

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Isolasi Enzim α -amilase

Enzim α -amilase dari *Bacillus Subtilis* ITBCCB148 diperoleh dengan menanam isolat bakteri dalam media inokulum selama 24 jam. Media inokulum tersebut kemudian dipindahkan ke dalam media fermentasi selama 72 jam pada suhu 32⁰C. Media inokulum dan fermentasi diinkubasi dalam *shaker* inkubator pada suhu 32⁰C dengan kecepatan 150 rpm. Media inokulum dan fermentasi mengandung *yeast* ekstrak 0,5%, pati 0,5%, KH₂PO₄ 0,05%, MgSO₄.7H₂O 0,02% dan CaCl₂.2H₂O 0,01% yang dilarutkan dalam akuades. Ekstrak kasar enzim α -amilase dalam media fermentasi dipisahkan dari komponen sel lainnya menggunakan sentrifuga dengan kecepatan 3500 rpm selama 20 menit pada suhu 4⁰C. Ekstrak kasar enzim α -amilase yang diperoleh memiliki aktivitas spesifik sebesar 393 U/mg.

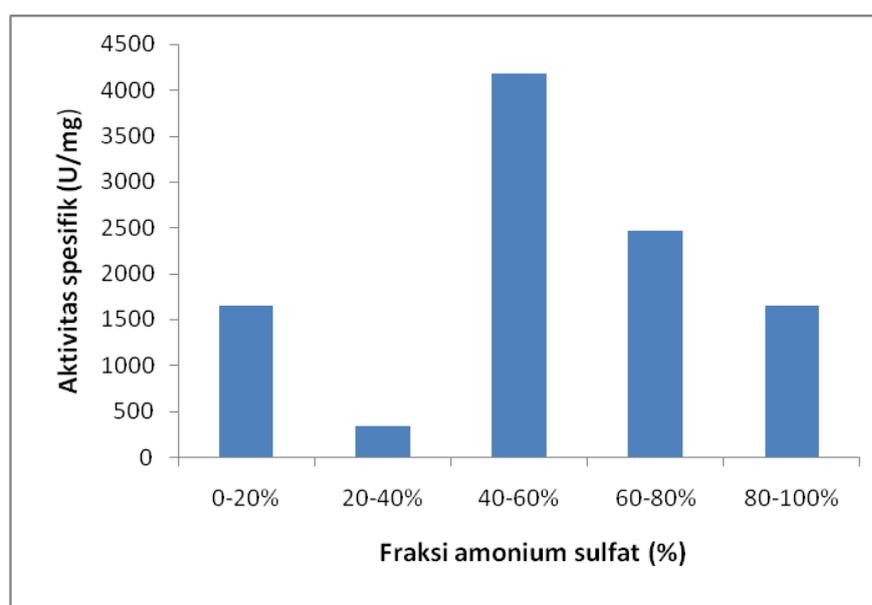
B. Pemurnian Enzim

Ekstrak kasar enzim α -amilase yang diperoleh kemudian dimurnikan. Pemurnian enzim yang dilakukan meliputi beberapa tahap yaitu fraksinasi dengan amonium sulfat, dialisis, dan kromatografi kolom penukar ion menggunakan CMC.

1. Fraksinasi dengan amonium sulfat

Fraksinasi enzim dilakukan dengan menambahkan garam amonium sulfat dengan berbagai tingkat kejenuhan. Kemudian endapan enzim yang dihasilkan dilarutkan dengan buffer pospat 0,1 M.

Penambahan senyawa elektrolit ke dalam larutan enzim akan menyebabkan menurunnya kelarutan enzim, sehingga terbentuk endapan dari protein enzim. Jika suatu garam yang kelarutannya dalam air sangat besar seperti amonium sulfat ditambahkan ke dalam larutan protein, maka terjadi kompetisi antara garam tersebut dan protein untuk dapat larut dalam air. Karena molekul protein jauh lebih besar dibandingkan dengan molekul amonium sulfat, maka amonium sulfat lebih mudah larut dengan mengambil air yang tersolvatasi pada permukaan protein sehingga molekul–molekul protein dapat berinteraksi satu sama lain untuk membentuk agregat (Scopes, 1984).



Gambar 6. Hubungan antara kejenuhan ammonium sulfat dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase

Dari Gambar 6 (Lampiran 1 Tabel 3) dapat dilihat bahwa aktivitas spesifik tertinggi enzim α -amilase ditunjukkan pada fraksi 40-60% yaitu sebesar 4.184,9 U/mg. Tetapi dapat dilihat pula bahwa aktivitas spesifik enzim pada fraksi 0-20% menunjukkan angka yang cukup besar yaitu 1.647,85 U/mg, dan fraksi 60-80% dengan aktivitas spesifik sebesar 2.459,62. Sehingga untuk proses selanjutnya fraksinasi hanya di bagi menjadi dua tahap yaitu 0-40% dan 40-85%. Hal ini dimaksudkan untuk menambah perolehan protein enzim yang didapat, sehingga tidak kehilangan banyak protein enzim selama proses pemurnian dan aktivitas α -amilase yang didapat cukup besar. Fraksi 0-40% tidak digunakan pada proses pemurnian selanjutnya, karena pada fraksi ini enzim α -amilase yang mengendap sangat sedikit sekali. Oleh karena itu fraksi 40-85% yang digunakan pada tahap pemurnian selanjutnya.

2. Dialisis

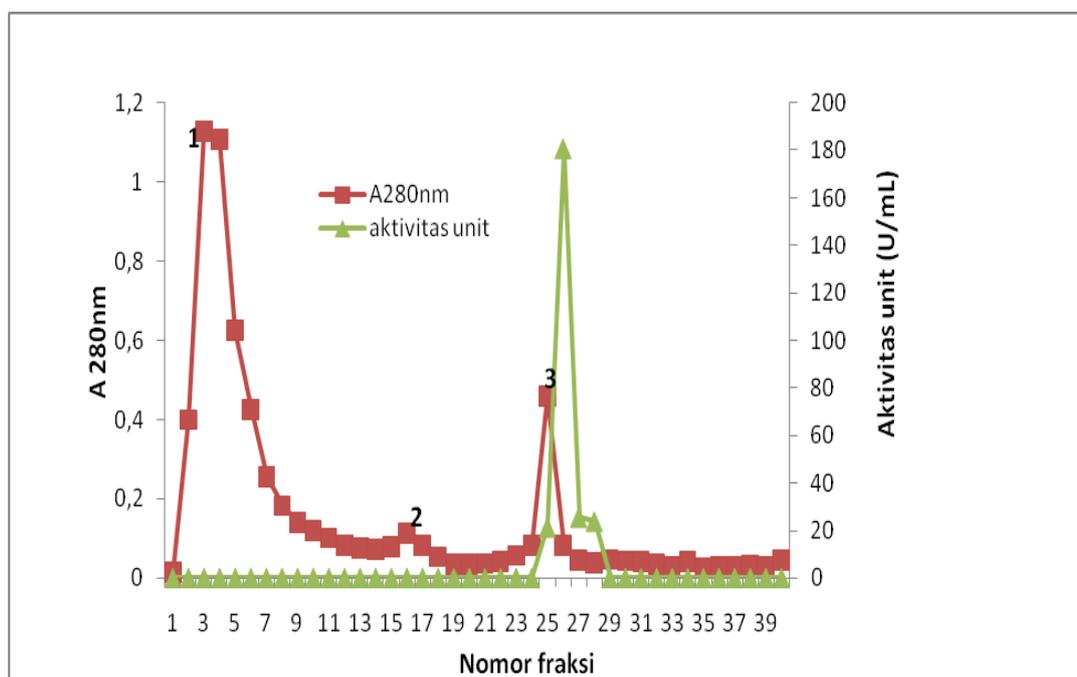
Endapan protein enzim hasil fraksinasi amonium sulfat 40-85% selanjutnya dimurnikan dengan dialisis. Dialisis dilakukan pada suhu dingin dan menggunakan magnetik *stirer*. Proses dialisis ini bertujuan untuk memisahkan protein enzim dari garam-garam dan ion-ion sehingga diperoleh enzim dengan kemurnian dan aktivitas yang tinggi.

Enzim α -amilase hasil dialisis fraksi ammonium sulfat 40-85% memiliki aktivitas spesifik 3.649 U/mg. Hasil tersebut menunjukkan bahwa aktivitas spesifik enzim hasil dialisis meningkat dengan tingkat kemurnian yang lebih

tinggi yaitu 9 kali lebih murni dibandingkan dengan ekstrak kasar dengan perolehan 60%.

3. Kromatografi kolom penukar ion dengan menggunakan CMC

Tahap ini merupakan langkah akhir pemurnian enzim α -amilase. Pemurnian dengan kromatografi kolom penukar ion dengan menggunakan CMC (karboksil metil selulose) diawali dengan penentuan buffer awal yaitu buffer yang sesuai untuk kolom penukar kation tersebut. Berdasarkan hasil percobaan yang dilakukan, enzim dapat menukar *counter* ion dengan baik pada pH 5,2. Oleh karena itu digunakan larutan buffer pospat pH 5,2; 0,05 M sebagai buffer awal. Sedangkan untuk buffer pengelusi, digunakan larutan buffer pospat pH 8,5; 0,05 M. Pola protein (A_{280nm}) dan aktivitas unit ($U\ mL^{-1}$) enzim α -amilase hasil kromatografi kolom penukar ion dengan menggunakan CMC dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Kromatogram enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 pada kolom CMC

Gambar 7 menunjukkan ada 3 puncak protein yang terpisah cukup baik. Puncak protein nomor 1 dan 2 tidak terdapat aktivitas α -amilase. Hal ini menunjukkan telah terpisahnya protein selain enzim α -amilase, dimana protein enzim masih terikat dengan kuat pada matriks. Aktivitas α -amilase terletak pada fraksi nomor 25 sampai fraksi nomor 28 dengan aktivitas tertinggi pada fraksi nomor 26 pada puncak protein nomor 3 (Lampiran 1 Tabel 4). Aktivitas α -amilase pada fraksi nomor 26 memiliki aktivitas unit sebesar 180 U/mL, dengan kadar protein 0,015 mg/mL dan aktivitas spesifik sebesar 12.000 U/mg. Kemurnian enzim meningkat 30 kali dibandingkan ekstrak kasar enzim dengan perolehan 15%.

Tahapan pemurnian enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dapat dilihat pada Tabel 1. Data-data pada tabel tersebut menunjukkan bahwa terjadi peningkatan aktivitas spesifik enzim yang cukup tinggi pada setiap tahap pemurnian. Peningkatan aktivitas spesifik enzim pada tahap pemurnian dengan dialisis (dialisis enzim hasil fraksinasi ammonium sulfat (40-85%) adalah 9 kali dan pemurnian dengan kromatografi kolom dengan menggunakan CMC adalah 30 kali. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemurnian yang dilakukan telah berhasil mendapatkan enzim α -amilase dengan aktivitas dan tingkat kemurnian yang cukup tinggi.

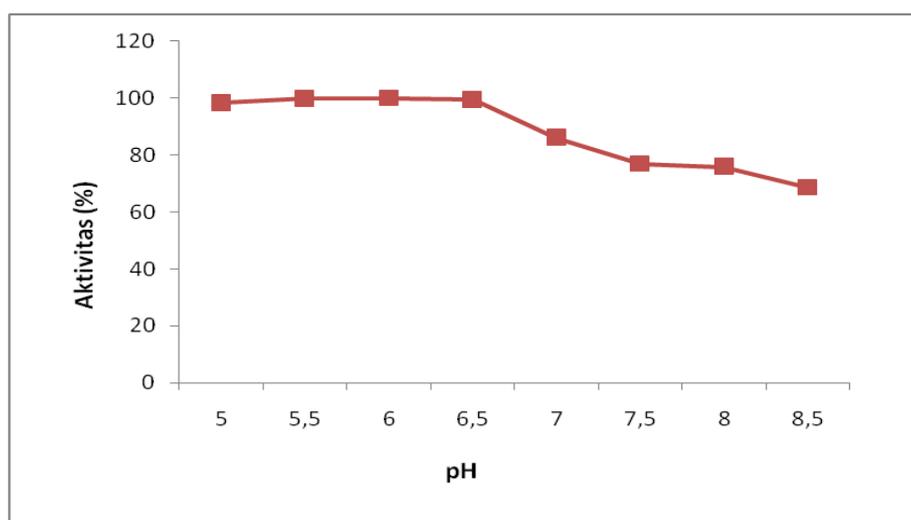
Tabel 1. Pemurnian enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148

Tahap	Volume enzim (ml)	Aktivitas unit (U mL^{-1})	Kadar protein (mg mL^{-1})	Aktivitas spesifik (U mg^{-1})	Aktivitas total(U)	Perolehan (%)	Tingkat Kemurnian (kali)
Eksrak kasar	1.000	125	0,318	393	125.000	100	1
Dialisis hasil fraksinasi (ammonium sulfat (40-85%))	60	1.259	0,345	3.649	75.540	60	9
Kromatografi kolom CMC	111	180	0,015	12.000	19.980	15	30

4. Karakterisasi enzim α -amilase Sebelum dan Sesudah Penambahan Polioliol

a. Penentuan pH optimum Enzim Hasil Pemurnian

Aktivitas (%) enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 hasil pemurnian terhadap berbagai pH dapat dilihat pada Gambar 8. Gambar tersebut menunjukkan bahwa enzim α -amilase hasil pemurnian memiliki pH optimum 6 dengan aktivitas 100 % (Lampiran 2 Tabel 5).



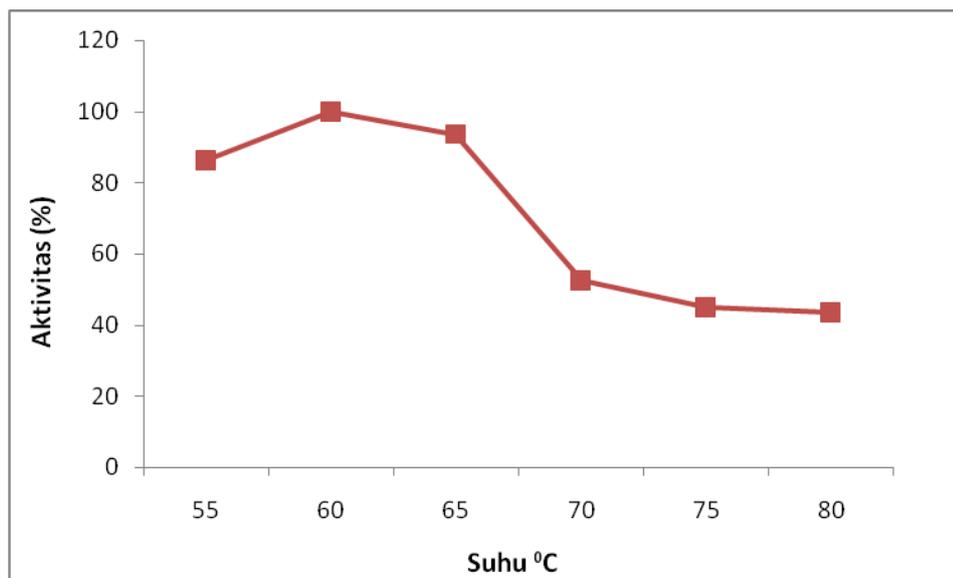
Gambar 8. Hubungan antara pH dengan aktivitas enzim α -amilase hasil pemurnian

Menurut Suhartono (1989) meningkatnya aktivitas enzim pada pH optimum disebabkan karena terjadinya perubahan ionisasi pada gugus ionik sisi enzim yang mempengaruhi sisi aktifnya. Hal ini menyebabkan enzim dapat mengikat substrat lebih efektif dan kemudian mengubahnya menjadi produk.

Disamping pengaruh struktur ion pada enzim, pH rendah atau tinggi dapat pula menyebabkan terjadinya denaturasi dan ini akan mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim. Pada pH di bawah pH optimum, ion H^+ akan berikatan dengan gugus NH_2 bebas membentuk NH_3^+ . Hal ini menyebabkan terputusnya ikatan hidrogen dari amina (NH_2) dengan gugus karbonil dalam molekul protein enzim dan mengakibatkan perubahan konformasi pada pusat aktif enzim. Sedangkan pada pH di atas pH optimum, ion OH^- akan berikatan dengan atom hidrogen dari molekul enzim membentuk H_2O , sehingga ikatan hidrogen dalam molekul protein enzim akan putus. Jika pH semakin jauh dari pH optimum, akan menyebabkan aktivitas enzim semakin menurun hingga laju reaksi mencapai nol.

b. Penentuan suhu optimum Enzim Hasil Pemurnian

Data pada Gambar 9 (Lampiran 2 Tabel 6) menunjukkan enzim α -amilase hasil pemurnian memiliki suhu optimum pada suhu $60^{\circ}C$. Suhu optimum adalah suhu yang menyebabkan terjadinya reaksi kimia dengan kecepatan yang paling besar.

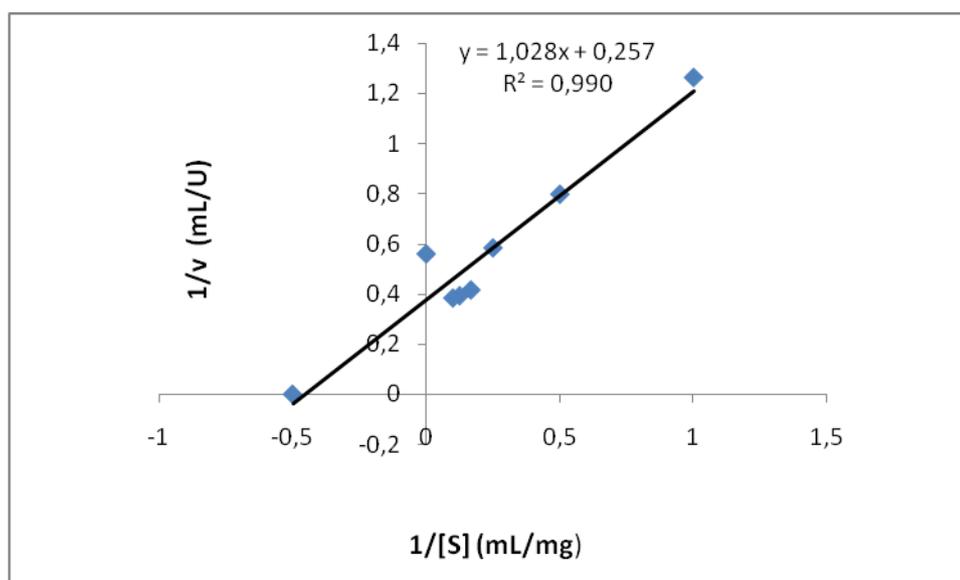


Gambar 9. Hubungan antara suhu dengan aktivitas enzim α -amilase hasil pemurnian

Dari Gambar diatas terlihat bahwa setelah mencapai suhu optimum, aktivitas enzim menurun secara perlahan. Hal ini disebabkan karena enzim mulai mengalami perubahan konformasi yang menyebabkan sisi aktif enzim tidak sesuai dengan substrat. Demikian pula substrat, pada suhu yang terlalu tinggi substrat dapat mengalami perubahan konformasi sehingga gugus reaktifnya mengalami hambatan untuk memasuki sisi aktif enzim (Suhartono, 1989). Sedangkan pada suhu yang lebih rendah dari suhu optimum, aktivitas enzim juga rendah. Hal ini terjadi karena rendahnya energi aktivasi yang tersedia. Energi aktivasi dibutuhkan untuk menciptakan kondisi tingkat kompleks aktif, baik dari molekul enzim maupun molekul substrat.

c. Penentuan K_M dan V_{maks} enzim hasil pemurnian

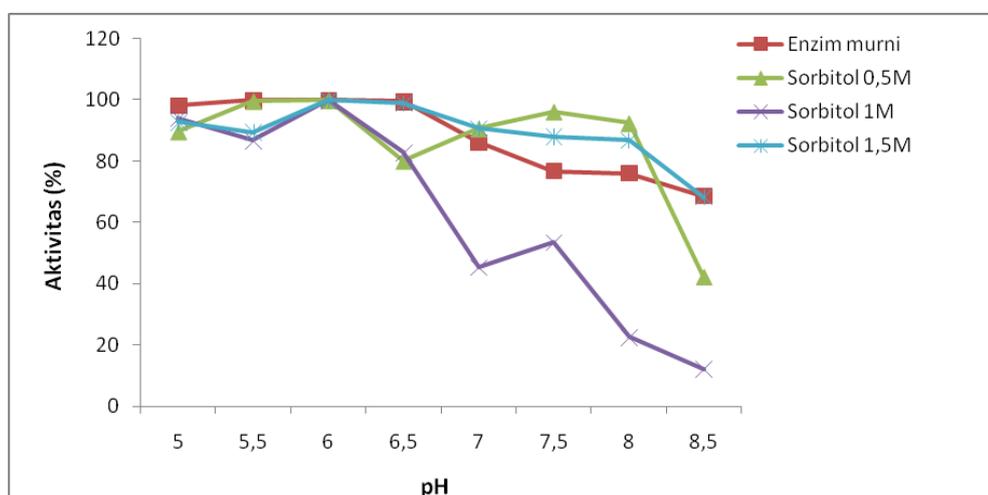
Penentuan K_M dan V_{maks} bertujuan untuk mengetahui konsentrasi substrat untuk menghasilkan laju reaksi maksimum. Penentuan harga K_M dan V_{maks} dilakukan dengan memvariasikan konsentrasi substrat terhadap enzim. Konsentrasi substrat yang digunakan yaitu 0,1; 0,2; dan 0,4; 0,6; 0,8; 1% dalam buffer pospat pH 6 0,01M. Untuk menentukan harga K_M dan V_{maks} , dapat dibuat kurva *Lineweaver-Burk* (Gambar 10). Dari persamaan *Lineweaver – Burk* diperoleh harga V_{maks} enzim hasil pemurnian sebesar $3,89 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{menit}^{-1}$ dan K_M sebesar $3,99 \text{ mg mL}^{-1}$ substrat. Data perhitungan K_M dan V_{maks} enzim α -amilase hasil pemurnian dapat dilihat pada Lampiran 3 (Tabel 7).



Gambar 10. Kurva *Lineweaver-Burk* enzim α -amilase hasil pemurnian

d. Penentuan pH optimum setelah penambahan sorbitol dan gliserol

Percobaan ini bertujuan untuk mengetahui stabilitas enzim α -amilase hasil pemurnian dan sesudah penambahan sorbitol terhadap variasi pH, serta untuk mengetahui apakah terjadi pergeseran pH optimum. Aktivitas (%) enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim setelah penambahan sorbitol dalam 3 variasi konsentrasi terhadap pH optimum dapat dilihat pada Gambar 11 (Lampiran 3 Tabel 8).

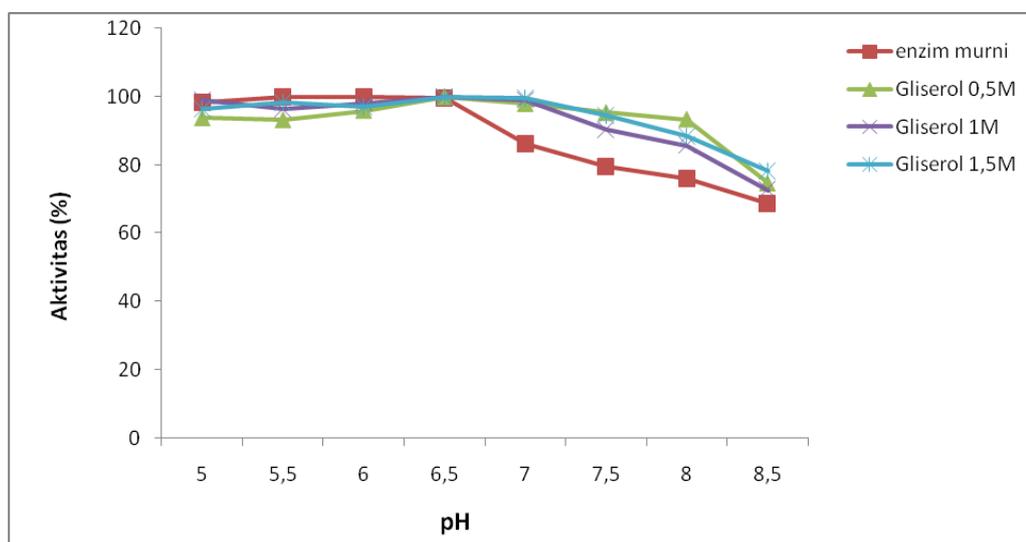


Gambar 11. pH optimum enzim hasil pemurnian dan enzim setelah penambahan sorbitol 0,5M; 1M dan 1,5M

Gambar 11 menunjukkan bahwa enzim α -amilase hasil pemurnian memiliki pH optimum 6. Enzim α -amilase setelah penambahan sorbitol (0,5 M; 1M; dan 1,5M) juga mempunyai pH optimum 6. Jadi tidak terjadi pergeseran pH optimum pada enzim α -amilase baik sebelum maupun sesudah penambahan sorbitol. Enzim hasil pemurnian dapat mempertahankan kestabilannya antara pH 5-6,5. Enzim setelah penambahan sorbitol 0,5M stabil pada kisaran pH 5-8.

Sedangkan enzim setelah penambahan sorbitol 1M mengalami penurunan aktivitas pada pH 7 dan stabil pada pH 7-8,5. Untuk enzim dengan penambahan sorbitol 1,5M stabil pada pH 5-7. Hasil tersebut menunjukkan bahwa enzim α -amilase setelah penambahan sorbitol lebih stabil pada pH basa.

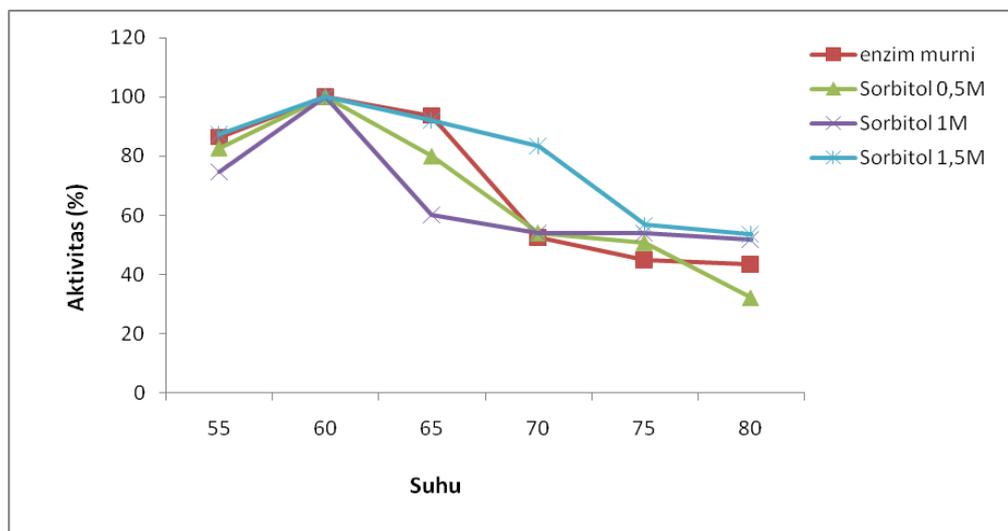
Sedangkan pada penambahan gliserol enzim α -amilase mengalami pergeseran pH optimum yaitu menjadi 6,5 dengan aktivitas 100% (Gambar 12 Lampiran 4 Tabel 9). Enzim dengan penambahan gliserol stabil antara pH 5-7,5, sedangkan enzim hasil pemurnian stabil antara pH 5-6,5. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa enzim dengan penambahan poliol stabil terhadap pH asam maupun basa sedangkan enzim tanpa penambahan poliol hanya stabil pada pH asam saja.



Gambar 12. pH optimum enzim hasil pemurnian dan enzim setelah penambahan Gliserol 0,5M; 1M; dan 1,5M

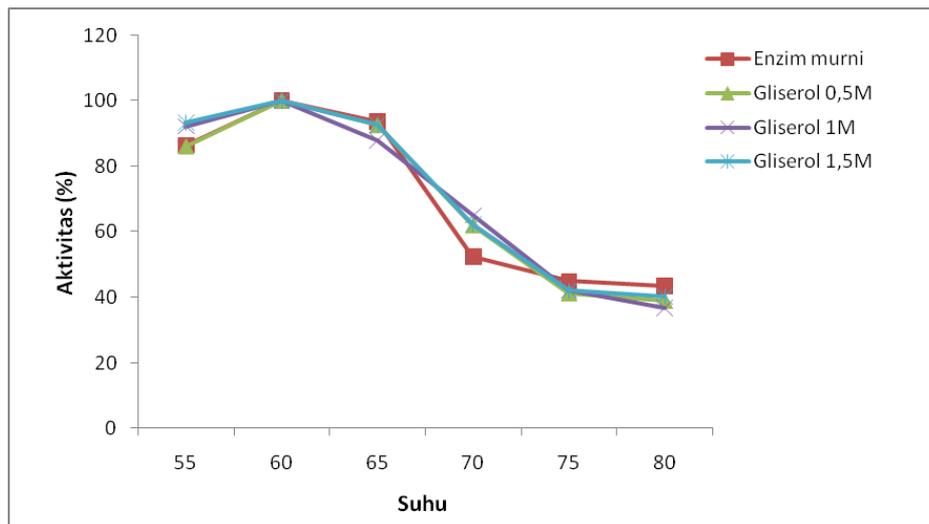
e. Penentuan suhu optimum setelah penambahan sorbitol dan gliserol

Aktivitas (%) enzim α -amilase setelah penambahan sorbitol dan aktivitas (%) enzim α -amilase hasil pemurnian pada berbagai suhu dapat dilihat pada Gambar 13 dan 14.



Gambar 13. Suhu optimum enzim hasil pemurnian dan setelah penambahan sorbitol 0,5M; 1M dan 1,5M

Dari Gambar 13 dapat dilihat bahwa suhu optimum enzim setelah penambahan sorbitol sama dengan suhu optimum hasil pemurnian yaitu 60°C (Lampiran 4 Tabel 10). Suhu optimum enzim setelah penambahan sorbitol mengalami peningkatan aktivitas (%) dibandingkan enzim sebelum penambahan sorbitol yaitu pada suhu antara 70-75°C. Pada suhu 70°C aktivitas enzim (%) dengan penambahan sorbitol (0,5M; 1M; 1,5M) berturut-turut adalah 54,04%; 54,09%; 83,25%. Sedangkan enzim hasil pemurnian memiliki aktivitas enzim sebesar 52,50%.



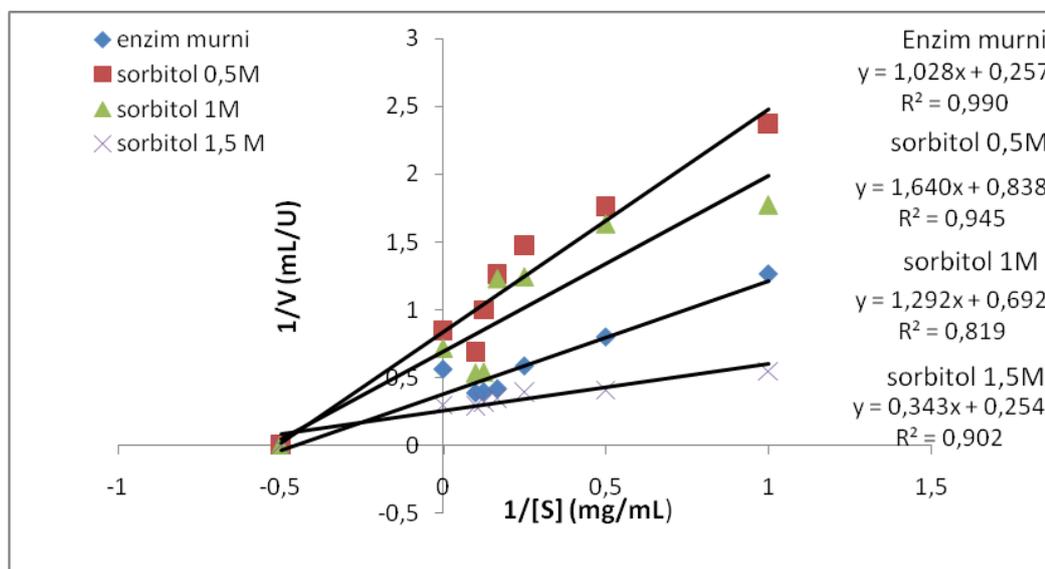
Gambar 14. Suhu optimum enzim hasil pemurnian dengan enzim setelah penambahan gliserol 0,5M; 1M; 1,5M

Gambar 14 menunjukkan bahwa suhu optimum enzim setelah penambahan gliserol tidak mengalami perubahan, yaitu 60°C dengan aktivitas 100% (Lampiran 5 Tabel 11). Dari Gambar diatas bahwa stabilitas enzim α -amilase relatif lebih baik dibandingkan dengan stabilitas enzim hasil pemurnian, yaitu pada suhu 70°C enzim dengan penambahan gliserol (0,5M; 1M; 1,5M) memiliki aktivitas berturut-turut sebesar 62,03%, 65,06%, dan 62,17%, sedangkan aktivitas enzim hasil pemurnian sebesar 52,50%.

f. Penentuan K_M dan V_{Maks} setelah penambahan sorbitol dan gliserol

Grafik penentuan harga K_M dan V_{maks} enzim setelah penambahan sorbitol dan gliserol dapat dilihat pada Gambar 15 dan 16. Gambar 15 menunjukkan harga K_M enzim setelah penambahan sorbitol 0,5M; 1M; dan 1,5M berturut-turut adalah 1,98 mg mL⁻¹ substrat; 1,86 mg mL⁻¹ substrat; 3,93 mg mL⁻¹ substrat. Sedangkan harga K_M untuk enzim hasil pemurnian adalah 3,89 mg mL⁻¹ substrat. Untuk harga V_{maks} enzim setelah penambahan sorbitol 0,5M; 1M; dan

1,5M berturut-turut adalah $1,19 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$; $1,44 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$; $1,35 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$. Sedangkan harga V_{maks} enzim hasil pemurnian adalah $8,69 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$.

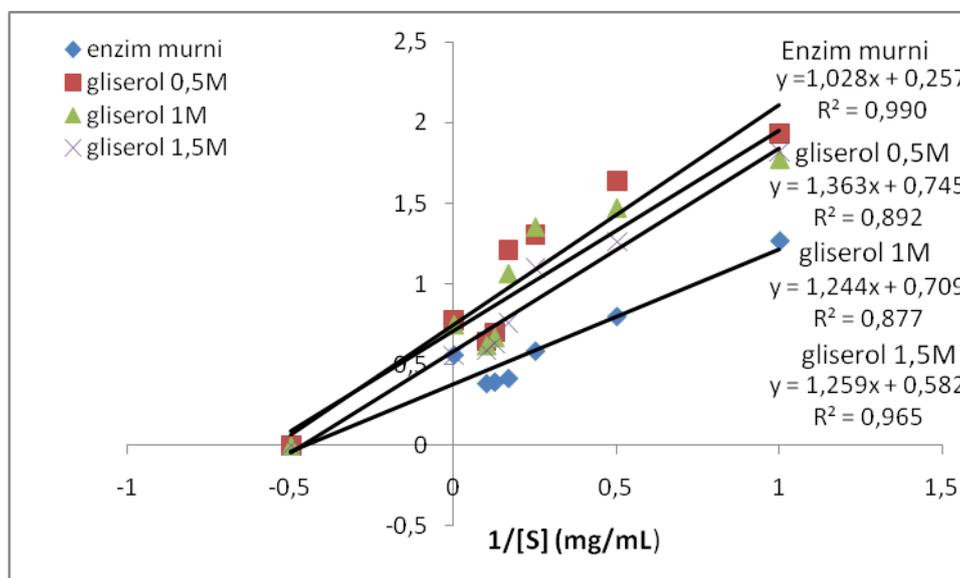


Gambar 15. Kurva *Lineweaver-Burk* enzim setelah penambahan sorbitol 0,5M; 1M; 1,5M

Gambar diatas menunjukkan harga K_M setelah penambahan sorbitol 0,5M dan 1M mengalami penurunan sedangkan sorbitol 1,5M mengalami peningkatan. Sedangkan untuk harga V_{maks} pada konsentrasi 0,5M; 1M; dan 1,5M mengalami penurunan. Hal ini mungkin disebabkan karena bagian aktif enzim langsung terlibat dalam aktivitas poliolnya, sehingga K_M enzim mengalami perubahan (Girindra, 1993).

Berdasarkan Gambar 15, laju reaksi enzim meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat. Pada konsentrasi enzim tetap dan konsentrasi substrat rendah, laju reaksi pun amat rendah, tetapi laju ini akan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat (Lehninger, 1982).

Gambar 16 menunjukkan harga K_M untuk enzim setelah penambahan gliserol 0,5M; 1M; dan 1,5M berturut-turut adalah 1,82 mg mL⁻¹ substrat; 1,75 mg mL⁻¹ substrat; 2,15 mg mL⁻¹ substrat. Sedangkan harga K_M untuk enzim hasil pemurnian adalah 3,99 mg mL⁻¹ substrat. Dan harga V_{maks} enzim setelah penambahan gliserol 0,5M; 1M; 1,5M berturut-turut adalah 1,34 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ menit⁻¹; 1,41 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ menit⁻¹; 1,71 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ menit⁻¹. Sedangkan harga V_{maks} enzim hasil pemurnian adalah 3,89 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ menit⁻¹.



Gambar 16. Grafik *Lineweaver-Burk* enzim setelah penambahan gliserol 0,5M; 1M; 1,5M.

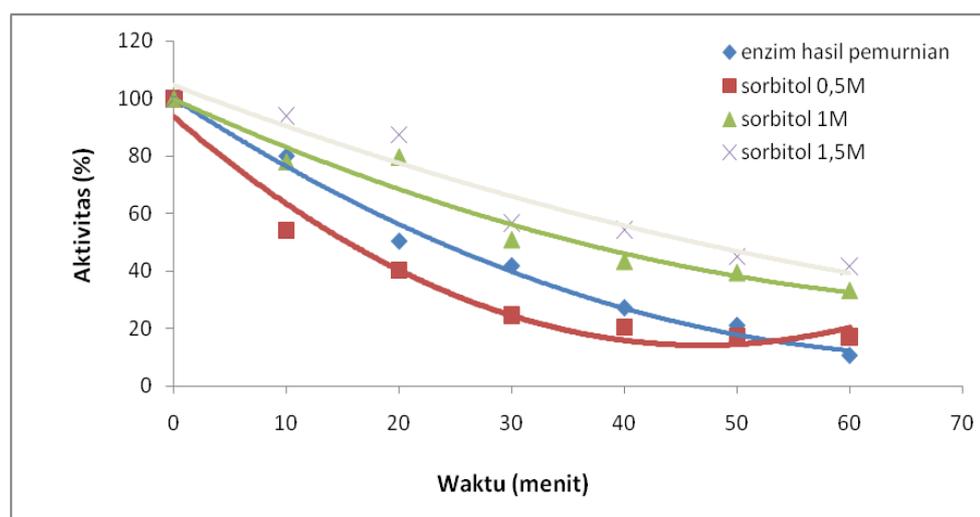
Dari data di atas harga K_M pada semua konsentrasi gliserol mengalami penurunan dibandingkn enzim sebelum penambahan poliol. Sedangkan harga V_{Maks} setelah penambahan gliserol semuanya juga mengalami penurunan.

Hal ini disebabkan gliserol pada molekul enzim diperkirakan membuat enzim menjadi kurang fleksibel dalam larutan air. Pada kondisi tanpa penambahan gliserol, enzim dapat berinteraksi mudah dengan substrat. Sedangkan pada

kondisi penambahan gliserol, adanya molekul lain menyebabkan kondisi ini berubah sehingga V_{Maks} menjadi turun.

g. Stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan enzim setelah penambahan sorbitol dan gliserol

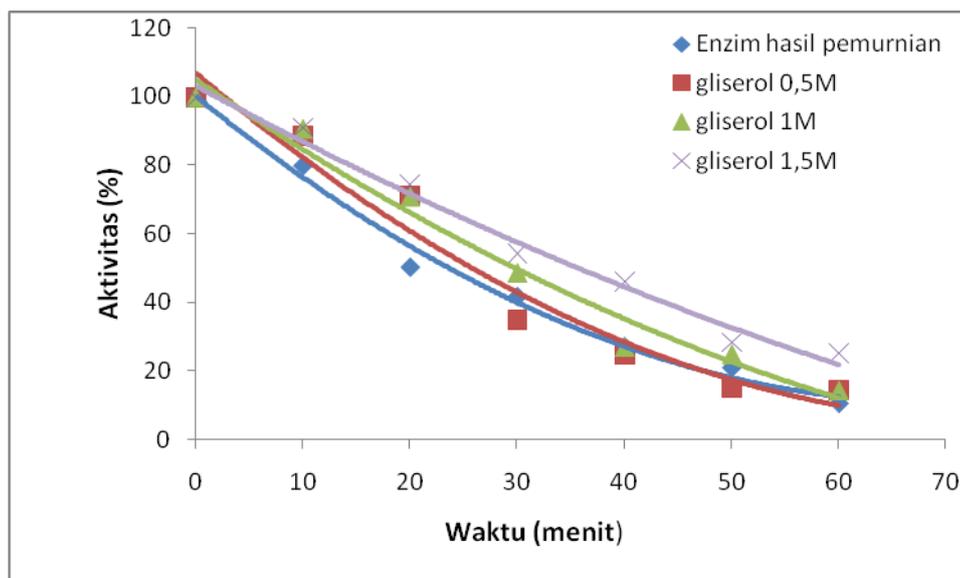
Aktivitas sisa enzim hasil pemurnian dan sesudah penambahan sorbitol dan gliserol (0,5M; 1M; 1,5M) terhadap suhu ditentukan dengan menginkubasi masing-masing enzim tersebut pada suhu 60°C selama 10 menit. Aktivitas enzim diukur tiap 10 menit dan dilakukan hingga inkubasi 60 menit. Gambar 17 menunjukkan aktivitas sisa (%) enzim sebelum dan sesudah penambahan sorbitol (0,5M; 1M; 1,5M).



Gambar 17. Stabilitas enzim hasil pemurnian dan enzim setelah penambahan sorbitol (0,5M; 1M; 1,5M)

Pada gambar diatas terlihat bahwa enzim hasil pemurnian memiliki aktivitas sisa yang lebih rendah, yaitu 10,45%, bila dibandingkan enzim setelah penambahan sorbitol (0,5M; 1M; 1,5M) yang memiliki aktivitas sisa berturut-turut 16,96%; 33,22%; dan 41,69% (Lampiran 7 Tabel 15).

Hasil tersebut menunjukkan bahwa enzim setelah penambahan sorbitol mempunyai stabilitas termal yang lebih tinggi dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Peningkatan stabilitas termal tertinggi dicapai pada enzim setelah penambahan sorbitol 1,5M.



Gambar 18. Stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan enzim setelah penambahan gliserol (0,5M; 1M; 1,5M)

Gambar diatas menunjukkan aktivitas sisa enzim selama penyimpanan pada suhu 60⁰C selama 60 menit. Aktivitas sisa enzim setelah penambahan gliserol (0,5M; 1M; 1,5M) berturut-turut adalah 14,16%; 14,16%; 24,79% (Lampiran 8 Tabel 17). Pada grafik terlihat bahwa aktivitas sisa enzim setelah penambahan gliserol juga meningkat dibandingkan dengan aktivitas sisa enzim hasil pemurnian yang sebesar 10,45%.

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa penambahan sorbitol dan gliserol pada enzim hasil pemurnian memberikan pengaruh yang cukup baik terhadap stabilitas enzim. Proses stabilitas enzim oleh poliol terjadi

karena adanya perubahan pada lingkungan enzim, yang menyebabkan konformasi struktur enzim menjadi lebih *rigid* karena intensitas interaksi hidrofobik antara gugus nonpolar yang meningkat. Interaksi hidrofobik merupakan faktor yang sangat penting dalam stabilitas struktur protein, karena dapat menyebabkan enzim mengalami *folding* sehingga menjadi stabil dibanding struktur *unfolding* (Lemos *et al.*, 2000).

5. Konstanta laju inaktivasi termal (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan enzim setelah penambahan sorbitol dan gliserol

Nilai konstanta laju inaktivasi termal (nilai k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan setelah penambahan poliol (sorbitol dan gliserol) dapat dilihat pada Tabel 2. Penentuan nilai k_i enzim hasil pemurnian dan enzim dengan penambahan poliol dapat dilihat pada Lampiran 8-10. Sedangkan contoh perhitungan nilai ΔG_i dapat dilihat pada Lampiran 11.

Tabel 2. Nilai k_i , ΔG_i , dan $t_{1/2}$ enzim hasil pemurnian dan enzim setelah penambahan poliol

Enzim	k_i (menit ⁻¹)	$t_{1/2}$ (menit)	ΔG_i (kj/mol)
Hasil pemurnian	0,035	19,80	102,489
Sorbitol 0,5M	0,029	23,89	103,010
Sorbitol 1M	0,018	38,50	104,330
Sorbitol 1,5M	0,016	43,31	104,657
Gliserol 0,5M	0,033	21,00	102,652
Gliserol 1M	0,033	21,00	102,652
Gliserol 1,5M	0,025	27,72	103,421

a. Konstanta laju inaktivasi termal (k_i)

Pada Tabel 2 menunjukkan terjadi penurunan nilai konstanta laju inaktivasi termal pada masing-masing setelah penambahan poliol. Hal ini berarti terjadi penurunan laju denaturasi enzim dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Penurunan nilai k_i diperkirakan karena kondisi enzim yang kurang fleksibel dalam larutan air yang menjadikan ketidakterlipatan (*unfolding*) protein menjadi berkurang, sehingga meningkatkan kestabilan enzim.

b. waktu paruh ($t_{1/2}$)

Semua waktu paruh ($t_{1/2}$) enzim setelah penambahan poliol meningkat. Menurut Stahl (1999) dalam Yandri (2004), menyatakan bahwa waktu paruh enzim akan menentukan stabilitas enzim tersebut. Berdasarkan penelitian ini, waktu paruh enzim tertinggi dicapai oleh enzim dengan penambahan sorbitol 1,5M yaitu 43,31 menit dan gliserol 1,5M sebesar 27,72 menit.

c. Perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i)

Dari (Tabel 2) terlihat bahwa terjadi peningkatan nilai ΔG_i enzim setelah penambahan poliol dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian, meskipun peningkatannya tidak terlalu besar. Hal ini menunjukkan bahwa enzim setelah penambahan poliol dengan konsentrasi yang lebih tinggi semakin *rigid* dan kurang fleksibel dalam air, sehingga energi yang diperlukan untuk mendenaturasi enzim tersebut semakin tinggi. Struktur enzim yang semakin

rigid memiliki ikatan yang lebih kuat sehingga konformasi enzim tidak mudah membuka dan struktur tersier enzim lebih dapat dipertahankan. Untuk mendenaturasi enzim tersebut dibutuhkan energi yang lebih tinggi, maka ΔG_i akan semakin besar. Oleh karena itu, harga ΔG_i yang semakin besar mengindikasikan suatu enzim yang semakin rigid, kurang fleksibel dan tidak mudah terdenaturasi. Kenaikan ΔG_i yang tidak terlalu besar ini juga dilaporkan oleh Yandri (2004) yang menyatakan terjadi peningkatan ΔG_i enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis*, yaitu enzim hasil pemurnian (102,3 kJ/mol) dan enzim hasil modifikasi kimia (CC-PEG 67% : 104,7 kJ/mol dan NPC-PEG 89% : 106,3 kJ/mol).