

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. AMILUM (STARCH) DAN AMILASE.

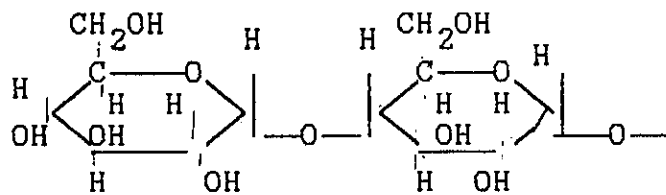
1. Amilum.

Amilum atau pati adalah salah satu jenis polisakarida yang amat luas tersebar di alam. Rasanya tidak manis dan terjadi pada proses asimilasi. Bahan ini disimpan sebagai cadangan makanan bagi tumbuhan di dalam biji (padi, gandum, jagung), di dalam batang (aren, sagu), di dalam umbi (ubi kayu, talas). Secara histologis, pati disimpan dalam bentuk plastida yang dinamakan amiloplast dalam sel (Tjokroadikoesoemo, 1986).

Dilihat dari susunan kimianya, pati adalah polimer dari maltosa atau glukosa. Berdasarkan jumlah molekul glukosa di dalam pati, susunan kimia pati bervariasi, tergantung pada tanaman asal pati tersebut. Walaupun demikian, secara garis besar pati dapat dibedakan atas :

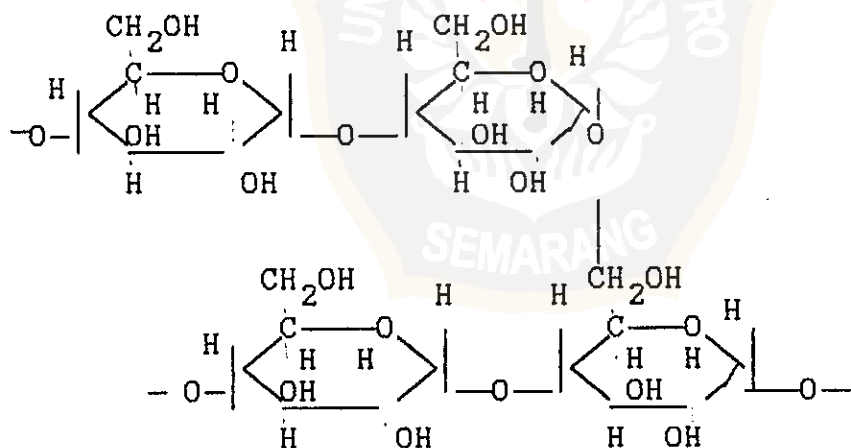
a. Amilosa (10 - 30 %).

Amilosa mempunyai sifat tidak larut dalam air dingin, tetapi larut dalam air panas. Amilosa dengan Jod memberikan warna biru. Berat molekul amilosa antara 10.000 - 50.000. Mempunyai rantai lurus, tersusun atas satuan-satuan α - D - glukopiranososa. Ikatan glikosida terjadi antara atom C no. 1 dan atom C no. 4, sehingga struktur kimianya dapat digambarkan sebagai berikut :



b. Amilopektin (70 - 90 %).

Amilopektin bersifat tidak larut baik dalam air panas maupun air dingin. Amilopektin dengan Jod memberikan warna merah sampai lembayung. Berat molekul amilopektin antara 50.000 - 1.000.000. Tersusun atas satuan α -D-glukopiranososa. Ikatan glikosida pada rantai lurus seperti pada amilosa, ikatan cabangnya antara atom C no.1 dan atom C no.6, sehingga struktur kimianya sebagai berikut :



2. Amilase.

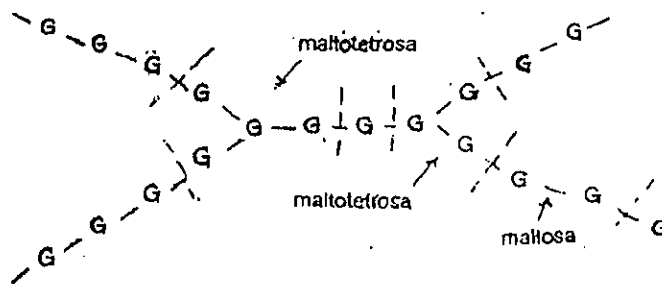
Hidrolisa amilum dapat dilakukan dengan asam mineral encer sebagai katalis, atau dengan enzim amilase sebagai katalis. Hidrolisa dengan amilase akan dihasilkan

molekul-molekul maltosa sebagai hasil akhir. Hidrolisa amilum dengan amilase tidak berjalan spontan, tetapi bertingkat-tingkat dengan hasil-hasil antara dekstrin. Dekstrin yaitu polisakarida yang molekulnya masih besar meskipun lebih kecil dibanding dengan molekul amilum. Kita kenal 3 buah dekstrin yang penting sebagai hasil antara hidrolisa amilum ini : amilodekstrin (yang dengan Jod memberikan warna ungu), erythrodekstrin (yang dengan Jod memberikan warna merah), dan akrodekstrin (yang dengan Jod tidak berwarna) (Fessenden, 1984)

Amilase dapat dikelompokkan menjadi 3 golongan enzim, yaitu :

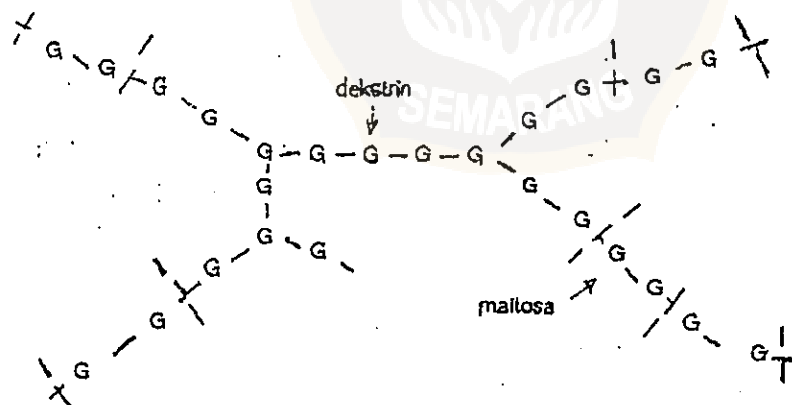
a. α - amilase (α -D-1,4-glukon-glukano-hidrolase)

merupakan enzim yang kerjanya memutuskan ikatan α - 1,4 secara acak di bagian dalam molekul baik amilosa maupun amilopektin. Aktivitas α -amilase ditentukan dengan mengukur hasil degradasi pati, biasanya dari penurunan kadar pati yang larut atau kadar dekstrinnya dengan menggunakan substrat jenuh. Hilangnya substrat dapat diukur dengan pengukuran derajat pewarnaan Jodium terhadap substrat. Enzim ini ditemukan pada hewan, tanaman dan mikroorganisme, terutama Bacillus stearothermophyllus, B. subtilis, dan Aspergillus. Hasil aktivitas enzim ini adalah D -glukosa, maltosa dan sejumlah dekstrin.



b. β - amilase (α -D-1,4-glukan-malto hidrolase).

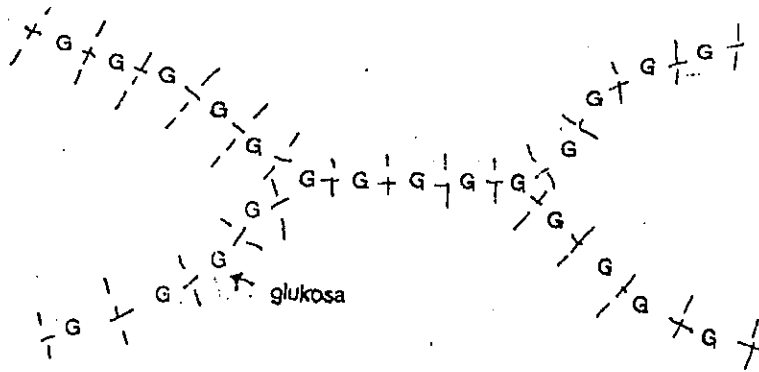
merupakan exoenzim yang memotong amilum menjadi gugus-gugus maltosa. Enzim ini biasanya diperoleh dari tumbuhan, tetapi ada beberapa bakteri yang dapat memproduksi. Hasil pemecahan enzim ini adalah maltosa dan maltotriosa. β -amilase memulai penyerangannya dari gugus terminal tidak reduktif.



c. Glukoamilase (α -1,4-glukan glukohidrolase).

merupakan enzim yang memotong rantai pati secara acak menjadi molekul - molekul glukosa. Glukoamilase ditemu-

kan pada beberapa kapang seperti pada Aspergillus sp dan Rhizopus sp, khamir dan beberapa bakteri.



(Fardiaz Srikandi, 1988)

Pemanfaatan enzim amilase secara komersial pertama kali berasal dari enzim takadiastase (fungal enzim) yang digunakan sebagai agensia farmasi di Amerika Serikat pada tahun 1894 (Crueger and Crueger, 1984). Enzim amilase banyak digunakan dalam bidang industri kertas, tekstil, alkohol, farmasi, roti, HFS (High Fructosa Syrup), dan berbagai produk pengolahan pati (Tjokroadikoesoemo, 1986).

Penelitian kimia enzim tidak hanya dilakukan dalam skala laboratorium, tapi juga dalam lapangan industri, fermentasi, dan pengobatan. Banyak sumber enzim amilolitik yang telah diketahui dan sifat-sifatnya telah dipelajari secara seksama (Yamamoto, 1982).

Perbedaan sumber atau asal enzim menyebabkan perbedaan daya tahan panas. Enzim yang serupa seperti

amilase bila dihasilkan oleh bakteri lebih tahan panas dari pada enzim amilase yang berasal dari kapang. Contohnya enzim α -amilase dari B. stearothermophyllus masih mempunyai keaktifan 71 % dari aktivitas awal setelah pemanasan 20 jam pada suhu 85°C (Winarno, 1983).

Secara umum suatu reaksi akan dipercepat apabila suhu reaksinya semakin tinggi. Endospora yang dihasilkan bakteri menyebabkan bakteri tersebut resisten terhadap panas. Bakteri yang tahan terhadap panas akan menghasilkan enzim yang stabil pada suhu yang tinggi.

Stabilitas enzim didalam larutan akan meningkat dengan penambahan senyawa tertentu, seperti garam dapur, dan Calsium. Enzim α - amilase yang dihasilkan oleh B. subtilis amat stabil pada suhu tinggi. Suhu optimum untuk enzim ini sekitar 70 - 90 °c. Enzim α - amilase yang dihasilkan B. licheniformis, B. stearothermophyllus dikenal sebagai enzim yang termostabil, yang tidak memerlukan ion logam tertentu untuk menjaga kestabilannya pada suhu yang tinggi. β -amilase dari bakteri mempunyai resisten panas yang lebih tinggi (lebih dari 70°C) daripada β - amilase tumbuhan, dan pH optimum lebih tinggi \pm pH 7,0. Tidak seperti α - amilase, enzim ini tidak membutuhkan Ca untuk stabilisasi dan aktivasi enzimnya (Yamamoto, 1982).

Secara bioteknologi penggunaan jenis bakteri tahan panas akan memberikan manfaat potensial bagi produk bahan bakar alkohol dibanding bila menggunakan khamir. Bakteri

tersebut akan mengubah bahan mentah (pati) menjadi alkohol secara lebih cepat dibanding dengan khamir. Tidak diperlukan lagi sistem pendinginan yang kompleks pada peralatan fermentasi (pada saat ini bejana fermentasi harus didinginkan untuk menjamin bahwa panas yang dihasilkan selama fermentasi harus tidak membahayakan khamir). Bejana fermentasi yang bekerja pada suhu yang relatif tinggi akan lebih sedikit kecenderungannya untuk terkontaminasi oleh organisme yang tidak diinginkan, karena tidak banyak mikrobia lain yang tahan panas. Akhirnya setelah cairan fermentasi menjadi hangat, akan diperlukan lebih sedikit panas untuk menyuling alkohol, dan biaya destilasi merupakan faktor penting dalam biaya total produksi (Prenties, 1990).

Untuk tumbuh dan tetap hidup mikrobia harus mengeluarkan sejumlah besar enzim pengkatalisa reaksi. Jika sel mikrobia diletakkan dalam lingkungan yang mengandung polimer seperti pati, maka pati akan dihidrolisa menjadi glukosa, glukosa dibawa ke dalam sel, degradasi hexosa menjadi senyawa C3 atau C2 dan kemudian masuk dalam siklus asam tri karboksilat untuk menghasilkan energi dan zat antara, yang kemudian digunakan untuk membentuk struktur sel seperti ribosom, flagella, membran dan mitokondria (Wang, Cooney, Demain, Dunnill, Humprey and Lilly., 1979).

B. Bakteri Genus *Bacillus*.

Klasifikasi bakteri *Bacillus* sp menurut Bergey's

manual (Buchanan and Gibson, 1975) sebagai berikut :

Devisi : Protophyta
Kelas : Schizomycetes
Bangsa : Eubacteriales
Suku : Bacillaceae
Marga : Bacillus
Jenis : Bacillus sp.

Dua genus bakteri pembentuk endospora tercatat dari genus Bacillus yang merupakan spesies yang aerob sampai anaerob fakultatif dan genus Clostridium yang hanya terdiri dari spesies yang anaerob obligat. Anggota genus Bacillus memproduksi enzim katalase, yang memecah Hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen, tetapi anggota genus Clostridium tidak memproduksi katalase sama sekali (Fro-bisher, 1962).

Anggota genus Bacillus sangat mudah diisolasi dari tanah atau udara. Untuk mengisolasi jenis-jenis bakteri anggota genus Bacillus dari tanah dilakukan dengan teknik khusus, yaitu dengan memanaskan suspensi tanah pada suhu 80⁰C selama 10 - 30 menit dengan maksud untuk memacu pembentukan endospora sedangkan sel-sel vegetatif bakteri lain yang tidak tahan panas dan tidak mampu membentuk endospora akan mati. Kultur diinkubasikan secara aerob, sehingga bakteri pembentuk endospora yang bersifat anaerob yaitu Clostridium sp tidak akan tumbuh (Alexander, 1978; Brock, Smith, and Madigan., 1984).

Anggota genus *Bacillus* sering diisolasi dengan menggunakan medium nutrien agar dengan komposisi : ekstrak daging, pepton, dan air suling dengan pH 6,8. Kemudian produksi bakteri tersebut lebih banyak dilakukan dengan menggunakan media sistem fermentasi "semi solid dan "sub merged". Pada proses fermentasi semi solid digunakan bahan-bahan yang banyak macamnya serta prosesnya panjang. Fermentasi "sub merged " lebih menguntungkan daripada fermentasi "semi solid", baik dalam kualitas maupun kemudahan dalam pengendalian produksinya secara massal. (Reed and Underkofler, 1966).

Untuk berlangsungnya proses sporulasi pada jenis-jenis bakteri anggota genus *Bacillus* pada umumnya diperlukan keadaan lingkungan tertentu yang berbeda-beda untuk masing-masing jenis. Faktor-faktor yang mempengaruhi antara lain : adanya ion-ion logam tertentu (Fe^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) suhu pertumbuhan, oksigen, dan asam-asam amino tertentu. Biasanya endospora terbentuk ketika sel mengalami kekurangan sumber karbon dan nitrogen.

Bakteri pembentuk endospora secara umum mempunyai resistensi tinggi terhadap desinfektan bahan-bahan kimia dan pada temperatur tinggi, sehingga dapat dipahami bahwa bakteri ini relatif lebih sukar dibunuh dari pada bakteri yang tidak membentuk endospora (Frobisher, 1962).

Fase endospora bukan merupakan fase perkembangan, melainkan hanya merupakan fase untuk

mempertahankan diri dari kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan (Alexander, 1978). Dengan dimilikinya endospora oleh bakteri anggota genus *Bacillus* menyebabkan bakteri-bakteri tersebut dapat resisten dan bertahan hidup pada kondisi lingkungan yang beraneka ragam selama bertahun-tahun (Hadioetomo, 1985).

Endospora bakteri terbentuk secara intraseluler, bersifat sangat membias cahaya, mempunyai masa dormansi yang lama, tahan terhadap panas, kering, radiasi, dan suasana asam. Bentuk, ukuran serta posisi endospora pada sporangiumnya berbeda-beda pada masing-masing jenis bakteri. Bentuk endospora adalah bulat atau bulat lonjong. Posisi endospora pada sporangiumnya ada yang terminal, sub terminal, atau sentral. Variasi bentuk, ukuran dan posisi endospora sering dijumpai pada beberapa jenis bakteri. Bentuk sporangium pada bakteri anggota genus *Bacillus* biasanya seperti sel vegetatifnya, akan tetapi kadang-kadang endosporanya mempunyai diameter sangat besar sehingga sporangium nampak membengkak (swollen). Adanya letak serta ukuran endospora yang bervariasi sangat bermanfaat di dalam pencirian dan identifikasi bakteri (Jutono, 1972).

Struktur spora yang matang (mature) dapat diamati dengan mikroskop elektron, strukturnya berbeda dengan struktur sel vegetatif juga berbeda dalam fisiologi dan biokimianya. Dinding spora terdiri atas beberapa lapis membran.

Analisa kimia spora bakteri menunjukkan adanya asam dipikolinat dengan kadar 5-10 % dari berat kering spora. Dan asam ini tidak terdapat pada sel-sel vegetatif. Disamping itu juga terdapat sejumlah besar kalsium (Ca) (Frobisher, 1962).

Para ahli mikrobiologi telah menghubungkan resistensi spora dengan selubungnya yang impermeabel, yang pada akhirnya berkaitan dengan kompleks asam dipikolinat-kalsium-peptidoglikan.

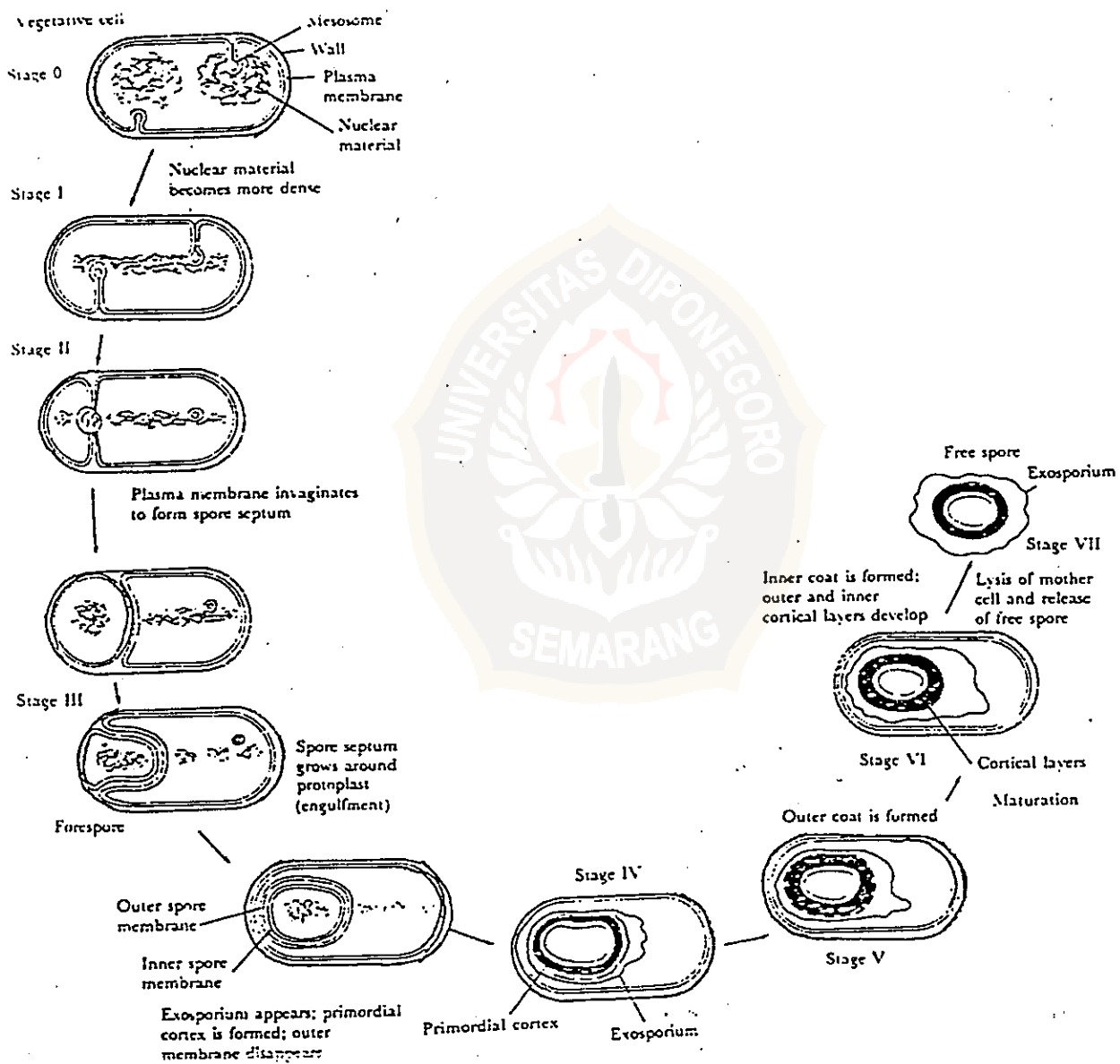
Tingkatan-tingkatan pembentukan endospora adalah sebagai berikut : (Gambar 01)

- I. Material inti menjadi pekat.
 - II. Membran plasma memmbentuk invaginasi dan selanjutnya membentuk sekat calon endospora.
 - III. Dinding endospora terbentuk mengelilingi protoplas.
 - IV. Setelah membran dalam dan luar endospora terbentuk, dilanjutkan pembentukan kortek dan selubung endospora luar.
 - V. Selubung endospora luar telah terbentuk.
 - VI. Kortek endospora telah masak dan endospora dalam kondisi yang telah masak.
 - VII. Sel vegetatif lisis dan endospora terbebaskan.
- (Frobisher, 1962).

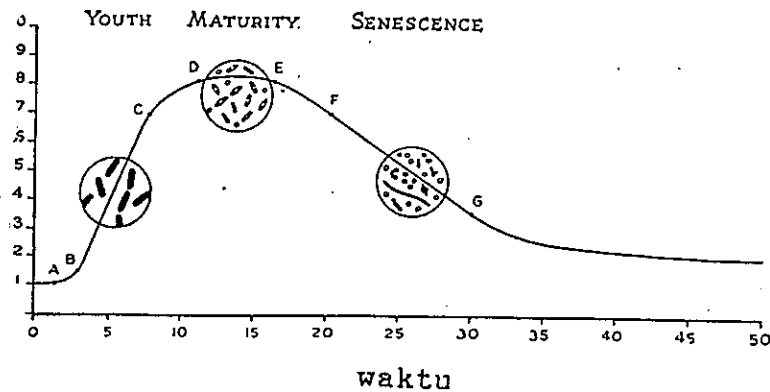
Sporulasi tidak terjadi selama pertumbuhan eksponential, tetapi hanya pada saat pertumbuhan terhenti dimana telah kehabisan satu atau lebih nutrien yang

essensial, penimbunan zat-zat beracun secara terus menerus atau kondisi tidak baik untuk pertumbuhan dan perbanyakan sel (Kelly, 1974).

Gambar 01. Tingkatan - tingkatan Pembentukan Endospora.
(Frobisher, 1962).



Gambar 02. Kurva Pertumbuhan Bakteri Yang Memperlihatkan Perubahan Morfologi Pada Bakteri Pembentuk Endospora. (Kelly, 1974).



Keterangan :

1-A = Fase lag

A-B = Periode pertumbuhan dipercepat

B-C = Kecepatan pembelahan maksimum (fase logaritma)

C-D = Periode pertumbuhan yang mulai terhambat (kecepatan pembelahan menurun).

D-E = Fase stationer.

E-F = Periode kematian yang dipercepat.

F-G = Periode kecepatan kematian yang maksimum.

Perkecambahan endospora merupakan proses yang kompleks. Secara sederhana prosesnya terdiri dari tiga tahap, yaitu : aktivasi, inisiasi dan pertumbuhan sel vegetatif awal. Perkecambahan endospora diawali dengan hilangnya sifat bias disertai dengan imbibisi air. Untuk perkecambahan seluruh genus *Bacillus* memerlukan oksigen atau dalam keadaan aerob, selain dibutuhkan air. Setelah itu kulit endospora pecah dan sel anakan yang baru akan

muncul sebagai sel vegetatif yang aktif.

Perkecambahan endospora bisa terjadi di berbagai tempat yang sesuai, di mana tersedia nutrisi yang cukup untuk pertumbuhannya.

Kebanyakan bakteri anggota genus *Bacillus* menunjukkan sistem enzim pada endosporanya, baik endoenzim maupun eksoenzim. Jenis-jenis bakteri tersebut dapat bertahan hidup pada berbagai macam substrat karena memiliki eksoenzim yang berfungsi untuk mereduksi senyawa-senyawa kompleks menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana sehingga dapat dimanfaatkan untuk pertumbuhannya (Hadioetomo, 1985).

C. Potensi Genus *Bacillus* Sebagai Bakteri Penghasil Enzim Amlase.

Produksi enzim tercatat dihasilkan dari berbagai macam bakteri, tetapi aplikasinya dalam lapangan industri belum secara seksama ditemukan. Bakteri dapat memproduksi beberapa enzim termasuk yang dapat menghidrolisis karbohidrat, lipid, dan substansi kompleks lainnya. Langkah awal dalam produksi enzim adalah menjamin kultur bakteri tumbuh secara melimpah dan menghasilkan enzim yang diinginkan. Kondisi kultur, seperti komposisi medium, pH, penggunaan media dan alat secara steril, temperatur; penggunaan aerasi dan faktor lain yang bekerja harus dikontrol dengan baik (Presscot, 1959).

Enzim komersial yang digunakan dalam industri

diproduksi oleh genus tertentu dari mikrobia fungi, bakteri, atau yeast. Alasan menggunakan mikrobia sebagai sumber enzim karena :

1. Enzim dari mikrobia dapat ditingkatkan dengan cara memanipulasi lingkungan dan genetik mikrobiannya.
2. Dalam skala besar fermentasi enzim sangat ekonomis sebab siklus dalam fermentasi yang pendek dan biaya media yang murah.
3. Spesies yang berbeda akan menghasilkan enzim yang berbeda, sesuai dengan kondisi yang diinginkan dalam reaktor (Wang *et al.*, 1979).

Tiap strain mikrobia memproduksi sejumlah besar enzim yang berfungsi dalam menghidrolisis material nutrien dan dalam reaksi metabolisme. Tetapi jumlah sebenarnya enzim yang diproduksi oleh individu sangat bervariasi antara spesies yang satu dengan spesies yang lainnya, dan juga antara strain yang berbeda pada spesies yang sama. Karenanya strain-strain diseleksi untuk produksi enzim tertentu secara komersial yang mempunyai kemampuan produksi paling tinggi seperti yang diinginkan. Proses penyaringan (Screening) meliputi dalam seleksi kultur yang asli untuk produksi enzim dan penemuan strain-strain yang baru yang mempunyai potensi lebih tinggi. Untuk penyaringan kultur diperoleh dari koleksi kultur standar dan diisolasi dari alam, biasanya dari sumber yang kaya materi substrat tergantung dari mana enzim yang diinginkan

itu aktif (Reed and Underkofler, 1966). Sebagai contoh, bakteri pembentuk endospora yaitu Bacillus sp dan Clostridium sp sering ditemukan dari tanah, bakteri asam laktat sering ditemukan pada susu, bakteri asam asetat sering ditemukan pada sari buah, dan sebagainya (Fardiaz Srikandi, 1988).

Dalam tanah dekomposisi amilum sangat cepat, oleh adanya aktivitas mikrobial tanah. Proses dekomposisi ini lebih cepat dibanding dengan dekomposisi secara mikrobiologi pada selulosa, hemiselulosa dan polisakarida lainnya. Bakteri, fungi, dan actinomycetes mempunyai kemampuan menghidrolisis amilum. Dalam tanah mengandung penghidrolisis amilum berkisar antara $10^5 - 10^7$ atau lebih sel tiap gram tanah. Dan bakteri ini banyak terdapat di daerah perakaran, tanaman atau tempat yang banyak terakumulasi amilum (Alexander, 1961).

Jenis-jenis bakteri dari genus Bacillus merupakan salah satu jenis bakteri tanah yang jumlahnya cukup melimpah. Kelimpahan jenis-jenis bakteri tersebut di tanah dapat berkisar antara $10^6 - 10^7$ sel tiap gram tanah (Edmons, 1978).

Tanah tempat pembuangan limbah tapioka masih banyak terakumulasi amilum, karena dari proses pembuatan tapioka, dapat dihasilkan $\pm 20\%$ dari berat bahan bakunya dan sisanya merupakan limbah, baik limbah cair maupun padat (Winarno, 1989).

Dalam seleksi pertama dapat dideteksi dan diisolasi mikrobia yang potensial digunakan dalam industri. Uji-uji untuk seleksi pertama harus bersifat cepat, spesifik, murah, mudah dan efektif. Supaya efektif, seleksi pertama terdiri dari beberapa tahap untuk menghilangkan mikrobia yang tidak dikehendaki dan sekaligus dapat mendeteksi dengan mudah mikrobia yang diinginkan, meskipun jumlahnya mungkin kecil sekali dibandingkan dengan populasi mikrobia. Seleksi mikrobia dapat dilakukan pada cawan agar, yaitu dengan cara menyebarkan suspensi mikrobia pada cawan agar dengan indikator tertentu. Untuk menyeleksi mikrobia yang memproduksi enzim amilase diketahui dari hidrolisis pati terlarut menggunakan larutan yodium (Fardiaz Srikandi, 1988).

Koloni-koloni yang terseleksi kemudian diamati koloni yang menunjukkan daerah aksi yang terbesar di atas substrat. Secara morfologis, biakan maupun sel bakteri yang berbeda dapat tampak serupa. Karena itu ciri fisiologis atau biokimiawi merupakan kriteria yang amat penting di dalam identifikasi spesimen yang tak dikenal. Beberapa macam uji fisiologis yang mungkin dilakukan merupakan reaksi enzimatik yang berkaitan dengan respirasi dan fermentasi, misal uji fermentasi gula dalam tabung Durham, fermentasi asam campuran (uji merah metil), fermentasi butandiol (uji Voges Proskauer), produksi katalase, dan reduksi nitrat. Juga reaksi hidrolisis yang

disebabkan oleh enzim-enzim ekstraseluler, misal uji hidrolisis pati, hidrolisis triptofan (uji indol), hidrolisis kasein dan uji-uji lain yang seringkali digunakan dalam identifikasi bakteri (Hadioetomo, 1985). Strain- strain yang terseleksi ditumbuhkan sebagai kultur murni dalam laboratorium. Dalam seleksi ini juga mungkin dapat diketahui karakteristik pertumbuhan dan kebutuhan lainnya yang penting untuk diketahui. Dari seleksi ini mungkin dapat diketahui jenis mikrobia yang diisolasi, sehingga dapat diketahui apakah mikroba yang kita isolasi merupakan galur baru atau pernah diisolasi sebelumnya. Dan seleksi lebih lanjut dengan perlakuan terhadap enzim yang diproduksi (Fardiaz Srikandi, 1988).

Hanya sejumlah kecil enzim mikrobial yang telah diakui sebagai enzim yang benar-benar komersial. Sumber enzim yang baik harus dicari dari mikrobial yang diseleksi dengan baik. Seringkali standard deskripsi taxonomi bakteri dengan menggunakan Bergey's manual Of Determinative Bacteriology atau literatur baku lain yang dapat menuntun identifikasi organisme dengan tepat (Reed and Underkofler, 1966).

α -amilase dihasilkan oleh beberapa bakteri dan fungi telah banyak diproduksi secara komersial. Beberapa bakteri yang memproduksi α -amilase antara lain : Bacillus subtilis, B. cereus, B. amyloliquefaciens, B. coagulans, B. polymixa, B. stearothermophilus, B. aldolyticus, B.

caldolyticus, B. acidocaldarius, B. subtilis var amylo-
saccharaticus, B. licheniformis, Lactobacillus, Micrococ-
cus, Pseudomonas, Arthrobacter, Escherichia, Proteus,
Pseudomonas, Thermomonospora, dan Serratia.

α -amilase yang terpenting dihasilkan oleh Bacillus
amyloliquefaciens, Bacillus licheniformis, Aspergillus
oryzae. Amilase dari Bacillus sp lebih banyak digunakan
dari pada amilase dari Aspergillus sp.

β -amilase biasanya diperoleh dari tumbuh-tumbuhan
tetapi ada beberapa bakteri yang dapat memproduksinya,
antara lain : Bacillus polymyxa, B. cereus, B. megaterium,
Streptomyces sp., Pseudomonas, Rhizopus japonicus, walaupun
hasil dari strain ini rendah. Akan tetapi β -amilase
bakteri mempunyai resisten panas yang tinggi (Yamamoto,
1982)

