produksi amilase sangat penting artinya karena selain untuk mendapatkan produk yang maksimal juga mendapatkan sumber karbon yang murah dan ketersediaannya melimpah. Di samping itu, selain sebagai sumber karbon amilum juga merupakan induktor untuk sekresi glukoamilase. Pengaruh

berbagai jenis tepung terhadap produksi glukoamilase *Sacharomycopsis* sp diperlihatkan dalam Gambar 2. Tepung beras merupakan sumber karbon yang paling baik untuk produksi glukoamilase dibanding media yang mengandung tepung lainnya. Pada akhir fermentasi pati yang tersedia dalam media produksi sudah habis yang ditandai dengan reaksi negative terhadap larutan iod. Aktivitas glukoamilase paling rendah diperoleh apabila ditumbuhkan pada media yang menggunakan tepung singkong. Perbedaan aktivitas glukoamilase yang dihasilkan pada berbagai jenis tepung kemungkinan disebabkan oleh perbedaan komposisi amilosa dan amilopektin yang menyusun pati setiap jenis tepung.

Amilosa dan amilopektin memiliki sifat yang berbeda dalam ukuran molekul dan solubilitasnya dalam air. Amilosa merupakan polimer rantai lurus dan disebut "soluble starch" yang tersusun residu glukosa yang saling berikatan melalui ikatan α -1,4 dan bersifat sedikit larut dalam air. Amilopektin merupakan polimer dari residu glukosa, memiliki rantai cabang yang berikatan melalui ikatan α -1,6 yang bersifat larut dalam air. Tapioka mengandung 83% amilopektin dan 17% amilosa. Tepung beras mengandung 11% amilopektin dan 89% amilosa. Besarnya aktivitas glukoamilase sebanding dengan laju hidrolisis pati. Laju hidrolisis amilosa oleh glukoamilase lebih cepat dibanding laju hidrolisis amilopektin yang memiliki rantai bercabang (Suhartono, 1989).

KESIMPULAN

Dalam medium cair yang mengandung pati terlarut sebagai sumber karbon, *Sacharomycopsis* sp. mempunyai aktivitas glukoamilase tertinggi yaitu sebesar $4,20 \times 10^2$ U/ml yang dicapai dua hari setelah inkubasi pada suhu kamar.

Suhu optimum reaksi enzimatik berkisar pada 40°C-50°C dan enzim relative stabil pada kisaran suhu 45°C-55°C. Pada suhu 65°C enzim kehilangan sekitar 40% aktivitasnya.

Kondisi optimum untuk berlansungnya reaksi enzimatik ada pada suasana sedikit asam yaitu pH 6,0 dan enzim relative stabil disekitar pH tersebut. Pada pH 8 enzim kehilangan sekitar 40% aktivitasnya.

Tepung beras merupakan sumber C yang baik digunakan sebagai media produksi glukoamilase dari

Saccharomycopsis sp., aktivitas glukoamilase yang dihasilkan adalah $9,28 \times 10^2$ U/ml.

DAFTAR PUSTAKA

- Dae-Hee Ee, Uchiyama K, Nozaki H, Shimizu H and Shioya S. 1995.** Maximum Glucoamylase Production by Temperature-sensitive Mutant of *Saccharomyces cerevisiae* in Bath Culture. *Annual reports of ICBiotech* **18**, Osaka University, Osaka, Japan.
- Fogarty WM and Kelly CT. 1979.** Starch degrading enzymes of a microbial origin. *Progres in Industrial Microbiology* **15**, 88-150.
- Futatsugi M, Ogawa T and Fukuda H. 1980.** Scale-up of glukoamilase production by *Saccharomycopsis fibuliger*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **76**, 419—422.
- Hadisepoetro ES, Takada N and Oshima Y. 1979.** Microflora in ragi and usar. *Journal of Fermentation Technology* **77**, 251-159.
- Harper HA, Rodwel VM and Mayes PA. 1979.** *Review of Physiological Chemistry*. Lange Medical Publication, California, USA.
- Hattori Y 1962.** Studies of amylolytic enzyme produced by *Endomyces* sp. 1. Production of extracellular amylase by *Endomyces* sp. *Agricultural and Biological Chemistry* **2**, 737-743.
- Kinoshita S, Sangpituk V, Rodpaya D, Nilubol N and Taguchi H. 1982.** Hydrolysis of starch by immobilized cells and by enzymes of *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus* sp. *IC Biotech.* **5**.
- Mangunwardoyo VV, Takano M and Shibasaki I. 1982.** Preservation and utilization of a concentrated seed culture for bacterial amylase production. *Annual reports of ICME* **5**, Osaka University, Osaka, Japan.
- Sukara E, R Melliawati and Saono S. 1992.** Amylases production from cassava by and indigenous yeast. *ASEAN Journal Science and Technology Development* **9 (I)**, 157-168.
- Suhartono MT. 1989.** Enzim dan Bioteknologi. PAU-IPB, Bogor.