

A THERMOPHILIC MICROBE PRODUCING DEXTRANASE FROM HEATED SUGAR CANE

Mikroba Termofil Penghasil Dekstranase dari Nira Panas

Afaf Baktir*, Zumrotul Koiriyah and Ali Rohman

Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences
University of Airlangga, Surabaya

Received 25 February 2005; Accepted 15 April 2005

ABSTRACT

A thermophilic aerobic microorganism designated NP4, was isolated from the heated sugar cane. It grew on dextran, and produced a thermoactive extracellular dextranase. Screening and isolation was done by assay of dextranase activity semi quantitatively on solid medium containing blue dextran. It provided several colonies with different morphology exhibited decolourized zones around, on culture plates containing blue dextran 2000^R. The screening resulted in isolation of one microbe which efficiently assimilate dextran as carbon source. Dextranase production from the choised strain in liquid medium was conducted at room temperature for 8 hours with shaking speed of 125 rpm. The dextranase enzyme showed optimum pH of 8 and optimum temperature of 60 °C.

Keywords: thermophilic aerobic, sugar cane, dextranase activity.

PENDAHULUAN

Dekstran adalah polimer glukosa dengan ikatan α -1,6 (95%) dan pada percabangan berikatan α -1,3 dan α -1,4 (5%) [1]. Di industri gula tebu, dekstran biasanya banyak ditemukan pada tebu yang terlambat giling atau penanganan pasca panen yang kurang baik. Kadar dekstran yang tinggi dalam nira tebu (cairan perasaan tebu) dapat mengganggu proses pembuatan gula terutama pada proses pengkristalan dan pemisahan gula. Dekstran terbentuk karena adanya aktivitas mikroorganisme *Leuconostoc mesenteroides* dan beberapa *Lactobacillus sp.*

Keberadaan dekstran mengakibatkan kerugian besar karena menurunkan efisiensi produksi gula dan kualitas akhir gula [1]. Dekstran yang terbentuk juga dapat menyebabkan hambatan proses pemurnian nira, peningkatan viskositas nira sehingga dapat menurunkan kemampuan pabrik memproses nira, dan terjadinya penurunan laju kristalisasi sukrosa. Enzim dekstranase telah dilaporkan secara nyata menurunkan viskositas nira dan kadar dekstran dalam nira pekat [2].

Selama proses produksi gula, terdapat beberapa tahap proses yang melibatkan panas, sehingga suhu nira dapat mencapai 50-70 °C. Agar proses hidrolisis dekstran berjalan secara efisien, maka enzim dekstranase yang digunakan

seharusnya enzim termooaktif. Oleh karena itu perlu dilakukan penapisan mikroba penghasil dekstranase dari sumber panas.

Pada bidang kedokteran, dekstranase juga digunakan untuk menghidrolisis dekstran yang secara alami ada di dalam substitusi plasma darah. Di samping itu dekstranase merupakan bahan campuran pasta gigi untuk mencegah dan mengobati plak gigi, sehingga karies gigi dapat dihindari [3]. Enzim dekstranase merupakan produk yang mempunyai nilai komersil tinggi. Enzim dekstranase ini masih merupakan produk impor, maka diperlukan usaha produksi dekstranase di dalam negeri.

Dalam nira terdapat dekstran terlarut, maka dapat diperkirakan ada mikroba pengguna dan penghidrolisis dekstran yang tumbuh di dalamnya. Mikroba-mikroba ini diharapkan menghasilkan enzim dekstranase. Enzim dekstranase yang dihasilkan diharapkan memiliki suhu optimum lebih tinggi daripada suhu optimum dekstranase yang diisolasi dari tanah.

METODE PENELITIAN

Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah nira panas yang diperoleh dari PG Gempolkrep, Mojokerto. Suhu dan pH nira diukur *in situ* selama *sampling*.

* Corresponding author.

Email address : afafi@yahoo.com

Seleksi Mikroba Penghasil Dekstranase

Dilakukan penapisan mikroba penghasil dekstranase dari sampel sesuai dengan metode Okushima [4]. Sejumlah 250 ml media skrining steril mengandung dekstran 0,2 % ditambahkan 6 mL sampel nira, diinkubasi pada suhu 30 °C selama 3 hari, kemudian 6 mL biakan ditumbuhkan ke media steril baru. Proses ini diulang sebanyak 6 kali. Pada setiap pengulangan, dilakukan uji aktivitas dekstranase secara kualitatif. Pada pengulangan terakhir, biakan cair ditanam pada media skrining padat mengandung dekstran biru, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Dilakukan pengamatan adanya *halo* di sekitar koloni. Percobaan penapisan ini juga dilakukan pada suhu 50 °C.

Koloni yang memberikan *halo* di sekitarnya pada prosedur penapisan yang telah diuraikan dipindahkan ke media agar miring.

Kultivasi Mikroba Terpilih

Biakan mikroba yang menunjukkan daerah *halo* terbesar dikultivasi sesuai metode sebelumnya [5].

Produksi Enzim Dekstranase

Inokulum sebanyak 2 mL ditambahkan ke dalam 200 mL media produksi dengan komposisi seperti pada penelitian sebelumnya [6], diinkubasi pada suhu 30 °C dengan penggojokan 125 rpm selama 14 jam. Setiap 2 jam dilakukan sampling biakan untuk uji aktivitas dekstranase secara kuantitatif. Kemudian dibuat kurva aktivitas dekstranase versus waktu, untuk menentukan waktu panen enzim dekstranase. Percobaan yang serupa diulang untuk produksi enzim dekstranase.

Penentuan Aktivitas Enzim Dekstranase

Penentuan aktivitas enzim dekstranase dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif. Cara kualitatif sebagai berikut. Biakan cair 15 µL dimasukkan ke dalam sumuran pada media skrining padat yang mengandung dekstran biru secara aseptis, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Kemudian diamati pembentukan *halo* (daerah tidak berwarna pada media skrining padat yang mengandung dekstran biru 2000) di sekitar sumuran.

Pada penentuan aktivitas enzim dekstranase secara kuantitatif, sampel berupa ekstrak enzim dekstranase 100 µL dalam tabung bertutup 1,5 mL ditambahkan 100 µL larutan dekstran 10 % dan 100 µL bufer sitrat-fosfat 40 mM pH optimum enzim, campuran diinkubasi pada optimum enzim selama 30 menit. Blanko dekstranase dibuat dengan prosedur yang sama tetapi dekstranase dalam

tabung bertutup terlebih dahulu dihentikan aktivitasnya dengan pemanasan 100 °C selama 10 menit.

Reaksi dihentikan dengan pemanasan 100 °C selama 10 menit. Gula pereduksi yang terbentuk ditentukan dengan metode Somogyi-Nelson. Satu unit aktivitas dekstranase didefinisikan sebagai jumlah enzim dekstranase yang membebaskan 1 µg/ml gula pereduksi yang dihitung sebagai glukosa per menit pada kondisi percobaan.

Karakterisasi Enzim Dekstranase

Nilai pH optimum ditentukan dengan cara mengukur aktivitas dekstranase contoh terhadap substrat dekstran, pada variasi pH 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 dan 9,0 menggunakan bufer fosfat sitrat 40 mM dan buffer fosfat 40 mM, pada suhu 40 °C selama 30 menit. Gula pereduksi yang terbentuk ditentukan dengan metode Somogyi-Nelson [7]. Percobaan ini dilakukan secara triplo.

Suhu optimum ditentukan dengan cara mengukur aktivitas dekstranase contoh terhadap substrat dekstran, pada pH optimum menggunakan bufer fosfat sitrat 40 mM, pada variasi suhu 40, 50, 60, 70, dan 80 °C selama 30 menit. Gula pereduksi yang terbentuk ditentukan dengan metode Somogyi-Nelson [7]. Percobaan ini dilakukan secara triplo.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penapisan mikroba penghasil enzim dekstranase dari sumber nira panas, yang menggunakan kondisi inkubasi suhu 50°C, memberikan hasil negatif. Biakan cair yang diperoleh pada kondisi ini, tidak memberikan *halo* di sekitar sumuran pada media skrining padat yang mengandung dekstran biru.

Prosedur penapisan dengan menggunakan suhu kamar memberikan hasil positif, ditunjukkan oleh pembentukan *halo* di sekitar sumuran pada media skrining padat yang mengandung dekstran biru. Hasil uji dekstranase secara kualitatif terdapat pada Gambar 1.

Biakan nira panas yang menunjukkan uji *halo* positif digoreskan pada media skrining padat steril, dihasilkan 13 koloni yang menunjukkan *halo* positif (Gambar 2). Di antara 13 koloni yang diperoleh, terdapat sebuah koloni yang memberikan diameter *halo* terbesar, yaitu koloni nomor 4 pada gambar 2B. Koloni nomor 4 dipilih untuk produksi dan karakterisasi enzim dekstranase.

Pertumbuhan Mikroba

Kurva pertumbuhan isolat nomor 4 dari nira panas (isolat NP4) tidak menunjukkan fase adaptasi (Gambar 3). Fase adaptasi tidak terjadi karena

mikroba sudah beradaptasi dengan medium yang digunakan sebelumnya pada prosedur penapisan.

Produksi Enzim Dekstranase

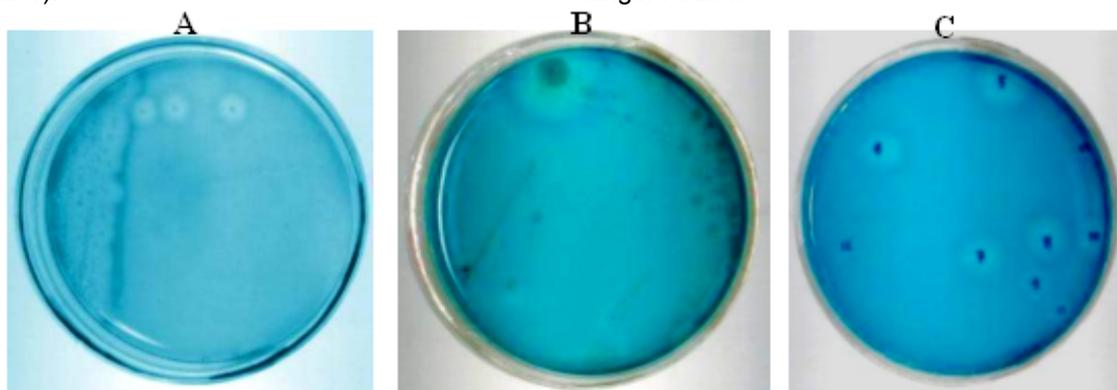
Data aktivitas dekstranase pada biakan cair selama produksi dekstranase terdapat pada Gambar 4. Pada produksi enzim dekstranase untuk tujuan karakterisasi, waktu panen biakan adalah jam ke 8, sesuai data pada Gambar 4. Supernatan dari biakan yang dipanen merupakan ekstrak dekstranase dengan aktivitas $13,97 \times 10^{-3} \text{ U}$.

Karakter Enzim Dekstranase

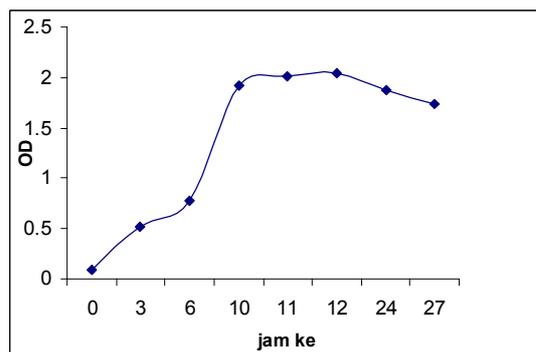
Enzim dekstranase yang dihasilkan oleh isolat NP4 aktif pada kisaran pH yang sempit, yaitu 7,5-8,5 dengan pH optimum 8. Pada $\text{pH} < 7,5$ dan $> 8,5$ enzim ini hampir tidak menunjukkan aktivitas (Gambar 1).



Gambar 1 Hasil uji aktivitas dekstranase secara kualitatif pada nira panas. A: Blanko nira panas, 1: Nira panas dengan inkubasi suhu 30°C , 2&3: Nira panas dengan inkubasi suhu 50°C , 4&5: Nira dingin I dan II

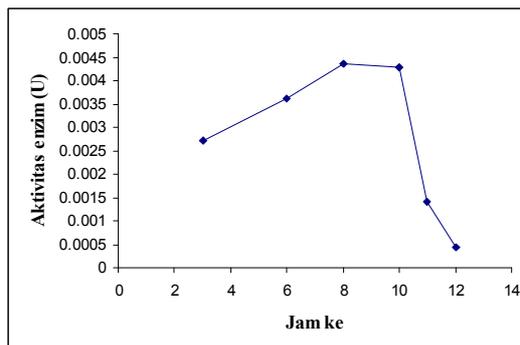


Gambar 2 Hasil penapisan mikroba penghasil dekstranase dari nira panas. Koloni 1,2 dan 3 (gambar A), koloni 4 (gambar B) dan koloni 5-13 (gambar C)



Gambar 3 Kurva pertumbuhan mikroba penghasil dekstranase dari nira panas

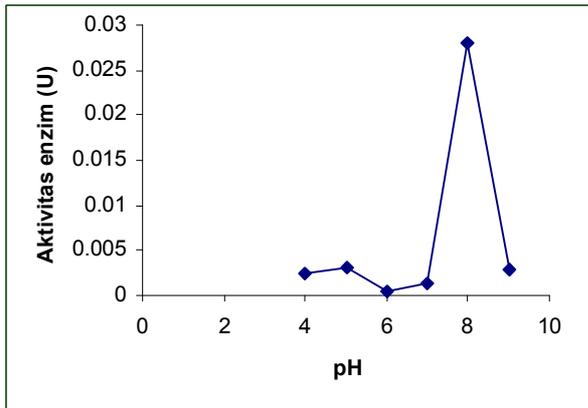
Berdasarkan karakter pH optimum, enzim ini masih dapat dipakai sebagai penghidrolisis dekstran dalam nira yang memiliki pH 7,5. Data pH nira ini diperoleh dari pengukuran *in situ* ketika pengambilan sampel. Namun apabila pH nira $< 7,5$ atau $> 8,5$, maka sebelum perlakuan dengan enzim dekstranase, pH nira perlu disesuaikan terlebih dahulu dengan penambahan asam atau basa.



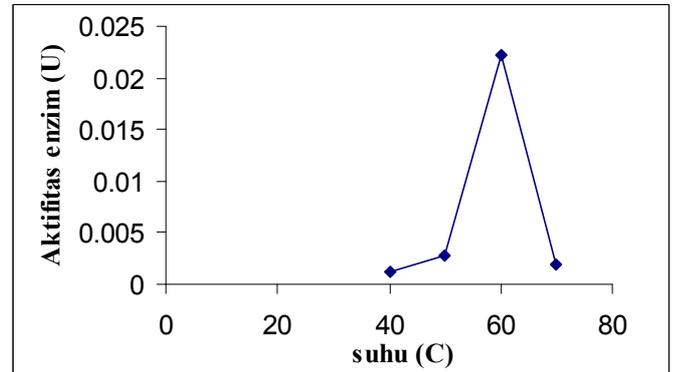
Gambar 4 Aktivitas enzim dekstranase pada biakan NP4

Suhu optimum enzim dekstranase NP4 adalah 60°C (Gambar 6). Enzim ini tergolong enzim termostabil, dihasilkan oleh mikroba termofil yang hidup dalam nira bersuhu $55-60^\circ\text{C}$. Mikroba termofil adalah organisme yang hidup pada suhu di atas 45°C [8].

Selama bertahun-tahun telah terjadi ledakan minat terhadap mikroba termofil, yang menjadi pusat



Gambar 5 Aktivitas enzim dekstranase dari isolat NP4 pada berbagai pH. pH optimum tercapai pada nilai pH 8



Gambar 6 Aktivitas enzim dekstranase dari isolat NP4 pada berbagai suhu. Suhu optimum tercapai pada 60 °C

perhatian sebagai kajian ilmu dasar maupun kajian terapannya. Penerapan mikroba termofil dalam bioteknologi sangat luas, yaitu sebagai sumber enzim unik dengan sifat tahan suhu tinggi. Contoh penerapan enzim termostabil adalah sebagai katalis dalam reaksi bersuhu tinggi. Pemakaian enzim termostabil juga bermanfaat untuk penghematan biaya produksi, peningkatan laju transfer massa akibat penurunan viskositas dan penekanan resiko kontaminan [8]. Sebagai upaya menghilangkan kontaminan dekstran dalam nira, enzim dekstranase dapat ditambahkan dalam nira yang masih panas maupun yang sudah dingin. Penambahan enzim dekstranase ke dalam nira yang masih panas memberikan beberapa keuntungan, yaitu: viskositas nira yang tinggi tidak terjadi, laju transfer nira cepat, dan reaksi hidrolisis dekstran berlangsung lebih cepat. Oleh karena enzim dekstranase pada penelitian ini diproduksi dari mikroba yang hidup dalam nira panas. Wynter *et al.* berhasil menemukan enzim dekstranase termostabil dengan suhu optimum 70 °C dari sumber air panas *The Great Artesian Basin of Australia* [9].

KESIMPULAN

Diperoleh 13 koloni mikroba dengan morfologi berbeda penghasil enzim dekstranase dari nira panas. Isolat NP4 sebagai koloni terpilih, menghasilkan enzim dekstranase yang menunjukkan karakter pH optimum 8 dan suhu optimum 60 °C.

DAFTAR PUSTAKA

1. Gale, A. and Inkerman, P.A., 1993, *Int. Sugar J.*, 95 (1136), 309 – 313.
2. Safarik, I., and Safarikovat, M., 1992, *Biotech. Ap. Biochem.*, 16, 263 –268.
3. El-Masry, H.G., 1991, *Zentralbl Microbio.*, 146, 185 –192.
4. Okushima, M., 1991, *J. Genet.*, 66, 173 – 187.
5. Baktir, A and Murdiyatmo, U., 2003, *Jurnal Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam*, 8, 45-50
6. Murdiyatmo, U, Laksmi, A. Wiwik E.W. and Laksmi, H, 1994, *Dekstranase bakterial : Produksi dan Penggunaannya di Pabrik Gula*. Prosiding Seminar Hasil Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi II, Cibinong.
7. Nelson, N., 1944, *J. Bio. Chem.* 153: 375-381.
8. Lestari, P., 1999, Eksplorasi Enzim Termostabil dari Mikrob Termofil, *Hayati* 7, 21-25
9. Wynter, C, Patel, B.K.C, Bain, P, de Jersey, J., Hamilton, S., and Inkerman, P.A., 1996, *FEMS Microb. Lett.*, 140, 271 –276