

- GLUKOSA
- STREPTOMYCES

IR-Perpustakaan Universitas Airlangga

1000
1000

547.7813
opt
1

DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA

OPTIMALISASI PRODUKSI GLUKOSA ISOMERASE DARI *Streptomyces griseus*

Ketua Peneliti :

PURKAN, S.Si.

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

3000364983141



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh : Dana Rutin Unair 1997/1998

SK.Rektor Nomor : 5935/J03/PL/1997

Nomor : 56

SELESAI
Purkan

**DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
DIREKTORAT JENDRAL PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

**OPTIMALISASI PRODUKSI GLUKOSA ISOMERASE
DARI *Streptomyces griseus***

Peneliti :

**Purkan, S.Si
Drs. Sofijan Hadi
Dra. Aning Purwaningsih
Dra. Sri Sumarsih
Abdulloh, S.Si**

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

3000 36498 3141



**LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
Dibiayai Oleh : Dana Rutin Unair 1997/1998
SK Rektor Nomor : 5935/J03/PL/1997
Nomor : 56**



DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
PERPUSTAKAAN Universitas Airlangga
UNIVERSITAS AIRLANGGA
LEMBAGA PENELITIAN

- | | | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|--|
| 1. Puslit Pembangunan Regional | 5. Puslit Pengembangan Gizi (5995720) | 9. Puslit Kependudukan dan Pembangunan (5995719) |
| 2. Puslit Obat Tradisional | 6. Puslit/Studi Wanita (5995722) | |
| 3. Puslit Pengembangan Hukum | 7. Puslit Olahraga | 10. Puslit / Kesehatan Reproduksi |
| 4. Puslit Lingkungan Hidup (5995718) | 8. Puslit Bioenergi | |

Kampus C, Jl. Mulyorejo Telp. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Fax. (031) 5995246, Surabaya 60115

IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN
=====

1. a. Judul Penelitian : Optimalisasi Produksi Glukosa Isomerase Dari *Streptomyces Griscus*
- b. Macam Penelitian : (V) Fundamental, () Terapan, () Pengembangan
() Institusional
- c. Katogori Penelitian : () I (V) II () III () IV
2. Kepala Proyek Penelitian
- a. Nama Lengkap Dengan Gelar : Purkan, S.Si.
- b. Jenis Kelamin : Laki-Laki
- c. Pangkat/Golongan dan NIP : Penata Muda/IIIa/132 161 176
- d. Jabatan Sekarang : Staf Pengajar
- e. Fakultas/Puslit/Jurusan : MIPA/Kimia
- f. Univ./Inst./Akademi : Universitas Airlangga
- g. Bidang Ilmu Yang Diteliti : Biokimia
3. Jumlah Tim Peneliti : 5 (lima) orang
4. Lokasi Penelitian : Fakultas MIPA Unair
5. Kerjasama dengan Instansi Lain
- a. Nama Instansi :
- b. A l a m a t :
6. Jangka Waktu Penelitian : 4 (empat) bulan
7. Biaya Yang Diperlukan : Rp 3.000.000,00
8. Seminar Hasil Penelitian
- a. Dilaksanakan Tanggal : 15 April 1998
- b. Hasil Penilaian : () Baik Sekali () Baik
(V) S e d a n g () K u r a n g

Surabaya, 15 April 1998

Mengetahui/ Mengesahkan :
a.n. Rektor
Ketua Lembaga Penelitian,

Prof. Dr. Noor Cholies Zaini
NIP. 130 355 372



KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah memberi rahmad-Nya, sehingga penelitian kami yang berjudul "Optimalisasi Produksi Glukosa Isomerase Dari *Streptomyces griseus*" dapat diselesaikan.

Kami menyampaikan terima kasih kepada :

1. Ketua Lembaga Penelitian Universitas, Airlangga yang telah memberi kesempatan dan fasilitas penelitian.
2. Dekan FMIPA Universitas Airlangga, yang telah memberi kesempatan dan fasilitas penelitian.
3. Kepala Laboratorium Kimia Organik dan Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Airlangga.
4. Semua pihak yang telah membantu kelancaran penelitian.

Semoga penelitian ini dapat memberikan manfaat.

Surabaya, Januari 1998

Peneliti

RINGKASAN

: Optimalisasi Produksi Glukosa Isomerase Dari
Streptomyces griseus.

: Purkan, S.Si
: Drs. Sofijan Hadi
Dra. Aning Purwaningsih
Dra. Sri Sumarsih
Abdulloh, S.Si

: FMIPA
: Dana Rutin Universitas Airlangga
SK Rektor Nomor : 5935/j03/PL/1997
Tanggal : 1 Oktober 1997

Pemakaian enzim untuk proses produksi fruktosa akhir-akhir ini sangat disukai. Hal ini disebabkan keunggulan enzim dibanding dengan katalis lainnya, terutama dalam hal spesifitas dan kondisi reaksinya yang lunak. Di industri produksi fruktosa dilakukan melalui dua tahap reaksi. Pertama biokonversi pati menjadi glukosa dan yang kedua tahap isomerisasi glukosa menjadi fruktosa oleh glukosa isomerase. Dalam hal ini ketersediaan enzim-enzim yang terlibat sangat membantu kelangsungan produksi. Ada beberapa mikroba penghasil glukosa isomerase, diantaranya : *Streptomyces*, *Lactobacillus* dan *E. coli*.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan profil produktivitas glukosa isomerase dari *Streptomyces griseus* yang diinduksi dengan inducer glukosa-xylosa, menentukan komposisi inducer glukosa-xylosa dan waktu fermentasi optimum selama fermentasi *Streptomyces griseus*.

Hal ini dilakukan dengan membuat enam media fermentasi yang berbeda-beda dalam hal komposisi kadar glukosa dan xylosa sebagai inducer glukosa isomerase dari *Streptomyces griseus*. Kemudian media-media ini ditanami mikroba dan difermentasi dengan waktu yang bervariasi. selanjutnya pada tiap-tiap waktu tertentu, kadar fruktosa yang dihasilkan oleh masing-masing media ditentukan untuk diketahui produktivitas glukosa isomerasinya. Kadar fruktosa ditentukan dengan metode sistein-karbazol pada $\lambda_{565 \text{ nm}}$. Kemudian masing-masing hasil dibandingkan untuk diketahui inducer yang terbaik dalam menghasilkan glukosa isomerase dari *Streptomyces griseus*. Selanjutnya sel *Streptomyces griseus* yang dihasilkan oleh inducer yang terbaik, diuji aktivitasnya dengan cara : mengkontakkan 0,25 gram sel basah dengan 4 ml substrat D-glukosa pada suhu 65 °C. Uji aktivitas ini dimaksudkan untuk menentukan waktu optimum produksi glukosa isomerase dari *Streptomyces griseus*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa (1) profil produktivitas glukosa isomerase yang dihasilkan oleh *Streptomyces griseus* pada media yang mengandung inducer xylosa saja, campuran glukosa-xylosa ataupun glukosa saja berbeda-beda pada

tiap-tiap waktu fermentasi, (2) Dibandingkan campuran induser glukosa-xylosa ataupun glukosa saja, induser xylosa lebih meningkatkan produktivitas glukosa isomerase dalam fermentasi *Streptomyces griseus* dan (3) Waktu optimum produksi glukosa isomerase dari *Streptomyces griseus* dicapai pada jam ke 28.

Disarankan agar meneliti konsentrasi optimum dari induser xylosa yang telah dilaporkan sebagai induser terbaik dalam meningkatkan produktivitas glukosa isomerase dari *Streptomyces griseus*, sehingga produksi enzim tersebut menjadi optimum. Di samping itu perlu dilakukan optimasi terhadap pH dan suhu selama produksi enzim tersebut.

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	i
RINGKASAN PENELITIAN	ii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah	2
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.4. Manfaat Penelitian	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. <i>Streptomyces griseus</i>	4
2.2. Pertumbuhan Mikroorganisme	6
2.3. Produksi Enzim Industri	8
2.4. Glukosa Isomerase	10
2.5. Fruktosa	11
2.6. Mekanisme Reaksi Enzim Glukosa Isomerase	14
2.7. Pengendalian Sintesis Enzim	17
BAB III. METODE PENELITIAN	21
3.1. Sambil, Bahan dan Peralatan	21
3.1.1. Sampel	21

3.1.2. Bahan kimia	21
3.1.3. Alat-alat	21
3.2. Prosedur Penelitian	21
3.2.1. Penyiapan medium padat	21
3.2.2. Penyiapan medium cair	22
3.2.3. Menanam biakan murni pada medium padat	22
3.2.4. Pembuatan inokulum	22
3.2.5. Penentuan komposisi induseri optimum untuk produksi glukosa isomerase dari sel <i>Streptomyces griseus</i>	23
3.2.6. Uji aktivitas enzim glukosa isomerase di dalam sel	23
3.2.7. Penentuan kadar fruktosa	24
BAB IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	25
4.1. Hasil Fermentasi <i>Streptomyces griseus</i>	25
4.2. Komposisi Induser Optimum Untuk Produksi Glukosa Isomerase dari Sel <i>Streptomyces griseus</i>	27
4.3. Aktivitas Glukosa Isomer ase di dalam sel <i>Streptomyces griseus</i>	31
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	35
5.1. Kesimpulan	35
5.2. Saran	35
DAFTAR PUSTAKA	37
LAMPIRAN	39

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1. Kemanisan relatif dari beberapa monosakarida dan disakarida	12

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
• Lampiran 1. Komposisi media fermentasi	38
Lampiran 2. Hasil penentuan kurva standart fruktosa	39
Lampiran 3. Cara Perhitungan Produktivitas Glukosa Isomerase Oleh <i>Streptomyces griseus</i>	41

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Biokonversi senyawa kimia menjadi produk bernilai ekonomi tinggi sangat diperlukan bagi perkembangan bioteknologi. Dalam proses biokonversi, enzim memegang peranan penting dalam mengkatalisis reaksi biokonversi tersebut.

Enzim merupakan protein yang berperan sebagai biokatalis reaksi-reaksi kimia dalam makhluk hidup. Kelebihan enzim sebagai biokatalis dibanding katalis kimia lainnya adalah enzim bekerja sangat spesifik dan keberadaannya dapat diregulasi secara genetik maupun non genetik. Secara genetik, enzim diregulasi oleh gen pengendali yang mengandung sisi pengontrol apakah suatu enzim akan diproduksi atau tidak (Watson, et al, 1987). Secara non genetik enzim dapat melakukan aktivitas optimum sangat bergantung pada kondisi optimum lingkungannya, seperti pH, suhu, jenis dan konsentrasi substrat (Stryer, 1981).

Salah satu jenis enzim yang penting dalam industri adalah enzim glukosa isomerase. Enzim ini mengkatalisis reaksi perubahan glukosa menjadi fruktosa. Fruktosa merupakan salah satu alternatif yang baik untuk dapat menggantikan gula sebagai bahan pemanis, karena fruktosa mempunyai kadar kemanisan 1,7 kali lebih manis dibanding dengan sukrosa (gula tebu), tidak menimbulkan rasa yang kurang enak dan harganya relatif murah. Oleh karena itu, fruktosa banyak digunakan dalam industri bahan makanan, kembang gula dan pengalengan buah-buahan. Selain itu dalam bidang kesehatan, fruktosa juga dapat digunakan untuk memenuhi kebutuhan bahan pemanis

bagi penderita diabetes militus, Hypoglicemia dan kelainan metabolisme glukosa (Crueger and Crueger, 1984).

Puspaningsih dkk (1992), telah melakukan biokonversi pati menjadi fruktosa melalui proses ko-amobilisasi glukoamilase dan *Streptomyces griseus* namun prosentase fruktosa yang dihasilkan masih rendah , yaitu 10,80 %. Diduga salah satu penyebabnya adalah enzim glukosa isomerase yang dihasilkan oleh *Streptomyces griseus* belum optimal. Pada penelitian tersebut digunakan glukosa sebagai induser.

Oleh karena enzim glukosa isomerase merupakan enzim induktif, maka untuk optimalisasi enzim tersebut dalam penelitian ini akan digunakan induser-induser xylosa dan glukosa, karena senyawa-senyawa tersebut terlibat dalam metabolisme karbohidrat (Stryer, 1981).

1.2. Perumusan Masalah

Dari latar belakang yang telah diuraikan tersebut terdapat permasalahan sebagai berikut :

1. Bagaimanakah profil produktivitas glukosa isomerase yang dihasilkan oleh *Streptomyces griseus* di dalam media fermentasi yang mengandung induser glukosa dan xylosa dalam berbagai komposisi?
2. Bagaimanakah komposisi optimum induser glukosa dan xylosa yang ditambahkan dalam media fermentasi agar *Streptomyces griseus* dapat menghasilkan produktivitas glukosa isomerase yang tinggi.
3. Pada jam ke berapa panen *Streptomyces griseus* dari media fermentasi menghasilkan glukosa isomerase dengan aktivitas yang optimum?

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Menentukan profil produktivitas glukosa isomerase di dalam sel *Streptomyces griseus* yang diinduksi oleh glukosa dan xylosa.
2. Menentukan komposisi induser dan waktu fermentasi optimum dalam produksi glukosa isomerase oleh sel *Streptomyces griseus*.

1.4. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan sumbangan dalam peningkatan produksi glukosa isomerase di industri. Dan lebih jauh dapat dikembangkan untuk produksi gula non sukrosa, khususnya HFS (*High Fructose Syrup*) sehingga dapat memenuhi kelangsungan kebutuhan gula secara terus menerus.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Streptomyces griseus*

Kedudukan *Streptomyces griseus* dalam taksonomi adalah sebagai berikut :

- Divisi** : Schizophyta
- Kelas** : Schizomycetes
- Bangsa** : Actinomycetes
- Suku** : Streptomycetaceae
- Genus** : *Streptomyces*
- Species** : *Streptomyces griseus*

Divisi tumbuhan belah (Schizophyta), selain berkembang biak dengan cara membelah juga mempunyai ciri-ciri berikut; bersel tunggal, mempunyai protoplas yang tidak terdiferensiasi dengan jelas, sehingga inti belum tampak nyata, demikian pula plastidanya. Tumbuhan belah dianggap sebagai kelompok tumbuhan dengan tingkat perkembangan filogenetik yang paling rendah, jadi dari segi evolusi merupakan kelompok tumbuhan yang paling tua dan paling sederhana (Tjitrosoepomo, 1986).

Schizomycetes (bakteri) merupakan kelompok makhluk hidup bersel tunggal. Mereka dimasukkan ke dalam golongan jasad renik atau mikroba, mengingat ukuran tubuhnya yang amat kecil, sehingga tidak dapat dilihat dengan mata telanjang (Tjitrosoepomo, 1986). Bakteri pada umumnya mempunyai ukuran sel 0,5 - 1,0 μm sampai 2,0 - 5,0 μm dan terdiri dari tiga bentuk dasar yaitu : bulat atau kokus, batang atau basilus dan bentuk spiral (Fardiaz, 1992).

Streptomyces mempunyai miselium, yang pada saat dewasa membentuk rangkaian tiga sampai beberapa spora. Beberapa species menunjukkan rangkaian spora yang pendek pada substrat miselium. Sklerotia, piknidial, sporangia dan sinnemata, struktur tersebut dibentuk oleh beberapa species. Spora nonmotil, membentuk koloni-koloni. Awalnya koloni tersebut permukaannya relatif lembu, tetapi kemudian berkembang miselium yang mungkin tampak granular, serbuk atau beludru menghasilkan bermacam-macam pigmen yang bertanggung jawab pada pewarnaan miselia vegetatif dan aerial. Beberapa galur menghasilkan satu atau lebih antibiotik. Aerob, kemoorganotrofik mempunyai tipe metabolisme oksidatif yang beraktivitas

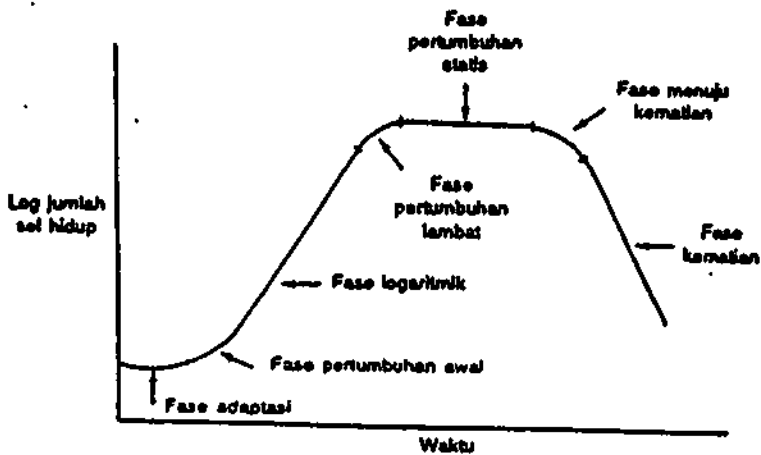
difus. dalam plasma. Kenyataan ini menimbulkan lahinya pendapat bahwa inti bakteri berifat nukleat (RNA) adalah bahan yang disamping DNA ikut menyusun inti sel, tersebar dengan membran inti seperti terdapat dalam sel umumnya belum terdapat. Asam ribo mengandung salah satu zat penyusun inti yaitu asam deoksi ribonukleat (DNA). Inti tersebut. Dalam sitoplasmanya terdapat butir-butir, diantaranya disebut nukleotida yang dengan membran plasma yang dapat diperlihatkan melalui proses plasmolisis sel itu dalam air menjadi berlendir seperti dinding sel ganggang biru. Isi sel berupa protoplas tumbuhan umumnya. Adanya selulosa dalam dinding selnya hanya merupakan pektin yang mengandung N dan lebih mendekati dinding sel hewan daripada dinding sel tidak mengandung selulosa, tetapi disusun dari hemiselulosa dan senyawa semacam Actinomycetes yang berupa sel tunggal itu mempunyai dinding sel yang jelas. Dinding dan cenderung untuk membentuk percabangan (Tjittrosopomo, 1986). Tubuh Actinomycetes mempunyai sel-sel memanjang, sehingga mirip hifa cendawan

katalis dan pada umumnya dapat mereduksi nitrat menjadi nitrit serta mendegradasi adenin, esculin, casein, gelatin, hypoxantin, pati dan L-tyrosin. Menggunakan senyawa-senyawa organik sebagai satu-satunya sumber karbon untuk energi dan pertumbuhan. PH optimum untuk pertumbuhan adalah 6,5 - 8,0. Secara luas tersebar dan melimpah di tanah, termasuk kompos. Beberapa species patogenik terhadap hewan dan manusia, yang lain fitopatogen (Holt dkk, 1994). *Streptomyces griseus* mempunyai temperatur optimum 37 °C untuk pertumbuhan. Galur yang berbeda dari organisme ini menghasilkan antibiotik yang berbeda. Salah satunya adalah streptomisin yang mempunyai aktivitas anti bakteri dan actinomycetes tetapi tidak aktif untuk jamur dan virus. Beberapa galur menghasilkan grisein. Yang lain membentuk kandisidin (Breed dkk, 1957).

2.2. Pertumbuhan Mikroorganisme

Pertumbuhan merupakan fungsi penambahan semua komponen dalam sel dan perbanyakkan jumlah sel. Dalam organisme uniselular, penambahan jumlah sel berarti juga penambahan jumlah organisme (Fardiaz, 1992).

Pertumbuhan mikroorganisme dalam suatu kultur dapat digambarkan dalam kurva pertumbuhan dengan berbagai fasenya. Kurvanya sebagai berikut :



Gambar 2.1 Kurva pertumbuhan mikroorganisme

Fase-fase pertumbuhan mikroorganisme meliputi :

- a. Fase adaptasi. Terjadi ketika mikroorganisme mulai mengenal lingkungan yang baru. Adanya perubahan pH, peningkatan nutrisi dan makin menurunnya inhibitor di lingkungan baru, menyebabkan sistem transport nutrisi di dalam sel menjadi lebih terinduksi. Kofaktor keluar sel dan pembentukan metabolit primer berjalan aktif.
- b. Fase pertumbuhan awal. Pada fase ini sel mulai membelah dengan kecepatan yang rendah karena baru menyelesaikan tahap penyesuaian diri.
- c. Fase pertumbuhan logaritmik. Sel, pada fase ini, membelah dengan cepat dan konstan. Sebagai akibatnya energi yang dibutuhkan menjadi banyak dan sel menjadi sensitif terhadap keadaan lingkungannya.

- d. Fase pertumbuhan lambat. Selanjutnya pertumbuhan sel menjadi lambat dan tidak stabil. Penyebabnya antara lain : zat nutrisi didalam medium berkurang dan adanya hasil metabolisme yang mungkin beracun dan menghambat pertumbuhan.
- e. Fase pertumbuhan tetap (statis). Pada fase ini jumlah populasi sel tetap karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati. Ukuran sel menjadi lebih kecil karena sel tetap membelah meskipun zat nutrisi mulai habis. Karena kekurangan zat nutrisi, sel kemungkinan mempunyai komposisi berbeda dengan sel yang tumbuh pada logaritmik.
- f. Fase menuju kematian dan fase kematian. Pada fase ini populasi mikroorganisme mulai menurun disebabkan oleh habisnya zat nutrisi dalam medium dan habisnya energi cadangan di dalam sel (Fardiaz, 1992).

2.3. Produksi Enzim Industri (Wiseman, 1984)

Dari segi teknik, produksi enzim untuk keperluan riset (ilmu pengetahuan) lebih rumit dalam hal produksi dibanding untuk keperluan industri. Dalam ilmu pengetahuan diperlukan enzim yang cukup murni, sehingga sering kali harganya menjadi lebih mahal di pasaran.

Untuk industri enzim diperlukan dalam jumlah banyak dengan harga yang relatif murah.. karena itu perlu diupayakan cara-cara produksi yang sederhana baik bahan baku, proses maupun pemisahannya tanpa banyak mengurangi mutu.

Kebanyakan enzim industri diperoleh dari sel mikroba, disamping beberapa enzim diisolasi secara tradisional dari jaringan tanaman atau hewan. Enzim mikroba jauh lebih disukai daripada enzim hewan atau tanaman karena banyak alasan, yaitu dapat diperoleh dalam jumlah besar, proses produksi lebih mudah, waktu generasi mikroba

lebih pendek sehingga mudah dilakukan manipulasi genetik untuk peningkatan kualitas maupun kuantitas enzim, enzim mikroba umumnya lebih stabil daripada enzim pada jenis yang sama yang diperoleh dari tanaman atau hewan.

Berdasarkan lokasi enzim yang dihasilkan oleh mikroba dibedakan dua jenis enzim, yaitu enzim intraselular dan ekstraselular. Enzim intraselular terletak di dalam sel mikroba, sedangkan enzim ekstraselular adalah enzim yang selama proses biosintesisnya menembus membran dalam dan keluar dari sel mikroba atau masih terikat pada membran luarnya.

Metode produksi enzim dari mikroba adalah melalui proses fermentasi. Dalam pengertian luas fermentasi adalah proses untuk menghasilkan produk-produk tertentu oleh biakan sel mikroba, yang meliputi enzim mikroba, metabolit primer dan sekunder serta fermentasi untuk memodifikasi suatu senyawa (biotransformasi).

Setelah biakan sel diperoleh dari suatu proses fermentasi, untuk memproduksi enzim maka dilakukan pemecahan sel untuk mengeluarkan enzim tersebut (enzim intraselular). Ada berbagai cara pemecahan sel, yaitu lisis sel, pengurutan menggunakan enzim, pclarutan secara kimia (otolisis), penghancuran sel dengan alat homogenasi, penggerusan dengan atau tanpa pasir dan ultrasonikasi. Semua pengerjaan dilakukan pada suhu 2 - 4 °C agar enzim tidak terdenaturasi. Suspensi yang diperoleh dari salah satu cara pemecahan sel tersebut disentrifugasi, supernatan merupakan ekstrak kasar enzim.

Untuk enzim ekstraselular, tidak perlu dilakukan pemecahan sel, karena enzim sudah berada diluar sel, yaitu didalam medium selama proses fermentasi, maka supernatan hasil sentrifugasi suspensi dari proses fermentasi merupakan ekstrak kasar enzim. Sentrifugasi dilakukan pada suhu 2 - 4 °C.

Ekstrak kasar enzim yang berbentuk cairan dapat diendapkan dengan berbagai cara, yaitu pengendapan dengan garam, aseton alkohol. Cara-cara ini dapat pula digunakan untuk pemurnian enzim dengan metode fraksinasi. Ekstrak kasar enzim berbentuk serbuk dibuat dengan *freeze drying* ekstrak enzim cair.

2.4. Glukosa Isomerase

Glukosa isomerase merupakan enzim dalam biokatalisator reaksi reversibel antara glukosa menjadi fruktosa. Enzim ini banyak digunakan dalam industri bahan makanan yang menghasilkan fruktosa, yaitu gula dengan kemanisan lebih tinggi 1,7 kali dari sukrosa (Crueger and Crueger, 1984).

Penemuan glukosa isomerase berawal pada tahun 1954, tatkala Marshall dan Kooi menumbuhkan *Pseudomonas hydropilla* pada media yang mengandung silosa dan glukosa. Dalam media pertumbuhan tersebut didapatkan fruktosa suatu isomer glukosa. Dilaporkan bahwa yang berperan dalam isomerisasi glukosa menjadi fruktosa adalah glukosa isomerase.

Dalam penyediaan glukosa isomerase, dewasa ini banyak mikroorganisme digunakan sebagai sumber enzim. Beberapa contoh mikroba penghasil glukosa isomerase adalah : *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus brevis*, *Escherichia coli* dan *Actinoplanes missouriensis*.

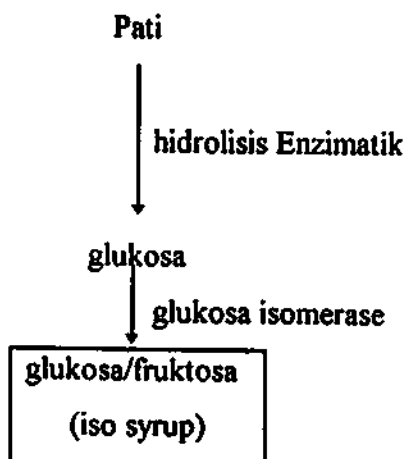
Pada umumnya glukosa isomerase merupakan enzim intrasel, yang dihasilkan oleh bakteri gram positif dan merupakan induktif, karena enzim ini dihasilkan di dalam sel serta memerlukan induser untuk mensintesis enzim tersebut (Bhatia and Prabhu, 1980).

Glukosa isomerase merupakan *thermophilic-metaloenzim* karena enzim ini tahan terhadap panas dan dalam perjalanan proses katalitiknya, enzim memerlukan ion logam tertentu sebagai kofaktor seperti Mg^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} dan Ni^{2+} (Godfrey dan Reichelt, 1983).

Studi mengenai efek inhibitor terhadap glukosa isomerase tidak banyak dipublikasikan. Namun senyawa yang pernah dilaporkan sebagai inhibitor glukosa isomerase adalah sorbitol, silitol dan manitol. Senyawa-senyawa tersebut merupakan inhibitor kompetitif terhadap glukosa isomerase

2.5. Fruktosa

Sirup fruktosa atau dikenal dengan nama "*High Fructose Syrup*" merupakan bahan pemanis yang dibuat dengan cara enzimatik bertingkat seperti terlihat pada gambar 2.2. Bahan dasar yang dipergunakan untuk pembuatan sirup fruktosa adalah pati melalui dua tahapan reaksi, yaitu hidrolisis pati menjadi glukosa dan isomerisasi glukosa menjadi fruktosa dengan menggunakan beberapa enzim antara lain α -amilase, glukamilase dan glukosa isomerase.



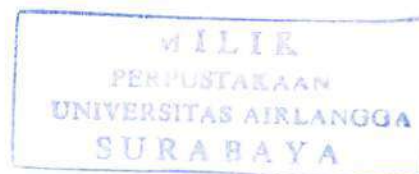
Gambar 2.2. Tahap-tahap didalam pembuatan fruktosa secara enzimatik

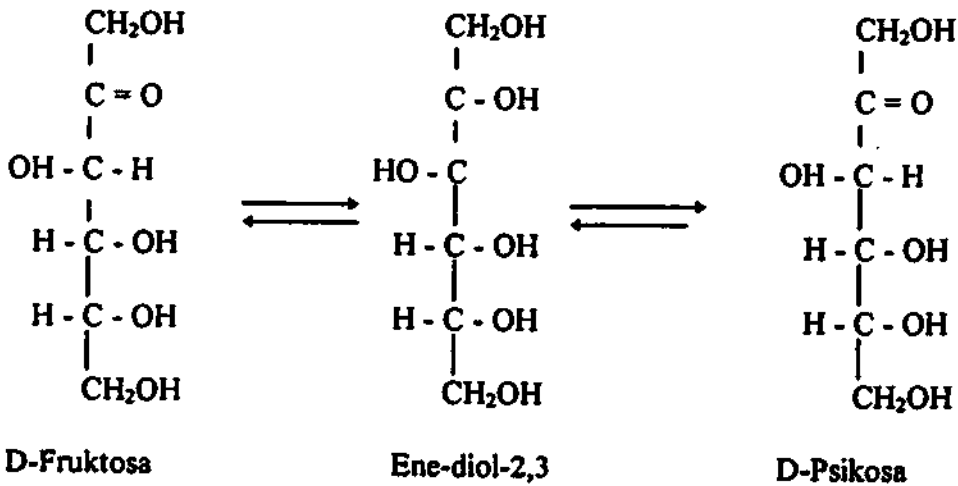
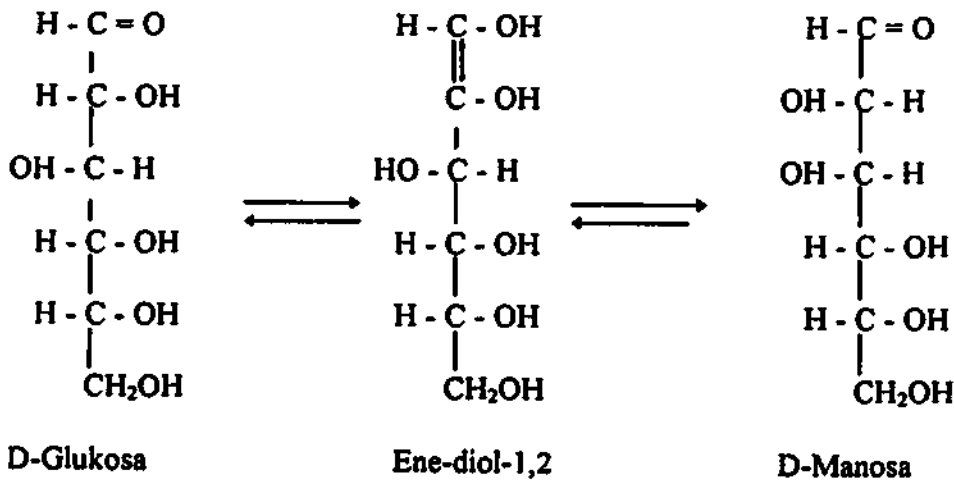
Pengolahan sirup fruktosa ini dikembangkan karena kebutuhan gula yang semakin meningkat. Selain itu juga sifat fruktosa yang mempunyai kadar kemanisan yang tinggi dibandingkan dengan glukosa, sehingga dapat menggantikan sukrosa sebagai bahan pemanis yang lain. Pada tabel 2.1 ditunjukkan tingkat kemanisan senyawa kelompok gula.

Tabel 2.1. Kemanisan relatif dari beberapa Monosakarida dan disakarida

Gula	kemanisan relatif (%)
Sukrosa	100
Laktosa	16
Maltosa	32
D-galaktosa	32
D-glukosa	74
D-fruktosa	173

Selain itu fruktosa dapat juga dihasilkan dari isomerisasi glukosa secara kimia pada temperatur tinggi dan dalam suasana basa, akan tetapi dihasilkan hasil samping, yaitu psikosa yang tidak dapat dimetabolisme didalam tubuh (gambar 2.3).

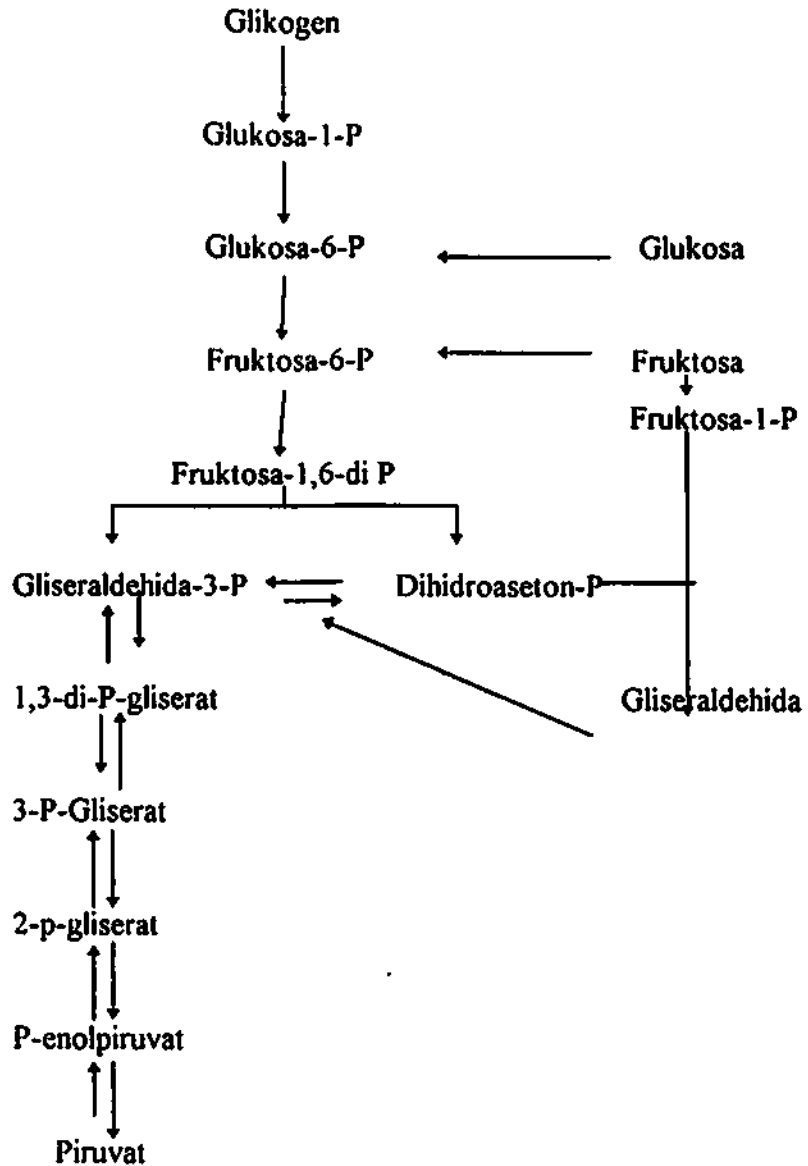




Gambar 2.3. Isomerisasi glukosa menjadi fruktosa secara kimia (Crueger and Crueger, 1984).

Sebagaimana halnya dengan monosakarida lainnya, metabolisme fruktosa dalam tubuh berpusat pada jalur glikolisis, seperti terlihat pada gambar 2.4. Masuknya fruktosa dalam jalur glikolisis yang terjadi didalam hati dapat melalui 2 cara yaitu; mengalami fosforilasi menjadi fruktosa-1 fosfat oleh enzim fruktokinase dan mengalami fosforilasi menjadi fruktosa-6 fosfat oleh enzim heksokinase, namun sebagian besar

proses yang terjadi di dalam hati berlangsung melalui jalur fruktosa-1 fosfat. Sedangkan didalam jaringan adiposa, masuknya fruktosa melalui jalur fruktosa-6 fosfat



Gambar 2.4. Jalur metabolisme fruktosa (Lehniger, 1982)

2.6 Mekanisme Reaksi Enzim Glukosa Isomerase

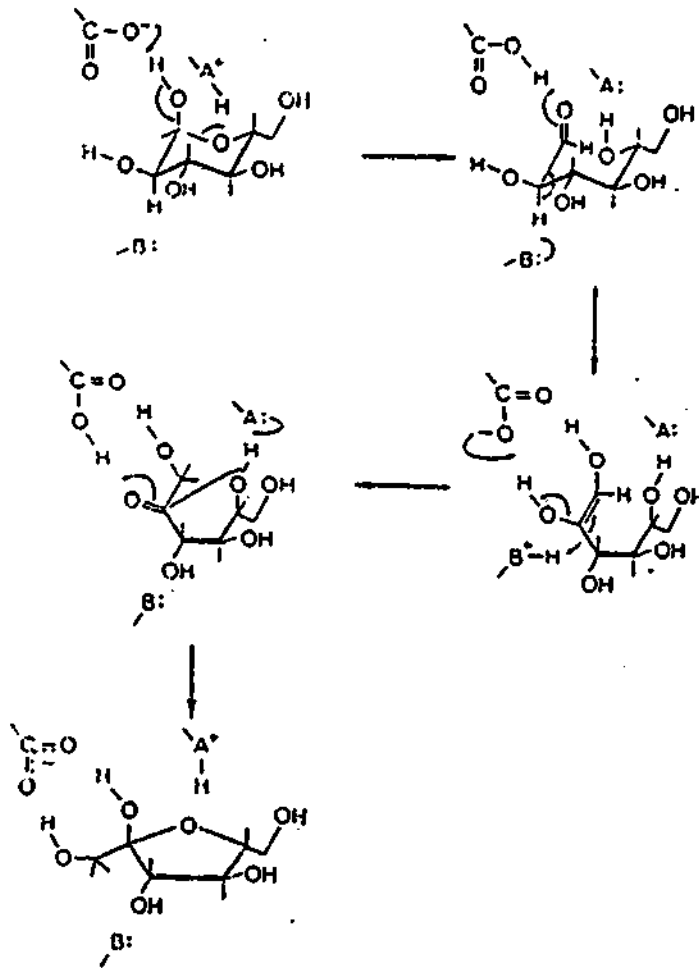
Reaksi isomerisasi oleh enzim pertama kali dilaporkan oleh Scharay dan Rose. Dijelaskan bahwa hanya dalam bentuk konfigurasi α , selulosa dan glukosa dapat

diisomerisasi, sedangkan terbentuknya β fruktosa pada reaksi isomerisasi terjadi karena mutarotasi dari α -fruktosa (Kay dkk, 1980).

Sanchez dan smiley melaporkan adanya kemiripan struktur antara silosa, glukosa, arabinosa dan ribosa yaitu gugus hidroksi pada C_2 bila berada pada posisi equatorial. Disebutkan pula bahwa gugus hidroksil pada C_3 dan C_4 equatorial untuk kerja isomerisasi optimum. Konfigurasi kursi dari glukosa sesuai dengan syarat, manakala glukosa berada dalam konfigurasi biduk maka akan dirubah ke bentuk kursi oleh glukosa isomerase dengan cara membuka cincin piranosa.

Reaksi isomerisasi terjadi bila substrat tidak dalam bentuk cincin. Oleh karena itu, tahap pertama yang dilakukan oleh enzim isomerisasi adalah membuka cincin dari substrat tersebut. Reaksi isomerisasi glukosa menjadi fruktosa terjadi melalui mekanisme yang disarankan oleh Suckling pada tahun 1985. Menurut Suckling terjadi 4 tahap reaksi, seperti terlihat pada gambar 2.5, yaitu :

1. Adanya donor proton pada pusat aktif enzim ($-AH^+$) akan mendorong pecahnya cincin piranosa dengan memutuskan ikatan antara C_1 dan O yang terikat pada C_5 . Putusnya ikatan ini disertai dengan ditangkapnya atom H oleh atom O yang terikat pada C_5 dari residu asam pusat aktif enzim. Proses selanjutnya terjadi penataan ulang dalam molekul glukosa membentuk gugus aldehid melalui pelepasan 1 atom H dari gugus alkohol pada C_1 , dimana atom H yang dilepaskan akan ditangkap oleh gugus karbonil dari pusat aktif enzim. Pada tahap ini terbentuk glukosa rantai terbuka.



Gambar 2.5. Mekanisme isomerisasi glukosa oleh glukosa isomerase

2. Atom O yang terikat pada C₁ relatif lebih bersifat negatif, sehingga dapat menarik atom H dari gugus karbonil dipusat aktif enzim. Penarikan satu atom H ini disertai dengan putusnya ikatan rangkap pada C₁ yang menyebabkan C₁ lebih bersifat elektropositif, sehingga menarik elektron dari C₂ yang disertai dengan dilepaskannya atom H dari C₂. Atom H yang dilepas oleh C₂ ditangkap oleh gugus basa dari pusat aktif enzim. Tahap ini menghasilkan senyawa antara cis-enediol.

3. Senyawa enediol adalah nukleofil yang cukup kuat, sehingga bila berdekatan dengan suatu donor proton akan terjadi penyerangan terhadap proton yang berdekatan. Enediol yang terbentuk akan menarik atom H (proton) dari pusat aktif enzim ($-BH^+$). Penataan ulang terjadi kembali dengan membentuk gugus karbonil dari pusat aktif enzim. Pada tahap ini terbentuk fruktosa melalui rantai terbuka.
4. Fruktosa rantai terbuka ini tidak berada dalam bentuk yang stabil, karena itu fruktosa rantai terbuka ini melakukan penataan ulang membentuk hemiketal siklik dengan menarik atom H dari gugus karbonil dan melepaskan atom H dari gugus alkohol pada C_5 .

2.7. Pengendalian Sintesis Enzim

Enzim adalah katalisator organik atau biokatalisator yang dihasilkan oleh sel. Oleh karena enzim merupakan bagian dari sel, maka semua faktor yang mempengaruhi sel akan berpengaruh pula pada enzim. Umumnya kehidupan mikroorganisme sangat dipengaruhi oleh lingkungannya terutama dalam penggunaan sumber energi dimana mikroorganisme mempunyai sistem pengendalian metabolisme yang memungkinkan bekerja secara efisien. Hal tersebut juga mempengaruhi enzim terutama dalam biosintesis enzim.

Berdasarkan biosintesisnya, maka dikenal dua macam enzim yaitu ; enzim konstitutif dan induktif. Enzim konstitutif adalah enzim yang selalu tersedia di dalam sel mikroba dalam jumlah yang relatif konstan, sedangkan enzim induktif adalah enzim yang ada didalam sel dengan jumlah yang tidak tetap, tergantung induser. Jumlahnya akan bertambah sampai beberapa ribu kali bahkan lebih apabila dalam medium mengandung

substrat yang menginduksi, terutama bila substrat penginduksi merupakan satu-satunya sumber karbon.

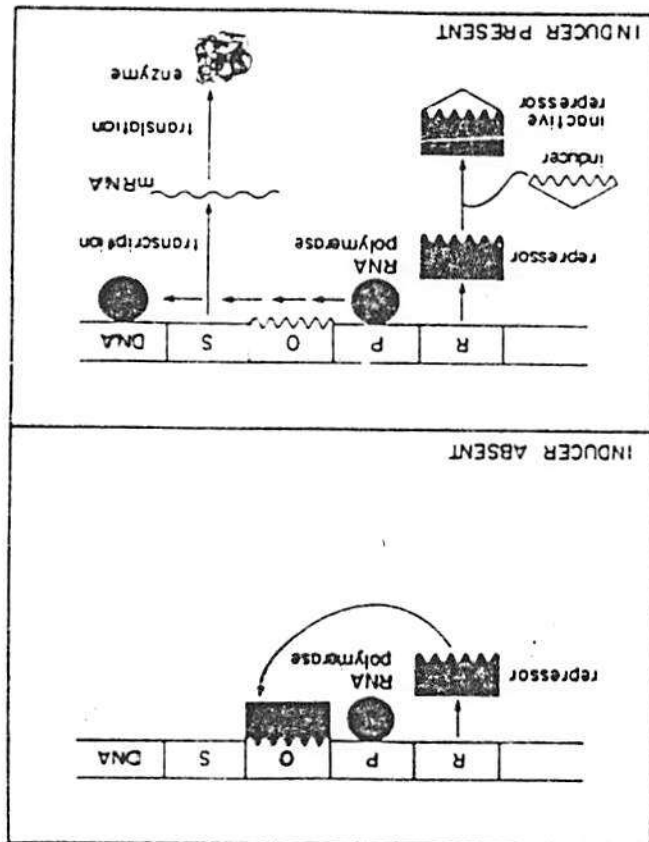
Yang berperan dalam sintesis enzim adalah DNA yang terdiri dari beberapa segmen. Tiap-tiap segmen DNA tersebut akan membentuk beberapa struktur gen. Dikenal dua mekanisme dalam biosintesis enzim, yaitu mekanisme induksi dan represisi. Kedua mekanisme ini dijelaskan oleh Yacob dan Monod yang dikenal dengan teori Operon. Menurut yacob dan Monod (1961) bekerjanya enzim ditentukan oleh beberapa gen (Gambar 2.6 dan 2.7). Gen terdiri dari :

1. Gen regulator (R) yang dapat membentuk senyawa spesifik yang bersifat represor (merupakan protein).
2. Gen operator (O) yang mengatur bekerja atau tidaknya gen-gen struktural.
3. Gen struktural (S) yang merupakan pola untuk sintesis mRNA yang berperan dalam sintesis protein.
4. Gen promotor (P) yang merupakan tempat pengikatan RNA polimerase yaitu enzim yang mengkatalisis proses transkripsi DNA mengkatalisis mRNA.

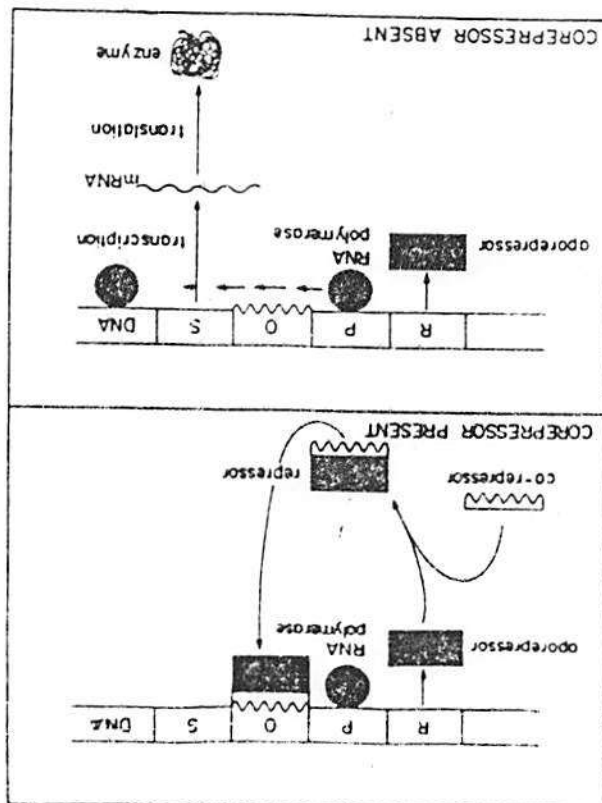
Mekanisme induksi terjadi apabila suatu inducer berikatan dengan represor sehingga gen operator dan gen gen-gen struktural dapat bekerja (Gambar 2.6).

Mekanisme represi terjadi apabila aporepresor (protein yang tidak aktif) tidak berikatan dengan represor sehingga gen operator dapat memberikan sinyal pada gen struktural (Gambar 2.7).

Gambar 2.6. Mekanisme induksi.



Gambar 2.7. Mekanisme repressi.



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Sampel, Bahan dan peralatan

3.1.1. Sampel

Sampel penelitian berupa biakan murni *Streptomyces griseus*, diperoleh dari laboratorium mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya.

3.1.2. Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan antara lain: bacto agar, ekstrak ragi, D-glukosa, D-xylosa, bacto pepton, kasein hidrolisat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, sistein, HCl dan Karbazol serta aquades.

3.1.3. Alat-alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik, autoclave, shaker, sentrifuge dingin, spektrofotometer UV-Vis, mikropipet, inkubator dan beberapa alat gelas.

3.2. Prosedur Penelitian

3.2.1. Penyiapan medium padat

Medium padat yang terdiri dari D-glukosa 1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,02 %, ekstrak ragi 0,5 %, bacto agar 1,7 % dilarutkan dalam aquades sampai volumenya 100 ml. Semua campuran dilarutkan dengan pemanasan sampai diperoleh larutan berwarna

kuning jernih. Larutan dituang ke dalam tabung reaksi sebanyak lima ml, kemudian ditutup dengan kapas lalu disterilkan dalam autoclave selama 15 menit pada tekanan 15 lb. tabung-tabung ini selanjutnya diletakan miring dan dibiarkan membeku.

3.2.2. Penyiapan medium cair

Medium cair dibuat dari ekstrak ragi 0,5 %, kasein hidrolisat 0,3%, bacto pepton 0,3 %, xylosa 1%, D-glukosa 0,1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,02 %, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1 %, $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ 1,3 %. Senyawa-senyawa tersebut dilarutkan dalam air sampai 100 ml dalam Erlenmeyer kemudian ditutup dengan kapas. Selanjutnya disterilkan dalam autoclave pada tekanan 15 lb selama 15 menit.

3.2.3. Menanambikan murni pada medium padat

Biakan murni *Streptomyces griseus*, yang diperoleh dari laboratorium mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga diperbanyak dalam medium padat agar miring. Penanaman dimulai dengan penggoresan mikroba pada permukaan agar miring dengan menggunakan jarum ose yang telah disterilkan dengan pembakar spiritus dalam ruang laminar. Media miring yang telah tertanami, kemudian dinkubasi pada suhu 30 °C atau suhu kamar selama 48 jam.

3.2.4. Pembuatan Inokulum

Biakan *Streptomyces griseus*, dalam medium agar miring diaktifkan dengan cara memindahkan spora yang telah tumbuh ke dalam media cair sebanyak dua mata ose secara aseptik. Selanjutnya dinkubasi dengan pengocokan 175 rpm selama 24 jam pada suhu kamar, sehingga diperoleh biakan aktif inokulum sel *Streptomyces griseus*.

kuning jernih. Larutan dituang ke dalam tabung reaksi sebanyak lima ml, kemudian ditutup dengan kapas lalu disterilkan dalam autoclave selama 15 menit pada tekanan 15 lb. tabung-tabung ini selanjutnya diletakan miring dan dibiarkan membeku.

3.2.2. Penyiapan medium cair

3.2.5. Penentuan komposisi induser optimum untuk produksi glukosa isomerase dari sel *Streptomyces griseus*

Untuk menentukan kondisi optimum produksi glukosa isomerase dibuat 6 media fermentasi yang komposisinya berbeda dalam hal variasi kadar D-glukosa dan D-xylosa. Komposisi lengkapnya tertulis pada lampiran 1. Media-media tersebut terlebih dulu disterilkan dalam autoclave pada tekanan 15 lb selama 15 menit. Ke dalam masing-masing media produksi ini dimasukkan inokulum aktif sebanyak 4 %, selanjutnya diinkubasi dengan pengocokan pada suhu kamar dengan kecepatan 180 rpm. Pada waktu inkubasi tertentu (t_0 , t_{12} , t_{18} , t_{24} , t_{26} , t_{28}) kadar fruktosa yang dihasilkan masing-masing media ditentukan untuk diketahui besarnya produktivitas glukosa isomerase yang diperoleh. Selanjutnya sel dari media yang terbaik dalam menghasilkan produk glukosa isomerase pada waktu inkubasi yang sama diuji aktivitasnya untuk optimasi waktu fermentasi.

3.2.6. Uji Aktivitas Enzim Glukosa Isomerase di Dalam Sel *Streptomyces griseus*

Sebelum sel-sel *Streptomyces griseus* diuji aktivitasnya, sel dipisahkan dari media produksi dengan sentrifuge dingin pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Residu dicuci 3 kali dengan larutan NaCl 0,85 % , hingga diperoleh sel yang siap digunakan.

Seperempat gram sel basah *Streptomyces griseus* yang bersih, diinkubasi pada 65 °C selama 15 menit. Kemudian ditambah dengan 4 ml substrat yang mengandung 0,1 M D-glukosa, 0,01 M MgSO₄ 7H₂O dalam buffer fosfat pH 7. Inkubasi dilanjutkan selama 2 jam sambil diaduk. Berikutnya filtrat dipisahkan dari residu dengan sentrifugasi, lalu ditentukan kadar fruktosanya dengan metode sistein karbazol.

3.2.7. Penentuan Kadar Fruktosa

Kadar fruktosa ditentukan dengan metode sistein karbazol (Dishe & Borenfreud) yang telah dimodifikasi. Metode ini spesifik untuk kadar fruktosa 10 - 60 ug/ml. Mula-mula direaksikan 1 ml cuplikan dengan 1 ml L-sistein HCl 1 %. Hasil reaksi ini kemudian ditambah 5 ml H₂SO₄ 75 % pada suhu es dan diaduk, selanjutnya ditambah 0,15 ml larutan karbazol 0,12 % dan diaduk. Pembentukan warna yang terjadi disempurnakan dengan inkubasi campuran pada suhu 40 °C selama 30 menit. Warna yang terbentuk diukur absorbansinya pada $\lambda_{565 \text{ nm}}$. Pada kondisi yang sama juga dilakukan uji pada kadar fruktosa standar.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Fermentasi *Streptomyces griseus*

Glukosa isomerase merupakan enzim intraselular artinya lokasinya terdapatnya di dalam sel. Untuk mendapatkan glukosa isomerase dalam penelitian ini digunakan bakteri *Streptomyces griseus*. Terdapat hubungan antara kualitas sel dengan jumlah enzim. Sel-sel yang subur dan tumbuh dengan baik akan berkemampuan lebih aktif dalam mensintesis suatu enzim. Oleh karena itu kondisi mikroba perlu diperhatikan, agar produksi enzim oleh sel tersebut menjadi tinggi.

Selama pertumbuhan, sel-sel *Streptomyces griseus* membutuhkan beberapa nutrisi untuk proses metabolismenya. Untuk mengamati pengaruh nutrisi terhadap glukosa isomerase yang dihasilkan oleh sel *Streptomyces griseus*, dibuat enam media fermentasi dengan komposisi seperti tertera pada lampiran I. Komposisi nutrisi dalam media-media ini hampir sama, hanya berbeda dalam hal kadar glukosa dan xylosanya.

Dalam media fermentasi, adanya xylosa, glukosa, bacto pepton, ekstrak ragi dan kasein hidrolisat sangat berperan sebagai sumber karbon. Selain itu bacto pepton, ekstrak ragi dan kasein hidrolisat berguna pula sebagai sumber nitrogen dan vitamin. Sementara fosfat berfungsi untuk mensintesis asam nukleat dan sumber energi, sedangkan magnesium dan natrium untuk mensintesis dinding sel, asam nukleat serta untuk memelihara struktur membran (Crueger and Crueger, 1984).

Selama penelitian, *Streptomyces griseus* ditumbuhkan secara bertahap, dimulai dengan membiakkan mikroba ini pada media agar miring. Pada media ini

Streptomyces griseus bisa bertahan dalam waktu yang cukup lama, kurang lebih dua minggu. Hal ini sangat menguntungkan untuk stock persediaan. Teramati pertumbuhan tersedut dengan adanya spora yang berwarna putih. Selanjutnya spora-spora ini dibiakkan dalam media cair untuk pembuatan inokulum.

Pada media cair spora-spora *Streptomyces griseus* diaktivasi dengan aerasi yang dilakukan dengan pengocokan. Aerasi dimaksudkan untuk memberikan oksigen secara terus-menerus selama pertumbuhan sel. Disamping itu, juga agar selama pertumbuhannya tidak timbul koloni-koloni. Beberapa lama setelah aerasi, teramati kekeruhan media yang lebih tinggi dari semula. Sampai pada jam ke 24, aktivasi ini dihentikan dimana pada saat tersebut pertumbuhan *Streptomyces griseus* telah mendekati kondisi steady state (dirujuk dari penelitian Puspaningsih, 1992). Kemudian sel-sel aktif ini dilipatgandakan dalam media fermentasi.

Sel-sel mengalami pelipatgandaan baik jumlah maupun isinya pada media fermentasi. Selama proses ini sel-sel membutuhkan banyak nutrisi dan menghasilkan banyak produk metabolisme. Gray et al (1972) menyebutkan bahwa pembentukan produk metabolik selama fermentasi dikendalikan oleh pertumbuhan sel dalam media.

Penelitian sebelumnya (Puspaningsih dkk, 1992) menyebutkan tentang fase-fase pertumbuhan *Streptomyces griseus*. Dijelaskan bahwa pada fase adaptasi dimana sel baru menyesuaikan diri dengan lingkungannya terjadi pada jam ke 0 sampai jam ke 5 waktu fermentasi. Berikutnya fase logaritmik, yaitu fase pertumbuhan sel dengan kecepatan drastis berlangsung dari jam ke 5 sampai jam ke 24. Kemudian fase peralihan diikuti dengan fase stasioner (steady state) bermula pada jam ke 26 dan terakhir fase kematian pada jam ke 45.

Informasi ini sangat membantu dalam panen sel untuk memperoleh produk metabolik yang diinginkan.

Glukosa isomerase merupakan enzim yang terlibat dalam pembentukan produk metabolik primer. Dalam pertumbuhan *Streptomyces griseus*, pembentukan metabolik primer terjadi secara aktif disekitar fase logaritmik. Namun bukan berarti produksi glukosa isomerase secara optimum terdapat pada fase logaritmik, tetapi bisa beberapa titik di sekitarnya.

Akhir dari fermentasi ini diperoleh sel-sel *Streptomyces griseus* yang berwarna putih dengan kualitas yang berbeda-beda untuk setiap waktu dan untuk masing-masing media. Dalam arti kemampuan sel tersebut untuk mengkonversi glukosa menjadi fruktosa pada waktu tertentu berbeda-beda baik pada media yang sama maupun media yang berbeda.

4.2. Komposisi Induser Optimum Untuk Produksi Glukosa Isomerase dari Sel *Streptomyces griseus*

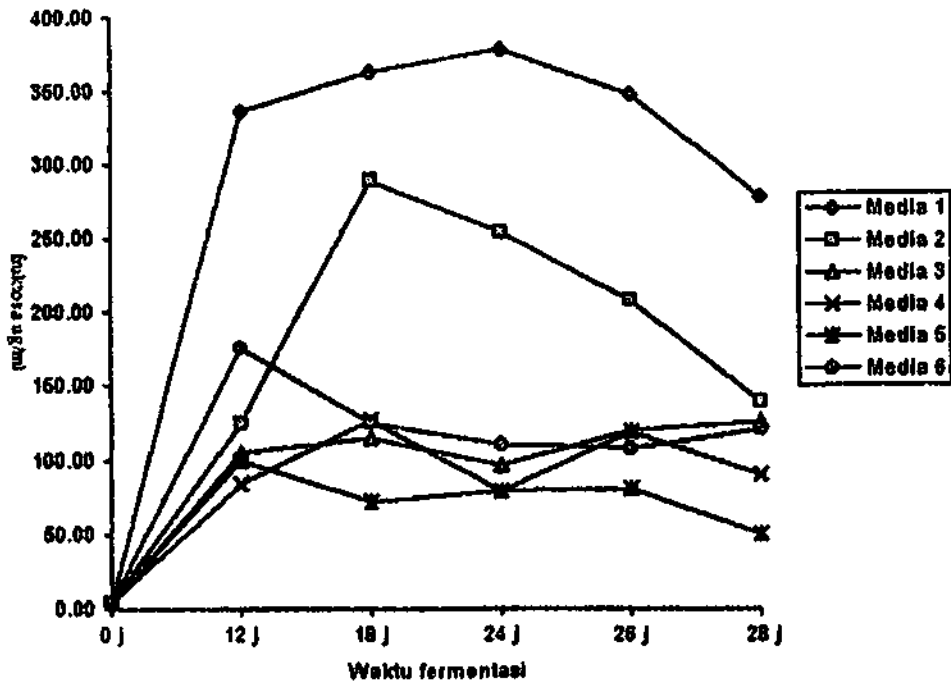
Glukosa isomerase merupakan enzim yang mengkatalis reaksi reversibel antara glukosa dengan fruktosa. Dalam produksi enzim, besar kecilnya aktivitas ini sangat menentukan produktivitas enzim yang diperoleh.

Produktivitas glukosa isomerase oleh *Streptomyces griseus* dapat diketahui dari kadar fruktosa yang dihasilkan dari masing-masing media fermentasi pada waktu tertentu. Kadar fruktosa yang tinggi dalam media menunjukkan produktivitas glukosa isomerase dalam media tersebut tinggi pula, sebab sebagaimana dikemukakan oleh Michalis Menten bahwa pada kondisi yang sama produk yang dihasilkan pada reaksi enzimatik sebanding dengan jumlah enzim yang terlibat dalam reaksi.

Oleh karena glukosa isomerase merupakan enzim induktif, maka penggunaan induser yang tepat untuk fermentasi *Streptomyces griseus* sangat diperlukan. Hal ini dimaksudkan agar produk enzim yang dihasilkan oleh mikroba tersebut akan maksimal.

Untuk keperluan optimasi induser, disediakan enam media fermentasi (I - VI) yang berbeda dalam hal komposisi induser glukosa - xylosa. Selanjutnya media-media tersebut difermentasi dengan biakan *Streptomyces griseus* dalam waktu yang bervariasi. Produk fruktosa yang dihasilkan tiap waktu tertentu diuji guna diketahui produktivitas glukosa isomerase di media-media yang bersangkutan.

Dalam penelitian ini, kadar fruktosa ditentukan dengan metode sistein-karbazol yang telah dimodifikasi, dimana warna yang terbentuk diukur pada $\lambda_{365 \text{ nm}}$. Serapan yang dihasilkan kemudian dibandingkan dengan serapan standar fruktosa untuk menentukan kadar fruktosa yang sebenarnya. Uji kadar fruktosa pada masing-masing media, menghasilkan gambar 4.1.



Gambar 4.1. Profil produktivitas glukosa isomerase dari *Streptomyces griseus* terhadap waktu fermentasi

Dari gambar 4.1 dapat dijelaskan bahwa perbedaan komposisi induser glukosa-xylosa dari masing-masing media fermentasi memberikan perbedaan pola produksi glukosa isomerase oleh *Streptomyces griseus* selama fermentasi. Media fermentasi yang hanya mengandung induser xylosa (media I) nampak menghasilkan sel *Streptomyces griseus* dengan produktivitas glukosa isomerase yang tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa induser xylosa lebih menginduksi sel dalam memproduksi glukosa isomerase dibandingkan dengan induser campuran (glukosa-xylosa) ataupun glukosa saja.

Selain itu gambar 4.1 juga memberikan informasi bahwa dalam total induser 1 %, semakin tinggi kadar xylosa dalam media, aktivitas glukosa isomerase yang dihasilkan oleh *Streptomyces griseus* juga semakin tinggi. Pengaruh adanya glukosa dalam media nampak menurunkan produktivitas glukosa isomerase oleh sel. Bahkan pada media VI (hanya berisi glukosa saja sebagai inducernya) produktivitas glukosa isomerase sangat kecil.

Sanchet dan Smiley (1975) mempelajari tentang pengaruh beberapa sumber karbon dalam media fermentasi terhadap produktivitas glukosa isomerase dari *Streptomyces albus*. Dilaporkan bahwa sumber karbon D-glukosa memberikan aktivitas isomerase yang sangat kecil (hampir 1%), sedangkan pada media yang mengandung xylosa diperoleh aktivitas isomerase yang tinggi (hampir 100%). Laporan ini sekaligus memperkuat hasil penelitian bahwa xylosa merupakan induser yang baik.

Dalam hal ini diduga bahwa xylosa berperan sebagai pengikat represor yang dihasilkan oleh gen pengendali. Dengan demikian pembentukan kompleks gen operator RNA polimerase-represor tidak terjadi, akibatnya gen-gen struktural glukosa isomerase dapat terekspresikan. Disebutkan di sini bahwa kompleks represor induser dapat terjadi dengan baik manakala konformasi kedua molekul tersebut sesuai. Jadi kesesuaian bentuk molekul antara represor dan induser sangat menentukan terekspresinya gen-gen struktural. Faktor ini diperkirakan kurang menguntungkan untuk glukosa. Akibatnya glukosa isomerase yang diinduksi dari *Streptomyces griseus* menjadi kecil.

Kondisi waktu yang ada pada gambar 4.1 masih belum bisa menjawab tentang waktu optimum produksi glukosa isomerase, sebab kadar fruktosa yang terukur pada

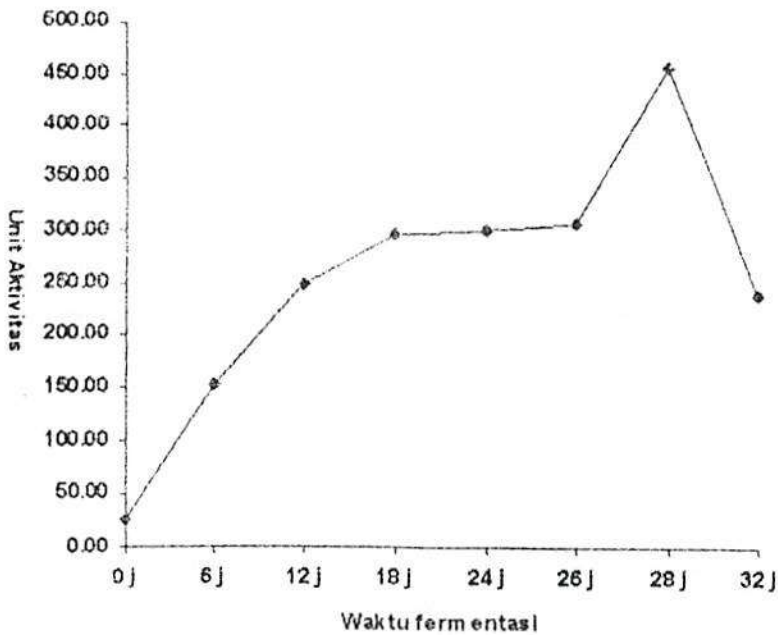
tiap-tiap waktu merupakan produk akumulasi dari fermentasi *Streptomyces griseus* yang berkesinambungan.

4.3. Aktivitas Glukosa Isomerase di Dalam Sel *Streptomyces griseus*

Kualitas sel yang digunakan untuk produksi enzim dapat mempengaruhi perolehan enzim (Stein dan Fisher, 1960). Sedangkan Monod menyebutkan bahwa pembentukan biomassa setiap waktu di dalam media merupakan fungsi pertumbuhan. Artinya fase-fase pertumbuhan suatu organisme sangat menentukan kualitas sel.

Telas disinggung di atas bahwa pembentukan glukosa isomerase di dalam sel *Streptomyces griseus* berlangsung dengan baik pada fasa logaritmik dan beberapa titik di sekitarnya. Namun optimasi waktu produksi enzim pada fase tersebut perlu dilakukan, agar dapat diketahui waktu panen optimum dari fermentasi *Streptomyces griseus* sehingga dihasilkan glukosa isomerase yang tinggi.

Untuk keperluan optimasi waktu produksi ini, dilakukan uji aktivitas glukosa isomerase di dalam sel *Streptomyces griseus* yang dipanen pada waktu fermentasi yang tertentu. Uji ini dilakukan terhadap media xylosa yang dari gambar 4.1 diketahui menghasilkan produktivitas enzim yang tinggi. Hasil uji aktivitas tersebut ditunjukkan oleh gambar 4.2.



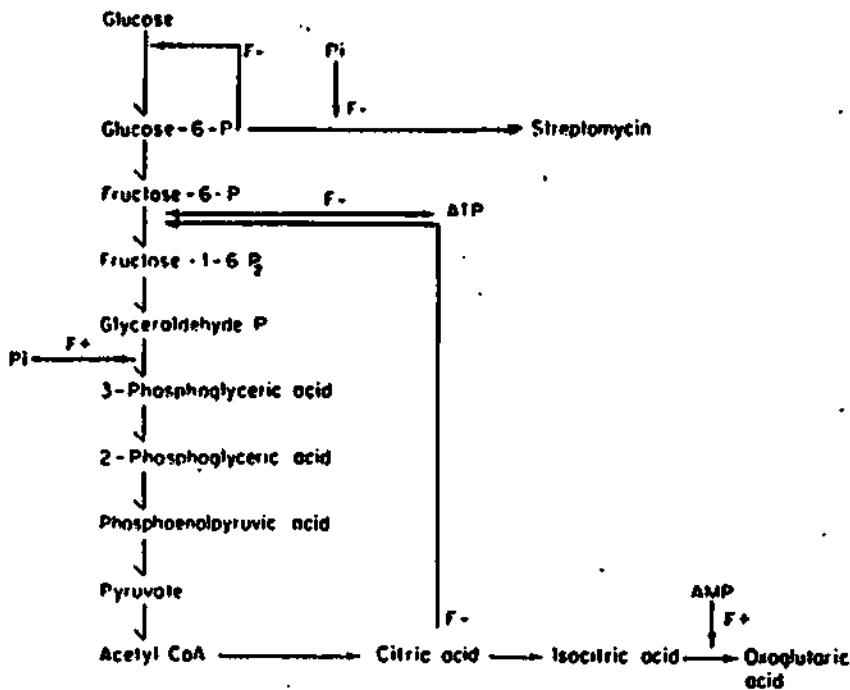
Gambar 4.2. Aktivitas glukosa isomerase di dalam sel *Streptomyces griseus* dari media xylosa terhadap waktu fermentasi.

Gambar 4.2 ini menunjukkan bahwa dari jam ke 0, aktivitas glukosa isomerase mulai meningkat seiring dengan bertambahnya waktu fermentasi dan mencapai optimum pada jam ke 28. Kemudian aktivitas ini pada jam fermentasi selebihnya terlihat mulai menurun.

Jika dihubungkan dengan fase-fase pertumbuhan *Streptomyces griseus*, aktivitas glukosa isomerase naik secara baik pada fase logaritmik dan fase peralihan (iodofase). Berdasarkan kualitas selnya, pada saat tersebut sel-sel tumbuh dengan cepat baik jumlah maupun isinya. Kemudian aktivitas tersebut optimum pada fase stasioner, di mana pada kondisi steady state ini, sel-sel *Streptomyces griseus* yang

terbentuk maksimum. Adapun penurunan aktivitas dari titik optimum diduga telah terjadi lisis sel, yaitu sel pecah dari kondisi yang utuh, sehingga jumlah enzim di dalamnya berkurang dan akibatnya mengurangi aktivitas tersebut.

Pada penelitian ini, aktivitas glukosa isomerase ditentukan dalam sel, tidak dalam bentuk yang bebas. Dengan alasan bahwa untuk keperluan optimasi produksi, uji aktivitas dalam sel cukup mewakili kondisi yang sebenarnya dari enzim. Dengan demikian akan memudahkan dalam produksi enzim berskala besar. Selain itu, untuk enzim intraselular jika optimasi dilakukan dengan memecah sel, akan memperpanjang kerja dan sangat mempersulit, sehingga dirasakan kurang efektif. Memang adanya glukosa memungkinkan sel-sel melakukan fungsi metabolisme sebagai berikut :



Gambar 4.3. Hipotesis kontrol metabolit pada *Streptomyces griseus*

Namun pengerjaan uji aktivitas pada temperatur optimum glukosa isomerase yaitu 65 °C, akan mendeaktivasi dari fungsi selnya, sehingga yang bekerja mengonversi glukosa menjadi fruktosa adalah benar-benar glukosa isomerase di dalam sel tersebut. Hal ini sebagaimana dikemukakan oleh Takasaki (1969), bahwa sel akan berfungsi dengan baik pada kondisi fisiologis.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian disimpulkan :

1. Profil produktivitas glukosa isomerase yang dihasilkan oleh *Streptomyces griseus* pada media yang mengandung induser xylosa, campuran glukosa-xylosa ataupun glukosa adalah berbeda- beda pada tiap waktu fermentasi tertentu.
2. Dibandingkan induser campuran (glukosa-xylosa) ataupun glukosa, induser xylosa lebih meningkatkan produktivitas glukosa isomerase dalam fermentasi *Streptomyces griseus*.
3. Waktu optimum produksi glukosa isomerasi dari *Streptomyces griseus* dicapai pada jam ke 28 waktu fermentasi.

5.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan disarankan :

1. Melakukan optimasi konsentrasi induser xylosa yang secara efektif dapat meningkatkan produktivitas glukosa isomerase dari *Streptomyces griseus*
2. Meningkatkan produktivitas glukosa isomerase dari *Streptomyces griseus* dengan meneliti pH dan temperatur optimum produksinya.
3. Melakukan mutasi *Streptomyces griseus* baik secara fisik maupun kimia, agar diperoleh mutan yang dapat memproduksi glukosa isomerase tanpa induser maupun

yang tidak menghasilkan protease. Sebab adanya protease akan menurunkan hasil glukosa isomerase yang diperoleh dari sel *Streptomyces griseus*.

4. Perlu dilakukan study produksi glukosa isomerase secara besar-besaran, sehingga dapat membantu dalam penyediaan HFS (*High Fructose Syrup*).

DAFTAR PUSTAKA

- Bailey, J.E and Ollis, D.F., 1986, *Biochemical Engineering Fundamentals*, second edition, Mc Graw-Hill Book Co., p. 180-202.
- Bhatia, M. and Prabhu, K.A., 1980, *Production of High Fructose Syrup by Heat Fixed Lactobacillus sp*, *Biotechnol and Engineering*, 22, p. 1957-1977.
- Breed, R.s., Murray, E.G.D., and Smith, N.R., 197, *Manual of Deternative Bacteriology*, seventh edition, The William & Wilkins Company, USA, p. 791.
- Crueger, W., and Crueger, A., 1984, *Biotechnology : Atext Book of Industrial Microbiology*, T.D. Brook, Editor, Science Tech., Inc., Madison.
- Doty, T.E., and E. Vanninen, 1975, *Cristalline Fructose Use as a Food Ingredient Expected to Increase*, *Food Technology*.
- Fardiaz, S., 1992, *Mikrobiologi Pangan*, PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, p. 98-101, 143.
- Godfrey, T., and Reichelt, 1983, *Industrial Enzimology : The Application of Enzyme Industry*, Stockton Press, New York, p. 338,339,487, 62.
- Lehninger, A.I., 1982, *Principles of Biochemistry*, Worth Publisher, Inc., New York, p. 270-186, 415-418.
- Puspaningsih, N.T, dkk, 1992, *Proses Ko-amobilisasi Enzim Glukoamilase dan Streptomyces griseus untuk Biokonversi Pati Jagung Menjadl HFS (High Fuctose Syrup)*, Lemlit Unair, Surabaya.
- Ryu, D. Y., and S. H. Chung, ,1977, *Performance of The Continous Glukosa Isomerase Reactor System for The Production of Fructoce Syrup*, *Biotechnologi & Bioengineering*, 19.
- Sanchez, S. and Smiley, K. L., *Properties of D-Xylose Isomerase From Streptomyces albus*, *Appl, microbiol*, 29, p. 745.
- Suyer, L., 1981, *Biochemistry*, 2 nd Ed, W. H. Freeman and Company, New York.
- Takasaki, Y., 1996. *Fermentatton Advances*. D. Perlman Ed. Academic, New York.
- Tjitrosoepomo, G., 1986, *Taksonomi Tumbuhan, Taksonomi Khusus*, Blarata karya Aksara, Jakarta. p 3-20.

- Tjokroadikoesoemo, S., 1993, *HFS dan Industri Ubi Kayu Lainnya*, Pt. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, p 67-70
- Watson, Hopkins, Roberts, Steitz, Weiner, 1987, *Molekuler Biology of The Gene*, 5th Ed, 1, The Benjamin Cumings Publishing Company, Inc, California.
- Wiseman, A., 1985, *Handbook of Enzyme Biotechnology*, 2nd Ed., Ellis Hurwood Ltd., New York, p 15, 56, 148-149

LAMPIRAN-LAMPIRAN

Lampiran 1

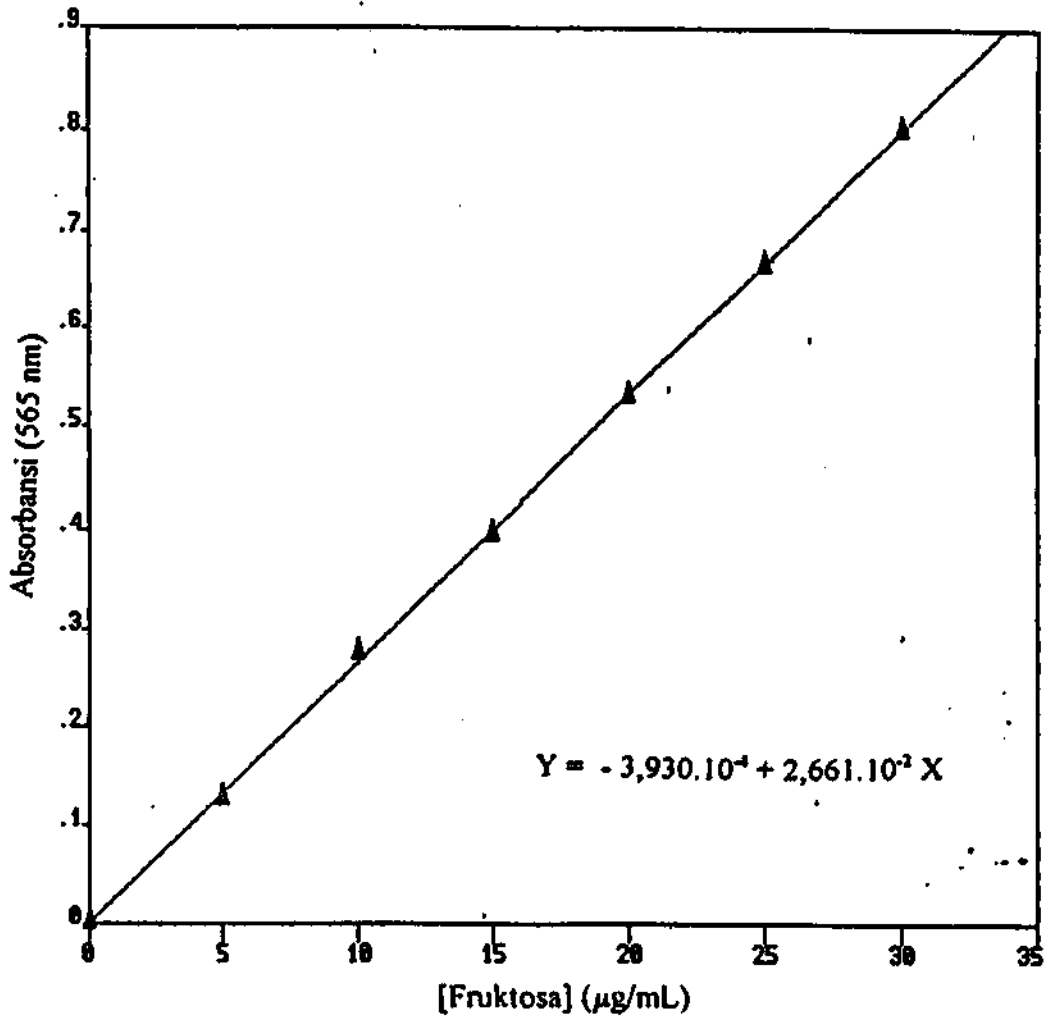
Komposisi media fermentasi

No	Bahan	Media					
		I	II	III	IV	V	VI
1.	Ekstrak ragi (gr)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
2.	Bacto pepton (gr)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
3.	Kasein hidrolisat (gr)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
4.	D (+)- xylosa (gr)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0.0
5.	D (+)- glukosa (gr)	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
6.	MgSO ₄ 7H ₂ O (gr)	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
7.	Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O (gr)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
8.	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O (gr)	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3
9.	Aquades (ml)	100	100	100	100	100	100

Lampiran 2

Hasil penentuan kurva standar fruktosa yang ditentukan dengan metode sistein-karbazol pada λ_{565} nm dan diperoleh data serapan sebagai berikut :

Konsentrasi fruktosa (ug/ml)	Absorbansi (λ_{565} nm)
5	0.128
10	0.275
15	0.395
20	0.529
25	0.665
30	0.799



Lampiran 3

1. Cara perhitungan produktifitas glukosa isomerase oleh *Streptomyces griseus*

1. Data serapan fruktosa dari media fermentasi yang ditentukan dengan metode sistein-karbazol pada $\lambda_{565 \text{ nm}}$

Media	Absorbansi pada waktu fermentasi (jam)					
	0	12	18	24	26	28
I	0.017	0.624	0.674	0.702	0.646	0.517
II	0.017	0.466	1.076	0.944	0.770	0.719
III	0.017	0.195	0.212	0.179	0.223	0.234
IV	0.017	0.157	0.235	0.146	0.221	0.168
V	0.017	0.185	0.134	0.147	0.149	0.094
VI	0.017	0.653	0.463	0.410	0.401	0.450

2. Dengan persamaan regresi linear diperoleh :

$$Y + 3.930 \cdot 10^{-4}$$

$X = \frac{\quad}{2.661 \cdot 10^{-2}} \quad (i)$ dimana i adalah besarnya pengenceran, untuk media II & VI serta semua t_0 jam = 7.15, sedang untuk media I, III, IV & V = 14.30 kecuali t_0

Sehingga diperoleh kadar fruktosa dari media fermentasi tersebut adalah :

Media	Kadar fruktosa (ug/ml) pada waktu fermentasi (jam)					
	0	12	18	24	26	28
I	4.673	335.544	362.413	377.460	374.366	278.043
II	4.673	125.318	289.222	253.755	207.002	139.021
III	4.673	105.003	114.138	96.404	120.050	125.961
IV	4.673	84.582	126.498	78.670	118.975	90.493
V	4.673	99.629	72.222	79.208	80.283	50.726
VI	4.673	175.564	124.512	110.271	107.853	121.019