

BIOCHEMISTRY
J

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

kke
kk
577-14
Pur
m



SELESAI

LAPORAN PENELITIAN
PENELITI MUDA
TAHUN ANGGARAN 1998/1999

PAMERAN 01 JAN 2000

UPAYA MENINGKATKAN TRANSLOKASI AMILASE
KE LINGKUNGAN EKSTRASELULAR SELAMA PROSES
FERMENTASI *Endomycopsis fibuligera*

MILIK
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Peneliti :

PURKAN
SOFIJAN HADI
ABDULLOH

3000 031993 141

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh : Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Terapan

DIP Nomor : 314/XXIII/3/--/1998 Tanggal 31 Maret 1998

Kontrak Nomor : 068/P2 IPT/DPPM/98/LITMUD/V/1998

Ditbinlitabmas, Ditjen Dikti, Depdikbud

Nomor Urut : 05

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Januari, 1999

3000 031993141

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

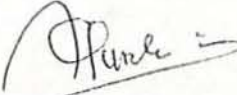


LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN DOSEN MUDA

1. a. Judul Penelitian : Upaya Meningkatkan Translokasi Amilase ke Lingkungan Ekstraselular Selama Proses Fermentasi *Endomycopsis fibuligera*
- b. Macam Penelitian : () Dasar () Terapan (✓.) Pengembangan
- c. Kategori : I / II / III
2. Ketua Peneliti
 - a. Nama Lengkap dan Gelar: Purkan, SSI
 - b. Jenis Kelamin : Laki-laki
 - c. Pangkat/Golongan/NIP : Penata Muda , III/a , 132161176
 - d. Jabatan Fungsional : Asisten Ahli Madya
 - e. Fakultas / Jurusan : MIPA , Jurusan Kimia
 - f. Univ./Akad./Sek.Tinggi : Universitas Airlangga
 - g. Bidang Ilmu yg diteliti : Biokimia
3. Jumlah Tim Peneliti : 3 (tiga) orang
4. Lokasi Peneliti : Fakultas MIPA Universitas Airlangga
5. Kerjasama
 - a. Nama Instansi : -
 - b. Alamat : -
6. Jangka Waktu Penelitian : 6 (enam) bulan
7. Biaya yang Diperlukan : Rp 4.500.000,- (Empat juta lima ratus ribu rupiah)



Surabaya, 17 Maret 1999
Ketua Peneliti


Purkan, SSI
NIP. 132161176



Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian

(Prof. Dr. Noor Choliz Zaini)
NIP. 130355372



UPAYA MENINGKATKAN TRANSLOKASI AMILASE
KE LINGKUNGAN EKSTRASELULAR SELAMA PROSES
FERMENTASI *Endomycopsis fibuligera*

Oleh :

Purkan, SSi

Drs. Sofijan Hadi

Abdulloh, SSi

Dibiayai Oleh : Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Terapan
Kontrak Nomor : 12/P2IPI/DPPM/LITMUD/V/1998
Ditbintabmas, Ditjen Dikti, Depdikbud
Nomor Urut : 12

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA
JANUARI 1999

RINGKASAN

UPAYA MENINGKATKAN TRANSLOKASI AMILASE KE LINGKUNGAN EKSTRASELULAR SELAMA PROSES FERMENTASI *Endomycopsis fibuligera*
(Purkan, Sofijan Hadi, Abdulloh : 1999, 50 halaman)

Amilase dihasilkan oleh *Endomycopsis fibuligera* sebagai enzim ekstraselular yang biosintesisnya diinduksi oleh molekul pati. Enzim ekstraselular adalah enzim yang selama biosintesisnya melewati membran sitoplasma, sedang lokasi akhir ditentukan oleh struktur sel. Selama sekresi beberapa enzim masih tetap terikat pada permukaan luar membran (ektoperifer), terutama pada sel ragi yang mempunyai struktur membran dan dinding sel yang lebih kompleks (Priest,1984). Hal ini akan mengurangi perolehan amilase selama proses fermentasi.

Dalam produksi amilase dari *Endomycopsis fibuligera*, Baktir (1991) melaporkan bahwa proses sekresi amilase dari mikroba tersebut berlangsung kurang baik. Biosintesis amilase berlangsung maksimal pada fase pertumbuhan logaritmik, tetapi aktivitasnya di cairan ekstraselular sangat rendah. Aktivitas tersebut meningkat secara tajam pada jam ke 108 waktu fermentasi, yaitu saat terjadinya lisis sel. Padahal fase kematian terjadi pada jam ke 40 waktu fermentasi. Hal ini menunjukkan bahwa pada saat sel *Endomycopsis fibuligera* sedang aktif pertumbuhannya, sekresi amilase pada saat itu masih rendah. Di samping itu sekresi amilase pada saat lisis ini belum bisa dikatakan maksimal, sebab beberapa amilase masih tetap terikat pada permukaan luar membran (Rogers, 1983). Oleh karena itu perlu peningkatan sekresi amilase ke lingkungan ekstraselular agar diperoleh produktivitas enzim yang tinggi. Translokasi (sekresi) amilase ditingkatkan dengan menggunakan ion logam magnesium dan kalsium yang terkait dengan biosintesis dan pelepasan enzim ke lingkungan ekstraselular.

Tujuan penelitian ini adalah mengungkap peranan ion magnesium dan atau kalsium terhadap proses sekresi amilase dari *Endomycopsis fibuligera* ; menentukan komposisi dan konsentrasi optimum ion magnesium dan atau kalsium yang ada pada

media fermentasi untuk memaksimalkan proses sekresi amilase dari *Endomycopsis fibuligera*; dan menentukan waktu optimum fermentasi amilase dari *Endomycopsis fibuligera* akibat adanya ion magnesium dan atau kalsium dalam media fermentasi.

Peranan Mg dan atau Ca dalam proses sekresi amilase, diungkap dengan cara mengamati produktivitas amilase yang dihasilkan oleh *Endomycopsis fibuligera* yang difermentasi dalam media bebas dan yang mengandung Mg dan atau Ca. Produktivitas amilase yang diamati meliputi aktivitas amilase, kadar protein dan aktivitas spesifik enzim. Ion logam bivalen (Mg dan atau Ca) yang telah memberikan efek sekresi yang paling tinggi, kemudian ditentukan komposisi dan konsentrasi optimum totalnya yang ada pada media fermentasi, untuk memaksimalkan enzim amilase yang dihasilkan. Selain itu dilakukan pula optimasi waktu fermentasi amilase dari *Endomycopsis fibuligera* dalam media yang mengandung Mg dan Ca. Produktivitas amilase yang dihasilkan tiap waktu fermentasi tertentu kemudian dibandingkan terhadap blangko, yaitu fermentasi amilase di media bebas Mg dan Ca.

Dari hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa : penambahan Mg dan Ca dalam media fermentasi mampu meningkatkan produktivitas amilase di lingkungan ekstraselular. Efek sekresi yang ditimbulkan oleh Ca lebih besar dari pada oleh Mg. Sekresi yang lebih besar lagi dapat ditimbulkan oleh hadirnya Mg dan Ca secara simultan di dalam media fermentasi ; sekresi amilase berlangsung optimum oleh campuran Mg dan Ca pada perbandingan komposisi 3 : 1 yang konsentrasi totalnya sebesar 0.2 % ; waktu optimum untuk fermentasi amilase dari *Endomycopsis fibuligera* akibat adanya Mg dan Ca di media fermentasi adalah 72 jam.

Disarankan untuk melakukan kombinasi Mg dan Ca dengan K, Na dan P atau tween 80 dalam fermentasi amilase dari *Endomycopsis fibuligera*, karena ketiga ion ini mempunyai peran penting yang antara lain sebagai sumber fosfat dalam pembentukan ATP selama pertumbuhan mikroba dan juga berperan dalam pengendalian biosintesis protein dan sekresinya keluar sel, terutama tween 80 yang telah diketahui perannya.

(Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Airlangga ; 12/P2IPT/DPPM/LITMUD/V/1998)

SUMMARY

The Effort to Increase Translocation of Amylase to Extracellular Environment During Fermentation of *Endomycopsis fibuligera* (Purkan, Sofijan Hadi, Abdulloh : 1999, 50 pages)

Amylase is an enzyme which biosynthesized by *Endomycopsis fibuligera* as extracellular enzyme. This enzyme will be synthesized, if induced by amylum molecule. Extracellular enzyme refer to any enzymes that crosses the cytoplasmic membrane. The final location of extracellular enzyme will therefore be determined by the structure of the cells. However, some enzymes are still bounded on surface of outer membrane (periplasm), especially yeast which have more complex of membrane structure and cell wall (Priest,1984). This fact will decrease the yield of enzymes during fermentation.

Baktir (1991) reported that the secretory amylase from *Endomycopsis fibuligera* has a weakness. Amylase is synthesized maximally at logarithmic phase, but it's activities in extracellular fluid is low. The top activities was reached at 107 hours of fermentation, which followed by cells lyses. At the moment, the death phase happened at 40 hours of fermentation. This fact shows that the *Endomycopsis fibuligera* cells is lysing, the secretion of amilase becomes lower. In contrast, the secretory amylase in this step can not be called as maximum yet, because some amylases are still bounded at outer membrane of cytoplasmic / periplasm (Rogers,1983). Therefore, an effort to increase the secretory amylase to extracellular surrounding in order to obtained a high productivity is necessary. In this case, the translocation of amylase will be done by using magnesium and calsium ions, which both linked with the synthesis and the secretory amylase to extracellular.

The aim of these researchs are : to know the effect of the present of magnesium and calsium ions in bacth cultures on increasing of amylase secretion; to determined the optimum composition and concentration of the mixture of magnesium and calsium ions in the medium for amylase production; as well as to determine the optimum time of amylase harvest during fermentation in medium which

contains magnesium and calcium ions.

The role of magnesium and calcium ions would be studied by observing the amylase productivity, included the activities, protein concentration and specific activities assay in medium which free or contain magnesium and calcium ions. Both of the metal ions which triggered the secretory amylase more highly, then optimized their composition and total concentration in batch cultures, followed by determination of the optimum time of amylase harvest during fermentation as a result of the present magnesium and calcium in batch cultures.

The research results showed that the presence of magnesium and calcium in batch cultures can trigger the secretory amylase higher than that from medium free of both metal ions. The effect of secretory amylase resulted from magnesium ion treatment lower than calcium ion, and the highest effect was obtained from treatment with mixture of magnesium and calcium together in batch cultures rather than that from magnesium and calcium alone in medium. The magnesium and calcium mixtures which could trigger a highly secretory amylase, have composition of 3 : 1 in total concentration 0.2 %. While the optimum time of amylase harvest as a result of the presence of magnesium and calcium ion in batch cultures is 72 hours of fermentation.

It is suggested to combine magnesium and calcium ions with potassium, sodium, phosphorus or tween 80 (surfactant) to enlarge amylase production from *Endomycopsis fibuligera*, because the three ions are needed by microbial e.g. as phosphorus sources to form ATP and to regulate the biosynthesis and protein secretion to extracellular, especially tween 80 had been known its effect to enhance of secretory amylase.

(Faculty of Mathematic And Natural Science
Airlangga University; 12/P2IPT/DPPM/LITMUD/V/1998)

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat ALLAH SWT, yang telah memberikan rahmatNYA sehingga penelitian yang berjudul “Upaya Meningkatkan Translokasi Amilase Ke Lingkungan Ekstraselular Selama Proses Fermentasi *Endomycopsis fibuligera*” ini dapat diselesaikan.

Pada kesempatan yang sama peneliti mengucapkan terima kasih kepada :

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

Semoga penelitian ini dapat memberikan manfaat.

Surabaya, januari 1999

Peneliti

DAFTAR ISI

	Hal
RINGKASAN	i
SUMMARY	iii
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
BAB I PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.4. Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Amilase	5
2.1.1. Substrat dari amilase	5
2.1.2. Jenis-jenis amilase	6
2.2. Khamir <i>Endomy copsis fibuligera</i>	7
2.3. Pertumbuhan Mikroorganisme	9
2.4. Enzim Ekstraselular	12
2.5. Biosintesis Enzim Ekstraselular	12
2.6. Kontrol Lingkungan Terhadap Sintesis Enzim Ekstraselular	15
2.7. Membran Sitoplasma	16
2.7.1. Lipid penyusun membran sitoplasma	16
2.7.2. Protein penyusun membran sitoplasma	18
2.7.3. Struktur membran model <i>fluid mosaic</i>	19
2.8. Dinding Sel Khamir	20
2.9. Sekresi Enzim	21
BAB III. METODE PENELITIAN	
3.1. Sampel Penelitian	27

3.2. Bahan dan Alat	27
3.3. Cara Kerja	27
3.3.1. Kultivasi ragi	27
3.3.2. Penentuan efek Mg dan Ca terhadap sekresi amilase	28
3.3.3. Optimasi sekresi amilase oleh Mg dan Ca	29
3.3.3.1. Penentuan komposisi optimum Mg dan atau Ca pada proses sekresi amilase	29
3.3.3.2. Penentuan konsentrasi optimum Mg dan atau Ca pada proses sekresi amilase	30
3.3.3.3. Penentuan waktu optimum dalam fermentasi amilase dengan adanya Mg dan atau Ca	31
3.3.4. Uji produktivitas amilase	31
3.3.4.1. Uji aktivitas sakarifikasi	31
3.3.4.2. Uji kadar protein	33
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1. Efek Mg dan Ca Terhadap Sekresi Amilase	34
4.2. Optimasi Sekresi Amilase Oleh Mg dan Ca	37
4.2.1. Komposisi optimum Mg dan Ca pada proses sekresi amilase	38
4.2.2. Konsentrasi optimum campuran Mg dan Ca pada proses sekresi amilase	40
4.2.3. Waktu optimum fermentasi amilase dari <i>Endomycopsis fibuligera</i> dengan adanya Mg dan Ca dalam media fermentasi	43
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1. Kesimpulan	48
5.2. Saran	48
DAFTAR PUSTAKA	49
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

	Hal
Tabel 4.1. Translokasi amilase akibat hadir dan tidaknya Mg dan Ca dalam media fermentasi	35
Tabel 4.2. Translokasi amilase pada berbagai komposisi Mg dan Ca	38
Tabel 4.3. Translokasi amilase oleh berbagai konsentrasi total Mg dan Ca dengan perbandingan 3 : 1	41
Tabel 4.4. Translokasi amilase pada waktu fermentasi tertentu di media bebas dan yang mengandung Mg dan Ca	43
Tabel 4.5. Translokasi amilase di media bebas dan yang mengandung Mg dan Ca pada waktu fermentasi optimum	46

DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar 2.1. Amilosa dan amilopektin	5
Gambar 2.2. Mekanisme hidrolisis pati oleh amilase	7
Gambar 2.3. Kurva pertumbuhan mikroorganisme	11
Gambar 2.4. Transpor protein	15
Gambar 2.5. Lipid dalam air	18
Gambar 2.6. Membran model fluid mosaik	19
Gambar 2.7. Struktur signal peptida protein Lam B dari <i>Escherichia coli</i>	23
Gambar 2.8. Loop model untuk sekresi protein melalui membran	24
Gambar 2.9. Model post translasional dalam mensekresi protein melalui membran	26
Gambar 4.1. Grafik translokasi amilase dengan hadir dan tidaknya Mg dan Ca di media fermentasi	35
Gambar 4.2. Pola translokasi amilase oleh berbagai campuran Mg dan Ca	39
Gambar 4.3. Grafik translokasi amilase pada berbagai konsentrasi total Mg dan Ca dengan komposisi 3 : 1	41
Gambar 4.4. Kurva translokasi amilase pada tiap waktu fermentasi tertentu di media bebas dan yang mengandung Mg dan Ca	44
Gambar 4.5. Grafik sekresi amilase pada waktu fermentasi optimum di media bebas dan yang mengandung Mg dan Ca	46

BAB I

PENDAHULUAN



1.1. Latar Belakang Masalah

Kebutuhan glukosa cair dari tahun ke tahun terus meningkat, hal ini disebabkan oleh tingkat konsumsi masyarakat terhadap produk-produk industri yang semakin tinggi dan juga oleh semakin banyak bermunculan industri-industri baru yang berbahan baku glukosa. Sementara dewasa ini kualitas tetes (molases) semakin menurun, akibat berkembangnya metode pemisahan dan pemurnian gula dalam industri tebu.

Glukosa merupakan bahan baku berbagai industri fermentasi, misal industri alkohol, industri *Mono Sodium Glutamat* (MSG), industri *High Fructose Syrup* (HFS), industri makanan dan minuman (Godfrey,1985).

Pati merupakan bahan baku termurah untuk produksi glukosa cair. Amilase adalah enzim penting yang digunakan untuk mengkonversi pati menjadi sirup glukosa. Di samping itu amilase juga digunakan dalam industri tekstil, penyamakan kulit, detergen dan lain-lain. Sampai saat ini amilase masih diimpor dari negara lain, hal ini menyebabkan ketergantungan dalam kelangsungan produksi glukosa dari pati maupun industri lainnya. Untuk mengatasi hal tersebut perlu dilakukan studi produksi enzim amilase.

Secara umum enzim diproduksi melalui proses fermentasi mikroorganisme kapang. Penggunaan khamir untuk proses ini jarang dilaporkan , padahal diantara 400 jenis khamir yang pernah dikenal dan dipertelakan oleh Lodder (1990), 90 jenis menunjukkan pertumbuhan positif pada medium pati, artinya mampu menghasilkan enzim amilase.

Baktir (1991) melaporkan *Endomycopsis fibuligera* sebagai khamir penghasil amilase dengan aktivitas unggul, yaitu memiliki dua jenis aktivitas *saccharifying* dan *liquefying* yang bekerja secara sinergis dalam menghidrolisis pati. Kemudian Purkan (1995) berhasil memisahkan dua kelompok amilase tersebut dengan metode presipitasi amonium sulfat. Karena keunggulan aktivitas yang dihasilkan oleh ragi ini, maka perlu dikembangkan metode produksinya, sehingga dapat memenuhi kebutuhan amilase di berbagai industri di Indonesia.

Amilase dihasilkan oleh *Endomycopsis fibuligera* sebagai enzim ekstraselular yang biosintesisnya diinduksi oleh molekul pati. Enzim ekstraselular adalah enzim yang selama biosintesisnya melewati membran sitoplasma, sedang lokasi akhir ditentukan oleh struktur sel. Selama sekresi, beberapa enzim masih tetap terikat pada permukaan luar membran (ektoperifer), terutama pada sel ragi yang mempunyai struktur membran dan dinding sel yang lebih kompleks (Priest, 1984). Hal ini akan mengurangi perolehan amilase selama proses fermentasi.

Dalam produksi amilase dari *Endomycopsis fibuligera*, Baktir (1991) melaporkan bahwa proses sekresi amilase dari mikroba tersebut berlangsung kurang baik. Biosintesis amilase berlangsung maksimal pada fase pertumbuhan logaritmik, tetapi aktivitasnya di cairan ekstraselular sangat rendah. Aktivitas tersebut meningkat secara tajam pada jam ke 107 waktu fermentasi, yaitu saat terjadinya lisis sel. Padahal fase kematian terjadi pada jam ke 40 waktu fermentasi. Hal ini menunjukkan bahwa pada saat sel *Endomycopsis fibuligera* sedang aktif pertumbuhannya, sekresi amilase pada saat itu masih rendah. Di samping itu sekresi amilase pada saat lisis ini belum bisa dikatakan maksimal, sebab beberapa amilase masih tetap terikat pada permukaan luar

membran (Rogers, 1983). Oleh karena itu perlu peningkatan sekresi amilase ke lingkungan ekstraselular agar diperoleh produktivitas enzim yang tinggi.

Upaya untuk meningkatkan translokasi (sekresi) amilase telah dilakukan sejak produksinya. Seperti Sen dan Chakrabarty (1984) yang menambahkan tween 80 pada media fermentasi *Lactobacillus cellobiosis* dan dilaporkan bahwa tween 80 efektif meningkatkan sekresi amilase dari mikroba tersebut. Bambang Go (1996), melaporkan bahwa hadirnya tween 80 konsentrasi rendah pada media fermentasi dapat meningkatkan sekresi amilase dari *Endomycopsis fibuligera*.

Sementara itu Wisdom *et al.* (1996) melaporkan bahwa Mg^{2+} dapat menimbulkan efek sekresi amilase dari isolat segmen pankreas. Pirt (1982) menyatakan tentang peranan ion-ion logam bivalen bagi sel. Disebutkan bahwa magnesium mempunyai arti penting dalam proses biosintesis dan translokasi protein ke luar sel (sekresi enzim), sedangkan unsur fosfor mempunyai peran dalam proses pertumbuhan dinding sel. Selain itu Edgington (1992) melaporkan bahwa ion kalsium mampu memacu proses sekresi protein keluar sel dengan cara meningkatkan terjadinya folding protein selama proses sekresi sedang berlangsung.

Pada kesempatan ini, akan dicoba meningkatkan produktivitas amilase dari *Endomycopsis fibuligera* dengan ion logam magnesium dan kalsium yang terkait dengan biosintesis dan pelepasan enzim ke lingkungan ekstraselular.

1.2. RUMUSAN MASALAH

Permasalahan penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Apakah produktivitas amilase dari *Endomycopsis fibuligera* dapat ditingkatkan dengan adanya magnesium dan atau kalsium di dalam media fermentasi ?.

2. Berapakah komposisi dan konsentrasi optimum magnesium dan atau kalsium yang ditambahkan pada media fermentasi agar sekresi amilase dari *Endomycopsis fibuligera* dapat berlangsung maksimal ?
3. Berapakah waktu optimum fermentasi amilase dari *Endomycopsis fibuligera* akibat adanya ion magnesium dan atau kalsium dalam media fermentasi ?

1.3. TUJUAN PENELITIAN

Penelitian ini bertujuan

1. Mengungkap peranan ion magnesium dan atau kalsium terhadap proses sekresi amilase dari *Endomycopsis fibuligera*.
2. Menentukan komposisi dan konsentrasi optimum ion magnesium dan atau kalsium pada media fermentasi untuk memaksimalkan proses sekresi amilase dari *Endomycopsis fibuligera*.
3. Menentukan waktu optimum fermentasi amilase dari *Endomycopsis fibuligera* akibat adanya ion magnesium dan atau kalsium dalam media fermentasi.

1.4. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian diharapkan dapat digunakan sebagai dasar bagi upaya pengembangan produksi amilase terutama berkaitan dengan peningkatan produktivitas amilase dari *Endomycopsis fibuligera*, sehingga bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan maupun aplikasinya di industri.

BAB II

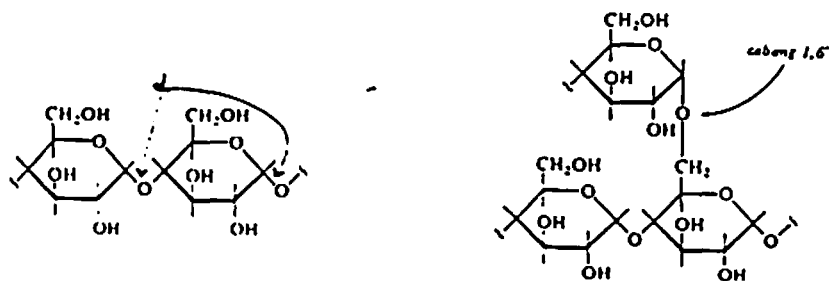
TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Amilase

Amilase adalah enzim yang menghidrolisis pati, glikogen dan polisakarida lain dengan cara memutus ikatan glikosidik α -1,4 dan atau α -1,6.

2.1.1. Substrat dari amilase

Substrat bagi amilase adalah pati, glikogen dan polisakarida lain. Pati merupakan polisakarida yang melimpah di alam. Pati dapat dipisahkan menjadi dua fraksi utama, yaitu amilosa dan amilopektin. Amilosa adalah polimer linear dari α -D-glukosa yang dihubungkan dengan ikatan glikosidik α -1,4. Sedangkan amilopektin, strukturnya berupa polimer bercabang dari α -D-glukosa. Rantai utamanya mengandung ikatan glikosidik α -1,4. Titik percabangan berupa ikatan glikosidik α -1,6 (Fessenden dan Fessenden, 1990).



Gambar 2.1 Amilosa dan amilopektin (Fessenden dan Fessenden, 1990)

Glikogen adalah polisakarida wujud penyimpanan glukosa dalam sistem hewan. Struktur glikogen mirip amilopektin. Di dalamnya terdapat ikatan glikosidik α -

1,4 (rantai utama) dan ikatan glikosidik α -1,6 (cabang). Glikogen lebih bercabang dibanding amilopektin (Fessenden dan Fessenden, 1990).

2.1.2. Jenis-jenis amilase

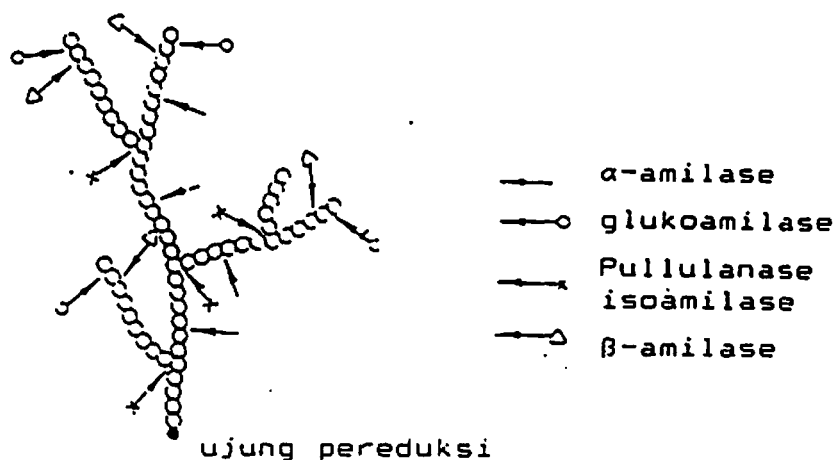
Dari mekanisme hidrolisisnya, amilase dibagi menjadi 4 golongan, yaitu α -amilase, β -amilase, glukoamilase dan enzim pemutus cabang.

α -Amilase menghidrolisis secara acak ikatan glikosidik α -1,4. Enzim ini merupakan *endoenzyme*, memutus ikatan dari bagian dalam molekul substrat. Kerja dari α -amilase tidak dihambat oleh ikatan glikosidik α -1,6 dan ikatan ini tidak terhidrolisis (Crueger and Crueger, 1989). Hasil hidrolisis dari amilosa berupa maltosa (disakarida) sampai maltoheksosa. Hidrolisis dari amilopektin menghasilkan glukosa, maltosa, dan beragam α -dekstrin yang mempunyai ikatan glikosidik α -1,6 di samping ikatan α -1,4 (Priest, 1984).

β -Amilase merupakan *exoenzyme* dan menghidrolisis ikatan glikosidik α -1,4 dari ujung-ujung non pereduksi secara berseling menghasilkan maltosa (anomer β). Enzim ini tidak dapat menghidrolisis serta melewati ikatan glikosidik α -1,6 sehingga pada hidrolisis amilopektin bisa dihasilkan β -dekstrin (Priest, 1984).

Glukoamilase bekerja sebagai *exoenzyme*, menghidrolisis ikatan glikosidik α -1,4 dari ujung-ujung non pereduksi menghasilkan β -D-glukosa. Ikatan glikosidik α -1,6 juga terhidrolisis meskipun dengan laju yang rendah (Priest, 1984).

Enzim pemutus cabang menghidrolisis ikatan glikosidik α -1,6. Ada 2 macam enzim ini, yaitu pullulanase dan isoamilase (Crueger and Crueger, 1989).



Gambar 2.2 Mekanisme hidrolisis pati oleh amilase (Crueger and Crueger, 1989)

Berdasarkan produk akhir hidrolisisnya, amilase digolongkan menjadi *Saccharifying amylase* dan *Liquefying amylase*. Golongan pertama memberi produk akhir hidrolisis gula bebas. Golongan kedua tidak menghasilkan gula bebas pada hidrolisisnya (Crueger and Crueger, 1989).

Saccharifying amylase merupakan *exoenzim*. Enzim ini memutus ikatan glikosidik dari ujung-ujung non pereduksi. Molekul-molekul monomer atau dimer dibebaskan. Contoh golongan ini adalah β -amilase dan glucoamilase (Crueger and Crueger, 1989).

Liquefying amylase menyerang substrat pada bagian dalam molekul (*endoenzyme*). Hasil hidrolisis adalah oligosakarida. Yang termasuk golongan ini adalah α -amilase dan enzim-enzim pemutus cabang (Crueger and Crueger, 1989).

2.2. Khamir *Endomyces fibuliger*

Kedudukan *E. fibuliger* di dalam taksonomi adalah sebagai berikut :

Divisi : Thalophita
 Kelas : Ascomycetes

Sub kelas	: Hemiascomycetidae
Ordo	: Endomycetales
Famili	: Saccharomycetaceae
Sub famili	: Saccharomycoidene
Tribe	: Endomycopseae
Genus	: <i>Endomy copsts</i>
Spesies	: <i>Endomy copsts fibuligera</i>

(Prescott, 1962)

Baktir (1991) melaporkan sekresi amilase dari *E. fibuligera* selama proses fermentasi. Media produksi yang dipakai terdiri dari pati sago sebagai sumber karbon dan ekstrak ragi sebagai sumber nitrogen, vitamin dan mineral. Perbedaan komposisi pati sago dan ekstrak ragi memberikan perbedaan pola produksi amilase selama fermentasi. Aktivitas amilase tertinggi diperoleh bila menggunakan media pati sago 1 % dan ekstrak ragi 1 %, yang menunjukkan puncak kurva aktivitas pada waktu fermentasi 107 jam.

Memurut Baktir (1991), aktivitas amilase dari *E. fibuligera* dalam cairan ekstraselular rendah pada fase logaritmik sampai stasioner. Aktivitas amilase meningkat secara tajam pada fase kematian sel dan maksimum pada saat terjadi lisis sel.

Amilase dari *E. fibuligera*, dilaporkan oleh Baktir (1991), memberikan aktivitas sakarifikasi 15.24 U/ml (aktivitas spesifik = 5.91), sekaligus aktivitas likuifikasi (1ml ekstrak kasar amilase mencerna 3.193 mgram pati sago permenit pada kondisi percobaan). Diduga bahwa *E. fibuligera* menghasilkan 2 jenis amilase.

Saccharifying amylase dan Liquefying amylase yang bekerja secara sinergis dalam memecah pati menjadi glukosa.

2.3. Pertumbuhan Mikroorganisme

Pertumbuhan didefinisikan sebagai penambahan secara teratur semua komponen dalam sel. Pada organisme uniselular, pertumbuhan merupakan penambahan jumlah sel yang berarti juga penambahan jumlah organisme (Fardiaz, 1992).

Pertumbuhan mikroorganisme di dalam suatu kultur digambarkan sebagai suatu kurva seperti terlihat pada gambar 2. 3. Fase-fase pertumbuhan mikroorganisme yang diamati antara lain fase adaptasi, fase pertumbuhan awal, fase pertumbuhan logaritmik, fase pertumbuhan lambat, fase pertumbuhan tetap, fase menuju kematian dan fase kematian (Fardiaz, 1992).

a. Fase Adaptasi

Pada fase ini mikroorganisme berusaha menyesuaikan dengan substrat dan kondisi lingkungan baru di sekitarnya. Pada saat ini sel belum membelah oleh karena beberapa enzim belum dapat disintesis. Jumlah sel pada fase ini mungkin tetap, tetapi kadang-kadang menurun. Lamanya fase ini bervariasi, dapat cepat atau lambat tergantung dari kecepatan penyesuaian dengan lingkungan di sekitarnya.

Lamanya fase adaptasi dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya adalah:

(1) Medium dan lingkungan pertumbuhan

Sel yang ditempatkan dalam medium dan lingkungan pertumbuhan sama seperti medium dan lingkungan sebelumnya, mungkin tidak diperlukan waktu adaptasi. Tetapi jika nutrien yang tersedia dan kondisi lingkungan yang baru sangat berbeda dengan yang sebelumnya, diperlukan waktu penyesuaian untuk mensintesis enzim-

enzim yang dibutuhkan untuk metabolisme.

(2) Jumlah inokulum

Jumlah awal sel yang semakin tinggi akan mempercepat fase adaptasi. Fase adaptasi mungkin berjalan lambat karena berbagai sebab, misalnya : (1) kultur dipindahkan dari medium yang kaya nutrisi ke medium yang kandungan nutrisinya terbatas, (2) mutan yang baru terbentuk menyesuaikan diri dengan lingkungannya, (3) kultur yang dipindahkan dari fase statis ke medium baru dengan komposisi sama seperti sebelumnya.

b. Fase Pertumbuhan Awal

Setelah mengalami fase adaptasi, sel mulai membelah dengan kecepatan yang masih rendah karena baru selesai tahap penyesuaian diri.

c. Fase Pertumbuhan Logaritmik

Pada fase ini sel jasad renik membelah dengan cepat dan konstan, yang pertambahan jumlahnya mengikuti kurva logaritmik. Pada fase ini kecepatan pertumbuhannya sangat dipengaruhi oleh medium tempat tumbuhnya seperti pH dan kandungan nutrisi juga kondisi lingkungan termasuk suhu dan kelembaban udara. Pada fase ini sel membutuhkan energi lebih banyak dibandingkan dengan fase lainnya, selain itu sel paling sensitif terhadap keadaan lingkungan.

d. Fase Pertumbuhan Lambat

Pada fase ini pertumbuhan populasi jasad renik diperlambat karena beberapa sebab, misalnya : (1) zat nutrisi di dalam medium sudah sangat berkurang, (2) adanya hasil-hasil metabolisme yang mungkin beracun atau dapat menghambat pertumbuhan jasad renik. Pada fase ini pertumbuhan sel tidak stabil, tetapi jumlah populasi masih

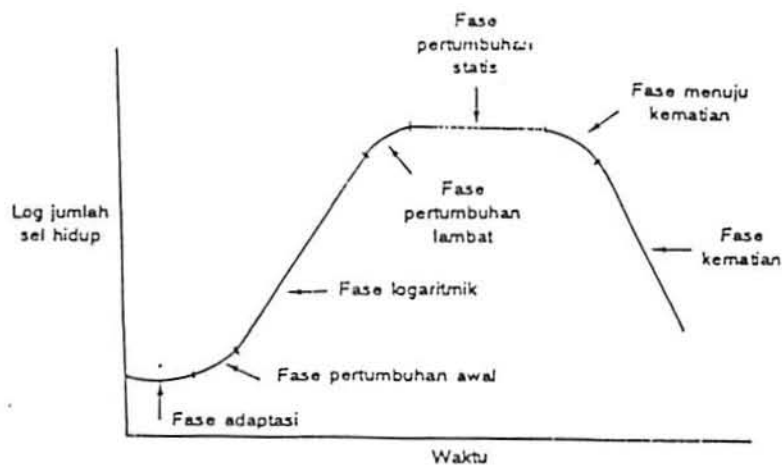
naik karena jumlah sel yang tumbuh masih lebih banyak daripada jumlah sel yang mati.

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 pada fase ini menjadi lebih kecil, karena sel tetap membelah meskipun zat nutrisi sudah mulai habis. Akibat kekurangan zat nutrisi, sel kemungkinan mempunyai komposisi berbeda dengan sel yang tumbuh pada fase logaritmik. Pada fase ini sel-sel menjadi lebih tahan terhadap keadaan ekstrem seperti panas, dingin, radiasi, dan bahan kimia.

f. Fase Menuju Kematian dan Fase Kematian

Pada fase ini sebagian populasi jasad renik mulai mengalami kematian karena beberapa sebab, yaitu : (1) nutrien di dalam medium sudah habis, (2) energi cadangan di dalam sel habis. Jumlah sel yang mati semakin lama akan semakin banyak, dan kecepatan kematian dipengaruhi oleh kondisi nutrien, lingkungan, dan jenis jasad renik.



Gambar 2.3 Kurva pertumbuhan mikroorganisme (Fardiaz, 1992)

2.4. Enzim Ekstraselular

Mikroorganisme heterotrof membutuhkan berbagai macam makromolekul sebagai makanannya. Cara memasukkan makanan dan metabolismenya adalah dengan pagositosis dan pignositosis. Cara ini hanya bisa ditempuh oleh mikroba yang tidak berdinding sel. Bagi mikroba yang berdinding sel ditempuh cara lain, yaitu sekresi enzim ekstraselular. Enzim dikeluarkan dari sel ke lingkungan untuk mendegradasi bahan polimer menghasilkan produk berberat molekul rendah yang dapat diserap sel. Enzim ekstraselular dengan demikian dapat didefinisikan sebagai enzim yang disekresikan melewati membran sitoplasma sel. Kebanyakan enzim ekstraselular adalah depolimerase (Priest, 1984).

Lokasi enzim ekstraselular bermacam-macam. Enzim ini keluar melalui membran dan mungkin tertahan oleh dinding sel untuk sementara waktu tetapi akhirnya dapat berdifusi keluar. Kemungkinan lain, enzim menempel pada bagian luar membran (Priest, 1984).

2.5. Biosintesis Enzim Ekstraselular

Secara umum biosintesis protein (termasuk enzim) berlangsung melalui tahap transkripsi dan translasi, dengan melibatkan molekul-molekul DNA dan RNA. Atas dasar fungsinya RNA dibedakan menjadi tiga macam, yaitu RNA messenger (mRNA), RNA transfer (tRNA), dan ribosom RNA (rRNA). Hubungan DNA, RNA, dan protein dalam jalur biosintesis protein adalah sebagai berikut :



(Watson, Tooze and Kurtz, 1988)



Transkripsi merupakan proses sintesis RNA dengan cetakan DNA dalam nukleus sel. Molekul hasil transkripsi dinamakan transkrip primer. Transkrip primer, selagi berada dalam nukleus, mengalami banyak proses (pemutusan, penggabungan, dan modifikasi rantai) menghasilkan mRNA, tRNA, dan rRNA yang siap menuju sitoplasma (Watson, Tooze and Kurtz, 1988).

Selanjutnya dalam sitoplasma terjadi translasi. Translasi adalah proses menerjemahkan urutan basa pada mRNA ke dalam urutan asam amino suatu polipeptida yang disintesis. Sintesis protein terjadi di ribosom. Tahap-tahap sintesis protein meliputi tahap inisiasi, elongasi dan terminasi (Stryer, 1981).

Tahap inisiasi meliputi penggabungan mRNA, sub unit ribosom 40 S, dan $tRNA_f^{met}$ membentuk kompleks inisiasi 60 S. Posisi $tRNA_f^{met}$ adalah sedemikian rupa sehingga antikodon berpasangan dengan kodon inisiasi AUG pada mRNA. Kemudian sub unit ribosom 60 S bergabung membentuk kompleks inisiasi 80 S. Pada ribosom, $tRNA_f^{met}$ terletak pada sisi P (peptidil). Sedangkan sisi A (aminoasil), yaitu sisi lain dari ribosom yang dapat ditempati molekul tRNA lain, masih kosong (Stryer, 1981).

Tahap elongasi dimulai dengan terikatnya aminoasil tRNA pada sisi A ribosom. Aminoasil-tRNA ini mempunyai antikodon yang komplementer dengan kodon mRNA yang ada di sisi A. Selanjutnya terjadi ikatan peptida. Unit metionin dari $tRNA_f^{met}$ (sisi P) ditransfer ke gugus amino dari aminoasil -tRNA (sisi A) membentuk dipeptidil-tRNA. Setelah itu translokasi terjadi. Pada proses ini tRNA kosong terlepas dari sisi P, peptidil-tRNA yang semula di sisi A menduduki sisi P, dan mRNA bergeser sejauh tiga nukleotida. Sisi A yang kosong siap untuk diisi lagi dengan

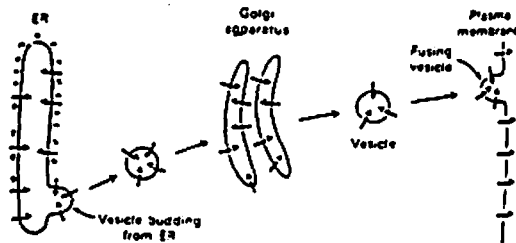
aminoasil-tRNA yang lain. Siklus ini berlangsung terus selama perpanjangan rantai (Stryer, 1981).

Tahapa terminasi terjadi ketika sisi A ribosom berisi kodon terminasi, yaitu UAA, UGA, atau UAG. Sel normal tidak mempunyai tRNA yang anti kodonnya komplementer dengan kodon-kodon ini. Akan tetapi kodon terminasi dikenali oleh suatu protein release factor yang akan terikat padanya. Pengikatan ini akan mengaktifkan peptidil transferase yang menghidrolisis ikatan antara polipeptida dan tRNA pada sisi P (Stryer, 1981).

Ribosom dalam sel ditemukan bebas dalam sitoplasma atau terikat pada retikulum endoplasma (RE). Ribosom yang terikat pada RE biasanya mensintesis protein membran dan protein yang akan disekresikan keluar sel. Suatu ribosom dapat diarahkan ke RE dengan adanya suatu sinyal (*Signal Hypothesis*). Sinyal ini berupa urutan asam amino yang dekat dengan ujung amino suatu polipeptida yang baru tumbuh. Diketahui bahwa urutan asam amino ini sebagian besar terdiri dari asam amino non polar. Sinyal ini dikenal oleh protein reseptor pada membran RE sehingga ribosom dapat terikat pada RE. Polipeptida yang baru tumbuh dapat langsung menembus membran RE menuju bagian luminal RE. Peristiwa ini bersamaan dengan proses perpanjangan rantai (cotranslational). Namun ada juga protein yang menembus membran setelah sintesis selesai (posttranslational). Pada luminal RE terjadi pemutusan residu sinyal oleh peptidase juga pengikatan karbohidrat membentuk glikoprotein (Stryer, 1981).

Selanjutnya terjadi pemindahan protein ke badan Golgi. Di badan Golgi terjadi glikosilasi lebih lanjut. Transpor protein baik dari RE ke badan Golgi ataupun dari

badan Golgi ke tempat sasaran, misalnya membran sitoplasma, melibatkan suatu vesikel. Vesikel terbentuk dari membran RE atau badan Golgi. Vesikel ini bergerrak ke membran sitoplasma, meleburkan diri dengan membran untuk mencurahkan seluruh isinya (eksositosia), (Schlegel, 1994).



Gambar 2.4 Transpor protein (Stryer, 1981)

2.6. Kontrol lingkungan terhadap sintesis enzim ekstraselular

Enzim ekstraselular biasanya dikontrol oleh lingkungan. Jika laju sintesis suatu enzim konstan pada waktu ada atau tidak ada substrat maka enzim ini dikatakan konstitutif. Walaupun demikian, pada kebanyakan sintesis enzim merupakan proses induktif. *Inducible enzyme* disintesis dengan laju yang rendah ketika substrat tidak ada. Pada waktu substrat ditambahkan ke medium, terjadi peningkatan laju sintesis secara drastis. Jika substrat selaku *inducer* tadi diambil maka laju sintesis akan menurun ke keadaan semula (Priest, 1984).

Mikroorganisme dapat mendeteksi adanya makromolekul (*inducer*) di lingkungannya dan kemudian meningkatkan laju sintesis enzim. Hal ini dimungkinkan karena enzim tetap diproduksi dengan laju rendah meskipun tidak ada substrat. Ketika substrat ditambahkan ke dalam medium terjadi pemecahan substrat oleh enzim. Produk

pemecahan inilah yang masuk ke sel dan menginduksi sintesis enzim ke laju yang lebih tinggi. Pada waktu produk terakumulasi secara berlebih, sintesis enzim akan dihambat oleh produk itu melalui mekanisme *end-product repression*. Mekanisme induksi dan represi ini, secara molekular menyangkut pengaturan transkripsi dari gen-gen pengkode enzim yang akan disintesis (Priest, 1984).

2.7. Membran Sitoplasma

Membran sitoplasma adalah membran sel yang terletak di antara sitoplasma dan dinding sel (Fardiaz, 1992).

Membran ini berperan mengatur keluar masuknya berbagai senyawa dari dan ke dalam sel. Hasil-hasil buangan metabolisme dikeluarkan melalui membran. Juga enzim-enzim yang diperlukan untuk degradasi makanan terkandung dalam membran ini (Fardiaz, 1992). Beberapa enzim bahkan perlu disekresikan melalui membran ke lingkungan untuk mendegradasi makanan sebelum makanan itu bisa masuk ke dalam sel. Enzim demikian dinamakan enzim ekstraselular (Priest, 1984).

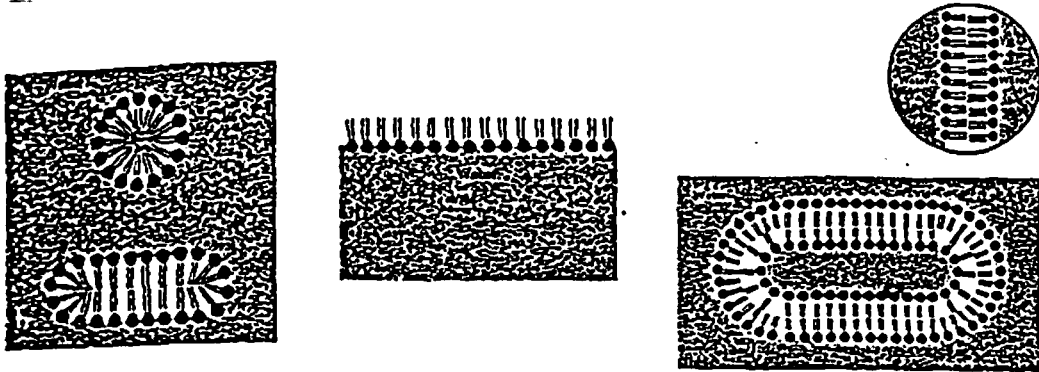
2.7.1. Lipid penyusun membran sitoplasma

Membran pada umumnya mengandung lipid, suatu golongan senyawa organik yang tidak larut dalam air (polar) tetapi larut dalam pelarut organik (non polar) (Lehninger, 1975).

Beberapa jenis lipid mempunyai sifat amfipatik, yaitu mempunyai gugus hidrofilik dan hidrofobik dalam strukturnya. Lipid yang mempunyai sifat seperti ini di antaranya meliputi : fosfolipid, glikosfingolipid dan sterol.

a. Fosfolipid : lipid yang mempunyai gugus ester fosfat. Contoh :

Lipid amfipatik apabila dimasukkan ke dalam air akan menata dirinya sedemikian rupa sehingga gugus hidrofiliknya akan berinteraksi langsung dengan air. Ada 3 kemungkinan bentuk, yaitu misel, *monolayer*, dan *bilayer*.



Gambar 2.5 Lipid dalam air (Lehninger, 1975)

Membran sitoplasma, seperti halnya membran-membran lain dari sel, mempunyai lipid dalam susunan bilayer (Lehninger, 1975).

Pada membran sel eukariot, lipid yang menyusun lebih bervariasi dibanding pada membran prokariot. Rantai asam lemak dari membran eukariot lebih banyak mengandung ikatan tak jenuh (Fardiaz, 1992). Pengaruh variasi dan derajat kejenuhan dari asam lemak ini akan dipaparkan dalam sub bab lain.

2.7.2. Protein penyusun membran sitoplasma

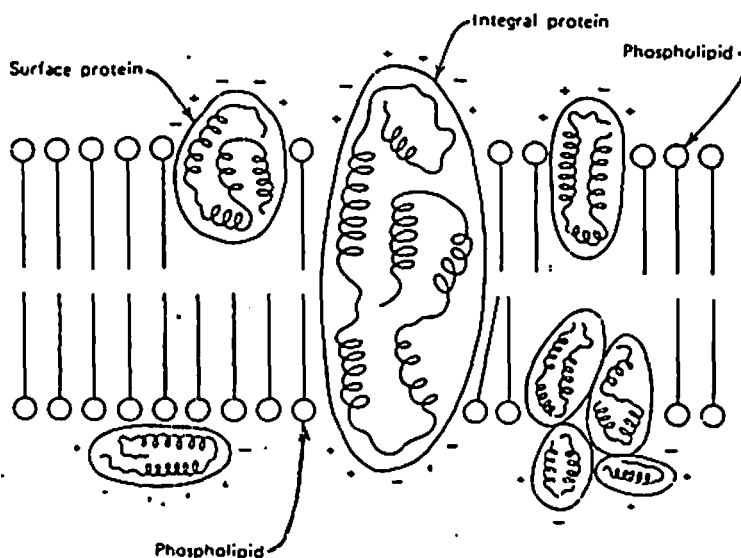
Penyusun utama membran sitoplasma yang lain adalah protein. Protein merupakan suatu polipeptida atau polimer dari asam amino. Pada membran, protein yang merupakan rantai polimer panjang ini melipat dirinya menjadi bentuk globular. Pada permukaan globular ini terdapat gugus hidrofilik maupun hidrofobik. Dalam hal ini protein membran bersifat amfipatik (Price, 1979).

Protein membran dapat dibagi dalam 2 kategori. Kategori pertama adalah protein ekstrinsik atau perifer. Protein ini melekat pada permukaan membran dengan ikatan yang lemah sehingga mudah dilepaskan. Yang kedua adalah protein intrinsik atau integral yang terikat kuat pada lipid membran sehingga sulit dilepaskan (Lehninger,1975).

2.7.3. Struktur membran model fluid mosaik

Berbagai hipotesis yang mencoba menjelaskan struktur membran telah dikemukakan tetapi yang paling banyak diterima adalah hipotesis fluid mosaik.

Model ini menerangkan bahwa lipid pada membran tersusun *bilayer*. Protein globular dapat masuk sebagian atau sepenuhnya ke dalam lapisan lipid ini. Seberapa jauh protein dapat masuk ditentukan oleh distribusi gugus polar dan non polar dari permukaannya. Dalam hal ini terjadi interaksi hidrofilik dan hidrofobik yang maksimal antara bagian-bagian dari protein dan lipid (Price,1979).



Gambar 2.6 Membran model fluid mosaik (Price,1979)

Lapisan bilayer dari lipid ternyata memiliki keadaan yang dinamis. Molekul

lipid dapat berdifusi secara lateral pada bidang membran. Demikian juga molekul membran lain, termasuk protein globular, dapat mengadakan transpor pada membran. Inilah yang dinamakan sifat fluiditas membran (Price, 1979).

Faktor penting yang berpengaruh pada fluiditas membran adalah kemungkinan Bergeraknya rantai hidrokarbon dari lipid. Rantai yang terdiri dari ikatan tunggal (-CH₂-CH₂-) akan membentuk struktur yang rigid dan kompak dengan rantai lain yang juga berisi ikatan tunggal. Akan tetapi bila terdapat ikatan rangkap (-CH=CH-) maka akan terjadi lekukan pada posisi ikatan rangkap itu. Strukturnya tidak akan kompak sehingga menimbulkan sifat fluiditas yang besar. Jadi semakin beragam tipe lipid pada membran, apalagi terdapat ikatan rangkap, semakin besar sifat fluiditasnya (Price, 1979). Fluiditas dari rantai hidrokarbon ini mempunyai arti yang penting dalam beberapa hal :

- a) Memungkinkan mobilitas dari molekul membran, misalnya protein.
- b) Memungkinkan terjadinya akomodasi yang lebih baik terhadap permukaan hidrofobik yang tidak teratur dari protein.
- c) Tersedianya daerah yang memungkinkan terjadinya difusi lateral dari berbagai molekul membran (Robertson, 1983).

2.8. Dinding sel khamir

- a) Dinding sel khamir pada sel-sel yang masih muda sangat tipis, dan semakin lama semakin tebal jika sel semakin tua. Komponen-komponen dari dinding sel khamir adalah : Glukan khamir, disebut juga selulosa khamir. Komponen ini merupakan polimer glukosa dengan ikatan glikosidik β -1,3 dan β -1,6. Glukan merupakan komponen terbesar dari dinding sel khamir.

- b) Mannan adalah polisakarida yang terdiri dari unit-unit D-manosa dengan ikatan glikosidik α -1,6 ; α -1,2 ; dan sedikit α -1,3.
- c) Protein, jumlahnya relatif konstan, yaitu 6-8 % dari berat kering dinding sel. Protein yang terdapat pada dinding sel termasuk enzim yang memecah substrat yang akan diserap.
- d) Khitin, merupakan polimer linear dari N-asetilglukosamin dengan ikatan glikosidik β -1,4. Khitin yang terdapat pada dinding sel jamur menyerupai khitin yang terdapat pada skeleton luar serangga tetapi derajat polimerisasinya lebih kecil sehingga lebih mudah larut.
- e) Lipid, terdapat dalam jumlah 8.5-13.5 % (Fardiaz, 1992).

Beberapa jamur, dinding selnya ditutupi oleh komponen ekstraselular yang berlendir yang disebut kapsul.

Komponen dari kapsul ini meliputi polisakarida termasuk fosfomannan dan heteropolisakarida. Heteropolisakarida merupakan polimer yang mengandung lebih dari 1 macam unit glukosa, seperti pentosa, heksosa dan asam glukuronat. Kapsul mungkin juga mengandung komponen hidrofobik yang tergolong sphingolipid (Fardiaz, 1992).

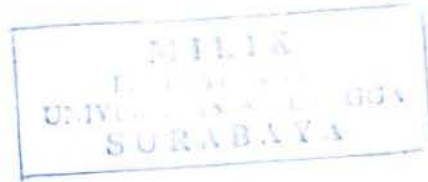
2.9. Sekresi Enzim

Sekresi enzim merupakan suatu proses transpor protein enzim ke lingkungan ekstraselular. Dari sitoplasma tempat enzim disintesis, enzim disekresi dengan cara menembus membran sel dan berdifusi keluar sel. Proses sekresi ini diselenggarakan oleh ribosom baik yang bebas di sitoplasma maupun yang terikat pada membran. Untuk enzim ekstraselular, proses sekresi merupakan tahap akhir daripada biosintesis enzim

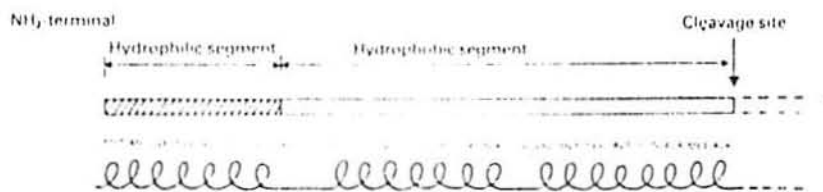
dan hal ini sangat penting sebab sekresi yang optimum akan meningkatkan dari suatu produk enzim. Dalam bakteri gram positif dan jamur, enzim ekstraselular ditranspor dari dalam sel melalui membran sitoplasma dan berdifusi menembus dinding sel, yang selanjutnya terkumpul di lingkungan. Tetapi pada bakteri gram negatif, dinding sel tersebut tersusun atas dua membran yang dipisah oleh lapisan periplasma, di mana kebanyakan enzim ditempatkan. Namun demikian, pada intinya bahwa semua enzim-enzim tersebut akan disekresi melalui penembusan terhadap membran, yang mekanisme sekresinya dapat ditelaah dengan menggunakan *signal* hipotesis (Priest, 1984).

Sekresi protein memerlukan suatu prekursor, berupa protein dengan rantai polipeptida yang lebih panjang daripada protein target (protein ekstraselular). Hal ini disebabkan karena bentuk prekursor tersebut berisi sejumlah rantai pendek tambahan kira-kira 15 sampai 32 unit asam amino. Rantai peptida pendek ini mengandung sebuah residu NH-terminal, berasal dari ribosom dan selanjutnya disebut sebagai *signal* atau *leader* peptida. Analisa terhadap struktur primer dari *signal* peptida sejumlah organisme eukariot dan prokariot didapatkan bahwa masing-masing *signal* peptida menunjukkan tingkat homologi yang kecil. Walaupun demikian, pada dasarnya bahwa semua *signal* peptida tersusun dari dua daerah, pertama daerah hidrofilik yang mengandung residu NH-terminal dan kedua daerah dengan residu asam amino-asam amino hidrofobik. Di samping itu diketahui juga tentang karakteristik yang ada pada daerah hidrofilik di antaranya : terdiri dari satu hingga tujuh unit asam amino, berstruktur hampir sama pada setiap organisme dan kurang banyak berperan dalam proses sekresi protein.

Lain halnya dengan daerah hidrofobik, daerah ini mempunyai peran yang cukup



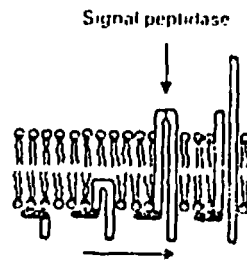
berarti. Karakteristik yang ada pada daerah ini yaitu mempunyai panjang kurang lebih 55⁰A (sekitar 15 hingga 19 unit asam amino), ujung terminasinya berupa asam amino berantai samping pendek seperti glisin atau alanin, dan letak ujung terminal tersebut berada tepat sebelum sisi pemotongan rantai peptida oleh enzim peptidase. Karakter yang lain adalah bahwa biasanya di bagian tengah dari daerah ini berisi residu prolin atau glisin yang berada pada posisi sekitar 17. Residu tengah ini sangat membantu untuk memprediksi tentang keberadaan struktur sekunder yang ada pada daerah tersebut. Sebab telah diidentifikasi bahwa daerah hidrofobik tersebut mempunyai kemampuan untuk membentuk dua konformasi α heliks, yang keduanya dipisah oleh residu polar pada posisi 17. Pembentukan struktur heliks sangat penting sekali sebab akan memacu berlangsungnya proses sekresi enzim ke lingkungan. Tentang struktur dan konformasi dari signal peptida yang telah disebutkan di atas, tercantum pada gambar 2.7.



Gambar 2.7 Struktur signal peptida protein Lam B dari *Escherichia coli*

Inouye dan Halegoue (1980) mengemukakan suatu model yang menghubungkan antara struktur dan fungsi dari *signal* peptida dalam proses sekresi enzim, yang kemudian dikenal sebagai *loop model*. Model ini mengemukakan bahwa dalam sekresi

protein, daerah hidrofilik *signal* peptida akan terikat pada *inner* membran sitoplasma yang bermuatan negatif. Selama protein ditranslasi, bagian hidrofobik yang merupakan ekor dari *signal* peptida menembus ke dalam membran secara aktif sampai sisi potongnya membentuk loop di luar membran. *Loop* tersebut selanjutnya diputus oleh enzim peptidase untuk membebaskan *signal* peptida dari rantai awal polipeptida target yang sedang tumbuh. Dengan kata lain, model ini menyatakan bahwa protein disekresi secara *cotranslasional* (gambar 2.8).



Gambar 2.8. Loop model untuk sekresi protein melalui membran (Inouye & Halegoua, 1980)

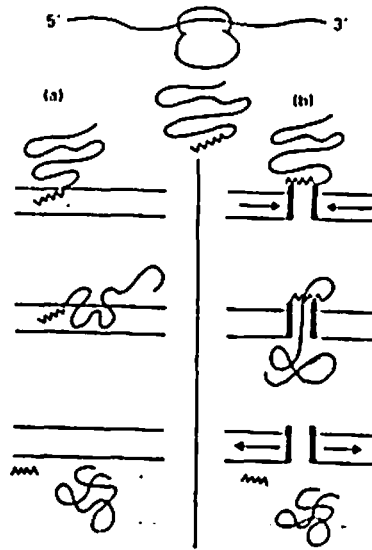
Atas dasar keterkaitannya dengan proses translasi (biosintesis protein), maka sekresi protein dibedakan atas dua jenis, yaitu sekresi *cotranslasional* dan *post translasional*. Dikatakan *cotranslasional*, oleh karena selama rantai polipeptida sedang diperpanjang oleh faktor EFTU, secara simultan pula rantai tersebut menembus membran sitoplasma untuk melakukan proses sekresi. Hal ini dapat diamati pada gambar 2.8 di atas. Jenis sekresi ini menerangkan tentang mekanisme proses sekresi melalui pembentukan struktur folding protein. Agar dapat disekresi, protein membentuk folding untuk mempermudah dalam penembusan terhadap membran. Sesampainya di luar membran, rantai polipeptida membentuk loop agar mudah dipisahkan dari ribosom

atau signal peptida oleh peptidase. Walaupun sebagian besar protein disekresi secara *cotranslasional*, namun demikian proses sekresi ini tidaklah universal. Sebab ada sebagian protein yang disekresi melalui *post translasional*. Salah satu contohnya adalah sekresi α -glukosidase dari beberapa strain.

Jenis sekresi kedua adalah *post translasional*. Pada jenis ini, protein akan disekresi bila proses translasinya telah selesai. Ada dua macam mekanisme yang dapat menjelaskan tentang bagaimana sekresi jenis *post translasional* ini berlangsung. Dua mekanisme tersebut adalah pertama *signal* hipotesis termodifikasi dan yang kedua *membrane trigger* hipotesis.

Melalui *signal* hipotesis termodifikasi, Blobel *et al.* (1979) mengemukakan bahwa sekresi protein dapat berlangsung melalui penembusan *signal* peptida ke dalam membran, yang selanjutnya berinteraksi dengan reseptor protein membran untuk menyediakan celah/saluran protein. Selama disekresi melalui saluran, protein melakukan modifikasi bentuk dari *folding* ke *unfolding*, dan selanjutnya melakukan *folding* kembali setelah keluar dari membran (gambar 2.9b).

Sementara itu Wickner (1979) menerangkan mekanisme *post translasional* melalui hipotesis membran *trigger*. Dikemukakan bahwa untuk sekresi protein, *signal* peptida dilibatkan untuk meningkatkan pembentukan *folding* dari protein target. Hal ini karena dengan cara demikian, protein itu akan berinteraksi dengan membran dan didorong (triggered) ke dalam membran untuk dikeluarkan ke lingkungan ekstraselular (gambar 2.9a).



Gambar 2.9. Model *post translational* dalam mensekresi protein melalui membran.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Sampel Penelitian

Mikroba yang digunakan untuk uji sekresi amilase adalah khamir *Endomycopsis fibuligera* ITB.cc.R64, diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Institut Teknologi Bandung.

3.2. Bahan dan Alat

Semua bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai derajat kemurnian pro-analisis (p.a.), kecuali apabila disebut lain. Bahan-bahan tersebut meliputi : ekstrak ragi, bacto agar, amonium molibdat, kalium-natrium tartrat, natrium sulfat anhidrous, natrium bikarbonat, natrium sulfat anhidrous, kupri sulfat, asam sulfat pekat, glukosa, sukrosa, natrium fosfat, asam sitrat, dinatrium hidrogen arsenat, amilun, magnesium klorida dan kalsium klorida.

Alat utama yang dipakai : spektrofotometer uv/vis, *refrigerator centrifuge Backman*, *rotary shaker*, *autoklaf*, *water bath*, *laminar flow* dan seperangkat alat gelas.

3.3. Cara Kerja

3.3.1. Kultivasi ragi

Ragi *Endomycopsis fibuligera* dikultivasi dalam tiga macam medium yang disesuaikan dengan keperluannya. Media padat agar miring ' sukrosa tauge ' untuk

menyimpan sel dalam waktu yang cukup lama, media pertumbuhan cair ' sukrosa tauge ' untuk memperbanyak sel sehingga diperoleh sel yang aktif membelah dalam jumlah cukup (inokulum), dan media produksi ' amilum-ekstrak ragi ' untuk produksi amilase.

Media padat agar miring ' sukrosa tauge ' terdiri dari sukrosa 6 %, filtrat tauge 10 % dan agar 1.5 % dalam akuades. Komposisi media pertumbuhan ' sukrosa tauge ' sama dengan media padat, tetapi tanpa agar. Media produksi ' amilum-ekstrak ragi ' terdiri dari amilum 1 % dan ekstrak ragi 1 % (Baktir, 1991).

Mula-mula *Endomycopsis fibuligera* dibiakkan dalam media agar miring steril pada 30 °C selama 3 hari. Biakan yang terjadi dipindahkan dengan bantuan jarum ose ke dalam Erlenmeyer 1 liter yang berisi media pertumbuhan steril sebanyak 250 ml. Kemudian ditempatkan pada *rotary shaker* dan dikocok pada kecepatan 180 rpm pada 30 °C selama 16 jam, yaitu sampai diperoleh suspensi sel dengan OD (optical density) sebesar 6. Biakan yang diperoleh merupakan inokulum. Semua pekerjaan kultivasi dilakukan secara aseptis. Metode kultivasi ragi dan produksi amilase dirujuk dari penelitian Baktir (1991).

3.3.2. Penentuan efek Ca dan Mg terhadap sekresi amilase

Ke dalam media produksi steril sebanyak 100 ml, ditambahkan sejumlah inokulum aktif sehingga kadar inokulum dalam media tersebut 5%.

Disiapkan 4 buah Erlenmeyer 100 ml dan diberi nomor 1 sampai 4. Ke dalam masing-masing Erlenmeyer tersebut, selanjutnya diisi dengan media produksi yang mengandung inokulum sebanyak 20 ml secara aseptis. Secara berurutan kemudian ditambahkan 5 ml akuades steril pada Erlenmeyer nomor 1; 5 ml larutan steril MgCl₂ pada Erlenmeyer nomor 2; 5 ml larutan steril CaCl₂ pada Erlenmeyer nomor 3; dan

larutan steril $MgCl_2$ serta $CaCl_2$ masing-masing 2.5 ml pada Erlenmeyer nomor 4. Keempat Erlenmeyer tersebut selanjutnya ditempatkan pada *rotary shaker* dan dikocok pada kecepatan 180 rpm pada $30\text{ }^{\circ}C$ selama 40 jam. Debris sel dibuang dari biakan cair dengan sentrifugasi pada 10.000 rpm suhu $4\text{ }^{\circ}C$ selama 10 menit. Supernatan dikumpulkan, merupakan ekstrak amilase yang akan diuji produktivitasnya melalui uji aktivitas enzim dan uji kadar protein.

3.3.3. Optimasi Sekresi amilase oleh Mg dan Ca

Mg dan atau Ca yang mempunyai efek peningkatan terhadap sekresi amilase (diiperoleh dari langkah 3.2), kemudian dioptimasi yang meliputi komposisi dan konsentrasinya serta ditentukan pula waktu optimum dalam fermentasi amilase akibat adanya Mg dan atau Ca.

3.3.3.1. Penentuan komposisi optimum Mg dan atau Ca pada proses sekresi amilase

Ke dalam Erlenmeyer steril 50 ml dimasukkan media produksi amilase yang telah mengandung inokulum 5 % sebesar 16 ml secara aseptis. Selanjutnya ditambahkan larutan steril $MgCl_2$ 1 % dan $CaCl_2$ 1 % hingga volume total yang ada dalam Erlenmeyer tersebut menjadi 20 ml, dimana larutan $MgCl_2$ 1 % dan $CaCl_2$ 1 % ini ditentukan dengan perbandingan volume 1 : 1. Berikutnya Erlenmeyer tersebut diletakkan dalam *rotary shaker* dan dikocok dengan kecepatan 180 rpm pada suhu $30\text{ }^{\circ}C$ selama 40 menit. Supernatan yang merupakan enzim amilase kemudian dipisahkan dari residu sel dengan sentrifugasi dingin pada suhu $4\text{ }^{\circ}C$, kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit.

Prosedur ini diulang untuk perbandingan volume larutan steril $MgCl_2$ 1 % dan $CaCl_2$ 1 % sebesar 2 : 1 ; 3 : 1 ; 4 : 1 ; 1 : 2 ; 1 : 3 ; dan 1 : 4. Kemudian amilase-amilase yang dihasilkan dari 7 media tersebut dibandingkan produktivitasnya melalui uji aktivitas enzim dan uji kadar protein dari supernatan.

3.3.3.2. Penentuan konsentrasi optimum Mg dan atau Ca pada proses sekresi amilase

Komposisi optimum yang diperoleh dari langkah 3.3.3.2, digunakan sebagai kondisi untuk menentukan konsentrasi optimum Mg dan atau Ca pada proses sekresi amilase. Dalam langkah ini Mg dan atau Ca yang ditambahkan berupa konsentrasi total dalam media produksi yang besarnya diatur hingga diperoleh konsentrasi total yaitu : 0% ; 0.1% ; 0.2% ; 0.5% ; 0.8% ; dan 1.0 %.

Disiapkan 6 buah Erlenmeyer yang telah diisi dengan media produksi steril. Keenam Erlenmeyer selanjutnya diberi nomor 1 hingga 6, dan masing-masing diisi dengan 16 ml media produksi steril yang mengandung 5% inokulum aktif. Untuk Erlenmeyer 1 digunakan untuk produksi amilase tanpa penambahan larutan steril $MgCl_2$ dan atau $CaCl_2$ (0 %), tetapi ditambahkan 4.0 ml air steril. Erlenmeyer 2 ditambah larutan steril $MgCl_2$ 0.5 % dan atau $CaCl_2$ 0.5% hingga diperoleh konsentrasi total 0.1% dalam media produksi. Erlenmeyer 3 ditambah larutan steril $MgCl_2$ 1.0 % dan atau $CaCl_2$ 1.0% hingga diperoleh konsentrasi total 0.2% dalam media produksi. Erlenmeyer 4 ditambah larutan steril $MgCl_2$ 2.5 % dan atau $CaCl_2$ 2.5% hingga diperoleh konsentrasi total 0.5% dalam media produksi. Erlenmeyer 5 ditambah larutan steril $MgCl_2$ 4.0 % dan atau $CaCl_2$ 4.0% hingga diperoleh konsentrasi total 0.8% dalam media produksi. Dan Erlenmeyer 6 ditambah larutan

steril $MgCl_2$ 5 % dan atau $CaCl_2$ 5% hingga diperoleh konsentrasi total 1.0% dalam media produksi.

Semua Erlenmeyer selanjutnya dikocok dengan *rotary shaker* pada 180 rpm, suhu $30^\circ C$ selama 40 jam. Amilase yang dihasilkan dipisahkan dari residu sel dengan sentrifugasi dingin suhu $4^\circ C$ dan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Kemudian ditentukan produktivitasnya melalui uji aktivitas enzim dan uji kadar protein. Hasil-hasil ini selanjutnya dibandingkan untuk diketahui konsentrasi total $MgCl_2$ dan atau $CaCl_2$ yang optimum dalam mensekresi amilase ke lingkungan ekstraselular.

3.3.3.3. Penentuan waktu optimum dalam fermentasi amilase dengan adanya Mg dan atau Ca

Media produksi yang mengandung inokulum aktif 5 % ditambah dengan larutan steril $MgCl_2$ dan atau $CaCl_2$ pada komposisi dan konsentrasi optimumnya (hasil langkah 3.3.3.1 dan 3.3.3.2). Media ini selanjutnya difermentasi dengan pengocokan pada *rotary shaker* berkecepatan 180 rpm, suhu $30^\circ C$ dan dipanen pada waktu 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, dan 108 jam. Amilase yang dihasilkan pada tiap-tiap waktu, kemudian ditentukan aktivitas dan kadar proteinnya untuk diketahui produktivitasnya.

Pada tiap waktu yang sama, dilakukan juga fermentasi amilase tetapi penambahan $MgCl_2$ dan atau $CaCl_2$ nya diganti dengan air steril. Hal ini dimaksudkan untuk membandingkan derajat produktivitas amilase tiap-tiap waktu akibat ada dan tidaknya $MgCl_2$ dan atau $CaCl_2$ di dalam media fermentasi tersebut.

3.3.4. Uji produktivitas amilase

Produktivitas amilase ditentukan melalui dua macam uji, yaitu pertama uji aktivitas sakarifikasi amilase dan kedua uji kadar protein hasil fermentasi.

3.3.4.1. Uji aktivitas sakarifikasi

Dilakukan reaksi enzimatik antara larutan sampel yang akan diukur aktivitasnya dengan substrat larutan pati 1 %. Reaksi enzimatik dihentikan dengan cara pemanasan pada penangas air mendidih. Gula pereduksi yang terbentuk diukur sebagai glukosa dengan metode somoyi-Nelson.

Dipipet 0.1 ml larutan sampel, dimasukkan ke dalam tabung reaksi bertanda 'eksperimen'. Ditambahkan 1 ml larutan pati 1 dalam bufer asetat pH 5.5, dikocok dan diinkubasi pada penangas air 50 °C selama 10 menit. Kemudian segera dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 10 menit, didinginkan dan kemudian ditambahkan 2 ml pereaksi Cu alkalis, dikocok dan dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 10 menit. Selanjutnya direndam dalam air dingin dan ditambah 2 ml pereaksi warna arsenomolibdat, dikocok sampai gelembung gas habis, ditambahkan 4.9 ml akuades dan dikocok sampai homogen, lalu segera dibaca serapannya pada λ 520 nm.

Dilakukan percobaan blangko pada waktu bersamaan dan dengan cara yang sama dengan prosedur di atas, hanya larutan sampel enzim dipanaskan terlebih dahulu pada penangas air mendidih selama 10 menit. Selisih serapan antara tabung 'eksperimen' dan tabung 'blangko', kemudian diplot pada kurva standar glukosa untuk menentukan aktivitas enzim.

Untuk kurva standar glukosa, disiapkan beberapa larutan glukosa standar, dengan kadar 0.3; 0.4; 0.5; 0.6; 0.8; dan 1 (b/v). Setiap larutan standar diperlakukan dengan cara yang sama, hanya larutan sampel dan larutan pati diganti dengan akuades. Dibuat kurva hubungan antara serapan dengan kadar glukosa yang terukur pada λ 520 nm.

Satu unit aktivitas sakarifikasi (U) adalah jumlah enzim yang menghasilkan 1 μg gula yang diukur sebagai glukosa per ml per menit pada kondisi percobaan.

Aktivitas spesifik adalah aktivitas total (U) dibagi kadar protein total (μg), atau aktivitas per ml (U/ml) dibagi kadar protein per ml ($\mu\text{g/ml}$). Satuan aktivitas spesifik adalah U/ μg protein.

3.3.4.2. Uji kadar protein

Kadar protein secara akurat digunakan untuk penentuan aktivitas spesifik enzim. Uji ini menggunakan metode *Lowry* dengan standar *bovine serum albumine* (BSA).

Disiapkan pereaksi-pereaksi A, B, C dan E (Lampiran 1). Dipipet larutan sampel sebanyak 0.1 ml, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan kemudian ditambahkan 0.4 ml akuades. Selanjutnya ditambahkan 2.5 ml pereaksi C, dikocok dan didiamkan selama 10 menit. Kemudian ditambah 0.25 ml pereaksi E, dikocok dan didiamkan selama 30 menit. Dibaca serapan dari larutan yang diperoleh pada λ 500 nm.

Kurva standar BSA dibuat dengan cara menyiapkan beberapa larutan BSA standar dengan kadar 2.5; 5; 10; 15; dan 20 $\mu\text{g/ml}$. Setiap larutan tersebut diperlakukan sama seperti larutan sampel. Serapan setiap larutan yang terukur pada λ 500 nm dicatat, dan dibuat kurva antara kadar BSA *versus* serapan.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

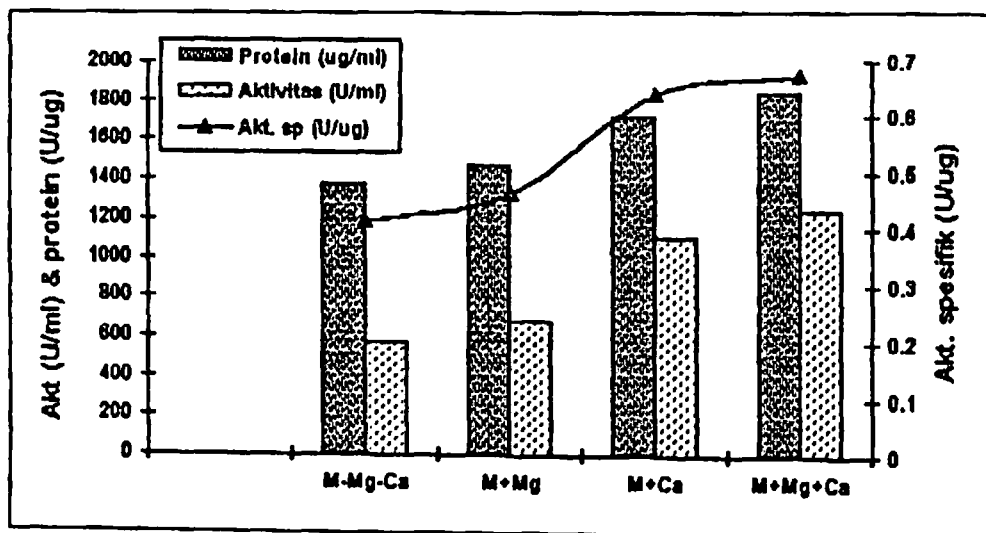
4.1. Efek Mg dan Ca Terhadap Sekresi Amilase

Pengaruh Mg dan Ca terhadap sekresi amilase oleh *Endomycopsis fibuligera* akan ditunjukkan melalui pengamatan produktivitas amilase di media fermentasi yang tanpa dan yang mengandung Mg dan atau Ca. Untuk menentukan produktivitas amilase ini, dilakukan dua macam uji, pertama uji aktivitas enzim dan kedua uji kadar protein. Pengamatan tunggal berupa uji aktivitas enzim dianggap masih belum dapat menjelaskan pengaruh yang ditimbulkan oleh Mg dan Ca pada proses sekresi enzim. Sebab Menurut Wiseman (1985) disebutkan bahwa ion Mg dan Ca dalam suatu larutan enzim dapat memberikan efek kofaktor selama reaksi enzimatik. Artinya bahwa ion-ion logam tersebut dapat meningkatkan aktivitas dari suatu produk enzim. Oleh karena itu dilakukan uji kadar protein, yang dapat menjelaskan bahwa terjadinya peningkatan produktivitas suatu enzim selama fermentasi, tidak semata-mata diakibatkan oleh adanya efek kofaktor pada enzim tetapi juga sebagai akibat adanya pola sekresi protein yang berbeda.

Hasil uji terhadap produktivitas amilase akibat hadir dan tidaknya Mg dan Ca di media fermentasi dapat dilihat pada tabel 4.1 dan grafik pada gambar 4.1.

Tabel 4.1. Translokasi amilase akibat ada dan tidaknya Mg dan Ca dalam media fermentasi.

Media	Keberadaan ion logam		Aktivitas (U/ml)	Protein ($\mu\text{g/ml}$)	Aktivitas spesifik U/ μg protein
	Mg	Ca			
1	-	-	571.156	1377.069	0.415
2	+	-	679.459	1465.721	0.464
3	-	+	1101.271	1713.948	0.642
4	+	+	1238.075	1838.061	0.673



Gambar 4.1. Grafik translokasi amilase dengan ada dan tidaknya Mg dan Ca di media fermentasi

Dari tabel dan gambar 4.1 dapat dijelaskan bahwa tanpa Mg dan Ca amilase yang tersekresi rendah (media 1). Sementara media yang ditambah Mg, Ca, serta Mg dan Ca secara bersamaan, terjadi peningkatan terhadap sekresi dan produktivitas amilase baik aktivitas maupun kadar proteinnya (media 2, 3, 4). Indikasi ini

menunjukkan adanya suatu pengaruh yang ditimbulkan oleh Mg dan Ca selama proses fermentasi amilase dari *Endomyopsis fibuligera*. Dibandingkan dengan media yang mengandung Mg (media 2), media yang mengandung Ca (media 3) nampak lebih tinggi produktivitas amilasanya. Namun demikian tingkat produktivitas kedua media ini (2 & 3), masih lebih rendah dibandingkan dengan yang berasal dari media 4 (mengandung Mg dan Ca). Produktivitas amilase di media 4 ini nilainya tertinggi dengan aktivitas total sebesar 1238.075 Unit/ml, kadar protein 1601.655 µg/ml dan aktivitas spesifik sebesar 0.673 Unit/ µg protein. Dalam hal ini dapat dinyatakan bahwa perpaduan antara Mg dan Ca lebih memacu proses sekresi amilase ke lingkungan ekstraselular.

Dalam mekanisme ekspor protein, proses sekresi enzim diawali dengan terjadinya antaraksi antara *signal* peptida dengan membran sel yang bermuatan negatif. Pada tahap inisiasi ini, ion Ca punya peranan yang cukup penting, yaitu meningkatkan membran untuk cenderung bermuatan negatif sehingga tahap ini lebih mudah berlangsung (Robertson, 1983). Selain itu, Edgington (1992) mengemukakan bahwa Ca memacu proses sekresi enzim ke lingkungan ekstraselular dengan cara meningkatkan pembentukan folding dari prekursor protein yang akan disekresi. Akibat dari folding ini, protein akan ditarik lebih kuat untuk dapat menembus membran, dengan demikian enzim akan mudah dibebaskan sebagai protein ekstraselular (Wickner, 1979).

Sementara itu bagi sel, ion Mg sangat penting dalam pengaktifan terhadap proses sekresi enzim. Sekresi enzim merupakan proses yang memerlukan energi, yang disediakan dari hidrolisis ATP oleh ATPase. Dalam sel, ATPase terikat pada

membran dan kerjanya sangat memerlukan adanya ion Na, Mg dan K (Robertson, 1983). Pada hidrolisis ATP, ATPase melakukan pengikatan terhadap ion Na atau Mg dan kemudian berubah menjadi bentuk terfosforilasi. Gugus fosfat ini selanjutnya dilepaskan dengan cara mengikat ion K untuk ditransfer ke molekul ADP dalam pembentukan ATP. Dengan demikian tersedianya ion Mg yang cukup bagi sel akan membantu sel dalam penyediaan energi untuk proses sekresi enzim. Selain itu dalam keterkaitannya dengan proses biosintesis enzim, ion Mg mutlak diperlukan sebab mempunyai efek kofaktor yang sangat tinggi terhadap sistem enzim yang terlibat pada proses biosintesis protein (Stryer, 1981).

Peran Mg dan Ca yang terpadu, nampaknya lebih menguntungkan dalam proses sekresi enzim daripada bila Mg atau Ca berada sendirian di dalam media. Hal ini yang menyebabkan bahwa produktivitas amilase di media 4 lebih tinggi dibandingkan dari media lainnya. Walaupun demikian, efek peningkatan yang teramati ini tidak terlalu tajam, hal mana diduga sebagai akibat dari belum optimumnya Mg dan Ca yang ditambahkan pada media fermentasi.

4.2. Optimasi Sekresi Amilase Oleh Mg dan Ca

Optimasi terhadap campuran Mg dan Ca pada proses sekresi amilase dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui parameter-parameter yang sesuai, yaitu yang dapat menghasilkan produktivitas amilase tertinggi.

Adapun variabel-variabel yang ditentukan meliputi komposisi atau perbandingan yang tepat antara Mg dan Ca untuk sekresi amilase, konsentrasi total

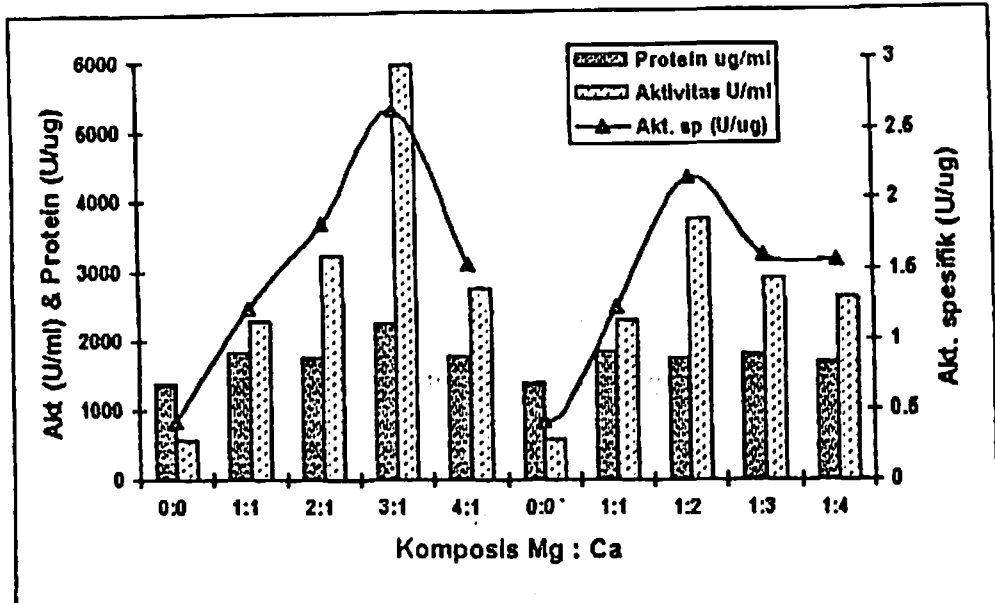
dari kedua ion logam, dan waktu fermentasi amilase akibat hadirnya kedua ion logam tersebut.

4.2.1. Komposisi optimum Mg dan Ca pada proses sekresi amilase.

Komposisi optimum dari campuran Mg dan Ca ditentukan dengan mengamati efeknya terhadap peningkatan translokasi amilase oleh *Endomycopsis fibuligera*. Komposisi yang optimum akan menampakkan sekresi amilase yang optimum pula. Tabel 4.2 dan gambar 4.2 menunjukkan tentang translokasi amilase yang dihasilkan oleh *Endomycopsis fibuligera* pada berbagai campuran Mg dan Ca. Dari hasil ini didapatkan bahwa produktivitas amilase tertinggi dicapai oleh komposisi Mg : Ca dengan perbandingan 3 : 1.

Tabel 4.2. Translokasi amilase pada berbagai komposisi Mg dan Ca

Komposisi ion logam		Aktivitas (U/ml)	Protein ($\mu\text{g/ml}$)	Aktivitas spesifik (U/ μg protein)
Mg	Ca			
0	0	571.156	1377.069	0.415
1	1	2281.061	1838.061	1.241
2	1	3221.731	1755.319	1.835
3	1	5935.007	2245.863	2.643
4	1	2737.217	1773.050	1.544
1	2	3706.244	1725.768	2.148
1	3	2868.321	1790.780	1.602
1	4	2609.341	1672.577	1.560



Gambar 4.2. Pola translokasi amilase oleh berbagai campuran Mg dan Ca

Dari gambar 4.2 dapat dijelaskan bahwa pada perbandingan Mg : Ca dengan komposisi Ca tetap, produktivitas amilase (aktivitas, protein & aktivitas spesifik) meningkat bersamaan dengan bertambahnya konsentrasi Mg dan mencapai optimum pada komposisi Mg : Ca dengan perbandingan 3 : 1. Di atas komposisi 3 : 1 ini (untuk Mg yang lebih besar) selanjutnya produktivitas amilase tersebut menurun. Sementara untuk perbandingan Mg : Ca dengan komposisi Mg tetap, produktivitas amilase (aktivitas & aktivitas spesifik) meningkat hanya sampai pada komposisi 1 : 2. Melebihi komposisi 1 : 2 ini (untuk Ca yang lebih besar), selanjutnya mengakibatkan aktivitas dan aktivitas spesifik tersebut menjadi menurun. Sedangkan untuk protein pada komposisi Mg tetap ini titik tertingginya dicapai pada komposisi 1 : 1. Namun demikian produktivitas amilase di titik ini masih lebih rendah dibanding dengan pada komposisi 1 : 2 (untuk Ca yang lebih besar), sebab amilase yang

dihasilkan mempunyai aktivitas dan aktivitas spesifiknya yang rendah.

Selain itu, gambar 4.2 menunjukkan pula bahwa hampir pada setiap perbandingan Mg : Ca, komposisi Mg > Ca cenderung mempunyai efek peningkatan amilase (aktivitas maupun protein) yang lebih tinggi daripada pada komposisi Ca > Mg. Oleh karena itu dapat dinyatakan bahwa komposisi Mg > Ca lebih memacu proses sekresi dan komposisinya optimum pada perbandingan 3 : 1.

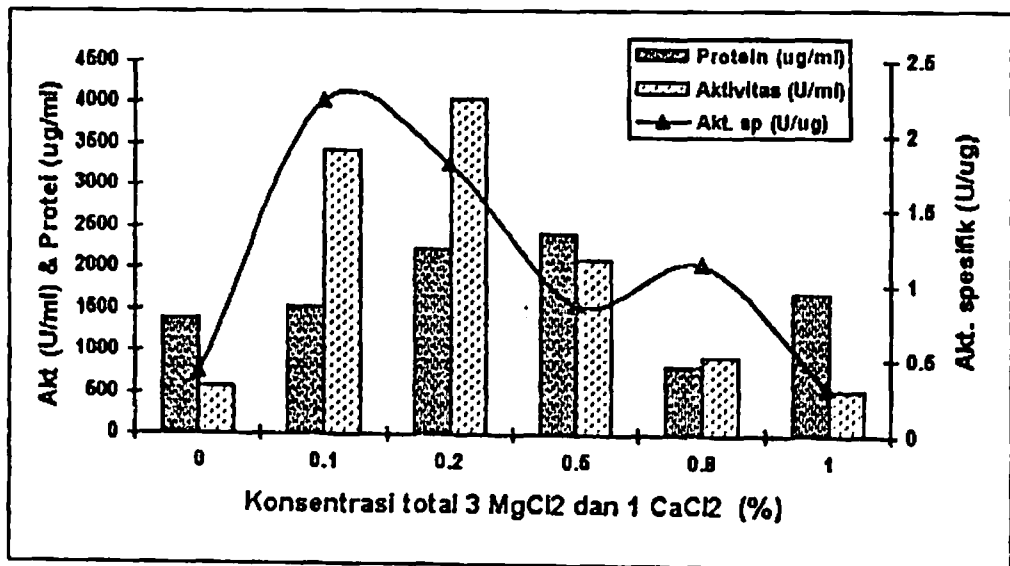
Tingginya Mg yang diperlukan oleh *Endomycopsis fibuligera* untuk peningkatan produktivitas amilase dibanding Ca, diduga untuk mengendalikan kecepatan antara proses biosintesis dan sekresi enzim tersebut. Priest (1984) menyebutkan bahwa biosintesis dan sekresi enzim ekstraselular merupakan proses yang saling terkait dan berlangsung secara *cotranslasional*. Mg mempunyai peranan penting dalam biosintesis protein dan sekresi enzim, sedangkan Ca perannya lebih nampak pada proses sekresi enzim. Sementara pada hasil sebelumnya (gambar 4.1) telah ditunjukkan bahwa efek Mg lebih rendah daripada Ca dalam hal peningkatan produktivitas amilase. Hal ini menyebabkan sel *Endomycopsis fibuligera* memerlukan Mg yang lebih tinggi dari Ca, untuk menyelaraskan kecepatan antara proses biosintesis amilase dengan proses sekresinya.

4.2.2. Konsentrasi total optimum campuran Mg dan Ca pada proses sekresi amilase

Komposisi optimum Mg : Ca untuk mensekresi amilase yaitu dengan perbandingan 3 : 1, selanjutnya ditentukan konsentrasi total optimumnya. Hasil dari langkah ini didapatkan hasil seperti pada tabel 4.3 dan gambar 4.3.

Tabel 4.3 Translokasi amilase oleh berbagai konsentrasi total Mg dan Ca dengan komposisi optimum 3 : 1

Konsentrasi total Mg : Ca (3 : 1) (%)	Aktivitas (U/ml)	Protein ($\mu\text{g/ml}$)	Aktivitas spesifik (U/ μg protein)
0.0	571.156	1377.069	0.415
0.1	3421.236	1530.732	2.235
0.2	4042.554	2228.132	1.814
0.5	2093.099	2411.348	0.868
0.8	941.666	827.423	1.138
1.0	548.355	1700.946	0.322



Gambar 4.3 Grafik translokasi amilase pada berbagai konsentrasi total Mg dan Ca dengan komposisi 3 : 1

Dari gambar 4.3. dapat dijelaskan bahwa dari konsentrasi total 0 % hingga 0.2 % aktivitas amilase meningkat dan mencapai optimum pada konsentrasi total 0.2

% ini, setelah itu menurun pada konsentrasi yang lebih besar. Sementara untuk protein, sekresinya meningkat dari konsentrasi total 0 hingga 0.5 %, lalu optimum di konsentrasi ini dan kemudian menurun pada konsentrasi selebihnya. Sedangkan aktivitas spesifik amilase, titik tertinggi dicapai pada konsentrasi total 0.1 %, yang kedua dicapai pada titik konsentrasi total 0.2 % dan relatif rendah pada titik konsentrasi total yang lainnya.

Dalam hal ini produktivitas amilase tertinggi nampak dihasilkan oleh campuran Mg : Ca (3 : 1) dengan konsentrasi total 0.2 % daripada oleh titik konsentrasi yang lainnya. Pada konsentrasi ini, nampaknya *Endomycopsis fibuligera* lebih menguntungkan dalam hal mensekresi amilase, sehingga menghasilkan aktivitas yang paling tinggi. Walaupun protein dan aktivitas spesifik yang dihasilkan pada titik konsentrasi 0.2 % ini tidak optimum, namun nilai keduanya cukup tinggi yaitu sedikit lebih rendah dari titik optimumnya. Oleh karena itu dapat dinyatakan bahwa translokasi amilase meningkat dari konsentrasi total 0 % , kemudian mencapai optimum pada konsentrasi total 0.2 %, lalu menurun untuk konsentrasi selebihnya. Peningkatan translokasi amilase dari titik konsentrasi total 0 hingga 0.2 %, diduga disebabkan oleh makin selarasnya keterpaduan antara laju proses biosintesis amilase dengan laju sekresinya. Sementara terjadinya penurunan produktivitas amilase untuk konsentrasi total lebih dari 0.2 %, diduga disebabkan oleh adanya efek inhibitor yang ditimbulkan oleh kedua ion logam tersebut pada konsentrasi yang tinggi. Sebab sistem enzim yang terlibat dalam proses translasi protein (biosintesis protein) dapat terhambat kerjanya oleh adanya konsentrasi ion logam bivalen yang tinggi (Stryer, 1981). Sementara Ruslan (1998) menyebutkan bahwa ion Ca pada konsentrasi

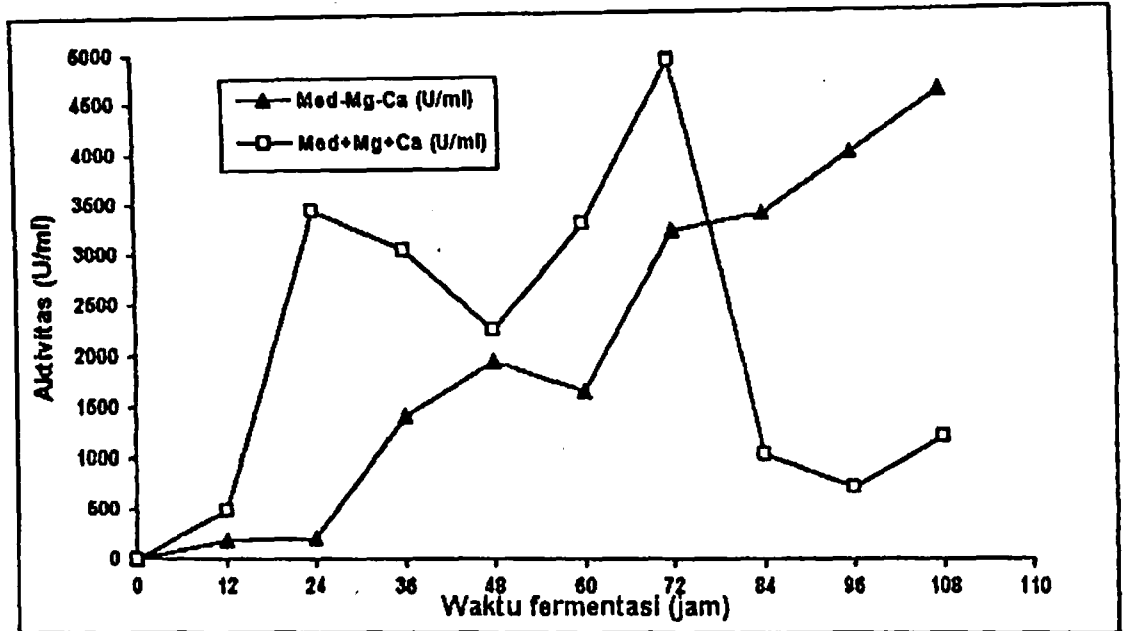
tertentu dapat menghambat proses transpor glukosa ke dalam sel.

4.2.3. Waktu optimum fermentasi amilase dari *Endomycopsis fibullgera* dengan adanya Mg dan Ca dalam media fermentasi

Dalam produksi enzim, optimasi waktu sangat penting untuk efisiensi waktu produksi. Untuk mengamati efek Mg dan Ca terhadap waktu fermentasi amilase dari *Endomycopsis fibullgera*, maka dilakukan pula pengamatan terhadap blanko yaitu fermentasi amilase dengan menggunakan media bebas Mg dan Ca. Adapun amilase yang terekresi pada waktu fermentasi tertentu dari media bebas dan yang mengandung Mg dan Ca dapat dilihat pada tabel 4.4 dan kurva pada gambar 4.4.

Tabel 4.4. Translokasi amilase oleh *Endomycopsis fibullgera* pada waktu fermentasi tertentu di media bebas dan yang mengandung Mg dan Ca

Waktu fermentasi (jam)	Aktivitas (U/ml) di media tanpa Mg & Ca	Aktivitas (U/ml) di media dengan Mg & Ca
12	187.535	485.654
24	206.346	3432.637
36	1409.080	3045.026
48	1933.494	2241.303
60	1648.486	3295.833
72	3216.030	4908.978
84	3375.635	1028.309
96	3979.85	709.100
108	4595.469	1206.154



Gambar 4.4. Kurva translokasi amilase oleh *Endomyopsis fibuligera* pada tiap waktu fermentasi tertentu di media bebas dan yang mengandung Mg dan Ca

Bagi mikroba yang menggunakan pati sebagai sumber karbon, maka amilase merupakan senyawa metabolit primer, sebab diperlukan untuk proses pertumbuhan sel.. Secara aktif, senyawa metabolit primer akan disintesis oleh suatu mikroba pada fase pertumbuhan logaritmik, yaitu fase pertumbuhan di mana sel-sel mikroba membelah dengan baik. Dalam penelitiannya, Baktir (1991) menyebutkan bahwa *Endomyopsis fibuligera* berada pada fase pertumbuhan logaritmik dan fase kematian hingga jam ke 40 waktu fermentasi.

Pada gambar 4.4 dapat diamati tentang adanya perbedaan pola sekresi amilase oleh *Endomyopsis fibuligera* di media bebas dan yang mengandung Mg dan Ca. Dalam media bebas Mg dan Ca, *Endomyopsis fibuligera* mensekresi sedikit amilase pada fase pertumbuhan logaritmik. Hal ini ditunjukkan oleh

rendahnya aktivitas amilase yang dihasilkan di lingkungan ekstraselular pada waktu fermentasi dari 0 hingga 40 jam. Aktivitas ini kemudian meningkat seiring dengan bertambahnya waktu fermentasi sampai pada jam ke 108 waktu fermentasi. Menurut Baktir (1991), sekresi amilase pada jam ke 107 atau sekitar 108 ini telah mencapai optimum sebagai akibat mikroba telah mengalami lisis sel.

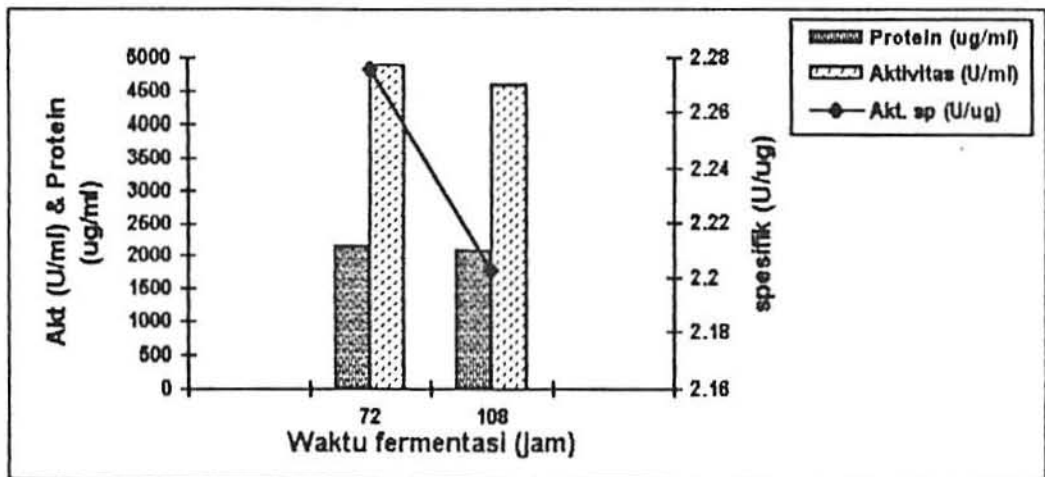
Sementara dalam media yang mengandung Mg dan Ca, sekresi amilase oleh *Endomycopsis fibuligera* mengalami peningkatan pada fase pertumbuhan logaritmik. Pada daerah ini nampak aktivitas amilase yang dihasilkan selalu lebih tinggi dibandingkan dengan yang diperoleh dari media bebas Mg dan Ca. Aktivitas ini terus meningkat hingga mencapai optimum pada jam ke 72 waktu fermentasi dan kemudian menurun untuk waktu fermentasi selanjutnya. Jika dibandingkan dengan fermentasi di media bebas Mg dan Ca, maka hasil ini dirasakan lebih baik sebab telah ada pemendekan waktu fermentasi dari 108 menjadi 72 jam. Dari pemendekan waktu ini memberikan indikasi adanya peran Mg dan Ca dalam mempercepat keluarnya amilase dari membran sel sebelum terjadinya lisis sel. Adapun terjadinya penurunan amilase yang cukup drastis untuk waktu fermentasi lebih dari 72 jam, diduga disebabkan oleh adanya proses deaktivasi amilase akibat banyaknya produk campuran yang berasal dari lisis sel atau juga oleh makin berkurangnya ion logam bivalen (Mg dan Ca) di lingkungan ekstraselular akibat telah terabsorb ke dalam sel *Endomycopsis fibuligera*.

Selain adanya pemendekan waktu fermentasi, Mg dan Ca yang ada pada media nampaknya juga memacu *Endomycopsis fibuligera* untuk mensekresi amilase yang cukup tinggi. Hal ini dapat dilihat dari perbedaan pola sekresinya di waktu

fermentasi optimum pada masing-masing media yang bebas dan yang mengandung Mg dan Ca (tabel 4.5 dan grafik pada gambar 4.5).

Tabel 4.5. Translokasi amilase di media yang bebas dan yang mengandung Mg dan Ca pada waktu fermentasi optimum

Media	Waktu optimum (jam)	Aktivitas (U/ml)	Protein ($\mu\text{g/ml}$)	Akt. spesifik (U/ μg protein)
Tanpa Mg & Ca	108	4595.469	2086.288	2.203
Dengan Mg & Ca	72	4908.978	2157.210	2.276



Gambar 4.5. Grafik sekresi amilase pada waktu fermentasi optimum dari media yang bebas dan yang mengandung Mg dan Ca

Gambar 4.5 ini menunjukkan bahwa translokasi amilase di media yang mengandung Mg dan Ca masih lebih baik dari pada yang dihasilkan di media bebas Mg dan Ca. Hal ini ditunjukkan oleh tingginya nilai aktivitas amilase, protein maupun aktivitas spesifik di media yang mengandung Mg dan Ca dari pada di media yang bebas kedua ion logam tersebut di masing-masing waktu fermentasi optimumnya.

Secara ringkas disebutkan bahwa penggunaan Mg dan Ca dalam fermentasi amilase dari *Endomycopsis fibuligera* sangat penting. Kedua ion logam telah terbukti mampu memperpendek waktu fermentasi dan juga mampu menghasilkan produktivitas amilase yang lebih tinggi dibandingkan dengan media tanpa Mg dan Ca.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan sebagai berikut.

1. Penambahan Mg dan Ca dalam media fermentasi mampu meningkatkan produktivitas amilase di lingkungan ekstraselular. Efek sekresi yang ditimbulkan oleh Ca lebih besar dari pada oleh Mg. Sekresi yang lebih besar lagi dapat ditimbulkan oleh hadirnya Mg dan Ca secara simultan di dalam media fermentasi.
2. Sekresi amilase berlangsung optimum oleh campuran Mg dan Ca pada perbandingan komposisi 3 : 1 dengan konsentrasi total sebesar 0.2 %.
3. Waktu optimum untuk fermentasi amilase dari *Endomycopsis fibuligera* akibat adanya Mg dan Ca di media fermentasi adalah berlangsung selama 72 jam.

5.2. Saran

Perlu dipelajari tentang kombinasi Mg dan Ca dengan K, Na, P atau tween 80 (surfaktan) selama fermentasi amilase dari *Endomycopsis fibuligera*, karena ketiga unsur tersebut sangat diperlukan pula oleh suatu mikroba, yaitu antara lain sebagai sumber fosfat dalam pembentukan ATP selama pertumbuhannya dan juga diduga ikut mengendalikan dalam proses biosintesis dan sekresi protein ke lingkungan ekstraselular terutama tween 80 yang telah diketahui perannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Annah Ruslan, 1998, *Hambatan Kalsium dan Antagonis Kalsium Verapamil terhadap Kinetika Transpor Glukosa Membran Eritrosit*, Seminar Nasional PBBMI , 12 Desember 1998, Bandung.
- Baktir,A., 1991, *Produksi dan Amobilisasi Amilase dari Endomycopsis fibuligera Untuk Proses Sakarifikasi Dalam Sirup Glukosa dari Pati Sago*, Tesis S2 , ITB, Bandung.
- Baktir,A., 1996, *Pemisahan dan Karakterisasi Beberapa Amilase dari Endomycopsis fibuligera ITB. R. cc.64.*, Lemlit-Unair, Surabaya.
- Bambang, Go., 1996, *Produksi Amilase dari Endomycopsis fibuligera Dengan Adanya Tween 80*, Skripsi S1, Unair, Surabaya.
- Crueger, W. and Crueger, A., 1989, *Biotechnology : A Textbook of Industrial Microbiology*, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, p. 163-169.
- Edgington, S.M., 1992, *Rites of Passage : Moving Biotenh Proteins through The ER*, Bio / Technology 9, p. 976-982.
- Fardiaz, S., 1992, *Mikrobiologi Pangan 1*, PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, hal. 12-24, 97-101, 230-233.
- Fessenden, R.J. dan Fessenden, J.S., 1990, *Kimia Organik*, (diterjemahkan oleh A.H. Pudjastmaka), jilid 2, edisi ketiga, Penerbit Erlangga, Jakarta, hal. 354-355.
- Fujii,M and Kawamura,Y., 1985, *Sinergic Action Of α -Amilase and Glukoamilase On Hidrolysis Of Starch*, Biotechnology and Bioengineering, Vol 27, P. 260-265.
- Lehninger, A.L., 1975, *Biochemistry*, second edition, Worth Publisher, Ich., New York, p. 287-305.
- Lodder, J. (ed), 1990, *The Yeast, A Taxonomic Study*, North Holland, Co., Amsterdam.
- Mac Kenzie, D.A., Jeenes, D.J., Belshaw, N.J., and Archer, D.B., 1993, *Regulation of Secreted Protein Production by Filamentous Fungi : Recent Development and Perspectives*, Journal of General Microbiology, Britain, Vol. 139, p. 2245-2307.
- Pirt, S.J., 1975, *Principles Of Microbe and Cell Cultivation* , Black Well Scientific Publications, Oxford London Edinburg Melbourne.

- Prescott, S.C and Renn, C.G., 1962, *Industrial Of Microbiology*, third edition, MC Gray Hill Book Company Inc, New York, P. 11, 33-36.
- Priest, F.G, 1984, *Extracellular Enzymes*, Van Nostrand Reinhold (uk) Co, Ltd, England, P. 1-2, 17-18, 32-35.
- Purkan, 1995, *Fraksinasi Ekstrak Kasar Amilase dari Endomycopsis fibuligera Untuk Memisahkan Sacchrifying dan Liquefying Amilase dengan Menggunakan Ammonium Sulfat*, Skripsi S1 Unair, Surabaya.
- Robertson, R.N., 1983, *The Livety Membranes*, Cambridge University Press, New York, p. 44 -58, 68.
- Rogers, H.I, 1983, *Bacterial Cell structures*, Van Nostrand Reinhold (uk), England.
- Saccoreia, I and Van Linden, N., 1981, *Production Of Blomass and Amilase by The Yeast Lipomyces kononenkoae in Starch Limited Continuous Culture*, Eur, J. Appl. Microbial., Biotechnol, P. 13, 24-28.
- Sen, S and Chakrabarty, S.I, 1984, *Amylase From L. Cellobiosus Isolated From Vegetables Waste*, J. Fermentation Tecnology, Vol. 62, P. 407-412.
- Stryer, L., 1981, *Biochemistry*, second edition, W.H. Freeman and Company, San Francisco, p. 559-721.
- Wisdom, DM, et all, 1996, *The Role of Magnesium in Regulating cck-8-Evoked Secretary Respon in the Exocrine Rat Pangreas*, journal of Mol-Cell-Biochem, jan, P. 123-132

Lampiran 1

Pereaksi Untuk Penentuan Kadar Protein Dengan Metode Lowry

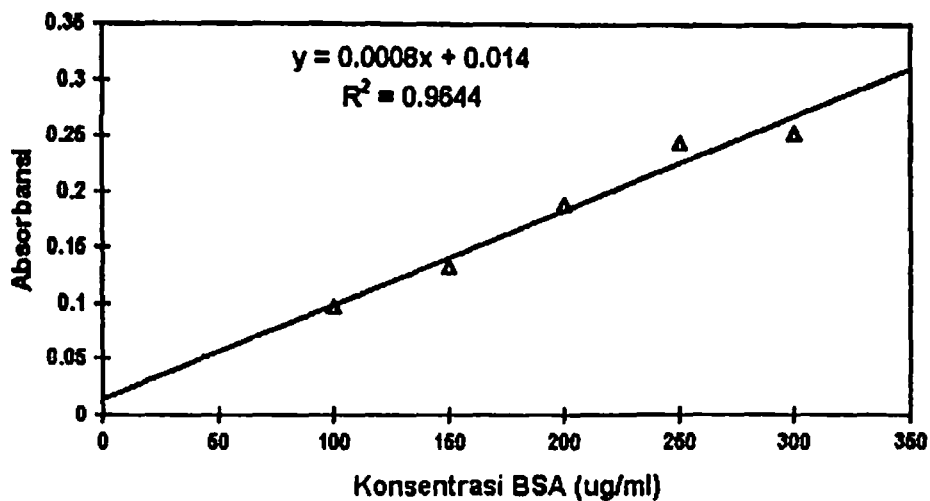
Kadar protein ditentukan dengan metode Lowry, yang komposisi pereaksinya terdiri dari :

- Larutan A., terdiri dari Na_2CO_3 2 % dalam 0.1 N NaOH.
- Larutan B, terdiri dari $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 % dalam 1 % natrium tartrat.
- Larutan C, terdiri dari larutan A dan B (50 : 1), dan selalu dibuat baru.
- Larutan D, adalah reagen Folin-Ciocalteu (Sigma).
- Larutan E, dibuat dari pereaksi D dengan pengenceran 2 kali.

Data untuk kurva standar Bovine Serum Albumine (BSA)

No	BSA ($\mu\text{g/ml}$)	Serapan pada λ 500 nm
1	100	0.097
2	150	0.133
3	200	0.189
4	250	0.244
5	300	0.253

Kurva standar hubungan antara konsentrasi BSA dengan serapan pada λ 500 nm



Lampiran 2

Cara Perhitungan Aktivitas dan Aktivitas Spesifik Enzim

Jika pada uji aktivitas enzim amilase dengan metode somogyi-Nelson didapatkan serapan pada λ 520 nm untuk sampel sebesar 0.349 dengan pengenceran 50 kali, dan 0.230 untuk blangko, maka masing-masing serapan tersebut di interpolasikan ke kurva standar glukosa $Y = a + bX$ (di mana Y harga serapan dan X konsentrasi gula yang dicari). Dengan demikian akan diperoleh kadar gula hasil biokonversi oleh enzim sebesar $\Delta X = 50 \left(\frac{0.349 - a}{b} \right) - \left(\frac{0.230 - a}{b} \right)$ per 0.1 ml larutan sampel enzim dan per 10 menit.

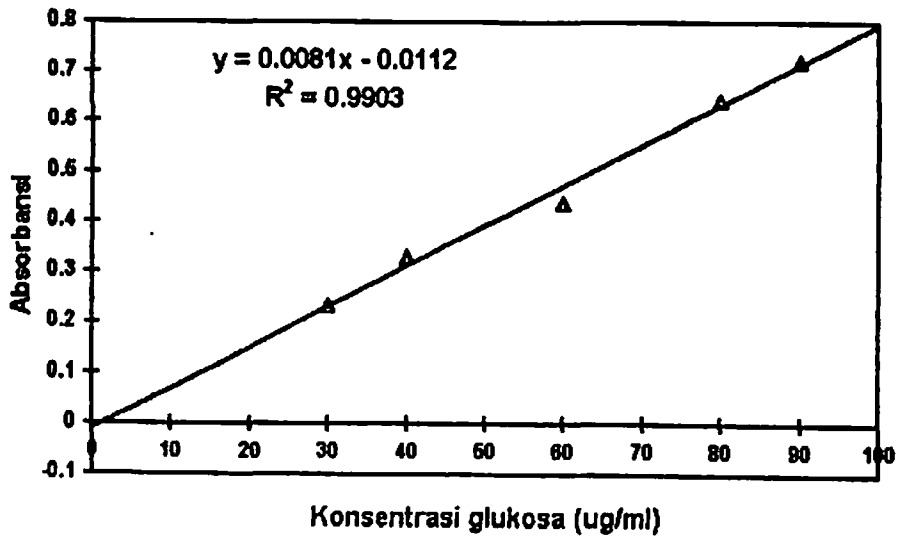
Definisi 1 Unit aktivitas enzim adalah jumlah enzim yang menghasilkan 1 μg glukosa per menit pada kondisi percobaan. Dari definisi ini maka besarnya aktivitas enzim tersebut sama dengan ΔX dengan satuan U/ml.

Sedang aktivitas spesifik diperoleh dengan membagi aktivitas enzim dengan kadar protein X_p ($\mu\text{g/ml}$), Sehingga didapatkan $\Delta X : X_p$ dengan satuan U/ μg protein.

Data untuk kurva standar glukosa

No	Glukosa ($\mu\text{g/ml}$)	Serapan pada λ 520 nm
1	30	0.232
2	40	0.328
3	60	0.437
4	80	0.643
5	90	0.720

Kurva standar hubungan antara kadar glukosa dengan serapan pada λ 520 nm



Lampiran 3

Pereaksi Untuk Penentuan Kadar Gula dengan Metode Somogyi-Nelson

Pereaksi yang digunakan untuk uji ini adalah sebagai berikut :

- a) Larutan Nelson A, terdiri dari 1.5 gram kalium natrium tetrat, 3.0 gram natrium karbonat anhidrous dan 18.0 gram natrium sulfat anhidrous, dilarutkan dalam air. Kemudian diencerkan dengan akuades hingga tercapai volume 100 ml.
- b) Larutan Nelson B, terdiri dari 2.0 gram kupri sulfat $5 \text{ H}_2\text{O}$, 18.0 gram natrium sulfat anhidrous dan 1-2 tetes asam sulfat pekat, dilarutkan dalam akuades sampai volume 100 ml.
- c) Pereaksi alkalis, terdiri dari larutan nelson A dan Nelson B dengan perbandingan 4 : 1 dan selalu dibuat baru.
- d) Pereaksi warna, terdiri dari 5 gram amonium molibdat yang dilarutkan dalam 90 ml akuades, ditambahkan 4.2 ml asam sulfat pekat, kemudian dimasukkan larutan 0.6 gram natrium arsenomolibdat $7\text{H}_2\text{O}$ dalam 5 ml akuades, diaduk. Larutan jernih berwarna kuning yang terbentuk disimpan dalam botol coklat dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C . Penyimpanan secara aman dilakukan dalam lemari es.

SELESAI

PAMERAN

01 JAN 2000

