

**Optimasi Produksi Enzim Amilase dari Bakteri Laut Jakarta
(*Arthrobacter arilaitensis*)
(Optimization of Amylase Enzyme Production from Jakarta Marine Bacterium
(*Arthrobacter arilaitensis*))**

A. Purnawan¹, Y. Capriyanti², PA. Kurniatin², N. Rahmani¹, & Yopi¹.

¹. Puslit Bioteknologi LIPI Jl. Raya Bogor Km 46 cibinong Bogor.

². Dept. Biokimia FMIPA IPB Jl. Agatis Darmaga Bogor

Email :awan001@lipi.go.id

Memasukkan: Januari 2015, **Diterima:** April 2015

ABSTRACT

Amylase is one of the most important industrial enzymes which can be used in a number of industrial processes including food industry, textile, paper industry, renewable energy, and pharmaceutical. This study reports the environmental conditions and nutrient media for amylase production from marine bacterium *Arthrobacter arilaitensis*. Various parameters such as substrate concentration, pH medium, temperature of fermentation, co-substrate, and nitrogen source was determined to obtain the optimum conditions. Maximum amylase enzyme production was obtained at starch concentration 1%, pH 7, temperature fermentation 30°C, co-substrate maltose with activity 2.7 U/mL. While the addition of several nitrogen sources was given decreased amylase activity, such as addition casein was decreased the activity into 2.3 U/mL.

Keywords: *Arthrobacter arilaitensis*, amylase activity, optimization, co-substrate, pH, temperature, substrate, nitrogen source

ABSTRAK

Amilase merupakan salah satu enzim yang penting dalam industri yang aplikasinya sangat luas pada berbagai proses industri mulai dari industri makanan, tekstil, industri kertas, energi terbarukan, hingga bidang farmasi. Penelitian ini berfokus untuk mendapatkan kondisi lingkungan serta nutrisi media yang optimum untuk produksi amilase dari bakteri laut *Arthrobacter arilaitensis*. Berbagai parameter seperti konsentrasi substrat, pH medium, suhu fermentasi, ko-substrat, dan sumber nitrogen telah ditentukan. Produksi enzim amilase maksimum didapatkan pada konsentrasi substrat pati 1%, pH 7, suhu 30°C, maltosa sebagai ko-substrat produksi dengan aktivitas 2.7 U/mL. Sedangkan penambahan beberapa sumber nitrogen memberikan pengaruh terhadap penurunan aktivitas amilase, seperti kasein menurunkan aktivitas enzim amilase menjadi 2.3 U/mL.

Kata Kunci: *Arthrobacter arilaitensis*, aktivitas amilase, optimasi, ko-substrat, pH, suhu, substrat, sumber nitrogen

PENDAHULUAN

Penggunaan enzim dalam dunia industri semakin meluas disebabkan oleh semakin pesatnya perkembangan teknologi aplikasi enzim, teknologi fermentasi, dan rekayasa genetika. Salah satunya adalah enzim amilase. Amilase merupakan kelompok enzim yang mempunyai kemampuan untuk memutuskan ikatan glikosida pada amilum. Enzim α -amilase (1,4- α -D-glukan glukano hidrolase, E.C.3.2.1.1) adalah enzim kunci dalam metabolisme organisme hidup yang menggunakan pati sebagai sumber karbon dan sumber energi. Enzim α -amilase berupa endo-enzim yang dapat menghidrolisis ikatan α -1,4-glikosida pada unit polimer pati yang berantai lurus atau bercabang menghasilkan glukosa (Regulapati *et al.* 2007).

Enzim ini memiliki aplikasi dengan skala yang luas, juga membuka area baru dari banyaknya proses bioteknologi yang bersifat komersial mulai dari industri tekstil, hidrolisis pati, bir, roti, sirup, pemanis buatan, etanol, detergen, industri kertas, industri penyulingan, energi terbarukan, hingga bidang farmasi (Pandey *et al.* 2000; Rani *et al.* 2003; Sivaramkrishnan *et al.* 2006; Bozic *et al.* 2011). Amilase merupakan enzim industri yang paling penting yang menyumbang sekitar 30% dari produksi enzim dunia sebagai contoh produksi amilase oleh *Bacillus licheniformis* dan *Aspergillus* sp. sekitar 300 ton enzim murni pertahun (Sivaramkrishnan *et al.* 2006). Oleh karena itu meskipun enzim amilase telah banyak diisolasi dan dikristalisasi, eksplorasi sumber amilase yang lebih efisien masih dibutuhkan

(Ahmadi *et al.* 2010).

Sumber α -amilase dapat diperoleh dari tumbuhan, hewan dan mikroorganisme. Amilase yang berasal dari mikroba dapat menghasilkan enzim yang besar, sehingga banyak dimanfaatkan sebagai enzim industri (Tanjildizi *et al.* 2005). Beberapa laporan menyebutkan α -amilase yang dihasilkan oleh bakteri berbeda dengan yang dihasilkan oleh jamur, contoh *Bacillus* dan *Aspergillus* sp. diteliti sebagai sumber yang berguna untuk industri (Silva *et al.* 2011). Saat ini mikroba yang banyak digunakan untuk produksi amilase berasal dari tanah, mikroba yang berasal dari laut belum banyak dimanfaatkan padahal karakteristik mikroba laut sangat unik dan spesifik, yaitu tahan pada salinitas/NaCl tinggi, suhu, cahaya, dan lingkungan ekstrim lainnya. Komunitas mikroba dari jenis bakteri, arkea, protista dan fungi bersel tunggal merupakan biomassa laut terbesar. Jumlah total sel bakteri di laut diperkirakan sebanyak $3,6 \times 10^{29}$ jumlah koloni/mL dengan total kandungan karbon selulernya sebesar 3×10^{17} g (Whitman *et al.* 1998). Keanekaragaman yang sangat tinggi ini mendorong banyaknya penelitian yang menggunakan mikroba laut, termasuk pencarian sumber enzim amilase baru. Sebagai contoh hasil isolasi mikroba laut *Brevibacterium* sp. dari perairan laut Muara Kamal Jakarta, diperoleh satu isolat yang berpotensi menghasilkan enzim amilase dengan aktifitas 2.9 U/mL, stabil pada pH 8 dan substrat pati 2% (Rahmani *et al.* 2011).

Peningkatan produksi amilase dapat dilakukan dengan mengatur kondisi lingkungan pertumbuhannya, sehingga amilase yang dihasilkan dapat diaplikasikan dalam dunia industri. Tujuan penelitian ini adalah menentukan kondisi optimum fermentasi yang meliputi konsentrasi substrat, pH media, suhu fermentasi, ko-substrat karbon, dan ko-substrat nitrogen untuk produksi amilase dari mikroba laut *Arthrobacter arilaitensis*.

BAHAN DAN CARA KERJA

Pembuatan media peremajaan isolat, sebanyak 3.8 gram *Artificial Sea Water* (ASW), 0,5 gram pati komersial, 0,5 gram agar, 0,1 gram *yeast extract* dan 0,5 gram pepton. Semua

bahan dilarutkan di dalam 100 mL akuades kemudian disterilisasi. Media yang telah ditanami isolat diinkubasi pada suhu 30 °C selama 3 hari.

Isolat mikroba yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari Kepulauan Seribu, Jakarta. Hasil skrining 50 isolat dengan menggunakan larutan kalium Iodida – Iodida (5.0 gram Kalium Iodida dan 1.0 gram Iod dilarutkan dengan 330 mL akuades) diperoleh enam isolat yang berpotensi menghasilkan enzim amilase, dari enam isolat dipilih satu isolat untuk penelitian ini.

Parameter yang dioptimasi pada media produksi amilase dari bakteri laut *Arthrobacter arilaitensis* terdiri dari optimasi konsentrasi substrat, pH, suhu fermentasi, ko-substrat, dan sumber nitrogen. Pembuatan media produksi yaitu disiapkan sebanyak 3,8% ASW, 0,1% *yeast extract* dan 0,5% pepton, dan 0,5% pati komersial dengan *analytical grade* sebagai substrat media produksi.

Optimasi konsentrasi substrat dilakukan pada 10 mL media prekultur dan 30 mL media kultur. Variasi konsentrasi substrat yang digunakan adalah konsentrasi 1%, 2,5%, dan 5%. Selanjutnya isolat segar diinokulasi ke dalam media prekultur, diinkubasi dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam pada suhu 30°C, media prekultur dimasukan kedalam media kultur selanjutnya di inkubasi kembali selama 120 jam. Setiap 24 jam dilakukan pengambilan sampel kultur untuk pengujian pertumbuhan sel bakteri dan aktivitas enzimnya untuk mengetahui konsentrasi optimum dalam media produksi.

Optimasi pH produksi dilakukan dalam media produksi yaitu dengan konsentrasi substrat optimum yang telah diperoleh dari pengujian sebelumnya sebesar 1%. Variasi pH media yang digunakan adalah pH: 5, 6, 7, 8, dan 9. Optimasi suhu fermentasi dilakukan pada variasi suhu 20°C, 30°C, 40°C, dan terakhir 50°C. Optimasi ko-substrat media ditambahkan variasi ko-substrat yaitu maltosa, galaktosa, glukosa, dan sukrosa dengan konsentrasi masing-masing 0,5%. Optimasi sumber nitrogen menggunakan media variasi ammonium sulfat, urea, kasein, dan tripton dengan konsentrasi masing-masing 0,5%.

Aktivitas amilase ditentukan dengan menggunakan metode DNS dan gula pereduksi yang dibebaskan ditentukan dengan menggunakan metode DNS (Miller 1959). Ekstraksi amilase dipertahankan pada suhu dingin minimal 4°C (Liu *et al.* 2011) untuk menjaga aktivitas enzim.

Identifikasi bakteri dilakukan secara molekuler dengan menganalisis sebagian gen 16S rDNAny. Gen 16S rDNA diamplifikasi dengan menggunakan primer 9F (5'-AGRGTGGATCMTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-ACGGYTACCTTGTTAYGACTT-3') Burggraf *et al.* 1992. Amplifikasi dilakukan dengan campuran reaksi yang mengandung DNA bakteri, primer 9F dan 1492R masing-masing 10 pmol 2 µl, larutan Go Taq (promega) 26 µl serta ddH₂O 20 µl. Adapun kondisi reaksi PCR ialah 95 °C, 2 menit (1 siklus); 95 °C, 30 detik, 65 °C, 1 menit, 72 °C, 2 menit (10 siklus); 95 °C, 30 detik, 55 °C, 1 menit, 72 °C, 2 menit (30 siklus) serta 72 °C, 2 menit (1 siklus). PCR produk disekuensing di First Base Malaysia. Hasil sekuen selanjutnya dibandingkan dengan database di Gen Bank menggunakan BLAST algorithm.

HASIL

Analisa kualitatif aktivitas amilase dari *Arthrobacter arilaitensis*

Isolat bakteri laut *Arthrobacter arilaitensis* dapat tumbuh dalam media padat pati 0.5% pada hari ke-3. Isolat bakteri laut *Arthrobacter arilaitensis* yang tumbuh dapat dilihat dari terbentuknya pelikel putih pada media (Gambar 1a), sedangkan potensi bakteri dalam memproduksi amilase ditentukan berdasarkan nisbah antara diameter zona bening (*halo*) dengan diameter koloni bakteri. Zona bening terbentuk akibat amilase yang dibebaskan keluar sel bakteri untuk memecah makromolekul karbohidrat menjadi oligosakarida (Gambar 1b).

Konsentrasi pati optimum untuk produk amilase dari *Arthrobacter arilaitensis*

Pertumbuhan sel bakteri dan aktivitas amilase pada berbagai konsentrasi substrat yang diuji bisa dilihat pada Gambar 2 dan Gambar 3. Pertumbuhan maksimum bakteri terjadi pada jam ke-48, hal ini ditandai dengan meningkatnya nilai OD secara drastis. Fase stasioner terlihat pada

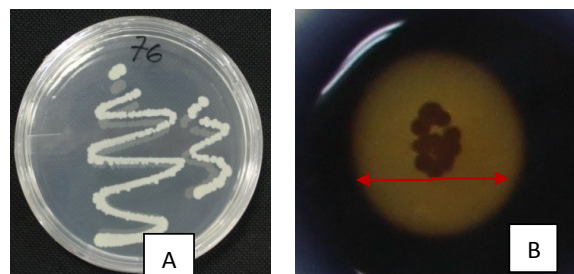
jam 72 dan mulai mengalami fase kematian dari jam ke-72 hingga jam ke-120 (Gambar 2). Hasil analisis aktivitas amilase yang dilakukan menunjukkan puncak tertinggi terjadi pada jam ke-72 pada masing-masing konsentrasi pati yang diuji dengan aktivitas enzim sebesar 2,6 U/mL untuk konsentrasi 1%, diikuti dengan konsentrasi 2,5% sebesar 2,3 U/mL, dan 2,2 U/mL pada konsentrasi 5% (Gambar 3).

pH optimum produksi amilase dari *Arthrobacter arilaitensis*

Titik optimum kurva pertumbuhan sel bakteri ditunjukkan pada jam ke-24 dimana pertumbuhan sel bakteri sedang berada pada fase log. Fase stasioner terlihat pada jam ke-48 hingga jam ke-72, lalu setelah jam ke-72 bakteri menuju fase kematian (Gambar 4). Hasil analisis aktivitas amilase pada media produksi dengan pH 7 menunjukkan hasil tertinggi dengan nilai sebesar 2,1 U/mL, diikuti pH 9 sebesar 1,9 U/mL, pH 6 sebesar 1,5 U/mL, lalu pH 8 sebesar 1,5 U/mL, dan terakhir pH 5 dengan nilai aktivitas enzim sebesar 1.4 U/mL. Titik optimum dicapai pada jam ke-72 pada semua kondisi pH (Gambar 5).

Suhu optimum pertumbuhan bakteri

Nilai absorbansi tertinggi pada kurva pertumbuhan sel bakteri untuk masing-masing kondisi suhu ditunjukkan pada jam ke-24, dimana pertumbuhan sel bakteri sedang dalam fase log. Titik optimum ditunjukkan pada kondisi suhu 30°C. Fase stasioner terjadi pada jam ke-48 hingga jam ke-72, lalu terjadi



Gambar 1. Bakteri laut *Arthrobacter arilaitensis* dalam media padat pati 0,5% (A), uji kualitatif aktivitas amilase *Arthrobacter arilaitensis* pada media ASW agar setelah pewarnaan dengan pewarna Lugol Iodin (tanda panah menunjukkan zona bening) (B).

penurunan pertumbuhan sel bakteri hingga jam ke-120. Fase lag tidak terlihat pada kurva pertumbuhan (Gambar 6). Nilai aktivitas amilase pada suhu 20°C, 30°C, 40°C, dan 50°C berturut-turut yaitu 1,7 U/mL, 2,4 U/mL, 1,9 U/mL, dan terakhir 0,9 U/mL. Aktivitas amilase menunjukkan jam ke-72 sebagai titik optimum untuk semua kondisi suhu, namun aktivitas amilase tertinggi ditunjukkan oleh suhu 30°C (Gambar 7).

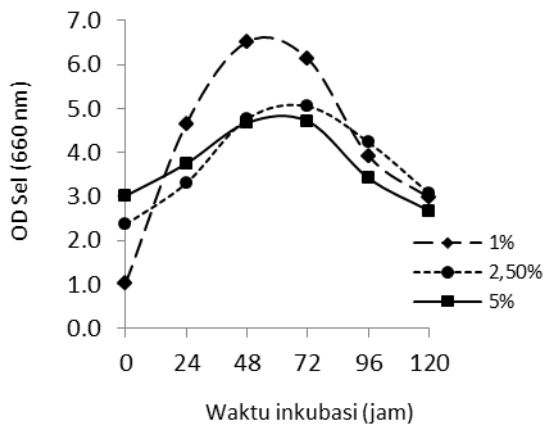
Ko-substrat optimum

Hasil analisis pertumbuhan sel bakteri menunjukkan terjadinya fase log pada jam ke-24. Fase stasioner pada jam ke-48 dan ke-72. Setelah itu terjadi penurunan pertumbuhan sel bakteri. Titik optimum terjadi pada jam ke-24 dengan glukosa dan maltosa sebagai ko-substrat

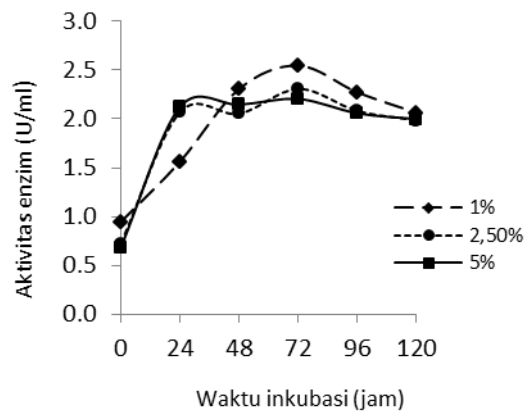
tinggi (Gambar 8). Aktivitas enzim amilase menunjukkan hasil optimum pada maltosa dengan nilai sebesar 2,7 U/mL, lalu galaktosa sebesar 2,3 U/mL, sukrosa sebesar 2,2 U/mL, dan terakhir sukrosa sebesar 2,0 U/mL. Titik optimum terjadi pada jam ke-72 dengan maltosa sebagai ko-substrat optimum (Gambar 9).

Sumber nitrogen optimum

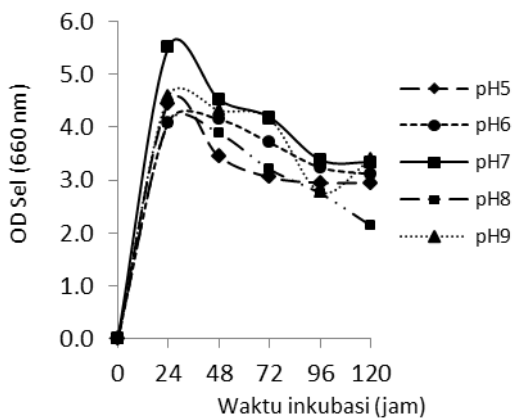
Kasein merupakan sumber nitrogen terbaik untuk bakteri laut *Arthrobacter arilaitensis* dengan titik optimum pertumbuhan sel bakteri pada jam ke-24 dan aktivitas enzim amilase pada jam ke-72. Fase log terjadi pada jam ke-24, lalu fase stasioner terjadi pada jam ke-48 hingga jam ke-72, dan terjadi penurunan pertumbuhan sel bakteri mulai dari jam ke-72 (Gambar 10). Aktivitas enzim amilase sumber



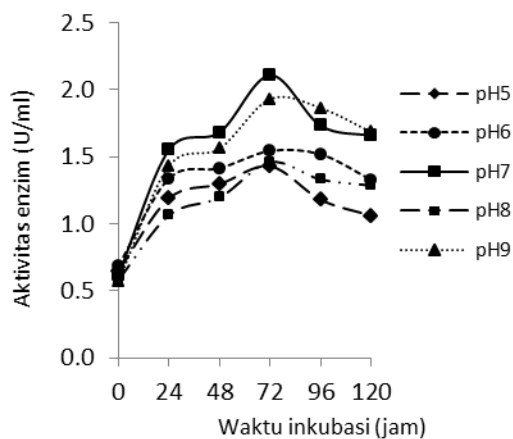
Gambar 2. Pertumbuhan sel bakteri laut *Arthrobacter arilaitensis* pada konsentrasi pati (1, 2.5, 5)%.



Gambar 3. Aktivitas amilase dari bakteri laut *Arthrobacter arilaitensis* pada konsentrasi pati (1, 2.5, 5)%.



Gambar 4. Pertumbuhan sel bakteri laut *Arthrobacter arilaitensis* dengan berbagai kondisi pH: 5, 6, 7, 8, 9.



Gambar 5. Aktivitas amilase dari bakteri laut *Arthrobacter arilaitensis* dengan berbagai kondisi pH: 5, 6, 7, 8, 9.

nitrogen kasein mempunyai nilai sebesar 2.3 U/ mL, lalu tripton sebesar 2,1 U/mL, urea sebesar 2,1 U/mL, dan terakhir dengan ammonium sulfat dengan aktivitas enzim sebesar 1.7 U/mL (Gambar 11).

Analisis sebagian gen 16S rDNA Bakteri

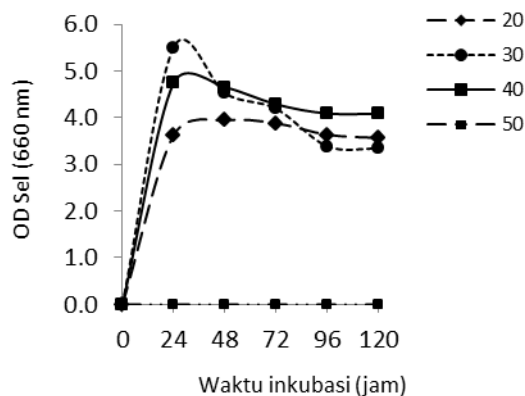
Amplifikasi daerah sebagian gen 16S rDNA menghasilkan produk sekitar 1500 bp (Gambar 12).

Isolat bakteri laut 76 diidentifikasi sebagai *Arthrobacter arilaitensis* berdasarkan analisis menggunakan BLAST.

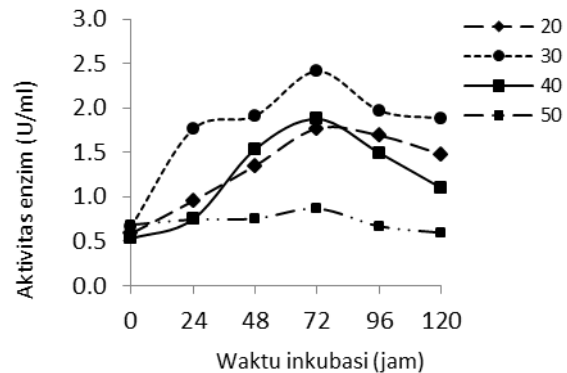
PEMBAHASAN

Peremajaan bakteri laut penghasil enzim amilase dilakukan dalam media pati 0.5% karena umumnya tingkat pertumbuhan maksimal telah dicapai pada kondisi tersebut. Bakteri laut *Arthrobacter arilaitensis* tumbuh dalam media pati

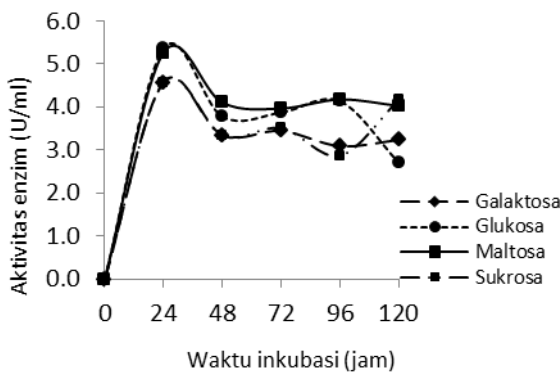
0.5% saat hari ke-3. Berdasarkan hasil penelitian (Gambar 2), terlihat adanya penurunan jumlah pertumbuhan sel bakteri mulai dari jam ke-72 hingga jam ke-120, dimana bakteri mulai mengalami fase kematian. Habisnya nutrisi dan akumulasi produk inhibitor seperti asam adalah beberapa faktor yang mempengaruhi kematian sel (Nurhajati *et al.* 2009). Fase pertumbuhan optimum untuk bakteri laut *Arthrobacter arilaitensis* ditunjukkan berturut-turut oleh konsentrasi substrat pati 1%, diikuti oleh konsentrasi pati 2,5%, dan konsentrasi pati 5%. Berbeda halnya dengan kondisi optimasi konsentrasi substrat, untuk kurva pertumbuhan sel bakteri kondisi pH (Gambar 4), suhu fermentasi (Gambar 6), ko-substrat (Gambar 8), dan sumber nitrogen (Gambar 10) yang mempunyai pola cenderung sama yaitu, terjadinya titik tertinggi atau optimum ketika jam ke-24 (fase log), lalu terjadi fase stasioner dikisaran jam ke-48 hingga jam ke-72 selanjutnya terjadi fase kematian. Pada kurva pertumbuhan sel bakteri



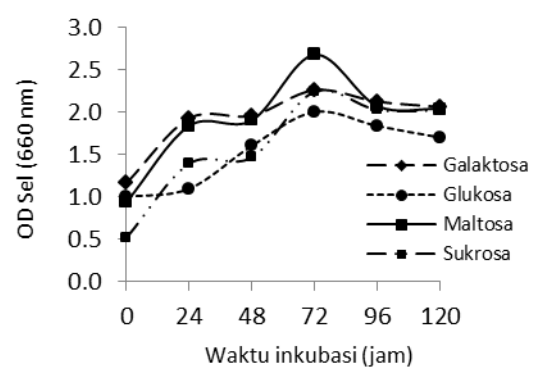
Gambar 6. Pertumbuhan sel bakteri laut *Arthrobacter arilaitensis* Pada berbagai suhu (°C) fermentasi.



Gambar 7. Aktivitas amilase dari bakteri laut *Arthrobacter arilaitensis* Pada berbagai suhu (°C) fermentasi.



Gambar 8. Pertumbuhan sel bakteri laut *Arthrobacter arilaitensis* dengan berbagai ko-substrat.



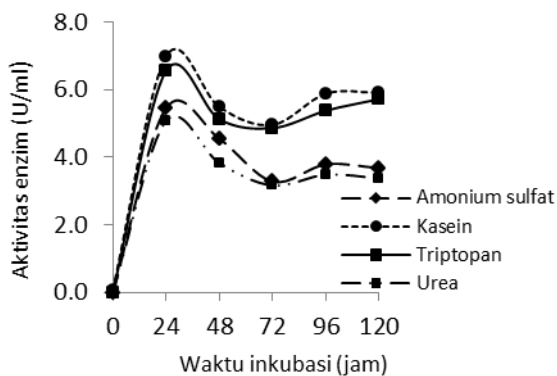
Gambar 9. Aktivitas amilase dari bakteri laut *Arthrobacter arilaitensis* dengan berbagai ko-substrat.

tidak terlihat adanya fase lag, hal ini dikarenakan pengukuran dilakukan 24 jam sekali, sehingga perubahan yang terjadi dalam kurun waktu kurang dari 24 jam tidak diketahui. Pertumbuhan sel bakteri mencapai titik optimum pada jam ke-24, terjadi pertumbuhan yang sangat cepat, setelah jam ke-24 semua bakteri dalam media produksi mengalami penurunan jumlah pertumbuhan sel bakteri. Suhu pertumbuhan optimum memungkinkan pertumbuhan tercepat terjadi dalam waktu yang singkat yaitu 12-24 jam (Pelczar & Chan 2008).

Bakteri laut *Arthrobacter arilaitensis* menunjukkan titik optimum yang berbeda pada perlakuan optimasi konsentrasi substrat dibandingkan dengan perlakuan optimasi lainnya, dimana titik optimum bakteri lebih lama terjadi. Hal ini disebabkan karena konstanta laju pertumbuhan dari bakteri memiliki nilai yang berbeda, yang tergantung pada kemampuan metabolisme bakteri tersebut (Dwipayana & Herto 2011). Awal fase adaptasi yang dilakukan pada awal analisis juga mempengaruhi perbedaan titik optimum, dimana fase adaptasi ini dipengaruhi langsung oleh medium, lingkungan pertumbuhan, serta jumlah inokulum (Wahyu & Ikhsan 2010). Analisis kurva pertumbuhan bakteri dibuat untuk melihat fase-fase pertumbuhan dari bakteri (Dwipayana & Herto 2011). Selain itu, untuk mengetahui waktu dan umur kultur mikroba yang akan dipanen (Prima Nanda 2013).

Konsentrasi pati optimum

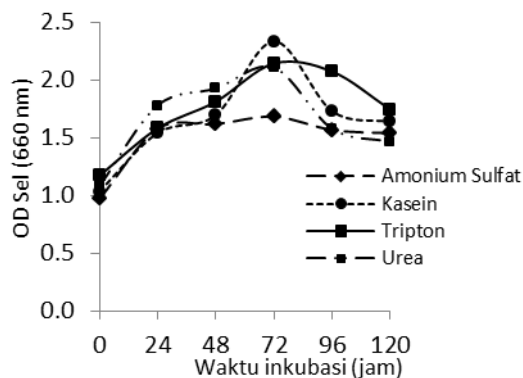
Menurut Vishnu *et al.* (2014), pati dikenal



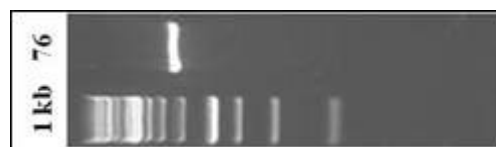
Gambar 10. Pertumbuhan sel bakteri laut *Arthrobacter arilaitensis* pada berbagai sumber nitrogen.

secara umum sebagai komponen nutrisi untuk induksi enzim amilolitik. Begitu pula menurut Hagihara *et al.* (2001) yang menyatakan bahwa pati merupakan sumber karbon yang baik untuk sintesis amilase oleh *Arthrobacter arilaitensis*. Konsentrasi pati yang akan digunakan dalam media kultur menjadi hal yang penting karena konsentrasi nutrisi dapat mempengaruhi laju pertumbuhan dan juga produk kultur. Konsentrasi pati yang diuji pada penelitian ini adalah 1%, 2,5%, dan 5%, dipilih berdasarkan penelitian sebelumnya dengan sedikit modifikasi (Rahmani *et al.* 2011).

Aktivitas enzim (Gambar 3) dapat dilihat pada puncak tertinggi, terjadi pada jam ke-72 pada berbagai konsentrasi pati yang diuji dengan aktivitas 2.1 U/mL pada jam ke-72 ke atas pertumbuhan sel bakteri mengalami fase kematian. Kondisi lebih baik ditunjukkan oleh konsentrasi substrat pati 1% yang merupakan konsentrasi nutrisi yang cocok untuk laju pertumbuhan bakteri laut *Arthrobacter arilaitensis* dalam memenuhi kegiatan metabolisme bakteri tersebut. Kegiatan metabolisme bakteri yang berjalan dengan baik membuat terjadinya peningkatan hasil pertumbuhan sel bakteri maupun aktivitas enzim amilasena. Hidrolisis



Gambar 11. Aktivitas amilase dari bakteri laut *Arthrobacter arilaitensis* pada berbagai sumber nitrogen.



Gambar 12. Analisis sebagian gen 16S rDNA bakteri laut isolate 76, lane 1 DNA marker 1Kb, lane 2 produk PCR isolate 76.

pati menjadi molekul yang lebih sederhana membuat konsentrasi substrat 2.5% dan 5% memiliki laju pertumbuhan yang rendah dan juga aktivitas enzim amilase yang lebih kecil dibanding dengan konsentrasi substrat 1% karena substrat pati saat dipecah menjadi molekul yang lebih sederhana jumlahnya menjadi tinggi dan menjadi penghambat. Hal tersebut dikarenakan secara kinetik konsentrasi rendah akan menjadi substrat pembatas, sedangkan konsentrasi yang tinggi akan menjadi substrat penghambat (Arnata 2009). Konsentrasi substrat yang tinggi dapat menjadi penghambat yang memperlambat proses hidrolisis.

pH optimum produksi

Nilai pH media pertumbuhan bakteri mempunyai peranan yang sangat penting dengan menginduksi perubahan morfologi bakteri dan sekresi enzim (Gupta *et al.* 2003). Nilai pH juga mempengaruhi penyerapan nutrisi dan aktivitas fisiologi mikroba sehingga mempengaruhi pertumbuhan biomassa dan pembentukan produknya. pH optimum pertumbuhan mengacu pada pH ekstraselular lingkungan sementara pH intraselular harus relatif netral untuk mencegah rusaknya makromolekul yang labil asam atau alkalin dalam sel (Tedja 2009).

Nilai pH optimum media untuk pertumbuhan bakteri laut *Arthrobacter arilaitensis* yaitu pH 7 (Gambar 4). Ketika pH media produksi dinaikkan, yaitu pH 8 dan pH 9 terlihat adanya penurunan jumlah sel bakteri dan aktivitas enzim amilase yang dihasilkan. Hal ini sama ketika pH media produksi berada di bawah pH 7, yaitu pH 5 dan pH 6 dimana terjadinya penurunan aktivitas.

Media produksi dengan pH 7 merupakan pH optimum untuk pertumbuhan sel dan aktivitas enzim amilase (Gambar 5). Aktivitas enzim berkaitan erat dengan strukturnya, perubahan struktur dapat menyebabkan perubahan aktivitas enzim. Enzim memiliki struktur *native* tersier yang sensitif terhadap pH dan secara umum denaturasi enzim terjadi pada nilai pH sangat rendah atau tinggi (Copeland 2000). Hasil penelitian ini menunjukkan hasil yang sejalan dengan beberapa penelitian sebelumnya, dimana pH optimum yang didapat yaitu pH 7, seperti *Bacillus* spp. (Vidyalakshmi *et al.* 2009),

Bacillus licheniformis (Sankaralingam *et al.* 2012), *Bacillus subtilis* strain XK-86 (Kolusheva & A. Marinova 2007), dan *Bacillus marini* (Ashwini *et al.* 2011).

Suhu optimum pertumbuhan bakteri

Suhu dapat mempengaruhi pola pertumbuhan bakteri, juga dapat mempengaruhi laju pertumbuhan, dan jumlah total pertumbuhan organisme (Pelczar & Chan 2008). Setiap spesies bakteri tumbuh pada suatu kisaran suhu tertentu, seperti *Bacillus* spp. mempunyai suhu optimum 35°C (Vidyalakshmi *et al.* 2009), *Arthrobacter arilaitensis* pada suhu 40°C (Vishnu *et al.* 2014), *Arthrobacter arilaitensis* VITRKBH dengan suhu optimum 45°C (Bhaskara Rao *et al.* 2013), dan *Bacillus subtilis* pada suhu 37°C (Amutha & Priya 2011). Hasil penelitian menunjukkan bahwa suhu optimum untuk bakteri laut *Arthrobacter arilaitensis* yaitu sebesar 30°C (Gambar 6). Hal tersebut dikarenakan suhu yang terlalu rendah atau terlalu tinggi tidak memungkinkan mikroorganisme untuk tumbuh. Reaksi kimia dan enzimatik mikroorganisme meningkat jika suhu meningkat, begitu pula dengan laju pertumbuhannya. Namun, di atas suhu tertentu protein tertentu dapat mengalami denaturasi (Tedja 2009). Suhu pertumbuhan optimum memungkinkan pertumbuhan tercepat terjadi dalam waktu yang singkat yaitu 12-24 jam (Pelczar & Chan 2008). Hal ini sesuai dengan hasil yang diperlihatkan pada Gambar 6, dimana pertumbuhan sel bakteri mencapai titik puncak pada jam ke-24. Pola pertumbuhan bakteri terlihat sangat dipengaruhi suhu, karena kenaikan 10°C membuat kecepatan reaksi pun naik berlipat ganda.

Aktivitas amilase dari bakteri laut *Arthrobacter arilaitensis* juga mempunyai hubungan linier dengan pertumbuhan sel bakteri, yaitu mempunyai nilai optimum pada suhu 30°C (Gambar 7). Hasil yang sama ditunjukkan oleh bakteri *Bacillus licheniformis* yang mempunyai suhu optimum sebesar 30°C untuk memproduksi enzim amilase (Sankaralingam *et al.* 2012). Suhu 30°C memperlihatkan nilai aktivitas enzim amilase yang paling tinggi dibandingkan yang lain karena reaksi metabolisme mikroorganisme dikatalisasi dengan baik oleh enzim (Rofi'i 2009).

Ko-substrat optimum

Sumber karbon memiliki efek untuk mengubah strain produksi ataupun kondisi lainnya (Ashwini *et al.* 2011). Sifat dan konsentrasi sumber karbon bergantung pada mikroorganisme yang akan dikulturkan (Tedja 2009). Penambahan sumber karbon dalam bentuk karbohidrat berpengaruh baik untuk produksi enzim. Beberapa jenis karbohidrat seperti maltosa, sukrosa, glukosa, dan galaktosa masing-masing diuji dalam penelitian ini agar didapatkan sumber karbon lain yang dapat membantu bakteri laut *Arthrobacter arilaitensis* untuk menghasilkan produksi optimum amilase. Penambahan ko-substrat dilakukan sebagai substrat awal selama bakteri beradaptasi dengan substrat utamanya (Dwipayana & Herto 2011).

Gambar 8 menunjukkan bahwa pertumbuhan sel bakteri paling optimal terjadi pada jam ke-24 dengan maltosa dan glukosa sebagai ko-substrat yang menunjukkan titik optimum tertinggi, lalu diikuti dengan galaktosa dan sukrosa. Aktivitas amilase mulai terlihat ketika pertumbuhan sel bakteri mencapai jumlah sel bakteri optimum dan aktivitas amilase mencapai titik optimum ketika pertumbuhan sel bakteri ada dalam fase stasioner yaitu pada jam ke-72. Gambar 9 menunjukkan bahwa aktivitas amilase optimum dicapai oleh ko-substrat maltosa. Glukosa menunjukkan hasil yang berbanding terbalik, dimana media glukosa baik untuk pertumbuhan sel bakteri, namun tidak untuk aktivitas amilase. Beberapa penelitian sebelumnya juga menunjukkan maltosa sebagai sumber karbon paling baik pada media pertumbuhan, diantaranya pada *Bacillus* sp (Thippeswamy *et al.* 2006) dan *Bacillus* spp. (Grata *et al.* 2008). Juga, hal yang sama dilaporkan oleh Santos dan Martinus (2003), dimana produksi maksimum α -amilase dari bakteri *Bacillus* sp pada fase eksponensial (350 U/mL) dengan medium yang mengandung 1% pati terlarut dan 1% maltosa.

Sumber nitrogen optimum

Keberadaan nitrogen penting untuk protein, asam nukleat, dan penyusun sel (Tedja 2009). Aktivitas amilase meningkat nilainya pada saat pertumbuhan sel bakteri mengalami fase stasioner dan mencapai titik optimum ketika fase stasioner berakhir yaitu pada jam ke-72

(Gambar 11). Bakteri yang tumbuh dan menghasilkan amilase menunjukkan bahwa terpenuhinya kebutuhan nitrogen didalam media kultur, karena jika dalam substrat hanya terdapat sedikit nitrogen, bakteri tidak akan dapat memproduksi enzim yang dibutuhkan untuk mensintesis senyawa (substrat) yang mengandung karbon. Gambar 10 menunjukkan bahwa kasein merupakan sumber nitrogen terbaik untuk bakteri laut *Arthrobacter arilaitensis* dibandingkan sumber nitrogen lainnya. Akan tetapi nilai aktivitasnya lebih rendah dari sebelum ditambahkan sumber nitrogen dari 2,7 U/mL menjadi 2,3 U/mL. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan sumber nitrogen tidak menyebabkan peningkatan signifikan terhadap aktivitas amilase yang diperoleh. Hasil yang ditunjukkan pada optimasi sumber nitrogen ini tidak berbeda jauh nilainya dengan media kultur yang tidak ditambahkan sumber nitrogen lainnya dengan kondisi yang sama (Gambar 3). Kasein menjadi sumber nitrogen terbaik untuk bakteri dalam beberapa penelitian sebelumnya seperti *Bacillus megaterium* BPTK5 (Kumar *et al.* 2012) dan *Bacillus subtilis* IP 5832 (Bozic *et al.* 2011).

KESIMPULAN DAN SARAN

Produksi optimum enzim amilase ditemukan pada konsentrasi substrat pati 1%, pH 7, suhu 30°C, maltosa sebagai ko-substrat dengan nilai aktivitas enzim amilase 2,7 U/mL. Penambahan sumber nitrogen tidak menunjukkan peningkatan aktivitas amilase yang signifikan, sebagai contoh sumber nitrogen terbaik maltose menurunkan aktivitas amilase menjadi 2,3 U/mL. Produksi enzim amilase optimum terjadi saat pertumbuhan sel bakteri pada fase stasioner yaitu jam ke-72.

UCAPAN TERIMA KASIH

Tulisan ini merupakan bagian dari kegiatan hasil penelitian yang dibiayai oleh dana DIPA Tematik Puslit Bioteknologi LIPI. Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada segenap Staf Peneliti Laboratorium Biokatalis dan Fermentasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Amutha, K. & J. Priya. 2011. Effect of pH, Temperature, and Metal Ions on Amylase Activity From *Bacillus subtilis* KCX 006. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2(2): 407-410.
- Arnata, IW. 2009. Pengembangan Alternatif Teknologi Bioproses Pembuatan Bioetanol Dari Ubi Kayu Menggunakan *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger*, dan *Saccharomyces cerevisiae* [Disertasi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Ashwini, K., K. Gaurav, L. Karthik, KV. Bhaskara Rao. 2013. Optimization, Production and Partial Purification of Extracellular α -amylase From *Bacillus* sp. *marini*. *Archives of Applied Science Research* 3(1): 33-42.
- Bhaskara, RKV., H. Bose, K. Richa, K. Singh, L. Karthik & G. Kumar. 2013. RSM Mediated Optimization of Amylase Production From Marine *Arthrobacter arilaitensis* VITRKB. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological, and Chemical Sciences* 4(4): 523-536.
- Bozic, N., J. Ruiz, J. Lopez-Santin, & Z. Vujcic. 2011. Optimization of the Growth and α -amylase Production of *Bacillus subtilis* IP 5832 in Shake Flask and Laboratory Fermenter Batch Cultures. *Journal Serbian Chemical Society* 76(7): 965-972.
- Copeland, RA. 2000. Methods for Protein Analysis: A Practical Guide to Laboratory Protocols. New York: Chapman and Hall.
- Grata K, M. Nabrdalik & A. Latala. 2008. Effect of Different Carbon Sources on Amylolytic Activity of *Bacillus* spp. Isolated From Natural Environment. *Proceedings of ECOpole* 2(2).
- Gupta, R., P. Gigras, H. Mohapatra, VK. Goswami, & B. Chauhan. 2003. Microbial α -amylases: A Biotechnological Perspective. *Process Biochemical*. 38:1599-1616.
- Hagihara, H., K. Igarashi, & Y. Hayashi. 2001. Novel Alpha Amylase That Is Highly Resistant to Chelating Reagents and Chemical Oxidants From the Alkaliphilic *Bacillus* Isolate KSM-K38. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1744-1750.
- Kolusheva, T., & A. Marinova. 2007. A Study of The Optimal Conditions For Starch Hydrolysis Through Thermostable α -amylase. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*. 42 (1):93-96.
- Kumar MDJ, T. Silambarasan, R. Renuga, R. Kumar, S. Karthigasdevi. 2012. . Production, Optimization, and Characterization of α -amylase and Glucose Isomerase Producing *Bacillus megaterium* BPTK5 From Cassava Waste. *European Journal of Experimental Biology* 2(3): 590-595.
- Liu, J., Z. Zhang, H. Zhu, H. Dang, J. Lu & Z. Cui. 2011. Isolation and Characterization of α -amilase From Marine *Pseudomonas* sp.K6-28-040. *Journal Biotechnology* 10 (14): 2733 -2740.
- Miller, GL. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* 31(3): 426-428.
- Pandey, A., P. Nigam, CR. Soccol, VT. Soccol, D. Singh & R. Mohan. 2000. Advances in Microbial Amylases. *Biotechnology Application Biochemical* 31:135-152.
- Pelczar, MJ., & ECS. Chan. 2008. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI Press.
- Rahmani N, Yopi, A. Andriani, A. Prima. 2011. Production and characterization of amilase anzyme from marine bacteria. *Proceeding of the 2nd International Seminar on Chemistry*: 255-259.
- Rani, G., P. Gigras, H. Mohapatra, VK. Goswami, & B. Chauhan. 2003. Microbial α -amylases: A Biotechnological Perspective Process Biochemis. 38: 1599-1616.
- Rofi'i, F. 2009. Hubungan Antara Jumlah Total Bakteri dan Angka Katalase Terhadap Daya Tahan Susu [Skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Sankaralingam S, T. Shankar, R. Ramasubburayan, S. Prakash, C. Kumar C. 2012. Optimization of Culture Condition for the Production of Amylase from *Bacillus licheniformis* on Submerged Fermentation. *American-Eurasian J. Agric & environ. Sci*. 12 (11):1507-1513.
- Santos, EO., & ML. Martinus. 2003. Effect Product of the Medium Composition on Formation of Amylase by *Bacillus* sp.

- Brazilian Archives of Biology and Technology*. 46 : 421-432.
- Sivaramkrishnan, S., D. Gangadharan, KD. Nampoothiri, CR. Sossol & A. Pandey. 2006. α -amylase From Microbial Sources- An Overview on Recent Developments. *Food. Technology Biotechnology*. 44: 173-184.
- Tedja, IS. 2009. *Mikrobiologi Esensial 1*. Jakarta: Ardy Agency.
- Thippeswamy, S., K. Girigowda, & VH. Mulimani. 2006. Isolation and Identification of α -amylase Producing *Bacillus* sp. From Dhal Industry Waste. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 43: 295-298.
- Vidyalakshmi, R., R Paranthaman & J. Indhumathi. 2009. Amylase Production on Submerged and Fermentation by *Bacillus* spp. *World Journal Chemistry* 43(4): 89-91.
- Vishnu, TS., AR. Soniyamby, BV. Praveesh & AT. Hema. 2014. Production and Optimization of Extracellular Amylase From Soil Receiving Kitchen Waste Isolate *Bacillus* sp. VS 04. *World Applied Sciences Journal* 29 (7): 961-967.
- Whitman, WB., DC. Coleman & Wiebe. 1998. Prokaryotes: The Unseen Majority. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 95: 6578-6583.