

**PENGARUH PENAMBAHAN SORBITOL TERHADAP STABILITAS
ENZIM α -AMILASE DARI *Bacillus subtilis* ITBCCB148**

(Skripsi)

**Oleh
APRILIA ISMA DENILA**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2016**

ABSTRAK

PENGARUH PENAMBAHAN SORBITOL TERHADAP STABILITAS ENZIM α -AMILASE DARI *Bacillus subtilis* ITBCCB148

Oleh

Aprilia Isma Denila

Enzim α -amilase merupakan enzim yang penting dalam bidang pangan, bioteknologi dan industri serta berperan dalam hidrolisis amilum dengan memutus ikatan α -1,4 glikosida. Pada bidang industri, enzim ini harus mampu bekerja pada pH ekstrim dengan stabilitas termal yang tinggi, namun pada umumnya enzim tidak stabil pada kondisi tersebut.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mempelajari pengaruh penambahan sorbitol terhadap stabilitas enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148. Untuk mencapai tujuan tersebut, telah dilakukan berbagai tahap yaitu : produksi, isolasi, serta pemurnian secara fraksinasi ammonium sulfat dan dialisis. Aktivitas enzim α -amilase ditentukan dengan metode *Fuwa* dan *Mandels* sedangkan kadar protein enzim ditentukan dengan metode *Lowry*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa enzim hasil pemurnian memiliki aktivitas spesifik sebesar 4185,70 U/mg, meningkat 11 kali dibandingkan ekstrak kasar enzim dengan aktivitas spesifik sebesar 373,559 U/mg. Enzim hasil pemurnian ini memiliki pH optimum 6,5; suhu 60°C; nilai $K_M = 9 \mu\text{mol/mL.menit}$; $V_{\text{maks}} = 500 \mu\text{mol/mL.menit}$, nilai $k_i = 0,029 \text{ menit}^{-1}$; $t_{1/2} = 23,896 \text{ menit}$; $\Delta G_i = 103,009 \text{ KJ mol}^{-1}$. Uji stabilitas termal enzim setelah penambahan sorbitol 0,5 M memiliki nilai $K_M = 3,4 \mu\text{mol/mL.menit}$, $V_{\text{maks}} = 200 \mu\text{mol/mL.menit}$, nilai $k_i = 0,021 \text{ menit}^{-1}$; $t_{1/2} = 33 \text{ menit}$; $\Delta G_i = 103,903 \text{ KJ mol}^{-1}$, sorbitol 1,0 M memiliki nilai $K_M = 4,95 \mu\text{mol/mL.menit}$, $V_{\text{maks}} = 333,333 \mu\text{mol/mL.menit}$, nilai $k_i = 0,016 \text{ menit}^{-1}$; $t_{1/2} = 43,312 \text{ menit}$; $\Delta G_i = 104,312 \text{ KJ mol}^{-1}$, dan sorbitol 1,5 M memiliki nilai $K_M = 7,5 \mu\text{mol/mL.menit}$, $V_{\text{maks}} = 500 \mu\text{mol/mL.menit}$, nilai $k_i = 0,012 \text{ menit}^{-1}$; $t_{1/2} = 57,75 \text{ menit}$; $\Delta G_i = 105,452 \text{ KJ mol}^{-1}$.

Penambahan sorbitol terhadap enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 menunjukkan peningkatan stabilitas termal enzim berdasarkan peningkatan waktu paruh dan ΔG_i serta turunnya nilai k_i .

Kata Kunci : α -amilase, *Bacillus subtilis* ITBCCB148, sorbitol.

ABSTRACT

EFFECTS OF SORBITOL ADDITION TO THE STABILITY OF THE ENZYME α -AMYLASE FROM *Bacillus subtilis* ITBCCB148

By

Aprilia Isma Denila

α -amylase is an enzyme that is important in the field of food, biotechnology, and industry as well as play a role in the hydrolysis of starch, to break the α -1,4 glycoside. In a specific industry, this enzyme must be capable of working at extreme pH with high thermal stability, but in general the enzyme is not stable in these condition.

The purpose of this research was to study the effects of sorbitol on the stability of the enzyme α -amylase from *Bacillus subtilis* ITBCCB148. To achieve these objectives, it has been carried out a number of stages, i.e: production, isolation, and purification by ammonium sulfate fractionation and dialysis. The enzyme activity was determined by the method of *Fuwa* and *Mandels* while the enzyme protein content determined by the method of *Lowry*.

The results showed that the purified enzyme has a specific activity of 4185.7 U/mg, an increased of 11 fold compared to crude extract of the enzyme with a specific activity of 373.559 U/mg. Purified enzyme has a pH optimum 6.5; temperature 60°C; $K_M = 9 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{sec}$; $V_{\text{max}} = 500 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{sec}$; $k_i = 0.029 \text{ sec}^{-1}$; $t_{1/2} = 23.896 \text{ sec}$; $\Delta G_i = 103.009 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Kinetic data of the enzyme after the addition of 0.5 M sorbitol has the $K_M = 3.4 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{sec}$; $V_{\text{max}} = 200 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{sec}$; $k_i = 0.021 \text{ sec}^{-1}$; $t_{1/2} = 33 \text{ sec}$; $\Delta G_i = 103.903 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, addition of 1.0 M sorbitol has the $K_M = 4.95 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{sec}$; $V_{\text{max}} = 333.333 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{sec}$; $k_i = 0.016 \text{ sec}^{-1}$; $t_{1/2} = 43.312 \text{ sec}$; $\Delta G_i = 104.312 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$; and addition of sorbitol 1.5 M has the $K_M = 7.5 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{sec}$; $V_{\text{max}} = 500 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{sec}$; $k_i = 0.012 \text{ sec}^{-1}$; $t_{1/2} = 57.75 \text{ sec}$; and $\Delta G_i = 105.452 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

The addition of sorbitol to the α -amylase from *Bacillus subtilis* ITBCCB148 showed increase the thermal stability of the enzyme which showed on an increment in half-life ΔG_i and capability to decrease the k_i value.

Keyword : α -amylase, *Bacillus subtilis* ITBCCB148, sorbitol.

**PENGARUH PENAMBAHAN SORBITOL TERHADAP STABILITAS
ENZIM α -AMILASE DARI *Bacillus subtilis* ITBCCB148**

Oleh

APRILIA ISMA DENILA

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar
SARJANA SAINS**

Pada

**Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Lampung**



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2016**

Judul Skripsi : **PENGARUH PENAMBAHAN SORBITOL
TERHADAP STABILITAS ENZIM α -AMILASE
DARI *Bacillus subtilis* ITBCCB148**

Nama Mahasiswa : **Aprilia Isma Denila**

Nomor Pokok Mahasiswa : 1117011005

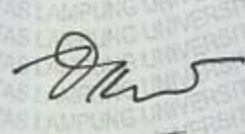
Jurusan : **Kimia**

Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**

MENYETUJUI

Ketua Jurusan

Pembimbing

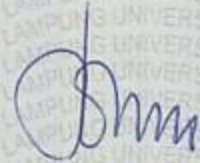

Dr. Suripto Dwi Yuwono, M.T.
NIP 19740705 200003 1 001


Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S.
NIP 19560905 199203 1 001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

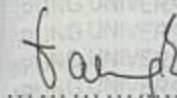
Ketua : **Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S.**



Penguji
Bukan Pembimbing : **Mulyono, Ph.D.**



Penguji
Bukan Pembimbing : **Prof. Dr. Tati Suhartati, M.Si.**



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Prof. Warsito, S.Si., DEA., Ph.D.
NIP 19710212 199512 1 001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 12 Oktober 2016

RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Way Jepara, Lampung Timur pada tanggal 23 April 1993, sebagai anak bungsu dari empat bersaudara putri dari Bapak Zaeral Umri dan Ibu Rohimah.

Jenjang pendidikan diawali dari Sekolah Dasar (SD) di SDN 1 Labuhan Ratu I diselesaikan pada tahun 2005. Sekolah Lanjutan Tingkat Pertama di SMPN 1 Way Jepara diselesaikan pada tahun 2008, dan Sekolah Menengah Atas di SMAN 1 Way Jepara diselesaikan pada tahun 2011. Tahun 2011, Penulis terdaftar sebagai Mahasiswa Jurusan Kimia FMIPA Unila melalui jalur UML (Ujian Mandiri Lokal).

Pada tahun 2015 Penulis melakukan Praktik Kerja Lapangan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Unila. Tahun 2015, penulis telah melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) selama 40 hari di Desa Labuhan Jaya Kab. Way Kanan. Selama menjadi mahasiswa penulis pernah menjadi asisten praktikum Sains Dasar tahun 2014, asisten praktikum Kimia Dasar tahun 2015, asisten praktikum Biokimia periode 2014-2016 untuk mahasiswa S1 Jurusan Biologi FMIPA Unila, mahasiswa S1 Jurusan Kimia FMIPA Unila. Penulis juga pernah menjadi asisten praktikum Kimia Medik untuk mahasiswa Kedokteran FK Unila.

Dalam bidang organisasi, penulis pernah terdaftar sebagai Kader Muda Himpunan Mahasiswa Kimia (KAMI) FMIPA periode 2011-2012, sebagai anggota biro kesekretariatan Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) periode 2012-2013, dan anggota biro penerbitan Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) periode 2013-2014.

*Janganlah kamu bersikap lemah dan janganlah (pula) kamu bersedih hati
(Q.S Ali Imran : 139)*

dan janganlah kamu berputus asa dari rahmat Allah (Q.S. Yusuf : 87)

*karena Sesungguhnya setelah kesulitan itu ada kemudahan (Q.S Al.
Insyirah : 5).*

*Keberhasilan adalah kemampuan untuk melewati dan mengatasi dari satu
kegagalan ke kegagalan berikutnya tanpa harus kehilangan semangat.
(Winston Churchill)*

*Kepuasan terletak pada usaha, bukan pada hasil. Berusaha dengan keras
adalah kemenangan yang hakiki.
(Mahatma Gandhi)*

*Orang hebat bukan orang yang selalu berhasil dalam setiap usahanya,
namun orang hebat adalah orang senantiasa bersabar, selalu
mengintrospeksi diri dan berfikir kreatif mencari bermilyar-milyar jalan
menuju kesuksesan.
(Penulis)*

*Berusahalah untuk tidak menjadi manusia yang berhasil tapi berusahalah
menjadi manusia yang berguna.
(Albert Einstein)*

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

"Dengan menyebut nama Allah Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang
(Q.S. Al-Fatihah : 1)

Kupersembahkan karya ini kepada :

ALLAH S.W.T

*Rosulullah SAW beserta keluarganya
Junjunganku, suri tauladanku, yang kunanti-nantikan syafa'atnya di hari
kebangkitan kelak.*

*Kedua Orang tua ku,
Bapak dan Ibu yang telah menyayangi, merawat, mendidik, mengajarkan
banyak kebaikan hingga saat ini. Terima kasih Bapak. Terima kasih Ibu.
Kalianlah semangat hidupku, penerang jalanku. Oleh karena itu, ijin kan
anakmu mempersembahkan sebuah karya kecil ini sebagai ungkapan rasa terima
kasih dan hormatku kepada Bapak dan Ibu untuk semua pengorbanan yang
telah Bapak dan Ibu lakukan untukku yang mungkin takkan pernah dapat
terbalas oleh apapun dan sampai kapanpun.*

*Ketiga Saudaraku :
Mba Yuni Ariyanti, Mba Yuli Fitriana dan Mba Yuli Daniarti*

*Keenam Keponakanku tercinta :
Azka Idhiyan Arrasyi, Syakira Nabilla Azzahra, Atiqah Kadziya, Naila
Muaratuz Zahra, Afkar Zaki Gusrian, dan Inaya Azmi Athifa Gusrian*

Pembimbing Prof. Dr. Ir. Yandri AS. M.S.

Guru-guru yang selalu membagi ilmunya untukku

Seluruh sahabat yang selalu menyemangati ku

dan Almamater Tercinta

SANWACANA

Assalamualaikum Wr. Wb.,

Alhamdulillah puji dan syukur penulis ucapkan kehadiran Allah S.W.T, serta sholawat dan salam selalu tercurah pada nabi Besar kita, Nabi Muhammad Saw. Atas segala rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi dengan judul, ” **Pengaruh Penambahan Sorbitol terhadap Stabilitas Enzim α -Amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148**”. Dalam menyelesaikan skripsi ini penulis tidak luput dari bimbingan, arahan, serta bantuan dari berbagai pihak, untuk itu penulis menghaturkan terima kasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S., selaku pembimbing utama dan yang telah banyak memberikan ilmu pengetahuan, gagasan, bimbingan, bantuan, dukungan, arahan, saran dan kritik kepada penulis selama penelitian hingga selesainya skripsi ini.
2. Bapak Mulyono, Ph.D. dan Ibu Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S., selaku pembahas atas kesediaan memberikan arahan, koreksi, saran dan kritik.
3. Bapak Prof. Sutopo Hadi, Ph.D., selaku pembimbing akademik atas segala bimbingan dan motivasi yang telah diberikan kepada penulis.
4. Bapak Prof. Warsito, S.Si., DEA., Ph.D., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

5. Bapak Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T., selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
6. Seluruh Dosen Universitas Lampung yang telah mendidik dan memberikan ilmu pengetahuan kepada penulis.
7. Seluruh Staf dan karyawan Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
8. Kedua orang tuaku Bapak Zaeral Umri dan Ibu Rohimah, yang selalu memberikan do'a, motivasi, dukungan, nasihat, yang sangat berharga bagi penulis.
9. Kakak-kakakku, Yuni Ariyanti, Yuli Fitriana, dan Yuli Daniarti yang selalu mendukungku.
10. *Partner* terbaikku, Ana Febrianti Wulandari dan Uswatun Hasanah, terima kasih atas kerja sama yang sangat baik serta bantuan, dukungan, canda, tawa, dan motivasinya selama penelitian. Terima kasih juga sudah menjadi pendengar yang baik atas segala keluhan penulis.
11. Sahabat-sahabat terbaikku, Lusi Meliyana S.Si., Vevi Aristiani S.Si., Uswatun Hasanah, Febri Windi Asmoro, Mega Suci Hanifa Putri, Ana Febrianti Wulandari dan Adik Ismi Khomsiah, atas segala bantuan dan motivasinya.
12. Sahabat-sahabat SMA-ku Dewi Oktaviani, Dewi Handayani, Retno Dewi Pertiwi, Kartini, Idha Triani, Yeni Perwira, dan Bonita Setiarini terima kasih atas persahabatan yang diberikan selama ini.

13. Teman-Teman SMA-Ku sekaligus keluarga besar PASTY terima kasih atas dukungan, persahabatan yang diberikan selama ini dan tetap jaga persaudaraan ini.
14. Teman-teman se-angkatan 2011, **Biochemgroup** : Ajeng Ayu Miranti S.Si., Ana Febrianti W, Ayu Berliana S.Si., Uswatun Hasanah, Febri Windi Asmoro, Azies Nur, J. Julianser Nico, Pandegani Paratmadja. **Organicgroup** : Ridho Nahrowi S.Si., Junaidi Permana S.Si., Miftahur rahman S.Si., Mirfat Salim Abdat S.Si., M. Andri Nosya S.Si., Yulia Ningsih S.Si., Wagiran S.Si., Jjelita Siahaan S.Si., Arik Irawan, Rio Febriansyah, **Physicgroup**: Lusi Meliyan S.Si., Ivan Halomoan S.Si., Ramos Vicher S.Si., Endah Pratiwi S.Si., Fatma Maharani S.Si., Vevi Aristiani S.Si., Eva Dewi Novianti Sirait S.Si., Umi Fadilah S.Si., Sanjaya Yudha Gautama S.Si., Yusry Ahmadhani, Jelita P Saroinsong S.Si., **Anorgroup**: Asti Nurul Aini S.Si., Mely Antika S.Si., Melli Novita Windiyani S.Si., Rio Wicaksono S.Si., Dewi Karlina S.Si., Dia Tamara S.Si., Rina Wijayanti S.Si., Nopitasari S.Si., Nico Mei Chandra S.Si., Yunia Hartina S.Si., Irkham Bariklana. **Analyticgroup**: Cindy Moyna Clara S.Si., Nira Dwi Puspita S.Si., Mega Suci Hanifa Puteri S.Si., Anggino Saputra S.Si, Ari Susanto, Ayu Fitriani S.Si., Daniar Febriliani S.Si., Fatimah Milasari, Frederica Giofany Tirtasari S.Si., Mardian Bagus Saputra S.Si., Lewi Puji L.M dan terimakasih atas kebersamaannya selama ini.
15. Rekan-rekan Laboratorium Biokimia (Castle), Princess Putri Amalia M.Si., Ajeng Ayu Miranti S.Si., Ayu Berliana S.Si., Ana Febrianti W, Uswatun Hasanah, Febri Windi Asmoro, Erlita Aisyah, Maria Ulfa, Ruwaidah

Muliyana, Diani Iska Miranti, Fifi Adriyanti, Rizki Putriyana, dan Syatira, terimakasih atas segala bantuan, kerjasama, keceriaan, dan kebersamaannya.

16. Himaki FMIPA Unila yang senantiasa memberikan pengalaman kepada penulis.
17. Kakak dan adik tingkat penulis : 2007, 2008, 2009, 2010, 2012, dan 2013
18. Adik-adik kost ku Putri Rahayu Ningsih, Intan Syapriani, dan Ayu Nessa yang selalu memberikan semangat dan bantuanya.
19. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu-persatu yang telah memberikan bantuannya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik.

Semoga Allah SWT membalas semua kebaikan yang telah mereka berikan kepada penulis. Amin. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, akan tetapi sedikit harapan semoga skripsi yang sederhana ini dapat berguna dan bermanfaat khususnya bagi rekan-rekan mahasiswa dan para pembaca umumnya. Amin.

Bandar Lampung, September 2016

Aprilia Isma Denila

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR	vi
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Tujuan Penelitian	3
C. Manfaat Penelitian	3
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
A. Enzim	4
1. Klasifikasi enzim	5
2. Sifat katalitik enzim.....	7
3. Faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim.....	7
4. Teori pembentukan enzim substrat	12
B. <i>Bacillus sp</i>	13
C. Enzim Amilase	14
D. Kinetika Reaksi Kimia	17
E. Stabilitas Enzim.....	18
1. Stabilitas termal enzim	19
2. Stabilitas pH enzim.....	20

F. Isolasi dan Pemurnian Enzim	21
1. Lisis dinding sel	21
2. Sentrifugasi	21
3. Fraksinasi dengan ammonium sulfat	22
4. Dialisis	23
5. Pengujian aktivitasn enzim dengan metode <i>Fuwa</i>	24
6. Penentuan kadar protein dengan metode <i>Lowry</i>	24
G. Senyawa Aditif	25
H. Poliol (Alkohol Polihidrat)	26
III. METODE PENELITIAN	28
A. Tempat dan Waktu Penelitian	28
B. Alat dan Bahan	28
C. Prosedur Penelitian	29
1. Pembuatan media inokulum dan fermentasi, inokulasi <i>Bacillus subtilis</i> ITBCCB148 dan produksi enzim α -amilase	29
a. Pembuatan media inokulum dan fermentasi	29
b. Inokulasi <i>Bacillus subtilis</i> ITBCCB148	29
c. Produksi enzim α -amilase	30
2. Isolasi Enzim	30
3. Uji aktivitas enzim α -amilase	31
a. Pembuatan pereaksi untuk pengujian aktivitas enzim α -amilase metode <i>Fuwa</i>	31
b. Pembuatan pereaksi untuk pengukuran kadar protein enzim α -amilase metode <i>Lowry</i>	31
c. Pembuatan pereaksi untuk pengujian aktivitas enzim α -amilase metode <i>Mandels</i>	32

4. Fraksinasi dengan ammonium sulfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	32
5. Dialisis	33
6. Uji aktivitas enzim α -amilase.....	34
Pengujian aktivitas enzim α -amilase	34
7. Penentuan kadar protein enzim α -amilase.....	35
Penentuan kadar protein enzim α -amilase metode <i>Lowry</i>	35
8. Penambahan sorbitol	35
9. Karakterisasi enzim sebelum dan sesudah penambahan sorbitol.....	36
a. Penentuan pH dan suhu optimum.....	36
b. Penentuan data kinetika enzim (nilai K_M dan V_{maks}).....	36
c. Uji stabilitas termal dan stabilitas pH enzim.....	37
d. Penentuan waktu paruh ($t_{1/2}$), konstanta laju inaktivasi (k_i), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i).....	37
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	40
A. Produksi dan isolasi enzim α -amilase	40
B. Pemurnian Enzim α -amilase	41
1. Fraksinasi dengan ammonium sulfat.....	41
2. Dialisis	43
C. Karakterisasi enzim hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan sorbitol	44
1. Penentuan pH optimum enzim sebelum dan setelah penambahan sorbitol	44
2. Penentuan suhu optimum enzim sebelum dan setelah penambahan sorbitol	46
3. Penentuan K_M dan V_{maks} enzim hasil pemurnian sebelum dan	

setelah penambahan sorbitol	47
4. Stabilitas termal enzim hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan sorbitol	49
5. Penentuan konstanta laju inaktivasi (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim sebelum dan setelah penambahan sorbitol	50
V. SIMPULAN DAN SARAN	53
1. Simpulan	53
2. Saran	54
DAFTAR PUSTAKA	55
LAMPIRAN	60
1. Hubungan antara berbagai tingkat kejenuhan ammonium sulfat (0-95%) dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase	60
2. Hubungan antara berbagai tingkat kejenuhan ammonium sulfat (0-95%) dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase	60
3. Hubungan antara pH dengan aktivitas unit enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim α -amilase hasil penambahan sorbitol	61
4. Hubungan antara pH dengan aktivitas sisa (%) enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim α -amilase hasil penambahan sorbitol	61
5. Hubungan antara suhu dengan aktivitas unit enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim α -amilase hasil penambahan sorbitol	62
6. Hubungan antara suhu dengan aktivitas sisa (%) enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim α -amilase hasil penambahan sorbitol	62

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil pengukuran aktivitas enzim α -amilase pada setiap tahap pemurnian	44
2. Nilai konstanta laju inaktivasi (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan sorbitol	50
3. Data penentuan K_M dan V_{maks} enzim α -amilase hasil pemurnian berdasarkan persamaan <i>Lineweaver – Burk</i>	63
4. Data penentuan K_M dan V_{maks} enzim α -amilase hasil setelah penambahan sorbitol pemurnian berdasarkan persamaan <i>Lineweaver – Burk</i>	63
5. Hubungan antara aktivitas unit (U/mL) enzim hasil pemurnian dan enzim hasil penambahan sorbitol 0,5; 1,0; 1,5 M selama inaktivasi termal pada suhu 60°C.....	64
6. Hubungan antara aktivitas sisa (%) enzim hasil pemurnian dan enzim hasil penambahan sorbitol 0,5; 1,0; 1,5 M selama inaktivasi termal pada suhu 60°C.....	64
7. Penentuan k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim hasil pemurnian pada suhu 60°C.	65
8. Penentuan k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim hasil penambahan sorbitol 0,5 M pada suhu 60°C.	65
9. Penentuan k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim hasil penambahan sorbitol 1,0 M pada suhu 60°C.	65
10. Penentuan k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim hasil penambahan sorbitol 1,5 M pada suhu 60°C.	66

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Hubungan aktivitas enzim dengan suhu.....	8
2. Hubungan kecepatan reaksi dengan pH	9
3. Hubungan antara laju reaksi dengan konsentrasi enzim	10
4. Hubungan konsentrasi dengan laju reaksi enzim	10
5. Teori kunci gembok dan teori induksi	12
6. <i>Bacillus subtilis</i>	14
7. Struktur amilosa ikatan α -1,4-glikosidik.....	16
8. Struktur amilopektin pada pati	16
9. Kurva <i>Lineweaver-Burk</i>	18
10. Stuktur kimia sorbitol.....	27
11. Skema pengendapan.....	33
12. Diagram alir penelitian.....	39
13. Hubungan antara kejenuhan amonium sulfat pada beberapa fraksi dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>Bacillus subtilis</i> ITBCCB148	41
14. Hubungan antara kejenuhan amonium sulfat (0-95%) dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>Bacillus subtilis</i> ITBCCB148	42
15. pH optimum enzim hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan sorbitol 0,5 ; 1,0 ; dan 1,5 M.....	45
16. Suhu optimum enzim hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan sorbitol 0,5 ; 1,0 ; dan 1,5 M	46

17. Grafik <i>Lineweaver-Burk</i> enzim hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan sorbitol 0,5 ; 1,0 ; 1,5 M	48
18. Hubungan antara stabilitas termal enzim hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan sorbitol 0,5; 1,0; dan 1,5 M pada suhu 60°C.	49
19. Hubungan $\ln(E_i/E_0)$ enzim hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan sorbitol 0,5 M; 1,0 M; dan 1,5 M	51

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Penjualan 25% enzim di dunia merupakan enzim α -amilase. Secara komersial enzim α -amilase banyak digunakan dalam beberapa industri seperti industri pengolahan makanan, pemeraman, deterjen, tekstil dan kertas (Mareel *et al.*, 2002). Sebagai biokatalisator, enzim ini banyak memberikan keuntungan yaitu mampu mempercepat reaksi tanpa ikut bereaksi, dapat bekerja spesifik dan efisien sehingga dapat menghemat waktu dan biaya (Page, 1997).

Enzim α -amilase merupakan enzim yang dapat menghidrolisis pati menjadi monomer yang lebih sederhana (Winarno, 1986). Enzim ini dapat diisolasi dari bermacam-macam sumber, seperti tumbuhan, hewan, dan mikroorganisme. Salah satu mikroorganisme penghasil enzim α -amilase adalah *Bacillus subtilis*, pada mikroba ini enzim-enzim α -amilase dihasilkan secara ekstraselular sehingga mudah untuk dipisahkan dan dimurnikan (Smith, 1990).

Secara umum enzim memiliki beberapa kelemahan selain harganya yang mahal, enzim hanya dapat sekali pakai, bekerja pada kondisi fisiologis dan tidak tahan

pada kondisi ekstrim (Smith, 1990), sedangkan untuk dapat dipakai dalam bidang industri, enzim harus memiliki aktivitas yang stabil pada kondisi suhu tinggi dan pH ekstrim (Goddette *et al.*, 1993). Terdapat beberapa cara yang dapat dilakukan untuk meningkatkan stabilitas enzim yaitu aplikasi teknik amobilisasi, modifikasi kimia, rekayasa molekuler dan penambahan zat aditif. Penggunaan zat aditif lebih sering dipilih karena relatif lebih mudah dan biayanya murah (Mosan and Combes, 1984).

Yandri dan Wulandari (2009) telah melakukan penambahan sorbitol pada enzim α -amilase dari *Rhizopus oryzae* dan menghasilkan pH optimum 55°C, serta pergeseran nilai pH optimum dari pH 6 pada penambahan sorbitol 0,5 M dan 1,0 M menjadi pH 4,5 pada penambahan sorbitol 1,5 M.

Pada penelitian ini, dilakukan penambahan zat aditif berupa sorbitol untuk melihat pengaruhnya terhadap stabilitas enzim α -amilase yang diisolasi dari *Bacillus subtilis*. Senyawa poliol dipilih karena memiliki beberapa kelebihan yaitu dapat mempertahankan konformasi enzim, mengurangi kemungkinan oksidasi gugus tiol pada enzim, menjaga stabilitas interaksi non kovalen, termasuk interaksi hidrofobik dalam molekul enzim, meningkatkan stabilitas dan daya simpan enzim, serta menjaga keutuhan struktur enzim terhadap degradasi oleh suhu (Suhartono, 1989).

B. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Memperoleh enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dengan aktivitas dan tingkat kemurnian yang tinggi.
2. Mengetahui pengaruh penambahan sorbitol terhadap stabilitas enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148.

C. Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diambil dari penelitian ini adalah :

1. Memberikan informasi mengenai pengaruh penambahan sorbitol terhadap stabilitas enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148.
2. Enzim α -amilase dengan stabilitas yang tinggi dapat digunakan dalam proses-proses industri.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Enzim

Enzim adalah golongan protein yang paling banyak terdapat dalam sel hidup dan mempunyai fungsi penting sebagai katalisator reaksi biokimia yang secara kolektif membentuk metabolisme perantara dari sel (Wirahadikusumah, 2001). Dengan adanya enzim, molekul awal yang disebut substrat akan dipercepat perubahannya menjadi molekul lain yang disebut produk (Grisham *et al.*, 1999). Enzim tersusun atas asam-asam amino yang melipat-lipat membentuk globular, dimana substrat yang dikatalisis bisa masuk dan bersifat komplementer (Martoharsono, 2006).

Suatu enzim dapat mempercepat reaksi 10^8 sampai 10^{11} kali lebih cepat dibandingkan dengan reaksi yang tidak dikatalisis oleh katalis (Poedjiadi, 2006). Enzim bersifat spesifik dalam kerja katalitiknya. Kespesifikan ini disebabkan oleh bentuknya yang unik dan adanya gugus-gugus polar atau nonpolar dalam struktur enzim (Fessenden dan Fessenden, 1982). Salah satu fungsi yang paling menonjol dari protein adalah aktivitas enzim. Enzim mempunyai fungsi khusus antara lain yaitu: 1) menurunkan energi aktivasi, 2) mempercepat reaksi pada suhu dan tekanan tetap tanpa mengubah besarnya tetapan seimbangannya dan 3) mengendalikan reaksi (Page, 1989).

1. Klasifikasi enzim

Menurut Montgomery (1993) klasifikasi enzim dapat dibedakan sebagai berikut :

a. Berdasarkan tipe reaksi yang diketahui, enzim dibagi menjadi enam kelompok:

1. Oksidoreduktase

Enzim oksidoreduktase adalah enzim yang dapat mengkatalisis reaksi oksidasi atau reduksi suatu bahan. Dalam golongan enzim ini terdapat 2 macam enzim yang paling utama yaitu oksidase dan dehidrogenase. Oksidase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi antara substrat dengan molekul oksigen. Dehidrogenase adalah enzim yang aktif dalam pengambilan atom hidrogen dari substrat.

2. Transferase

Enzim transferase adalah enzim yang ikut serta dalam reaksi pemindahan (transfer) suatu gugus.

3. Hidrolase

Enzim hidrolase merupakan kelompok enzim yang sangat penting dalam pengolahan pangan, yaitu enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis suatu substrat atau pemecahan substrat dengan pertolongan molekul air. Enzim-enzim yang termasuk dalam golongan ini diantaranya adalah amilase, invertase, selulase dan sebagainya.

4. Liase

Enzim liase adalah enzim yang aktif dalam pemecahan ikatan karbon-karbon, karbon sulfur, dan karbon nitrogen (tidak termasuk ikatan peptida). Nama trivial lainnya adalah dekarboksilase, aldolase, sintase, sitratliase dan dehidratase.

5. Isomerase

Enzim isomerase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi perubahan konfigurasi molekul dengan cara pengaturan kembali atom-atom substrat, sehingga dihasilkan molekul baru yang merupakan isomer dari substrat atau dengan perubahan isomer posisi misalnya mengubah aldosa menjadi ketosa.

6. Ligase

Enzim ligase adalah enzim yang mengkatalisis pembentukan ikatan-ikatan tertentu, misalnya pembentukan ikatan C-C, C-O dan C-S dalam biosintesis koenzim A serta pembentukan ikatan C-N dalam sintesis glutamine.

b. Berdasarkan tempat bekerjanya enzim dibedakan menjadi dua, yaitu :

1. Endoenzim, disebut juga enzim intraseluler, yaitu enzim yang bekerja di dalam sel.
2. Eksoenzim, disebut juga enzim ekstraseluler, yaitu enzim yang bekerja di luar sel.

c. Berdasarkan cara terbentuknya dibedakan menjadi dua, yaitu :

1. Enzim konstitutif, yaitu enzim yang jumlahnya dipengaruhi kadar substratnya, misalnya enzim amilase.
2. Enzim adaptif, yaitu enzim yang pembentukannya dirangsang oleh adanya substrat, contohnya enzim β -galaktosidase yang dihasilkan oleh bakteri *E. Coli* yang ditumbuhkan di dalam medium yang mengandung laktosa (Lehninger, 2005).

Enzim memiliki beberapa keunggulan diantaranya ialah memiliki produktivitas dan spesifisitas yang tinggi tanpa pembentukan senyawa samping, sehingga

mengurangi biaya purifikasi dan efek kerusakan terhadap lingkungan (Chaplin dan Bucke, 1990).

2. Sifat katalitik enzim

Sifat-sifat katalitik khas dari enzim adalah sebagai berikut :

- a. Enzim meningkatkan laju reaksi pada kondisi biasa (fisiologik) dari tekanan, suhu dan pH. Hal ini merupakan keadaan yang jarang dengan katalis-katalis lain.
- b. Enzim berfungsi dengan selektivitas atau spesifisitas bertingkat luar biasa tinggi terhadap reaktan yang dikerjakan dan jenis reaksi yang dikatalisasikan. Maka reaksi-reaksi yang bersaing dan reaksi-reaksi sampingan tidak teramati dalam katalisasi enzim.
- c. Enzim memberikan peningkatan laju reaksi yang luar biasa dibanding dengan katalis biasa (Page, 1997).

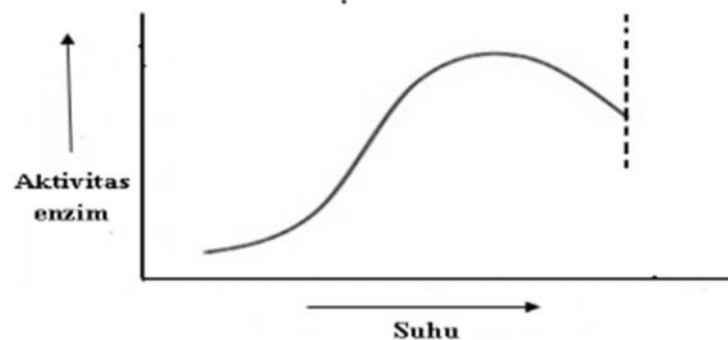
3. Faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim

Kerja enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain konsentrasi enzim, substrat, suhu, pH, kofaktor, pelarut organik dan inhibitor. Tiap enzim memiliki suhu dan pH optimum yang berbeda-beda, karena enzim merupakan protein yang dapat mengalami perubahan bentuk jika suhu dan pH berubah. Diluar suhu dan pH optimal enzim tidak dapat bekerja maksimal atau bahkan akan kehilangan fungsinya sebagai katalis karena rusaknya struktur protein enzim (Maton *et al.*, 1993).

Berikut ini faktor-faktor yang mempengaruhi kerja enzim :

a. Suhu

Enzim mempercepat terjadinya reaksi kimia pada suatu sel hidup. Dalam batas-batas suhu tertentu, kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim akan naik bila suhunya naik. Reaksi yang paling cepat terjadi pada suhu optimum (Rodwell, 2011). Suhu optimum merupakan suhu pada saat enzim memiliki aktivitas maksimum. Suhu yang terlalu tinggi (jauh dari suhu optimum suatu enzim) akan menyebabkan enzim terdenaturasi. Bila enzim terdenaturasi, maka bagian aktifnya akan terganggu yang menyebabkan konsentrasi efektif enzim menjadi berkurang. Hal ini menyebabkan laju reaksi enzimatik menurun (Poedjiadi dan Supriyatin, 2006). Pada suhu 0°C enzim menjadi tidak aktif dan dapat kembali aktif pada suhu normal (Lay and Sugyo, 1992). Hubungan antara aktivitas enzim dengan suhu ditunjukkan dalam Gambar 1.

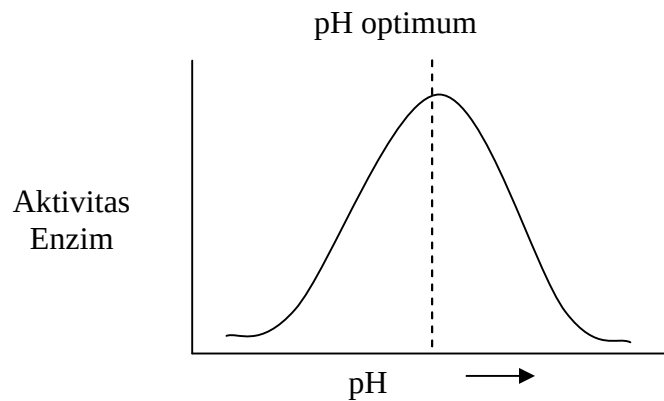


Gambar 1. Hubungan aktivitas enzim dengan suhu (Rodwell, 2011)

b. pH

(Derajat Keasaman) enzim pada umumnya bersifat amfolitik, yang berarti enzim mempunyai konstanta disosiasi pada gugus asam maupun gugus basanya, terutama pada gugus residu terminal karboksil dan gugus terminal amino.

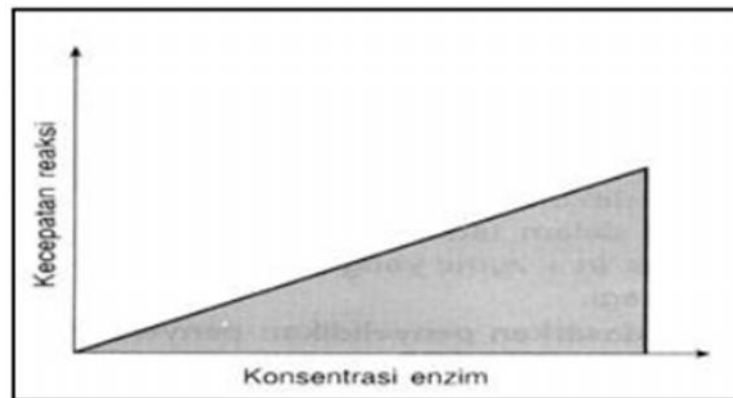
Perubahan kereaktifan enzim diperkirakan merupakan akibat dari perubahan pH lingkungan (Winarno, 2002). Perubahan pH dapat mempengaruhi asam amino kunci pada sisi aktif, sehingga menghalangi sisi aktif enzim membentuk kompleks dengan substratnya (Page, 1997), ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Hubungan kecepatan reaksi dengan pH (Winarno,2002).

c. Konsentrasi enzim

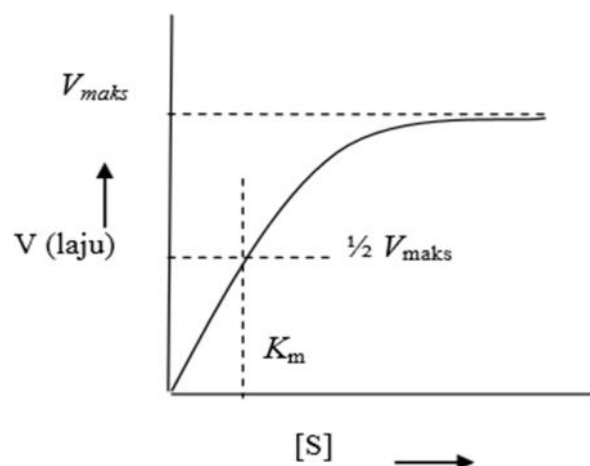
Konsentrasi enzim secara langsung mempengaruhi kecepatan laju reaksi enzimatik dimana laju reaksi meningkat dengan bertambahnya konsentrasi enzim (Poedjiadi dan Supriyatin, 2006). Laju reaksi tersebut meningkat secara linier selama konsentrasi enzim jauh lebih sedikit daripada konsentrasi substrat. Hal ini biasanya terjadi pada kondisi fisiologis (Page, 1997). Hubungan antara laju reaksi enzim dengan konsentrasi enzim ditunjukkan dalam Gambar 3.



Gambar 3. Hubungan antara laju reaksi dengan konsentrasi enzim (Page, 1997).

d. Konsentrasi substrat

Kecepatan reaksi enzimatik pada umumnya tergantung pada konsentrasi substrat. Kecepatan reaksi akan meningkat apabila konsentrasi substrat meningkat. Peningkatan kecepatan reaksi ini akan semakin kecil hingga tercapai suatu titik batas yang pada akhirnya penambahan konsentrasi substrat hanya akan sedikit meningkatkan kecepatan reaksi (Lehninger, 2005). Hubungan antara konsentrasi substrat dengan laju reaksi enzim ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Hubungan konsentrasi substrat dengan laju reaksi enzim (Shahib, 2005)

e. Aktivator dan inhibitor

Beberapa enzim memerlukan aktivator dalam reaksi katalisnya. Aktivator adalah senyawa atau ion yang dapat meningkatkan kecepatan reaksi enzimatis. Komponen kimia yang membentuk enzim disebut juga kofaktor. Kofaktor tersebut dapat berupa ion-ion anorganik seperti Zn, Fe, Ca, Mn, Cu, Mg atau dapat pula sebagai molekul organik kompleks yang disebut koenzim (Martoharsono, 2006).

Menurut Wirahadikusumah (2001), inhibitor merupakan suatu zat kimia tertentu yang dapat menghambat aktivitas enzim. Pada umumnya cara kerja inhibitor adalah dengan menyerang sisi aktif enzim sehingga enzim tidak dapat berikatan dengan substrat dan fungsi katalitik enzim tersebut akan terganggu (Winarno, 2002).

f. Kofaktor Logam

Kofaktor adalah suatu faktor yang membantu keaktifan enzim. Ikatan antara kofaktor dan enzim dapat sangat kuat dan ada pula yang tidak terikat dengan kuat (Poedjiadi, 1994).

g. Pelarut Organik

Penggunaan pelarut dalam reaksi enzimatis memberikan keuntungan antara lain ialah kelarutan substrat-organik dan enzim lebih tinggi dibandingkan dengan air serta meningkatkan kestabilan enzim dengan pelarut (Kwon and Rhee, 1986).

4. Teori pembentukan enzim substrat

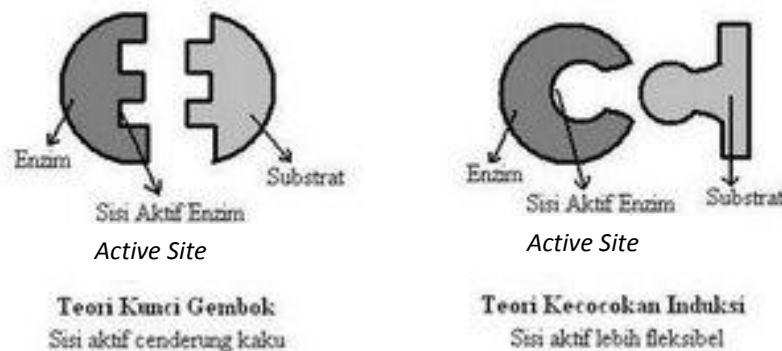
Menurut Shahib (2005) ada dua teori pembentukan kompleks enzim substrat yaitu teori lock and key dan teori induced-Fit yang dapat diilustrasikan pada Gambar 5.

a. Teori *lock and key* (gembok dan kunci)

Di mana substrat yang spesifik akan terikat pada daerah spesifik di molekul enzim yang disebut sisi aktif. Substrat mempunyai daerah polar dan non polar pada sisi aktif yang baik bentuk maupun muatannya merupakan pasangan substrat. Hal ini terjadi karena adanya rantai peptida yang mengandung rantai residu yang menuntun substrat untuk berinteraksi dengan residu katalitik. Ketika katalisis berlangsung, produk masih terikat pada molekul enzim. Kemudian produk akan bebas dari sisi aktif dengan terbebasnya enzim.

b. Teori *induced-fit* (ketetapan induksi)

Teori ini menerangkan bahwa enzim bersifat fleksibel. Bentuk sisi aktif enzim sebelumnya tidak sesuai dengan bentuk substrat, tetapi setelah substrat menempel pada sisi aktif, maka enzim akan terinduksi dan menyesuaikan dengan bentuk substrat.



Gambar 5. Teori kunci gembok dan teori induksi (Shahib, 2005)

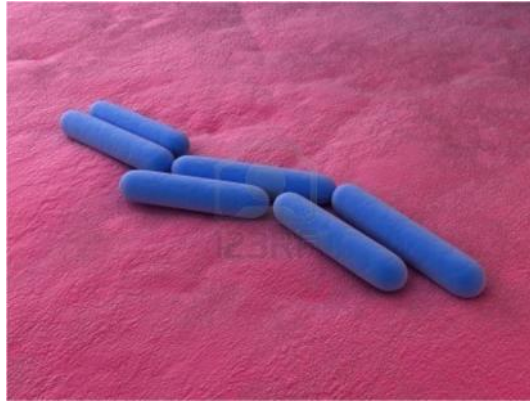
Menurut teori kunci gembok, terjadinya reaksi antara substrat dengan enzim karena adanya kesesuaian bentuk ruang antara substrat dengan situs aktif dari enzim, sehingga sisi aktif enzim cenderung kaku. Substrat berperan sebagai kunci masuk ke dalam situs aktif, sehingga terjadi kompleks enzim-substrat. Pada saat ikatan kompleks enzim-substrat terputus, produk hasil reaksi akan dilepas dan enzim akan kembali pada konfigurasi semula. Berbeda dengan teori kunci gembok, menurut teori kecocokan induksi reaksi antara enzim dengan substrat berlangsung karena adanya induksi substrat terhadap situs aktif enzim sedemikian rupa sehingga keduanya menjadi struktur yang komplemen atau saling melengkapi. Menurut teori ini sisi aktif tidak bersifat kaku, tetapi lebih fleksibel (Yandriano, 2006).

B. *Bacillus* sp

Bacillus merupakan salah satu mikroba golongan bakteri. Sebagian besar bakteri genus *Bacillus* pada umumnya hidup di tanah, diantaranya adalah *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, dan kelompok *Bacillus spaericus*. Selain di tanah, beberapa jenis *Bacillus* juga ditemukan di lumpur dan di muara yaitu *Bacillus firmus* dan *Bacillus lentus*. Selain ditemukan di kedua habitat di atas, ada juga beberapa jenis *Bacillus* yang hidup di laut misalnya *Bacillus marinus*, *Bacillus cirroflagelosus*, *Bacillus epiphytus*, dan *Bacillus filicolonicus* (Priest, 1993).

Bacillus subtilis merupakan bakteri yang mempunyai spora. Sporanya berbentuk oval atau silinder dan lebarnya tidak melebihi dari sel induknya. Mikroorganisme ini bersifat gram positif dan bersifat aerob (Schelege dan Schmidt, 1994).

Bacillus subtilis berbentuk batang lurus gram positif berukuran $1,5 \times 4,5 \mu\text{m}$, sendiri-sendiri atau tersusun dalam bentuk rantai, bergerak, dan tidak bersimpai (Gupta, 1990). Gambar *Bacillus subtilis* ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. *Bacillus subtilis* (Gupta, 1990).

C. Enzim Amilase

Amilase (alfa, beta dan glukoamilase) merupakan enzim yang penting dalam bidang pangan dan bioteknologi. Amilase dapat diperoleh dari berbagai sumber seperti tanaman, binatang dan mikroorganisme. Saat ini sejumlah enzim amilase telah diproduksi secara komersial. Penggunaan mikrobia dianggap lebih prospektif karena mudah tumbuh, cepat menghasilkan dan kondisi lingkungan dapat dikendalikan (Biogen, 2008).

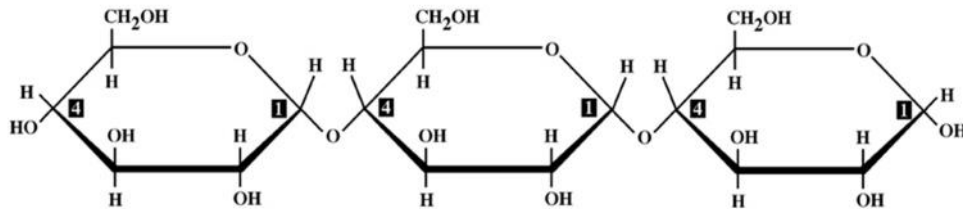
Enzim α -amilase (α -1,4-D-glukan-4-glukanohidrolase, EC 3.2.1.1) berperan dalam hidrolisis amilum dengan memecah ikatan α -1,4 glikosida dan melewati ikatan α -1,6 untuk menghasilkan glukosa, maltosa dan maltodekstrin lainnya. Struktur amilosa dan amilopektin pada pati ditunjukkan pada Gambar 7 dan Gambar 8. Enzim ini banyak digunakan dalam hidrolisis pati untuk sirup dan minuman, yang umumnya diperoleh dari *Aspergillus oryzae*, *Bacillus*

amyloliquifaciens, dan *B. Licheniformis* (Khoo *et al.*, 1994; Nigam dan Singh, 1995). Disamping itu, dalam industri tekstil digunakan enzim amilase untuk menghilangkan pati dan juga digunakan sebagai aditif dalam detergen (Shaw, 2008). Enzim ini menyumbang sekitar 30% dari total produksi enzim dunia dan mempunyai aplikasi yang luas di dalam industri. Enzim α -amilase membutuhkan ion kalsium (Ca^{2+}) untuk aktivitas, integritas struktural dan untuk stabilitasnya (Bordbar and Omidian, 2005).

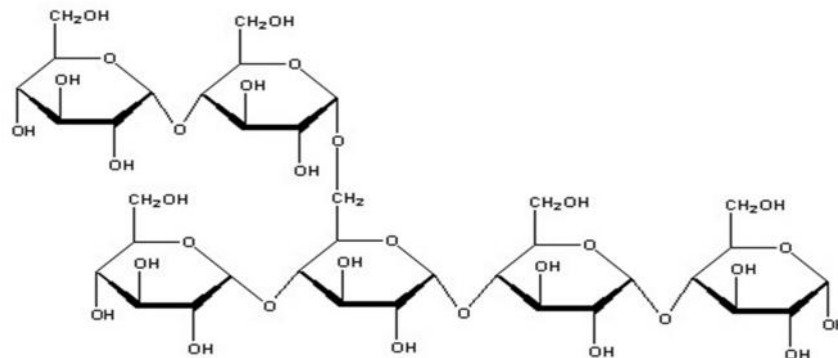
Beberapa industri yang menggunakan α -amilase adalah industri pengolah pati, makanan, pemeraman, deterjen, tekstil, dan kertas. Tiap aplikasi industri mensyaratkan sifat yang khas dari α -amilase terkait dengan spesifisitas, stabilitas, dan pengaruh suhu serta pH terhadap aktivitasnya (Ginting, 2009).

Saat ini, hidrolisis enzimatis pati mentah sangat diperlukan untuk menekan konsumsi energi di dalam industri yang berbasis pati. Pada industri pembuat pemanis, enzim α -amilase dan glukosa isomerase hipertermofilik akan sangat membantu proses pemecahan pati (starch) menjadi oligomer lalu menjadi fruktosa atau glukosa dalam bentuk sirup. Karena proses ini semua dilakukan pada suhu sangat tinggi dan ada pula proses pengadukan, sehingga menuntut enzim yang mendegradasi pati atau mengubah gula oligomer menjadi glukosa atau fruktosa harus sangat stabil dan aktif di suhu panas. Eksplorasi sumber-sumber baru penghasil α -amilase dan karakterisasi α -amilase yang dihasilkannya penting dilakukan untuk memfasilitasi penemuan α -amilase baru yang memenuhi persyaratan industri dengan kemampuan yang lebih baik, terutama dalam

mendegradasi pati mentah. Salah satu sumber potensial penghasil α -amilase yang belum banyak dieksplorasi adalah bakteri laut (Oliveira,2008).



Gambar 7. Struktur amilosa ikatan α -1,4-glikosidik



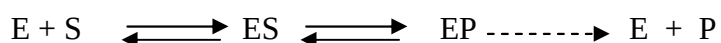
Gambar 8. Struktur amilopektin pada pati (Fessenden dan Fessenden,1982).

Terdapat 4 golongan enzim amilase yakni Eksoamilase, Endoamilase, Glukoamilase, dan Debranching enzim (Biogen, 2008). Eksoamilase, adalah enzim yang memutuskan ikatan α -1,4 glikosida pada bagian luar molekul. Salah satu enzim yang termasuk golongan ini adalah β -amilase (EC 3.2.1.2). (2). Endoamilase, adalah enzim yang mengkatalisis penguraian pati dari bagian tengah atau bagian dalam molekul. Enzim yang termasuk dalam golongan ini adalah α -amilase. (3). Glukoamilase (1,4- α -D-glukan glukohidrolase, EC 3.2.1.3), berperan dalam membebaskan glukosa dari ujung non-pereduksi dari pati. Enzim ini banyak digunakan terutama dalam produksi sirup dari pati, yang umumnya diperoleh dari

Aspergillus niger dan spesies *Rhizopus*. (4) Debranching enzim, adalah enzim yang spesifik dalam memutuskan ikatan α -1,6 glikosida dalam pati (amilopektin). Enzim yang termasuk golongan ini adalah pululanase (EC 3.2.1.41) dan isoamilase (EC 3.2.1.68) (Khoo *et al.*, 1994; Nigam dan Singh, 1995).

D. Kinetika Reaksi Enzim

Menurut Suhartono (1989) kinetika enzim merupakan salah satu cabang ilmu enzimologi yang membahas faktor-faktor yang mempengaruhi laju reaksi. Menurut Ngili (2008) faktor-faktor yang mempengaruhi laju reaksi seperti; suhu, pH, konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, aktivator, inhibitor dan waktu inkubasi. Berdasarkan postulat Michaelis dan Menten pada suatu reaksi enzimatis terdiri dari beberapa fase yaitu pembentukan kompleks enzim substrat (ES), dimana E adalah enzim dan S adalah substrat, modifikasi dari substrat membentuk produk (P) yang masih terikat dengan enzim (EP), dan pelepasan produk dari molekul enzim (Shahib, 2005).



Konsentrasi substrat pada laju reaksi divariasikan dan konsentrasi enzim tetap. Kecepatan awal (V_0) diukur sebagai kemiringan tangen dalam kurva kemajuan pada waktu $t = 0$. Ketika $[S] \gg [E]$, maka V_0 berbanding lurus dengan konsentrasi enzim dalam campuran reaksi. Dimana V_0 adalah fungsi hiperbola (persamaan *Michaelis-Menten*) dari $[S]_0$ yang bervariasi dibawah ini.

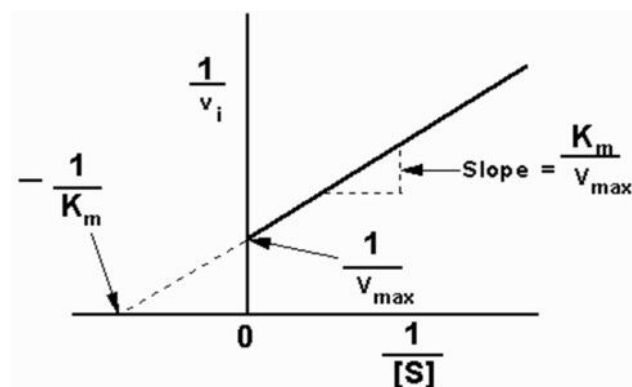
$$V_0 = -\left(\frac{d[S]}{dt}\right)_{t=0} = \frac{V_{maks} + [S]_0}{K_m + [S]_0}$$

Ketika $[S]_0$ sangat besar maka $V_0 = V_{maks}$ (kecepatan maksimum) dan ketika $V_0 = V_{maks}$ maka nilai $[S]_0 = K_m$ (tetapan *Michaelis*).

Persamaan *Michaelis-Menten* dapat menghasilkan garis lurus ketika satu variabel baru diplotkan terhadap yang lain. Transformasi persamaan *Michaelis-Menten* yang digunakan adalah persamaan “double reciprocal” *Lineweaver-Burk*. Dengan mengambil resiprok dari dua sisi persamaan *Michaelis-Menten*, maka diperoleh;

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{maks}} \frac{1}{[S]_0} + \frac{1}{V_{maks}}$$

Plot dari pasangan data $(1/[S]_{0,i}, 1/V_{0,i})$, untuk $i = 1, \dots, n$, dengan n adalah jumlah pasangan data, akan memberikan suatu garis lurus dengan ordinat dan absis intercept $1/V_{maks}$ dan $-1/K_m$, seperti pada Gambar 9 (Suhartono, 1989).



Gambar 9. Kurva *Lineweaver-Burk*

E. Stabilitas Enzim

Menurut Wiseman (1985) dan Kazan *et al.* (1997), stabilitas enzim dapat diartikan sebagai kestabilan aktivitas enzim selama penyimpanan dan penggunaan enzim tersebut, serta kestabilan terhadap berbagai senyawa yang bersifat merusak enzim seperti pelarut tertentu (asam atau basa) dan pengaruh suhu dan pH yang ekstrem

atau kondisi-kondisi non fisiologis lainnya. Ada dua cara untuk meningkatkan stabilitas enzim agar tetap tinggi, yaitu menggunakan enzim yang memiliki stabilitas enzim alami dan mengusahakan peningkatan stabilitas enzim yang secara alami tidak atau kurang stabil.

1. Stabilitas termal enzim

Pada suhu yang terlalu rendah kemandapan enzim tinggi, tetapi aktivitasnya rendah. Pada suhu yang terlalu tinggi aktivitas enzim tinggi, tetapi kemandapannya rendah. Kenaikkan suhu enzim akan mempengaruhi kecepatan laju reaksi, namun hanya sampai batas tertentu dan dapat menyebabkan terjadinya denaturasi protein. Daerah suhu saat kemandapan dan aktivitas enzim cukup besar disebut suhu optimum untuk enzim tersebut (Wirahadikusumah, 1989).

Proses inaktivasi enzim pada suhu tinggi berlangsung dalam dua tahap, yaitu :

- a) Adanya pembukaan parsial struktur sekunder, tersier dan kuartener molekul enzim.
- b) Perubahan struktur primer enzim karena adanya kerusakan asam amino tertentu oleh panas (Ahern dan Klibanov, 1987).

Stabilitas termal enzim akan jauh lebih tinggi dalam kondisi kering dibandingkan dalam kondisi basah. Air pada kondisi mikroakueus mempunyai peranan penting pada proses inaktif enzim. Karena pada kondisi tersebut reaksi inaktivasi oleh panas dapat diperlambat dan stabilitas termal enzim akan meningkat. Selain itu, air juga bertindak sebagai pelumas membuat konformasi suatu molekul enzim menjadi sangat fleksibel, sehingga bila air dihilangkan molekul enzim akan menjadi lebih kaku (Virdianingsih, 2002).

Dalam industri, pada proses reaksinya biasanya menggunakan suhu yang tinggi. Penggunaan suhu yang tinggi bertujuan untuk mengurangi tingkat kontaminasi dan masalah-masalah viskositas serta meningkatkan laju reaksi. Penggunaan enzim pada suhu yang lebih tinggi hingga 85-100°C hanya dijumpai pada proses hidrolisis pati dengan menggunakan α -amilase bakterial. Oleh sebab itu, diperlukan enzim dengan stabilitas termal pada rentang suhu yang tinggi.

2. Stabilitas pH enzim

Semua reaksi enzim dipengaruhi oleh pH medium tempat reaksi terjadi (Suhartono, 1989). Stabilitas enzim dipengaruhi oleh banyak faktor seperti suhu, pH, pelarut, kofaktor dan kehadiran surfaktan (Eijsink *et al.*, 2005). Dari faktor-faktor tersebut, pH memegang peranan penting. Diperkirakan perubahan keaktifan pH lingkungan disebabkan terjadinya perubahan ionisasi enzim, substrat atau kompleks enzim substrat. Enzim menunjukkan aktivitas maksimum pada kisaran pH optimum enzim dengan stabilitas yang tinggi (Winarno, 1989).

Pada reaksi enzimatik, sebagian besar enzim akan kehilangan aktivitas katalitiknya secara cepat dan *irreversibel* pada pH yang jauh dari rentang pH optimum untuk reaksi enzimatik. Inaktivasi ini terjadi karena *unfolding* molekul protein sebagai hasil dari perubahan kesetimbangan elektrostatik dan ikatan hidrogen (Kazan *et al.*, 1997).

F. Isolasi dan Pemurnian Enzim

Menurut Judoamidjojo (1990), tahapan proses pengisolasian dan pemurnian enzim adalah sebagai berikut:

1. Lisis dinding sel

Lisis atau memecah dinding sel dapat dilakukan dengan cara homogenisasi yang bertujuan untuk mengeluarkan enzim dari sel. Homogenisasi dapat dilakukan dengan alat homogenisator seperti lumpang dan *waring blender*.

2. Sentrifugasi

Sentrifugasi digunakan untuk memisahkan endapan dari supernatan dengan teknik sedimentasi, yaitu teknik yang membuat suatu larutan dipusingkan dengan kecepatan tinggi, sehingga yang mempunyai berat molekul besar akan mengendap pada dasar tabung. Pada proses sentrifugasi sebaiknya dilakukan pada suhu 2-4°C untuk mencegah terjadinya denaturasi akibat panas yang ditimbulkan proses sentrifugasi.

Prinsip sentrifugasi berdasarkan pada kenyataan bahwa setiap partikel yang berputar pada laju sudut yang konstan akan memperoleh gaya keluar (F). Besar gaya ini bergantung pada laju sudut ω (radian/detik) dan radius pertukarannya (sentimeter).

$$F = \omega^2 r$$

Gaya F dipengaruhi oleh gaya gravitasi bumi, karena itu dinyatakan sebagai gaya sentrifugal relatif (RCF dengan satuan g (gravitasi)).

$$RCF = \frac{\omega^2 r}{980}$$

Dalam praktiknya, alat sentrifugasi dioperasikan dengan laju rpm. Oleh sebab itu, harga rpm dikonversikan kedalam bentuk radian menggunakan persamaan:

$$\omega = \frac{\pi (rpm)}{30}$$

$$RCF = (\pi rpm)^2 r \times \frac{9}{8}$$

$$RCF = (1.119 \times 10^{-5})(rpm)^2 r \text{ (Cooper, 1997 dalam sariningsih, 2000).}$$

3. Fraksinasi dengan ammonium sulfat $(NH_4)_2SO_4$

Fraksinasi merupakan proses pengendapan secara bertahap. Pengendapan ini dapat dilakukan dengan penambahan garam seperti natrium klorida, natrium sulfat atau ammonium sulfat. Pada umumnya garam yang sering digunakan adalah ammonium sulfat karena (1) kebanyakan enzim tahan terhadap garam ini, (2) memiliki kelarutan yang besar dalam air, (3) mempunyai daya pengendapan yang besar, dan mempunyai efek penstabil terhadap kebanyakan enzim. Konsentrasi garam dapat mempengaruhi kelarutan enzim (Wirahadikusumah 1989).

Menurut Suhartono (1989), penambahan senyawa elektrolit menurunkan kelarutan protein, karena kelarutannya dipengaruhi oleh kekuatan ion. Dengan meningkatnya kekuatan ion, kelarutan enzim akan semakin besar atau disebut dengan peristiwa “*salting in*”, setelah mencapai suatu titik tertentu kelarutannya akan semakin menurun disebut peristiwa “*salting out*”. Pada kekuatan ion rendah, protein akan terionisasi sehingga interaksi antar protein akan menurun dan kelarutan akan meningkat. Peningkatan kekuatan ion ini meningkatkan kadar air yang terikat pada ion, dan jika interaksi antar ion kuat, kelarutannya menurun

akibatnya interaksi antar protein lebih kuat dan kelarutannya menurun (Agustien dan Munir, 1997).

4. Dialisis

Dialisis merupakan metode yang digunakan untuk memisahkan garam dari larutan protein berdasarkan pada sifat semipermeabel membran. Secara umum, proses dialisis berlangsung sebagai berikut: Larutan protein atau enzim dimasukkan ke dalam kantung dialisis yang terbuat dari membran semipermeabel (selofan). Jika kantung yang berisi larutan protein atau enzim dimasukkan ke dalam larutan bufer, maka molekul kecil yang ada di dalam larutan protein atau enzim seperti garam anorganik akan keluar melewati pori-pori membran, sedangkan molekul protein atau enzim yang berukuran besar tetap tertahan dalam kantung dialisis. Keluarnya molekul menyebabkan distribusi ion-ion yang ada di dalam dan di luar kantung dialisis tidak seimbang. Untuk memperkecil pengaruh ini digunakan larutan bufer dengan konsentrasi rendah di luar kantung dialisis (Lehninger, 1982). Setelah tercapai keseimbangan, larutan di luar kantung dialisis diganti dengan larutan yang baru agar konsentrasi ion-ion di dalam kantung dialisis dapat dikurangi.

Proses ini dapat dilakukan secara terus menerus sampai ion-ion di dalam kantung dialisis dapat diabaikan (Mc Phie, 1971 dalam Boyer 1993). Difusi zat terlarut bergantung pada suhu dan viskositas larutan. Meskipun suhu tinggi dapat meningkatkan laju difusi, namun sebagian besar protein dan enzim stabil pada suhu 4-8°C sehingga dialisis harus dilakukan di dalam ruang dingin (Pohl, 1990).

5. Pengujian aktivitas enzim dengan metode Fuwa

Aktivitas enzim ditentukan dengan metode Fuwa yang didasarkan pada pengurangan substrat yang terdeteksi dengan penambahan iodin yang menghasilkan pewarnaan bening. Keuntungan metode Fuwayaitu lebih spesifik untuk mengidentifikasi aktivitas enzim dengan waktu reaksi yang singkat selama 10 menit inkubasi dan pati digunakan sebagai substratnya. Semakin kecil absorbansi sampel maka semakin baik aktivitas dari enzim tersebut (Fuwa, 1954).

Keunggulan spektrofotometer *UV-Vis* untuk pengukuran aktivitas α -amilase adalah (1) dapat dilakukan pengujian secara langsung tanpa penambahan reagen apapun, (2) berlangsung cepat, tanpa proses inkubasi, (3) hubungan konsentrasi protein dengan absorbansi adalah linier.

6. Penentuan kadar protein dengan metode Lowry.

Penentuan kadar protein bertujuan untuk mengetahui bahwa protein enzim masih terdapat pada tiap fraksi pemurnian (tidak hilang dalam proses pemurnian) dengan aktivitas yang atau tetap baik. Salah satu metode untuk menentukan kadar protein adalah metode Lowry. Metode ini bekerja pada kondisi alkali dan ion tembaga (II) akan membentuk kompleks dengan protein. Ketika reagen *folin-ciocalteau* ditambahkan, maka akan mengikat protein. Ikatan ini secara perlahan akan mereduksi reagen *folin* menjadi heteromolibdenum dan merubah warna dari kuning menjadi biru.

Pada metode ini, pengujian kadar protein didasarkan pada pembentukan kompleks Cu^{2+} dengan ikatan peptida yang akan tereduksi menjadi Cu^+ pada kondisi basa. Cu^+ dan rantai samping tirosin, triptofan, dan sistein akan bereaksi dengan reagen *folin-ciocalteau*. Reagen bereaksi dengan menghasilkan produk tidak stabil yang tereduksi secara lambat menjadi molibdenum atau *tungsteen blue*. Protein akan menghasilkan intensitas warna yang berbeda tergantung pada kandungan triptofan dan tirosinnya.

Metode ini relatif sederhana dan dapat diandalkan serta biayanya relatif murah. Namun, metode ini mempunyai kelemahan yaitu sensitif terhadap perubahan pH dan konsentrasi protein yang rendah. Untuk mengatasinya adalah dengan cara menggunakan volume sampel yang sangat kecil sehingga tidak mempengaruhi reaksi (Lowry *et al.*, 1951).

G. Senyawa Aditif

Senyawa aditif merupakan senyawa yang jika ditambahkan pada larutan enzim akan meningkatkan stabilitas struktur protein enzim tanpa mempengaruhi interaksi kovalen pada enzim. Pengaruh senyawa aditif terbatas pada interaksi non kovalen dengan enzim atau pada sistem pelarut enzim (Wulandari, 2008). Schwimmer (1981) menggolongkan zat aditif menjadi beberapa kelompok yaitu: substrat, senyawa hidrofilik, larutan garam dan gula, ionlogam, anion, polianion, polikation, protein dan polimernya, inhibitor protease, senyawa pengkelat, anti buih, serta senyawa pereduksi dan antioksidan.

Golongan alkohol polihidrat termasuk ke dalam senyawa hidrofilik. Senyawa hidrofilik akan menimbulkan hidrasi sehingga konfirmasi protein terjaga dari kemungkinan “membuka”, artinya konfirmasi aslinya cenderung tetap stabil. Senyawa ini sifatnya menarik air (hidrofilik) sehingga dapat menurunkan aktivitas air. Selain itu penambahan senyawa ini akan meningkatkan interaksi hidrofilik di antara protein enzim sehingga diduga meningkatkan kestabilannya. Senyawa ini dapat bertindak sebagai penangkap atau pengikat radikal bebas sehingga mengurangi kemungkinan oksidasi terhadap enzim (Schwimmer, 1981).

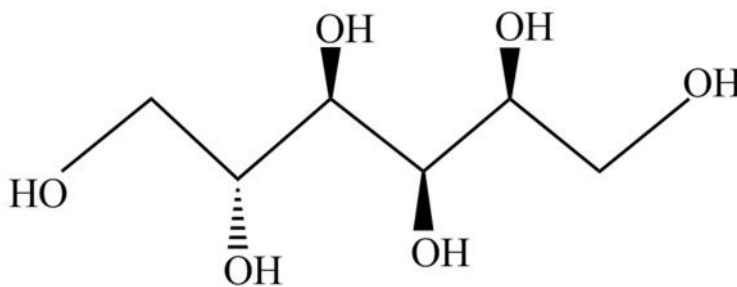
H. Polioli (Alkohol Polihidrat)

Polioli merupakan senyawa polihidroksi yang dimanfaatkan untuk berbagai keperluan industri, yaitu sebagai bahan surfaktan dalam formulasi bahan makanan, kosmetik, dan dalam bidang farmasi seperti obat-obatan (Narine *et al.*, 2007). Dalam industri polimer, senyawa polioli digunakan sebagai monomer pembentuk polimer, pemlastis, pemantap, pelunak, dan sebagai bahan aditif lainnya untuk pengolahan berbagai bahan polimer diantaranya PVC, polietilen, polipropilen, poliamida, poliester, dan poliuretan (Goud *et al.*, 2006).

Semakin besar berat molekul polioli maka makin tinggi pengaruhnya terhadap stabilitas enzim. Pada penelitian akan dipelajari pengaruh penambahan sorbitol terhadap stabilitas enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148.

Sorbitol yang biasanya dikenal sebagai glusitol adalah gula yang metabolismenya lambat dalam tubuh. Sorbitol dihasilkan oleh reduksi glukosa dengan penggantian gugus aldehid dengan gugus hidroksil. Sorbitol umumnya digunakan sebagai

bahan baku industri barang konsumsi pengganti gula dalam makanan diet dan permen karet bebas gula, dan sering digunakan dalam kosmetik modern sebagai penghilang noda. Sorbitol memiliki titik leleh 95°C, titik didih 296°C, massa molekul sebesar 182,17 g.mol⁻¹, densitas sebesar 0,68 g.cm⁻³, dengan nama IUPAC (2S,3R,4R,5R)-Hexane-1,2,3,4,5,6-hexol (Hart *et al.*, 2003). Struktur sorbitol dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Struktur Kimia Sorbitol (Perry, 1999).

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan pada bulan Januari – Juni 2016 di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Adapun alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain alat-alat gelas, jarum ose, pembakar spritus, mikropipet *ependorff*, neraca analitik, spatula, pengaduk magnet, batang pengaduk, sentrifuga, *autoclave* model S-90N, lemari pendingin, *shaker incubator (orbit environ shaker)*, *waterbath*, *laminar air flow* CURMA model 9005-FL, termometer, pH meter, magnetic stirrer dan spektrofotometer *UV-Vis* Hitachi U2010.

Sedangkan bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah NA (*Nutrient Agar*), NaNO_3 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , KCl , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pati, yeast ekstrak, sorbitol, ammoniumsulfat, akuades, larutan amilum, larutan BSA (*Bovine Serum Albumin*), Na_2CO_3 , NaOH , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, reagen *follin ciocalteau*, Na/K-

tartarat, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , pereaksi iodin, HCl 1 N, KI, pereaksi DNS, kantong selofan dan kertas saring.

Mikroorganisme penghasil enzim α -amilase yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Bacillus subtilis* ITBCCB148 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi dan Teknologi Bioproses Jurusan Teknik Kimia Institut Teknologi Bandung.

C. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan media inokulum dan fermentasi, inokulasi *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dan produksi enzim α -amilase

a. Pembuatan media inokulum dan fermentasi

Media inokulum dan fermentasi yang digunakan terdiri dari (g L^{-1}) 0,1% pati, 0,5% yeast ekstrak, 0,05% MgSO_4 , 0,02% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,3% KH_2PO_4 , 0,001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2% NaNO_3 , 0,05% KCl dilarutkan dalam akuades. Media ini disterilisasi pada suhu 121°C , tekanan 1 atm, selama kurang lebih 15 menit dalam *autoclave*.

b. Inokulasi *Bacillus subtilis* ITBCCB148

Sebanyak 1-3 ose biakan *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dari media agar miring dipindahkan ke dalam media inokulum secara aseptis, lalu dikocok dalam *shaker inkubator* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 35°C selama 24 jam.

c. Produksi enzim α -amilase

Produksi enzim selulase dilakukan dengan cara memindahkan sebanyak 2% media inokulum dari jumlah media fermentasi ke dalam media fermentasi secara aseptis lalu dikocok dalam shaker incubator dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 35°C selama 72 jam.

2. Isolasi enzim α -amilase

Prinsip sentrifugasi berdasarkan kecepatan sedimentasi dengan cara pemusingan. Sentrifugasi digunakan untuk memisahkan enzim ekstraseluler dari sisa-sisa sel. Sentrifugasi dilakukan pada suhu rendah (di bawah suhu kamar) untuk menjaga kehilangan aktivitas enzim (Suhartono, 1989).

Setelah media fermentasi yang berisi *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dikocok menggunakan *shaker inkubator* pada suhu 35°C selama 72 jam selanjutnya dipisahkan enzim dari komponen sel lainnya dengan sentrifugasi pada 5000 rpm dan suhu 4°C selama 20 menit. Filtrat yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim yang selanjutnya dilakukan uji aktivitas enzim α -amilase dengan metode *Fuwa* serta pengukuran kadar protein dengan metode *Lowry*.

3. Uji Aktivitas enzim α -amilase

a. Pembuatan pereaksi untuk pengujian aktivitas enzim α -amilase metode Fuwa

1. Pereaksi iodin

Dimasukkan 2 gram KI dalam labu takar 100 mL dan dilarutkan dalam 10 mL akuades. Lalu ditambahkan 0,2 gram I_2 . Kemudian ditambahkan akuades hingga batas miniskus.

2. Larutan pati

0,1 gram pati dilarutkan dalam 100 mL akuades dan dipanaskan hingga larut.

3. Larutan buffer fosfat

ke dalam labu ukur 1000 mL, 27,8 gram NaH_2PO_4 dilarutkan dalam 1000 mL akuades (Larutan stok A) dan dalam labu ukur 1000 mL, 53,65 gram $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ dilarutkan dalam 1000 mL akuades (Larutan stok B).

b. Pembuatan pereaksi untuk pengukuran kadar protein enzim α -amilase metode Lowry

Pereaksi A : 2 gram Na_2CO_3 dilarutkan dalam 100 ml NaOH 0,1 N.

Pereaksi B : 5 mL larutan $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 1% ditambahkan kedalam 5 mL larutan Na/K-tartarat 1 %.

Pereaksi C : 2 mL pereaksi B + 100 mL pereaksi A

Pereaksi D : reagen folin ciocalteau diencerkan dengan akuades 1:1.

Larutan standar: Larutan BSA (Bovine Serum Albumin) dengan kadar 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 ppm.

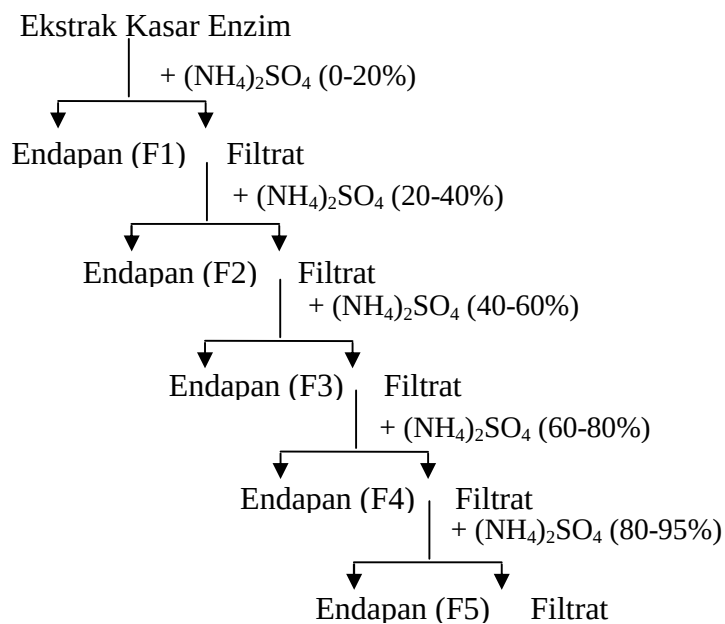
c. Pembuatan pereaksi untuk pengukuran aktivitas enzim α -amilase metode Mandels (Mandels *et al.*, 1976)

Ke dalam labu ukur 100 mL, dimasukkan 1% NaOH, 1 mL Na(K) tartrat 40%, 1% DNS (*dinitrosalisilic acid*), 0,2% fenol dan 0,05% Na₂SO₃ kemudian dilarutkan dengan 100 mL akuades hingga tanda batas.

4. Fraksinasi dengan ammonium sulfat [(NH₄)₂SO₄]

Ekstrak kasar enzim yang diperoleh diendapkan dengan garam amonium sulfat pada berbagai derajat kejenuhan yaitu (0-20)%; (20-40)%; (40-60)%; (60-80); (80-100)%. Skema proses pengendapan protein enzim dengan penambahan amonium sulfat ditunjukkan pada Gambar 11.

Sejumlah ekstrak kasar enzim yang diperoleh ditambahkan garam amonium sulfat secara perlahan sambil diaduk dengan *magnetik stirer*. Endapan protein enzim yang didapatkan pada tiap fraksi kejenuhan amonium sulfat dipisahkan dari filtratnya dengan sentrifugasi dingin pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Kemudian endapan yang diperoleh dilarutkan dalam 5 mL bufer fosfat 0,1 M pH 6 dan diuji aktivitasnya dengan metode Fuwa, serta diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry. Selanjutnya, filtrat yang didapat dari fraksi 0-20% digunakan untuk diendapkan kembali dengan fraksi kejenuhan 20-40% dengan prosedur yang sama (Yandri *et al.*, 2010).



Gambar 11. Skema pengendapan protein enzim dengan amonium sulfat

5. Dialisis

Endapan enzim yang telah dilarutkan dari tiap fraksi amonium sulfat dengan aktivitas spesifik yang tinggi dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis dengan bufer fosfat 0,01 M pH 6 selama 24 jam pada suhu dingin (Pohl, 1990). Selama dialisis, dilakukan pergantian bufer selama 4-6 jam agar konsentrasi ion-ion di dalam kantong dialisis dapat dikurangi. Proses ini dilakukan secara kontinyu sampai ion-ion di dalam kantong dialisis dapat diabaikan. Untuk mengetahui bahwa sudah tidak ada lagi ion-ion garam dalam kantong, maka diuji dengan menambahkan larutan $\text{Ba}(\text{OH})_2$ atau BaCl_2 , bila masih ada ion sulfat dalam kantong, maka akan terbentuk endapan putih BaSO_4 . Semakin banyak endapan yang terbentuk, maka semakin banyak ion sulfat yang ada dalam

kantong. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas dengan metode Fuwa, serta diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.

6. Uji aktivitas enzim α -amilase

Metode Fuwa(Fuwa, 1954)

Aktivitas enzim α -amilase ditentukan oleh metode iodine (Fuwa, 1954). Metode ini berdasarkan jumlah pengurangan jumlah pati hingga menghasilkan warna bening. Sebanyak 0,25 mL enzim ditambahkan ke dalam 0,25 mL larutan pati 0,1% lalu diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 0,25 mL HCl 1 N dan kemudian ditambahkan 0,25 mL pereaksi iodine (I_2 0,2% dan KI 2%) dan 4 mL akuades. Lalu campuran diaduk rata dan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer *UV-VIS* pada λ 600 nm. Kontrol dibuat dengan cara yang sama, menggunakan 0,25 mL enzim yang sudah dinaktifkan dengan HCl. Penentuan aktivitas dengan menggunakan metode iodine dilakukan pada tahap isolasi, pemurnian dan karakterisasi enzim.

Metode Mandels (Mandels *et al.*, 1976)

Metode ini berdasarkan glukosa yang terbentuk (Mandels *et al.*, 1976). Sebanyak 0,25 mL enzim, 0,25 mL larutan pati 0,1% dan bufer fosfat pH 6,5 dicampur lalu diinkubasi selama 60 menit pada suhu 60°C. Kemudian ditambahkan 1 mL pereaksi DNS (*dinitrosalicylic acid*) dididihkan selama 10 menit pada penangas air dan didinginkan. Setelah dingin, campuran tersebut diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang 510 nm. Kadar

glukosa yang terbentuk ditentukan dengan menggunakan kurva standar glukosa.

Uji ini dilakukan pada tahap penentuan K_M dan V_{maks} .

7. Penentuan kadar protein enzim α -amilase

Penentuan kadar protein metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951)

Kadar protein enzim ditentukan dengan metode Lowry (1951). Sebanyak 0,1 mL enzim yang akan diukur kadar proteinnya ditambahkan 0,9 mL akuades lalu direaksikan dengan 5 mL pereaksi C dan campuran diaduk rata kemudian dibiarkan selama 10 menit pada suhu kamar. Setelah itu ditambahkan dengan cepat 0,5 mL pereaksi D dan diaduk dengan sempurna, didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Untuk kontrol, 0,1 mL enzim diganti dengan 0,1 mL akuades, selanjutnya perlakuannya sama seperti sampel. Serapannya diukur menggunakan spektrofotometer *UV-VIS* pada λ 750 nm. Untuk menentukan konsentrasi protein enzim yang digunakan kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumin*).

8. Penambahan sorbitol

Larutan poliol yang digunakan (g.mL^{-1}) yaitu sorbitol. Larutan poliol ditambahkan pada enzim hasil pemurnian dari dialisis dengan konsentrasi 0,5 M; 1 M; dan 1,5 M dengan perbandingan 1:1.

9. Karakteristik enzim (sebelum dan setelah penambahan sorbitol)

Karakterisasi enzim sebelum dan setelah penambahan sorbitol meliputi: penentuan pH dan suhu optimum, penentuan data kinetika (K_M dan V_{maks}), serta penentuan kestabilan terhadap suhu dan pH.

a. Penentuan pH dan suhu optimum

1) Penentuan pH optimum

Untuk mengetahui pH optimum enzim sebelum dan setelah penambahan sorbitol digunakan bufer fosfat 0,05 M dengan variasi pH sebagai berikut : 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 ; 7,5 ; dan 8,0. Suhunya dijaga tetap pada 60°C, kemudian dilanjutkan dengan pengukuran aktivitas enzim dengan metode Fuwa.

2) Penentuan suhu optimum

Untuk mengetahui suhu optimum kerja enzim sebelum dan setelah penambahan sorbitol dilakukan dengan variasi suhu yaitu 40; 45; 50; 55; 60; 65; dan 70°C, pH tetap dijaga pada pH optimum. Selanjutnya diukur aktivitas enzim dengan metode Fuwa.

b. Penentuan data kinetika enzim (nilai K_M dan V_{maks})

Konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) enzim sebelum dan setelah penambahan sorbitol ditentukan dari kurva *Lineweaver-Burk*. Kurva *Lineweaver-Burk* dibuat dengan menguji aktivitas enzim α -amilase dengan variasi konsentrasi substrat (larutan pati) 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 dan 1,25% dalam

bufer fosfat pada pH 6,5 dan suhu 60°C selama 60menit. Selanjutnya diukur aktivitas enzim dengan metode Mandels.

c. Uji stabilitas termal dan pH enzim (Yang *et al.*, 1996)

Penentuan stabilitas termal enzim dilakukan dengan mengukur aktivitas sisa enzim setelah diinkubasi selama periode waktu 60 menit pada pH dan suhu optimum hasil penentuan sebelumnya. Caranya adalah dengan mengukur aktivitas enzim setelah proses pemanasan setiap interval waktu 10 menit. Aktivitas awal enzim (tanpa proses pemanasan) diberi nilai 100%.

$$\text{Aktivitas sisa} = \frac{\text{Aktivitas enzim setelah perlakuan}}{\text{Aktivitas enzim awal (tanpa perlakuan)}} \times 100\%$$

(Virdianingsih, 2002).

d. Penentuan waktu paruh ($t_{1/2}$), konstanta laju inaktivasi (k_i), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i)

Penentuan nilai k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim α -amilase hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan sorbitol dilakukan dengan menggunakan persamaan kinetika inaktivasi orde 1 (Kazan *et al.*, 1997)

dengan persamaan:

$$\ln (E_i/E_0) = - k_i t$$

Sedangkan untuk perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan sorbitol dilakukan dengan menggunakan persamaan:

$$\Delta G_i = - RT \ln (k_i h/k_B T)$$

Keterangan :

R = konstanta gas ($8,315 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

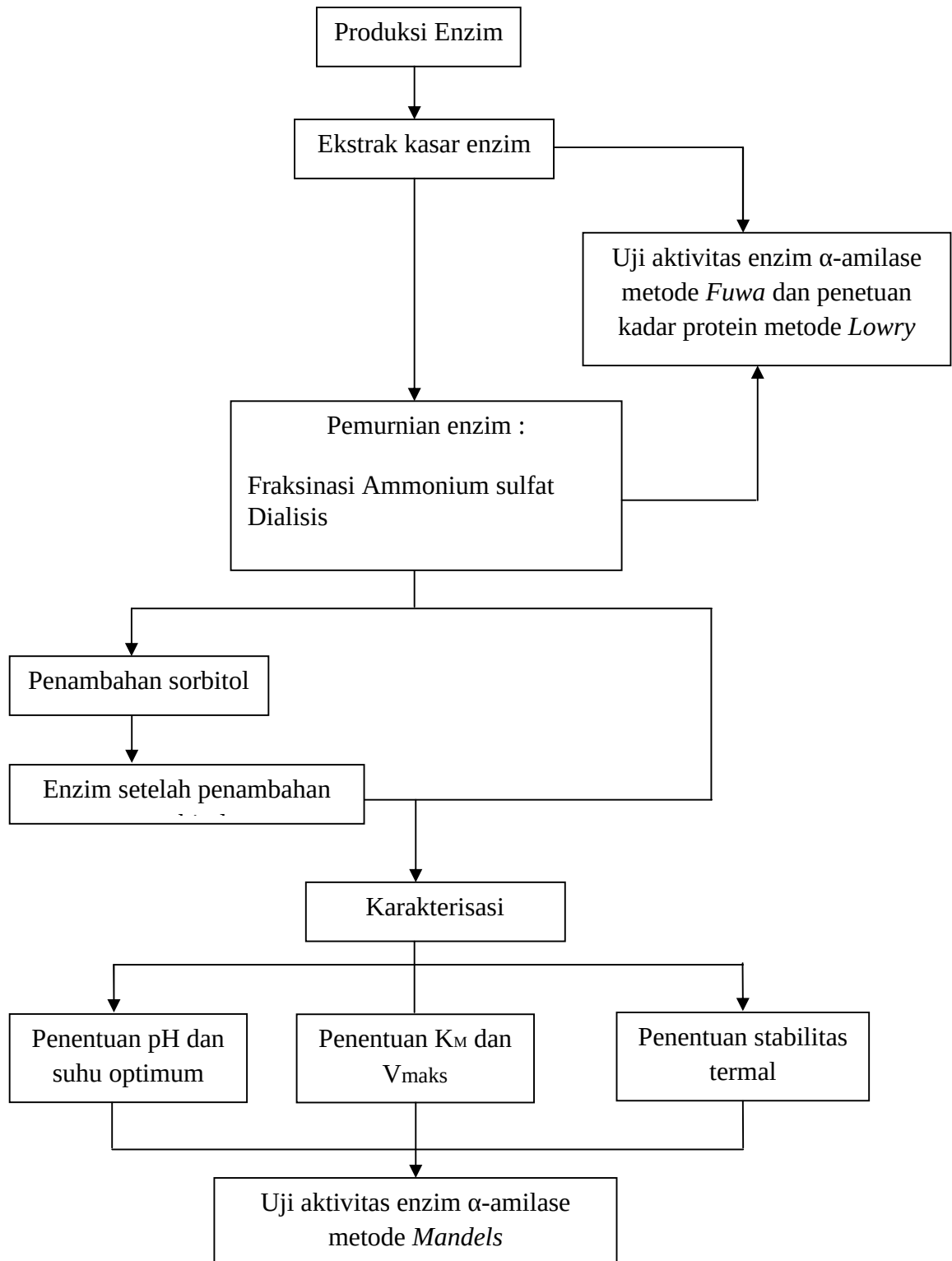
T = suhu absolut (K)

k_i = konstanta laju inaktivasi termal

h = konstanta Planck ($6,63 \times 10^{-34} \text{ J det}$)

k_B = konstanta Boltzmann ($1,381 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$)

Secara keseluruhan, penelitian ini terangkum dalam diagram alir penelitian yang ditunjukkan dalam Gambar 12.



Gambar 12. Diagram alir penelitian

V. SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Kondisi optimum hasil memproduksi enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 adalah pada pH 6 dengan waktu inkubasi 72 jam.
2. Aktivitas spesifik enzim α -amilase hasil pemurnian adalah sebesar 4.185,70 U/mg, meningkat 11 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar yang mempunyai aktivitas spesifik sebesar 373,559 U/mg.
3. Enzim hasil pemurnian dan enzim hasil setelah penambahan sorbitol memiliki pH optimum 6,5 dan suhu optimum 60°C.
4. Enzim α -amilase hasil pemurnian memiliki nilai K_M adalah sebesar 9 mg/mL dengan nilai V_{maks} adalah sebesar 500 $\mu\text{mol/mL.menit}$, dan enzim hasil penambahan sorbitol (0,5; 1,0; 1,5 M) memiliki nilai K_M berturut-turut 3,4 mg/mL, 4,95 mg/mL, dan 7,5 mg/mL. Nilai V_{maks} berturut-turut nilai 200 $\mu\text{mol/mL.menit}$, 333,333 $\mu\text{mol/mL.menit}$, dan 500 $\mu\text{mol/mL.menit}$.
5. Stabilitas termal enzim α -amilase hasil pemurnian menunjukkan nilai k_i sebesar 0,029 menit^{-1} dengan waktu paruh ($t_{1/2}$) dan (ΔG_i) sebesar 23,896 menit dan 103,009 KJ/mol. Sedangkan enzim hasil penambahan sorbitol

(0,5; 1,0; 1,5 M) menunjukkan nilai k_i berturut-turut: 0,021 menit⁻¹, 0,016 menit⁻¹, 0,012 menit⁻¹. Waktu paruh ($t_{1/2}$) enzim hasil setelah penambahan sorbitol berturut-turut: 33 menit, 43,312 menit, 57,75 menit, dan ΔG_i sebesar berturut-turut: 103,903 KJ/mol, 104,312 KJ/mol, 105,452 KJ/mol.

6. Hasil penentuan nilai k_i , $t_{1/2}$ dan ΔG_i menunjukkan bahwa terjadi peningkatan stabilitas termal enzim setelah penambahan sorbitol sebesar 1,3 – 2,4 kali dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian

B. Saran

Dari hasil penelitian yang diperoleh, maka disarankan untuk menggunakan senyawa aditif lain selain sorbitol untuk enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 sehingga akan didapatkan enzim α -amilase dengan aktivitas dan kestabilan yang lebih tinggi lagi.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustien, A. dan E. Munir. 1997. Purifikasi penisilin asilase dari *Bacillus*. Prosiding Seminar Wawasan Keilmuan Untuk Meningkatkan Kualitas Pembangunan Bangsa Indonesia. *PPI Universitas Sains Malaysia*. 270-177.
- Ahern, T.J. and A.M. Klibanov. 1987. Why do enzyme irreversibly inactive at high temperature. *Biotec 1. Microbial Genetic Engineering and Enzyme Tecnology*. Gustav fischer. Stuttgart. New York.
- Biogen. 2008. Amilase. http://biogen.litbang.deptan.go.id/terbitan/agrobio/abstrak/agrobio_vol. Tanggal akses 05 Mei 2008.
- Bordbar, K. and R. H. Omidian. 2005. Study On Interaction of α -amylase from *Bacillus subtilis* With Cetyl trimethylammonium bromide, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 40. 67-71.
- Boyer, R.F. 1993. *Modern Experimental Biochemistry* Benjamin Cumming Publising Company. Redwood City. California.
- Chaplin, M.F. and Bucke. 1990. *Enzyme Technology*. Cambridge University Press. Cambridge, Great Britain.
- Eijnsink, G.H., G. Sirgit, V. Torben, and Bertus van de Burg. 2005. Directed Evolution of Enzym Stability. *Biomolecular Engineering*. Elsevier Science Inc. New York. 23: 21-30.
- Fessenden, R.J. dan Fessenden J.S. 1982. *Kimia Organik*. Jilid 2. Alih bahasa oleh Aloysios H.P. Erlangga. Jakarta. 395-396.
- Fuwa, H. 1954. A new method for Microdetermination of Amylase activity By the use of Amylose as the substrate. From the Institute of Scientific and Industrial Research. Osaka University. Osaka. *The Journal of Biochemistry*. 41. 583-603.

- Ginting, Y. 2009. *Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Enzim Amilase Kasar Thermofilik dari Sumber Air Panas Semangat Gunung, Kabupaten Karo, Sumatera Utara. (Tesis)*. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Goddete, D.W, C. Terri, F.L. Beth, L. Maria, R.M. Jonathan, P.Christian, B.R. Robert, S.Y.Shiow, C.R. Wilson. 1993. Strategy and implementation of a system for protein engineering. *Journal of Biotechnology*. 28. 41-54.
- Grisham, M. Charles ; and H. Reginald Garrett. 1999. *Biochemistry*. Saunders College Pub. Philadelphia.
- Gupta, S. 1990. *Mikrobiologi Dasar*. Alih bahasa oleh Dr. Julius E. S. Binarupa Aksara. Jakarta. Halaman: 246.
- Hart, H. 1983. *Kimia Organik*. Erlangga. Jakarta. Halaman: 917.
- Judoamidjojo, M., A.D. Abdul, and G.S. Endang. 1989. *Teknologi Fermentasi*. Rajawali Press. Jakarta. 128-132.
- Kamelia, R., Muliawati S. dan Dessy N. 2005. Isolasi dan Karakterisasi Protease Intraseluler Termotabil dari Bakteri *Bacillus stearotherophilus* RP1. *Seminar Nasional MIPA*. Departemen Kimia, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Kazan, D., H. Ertan and A. Erarslan. 1997. Stabilization of *Escherichia coli* Penicillin G acylase against thermal Inactivation by cross-linking with dextran dialdehyde polymers. *Applied. Microbiology and Biotechnology*. 48: 191-197.
- Khoo, S.L., Amirul, A.A., M. Kamaruzzaman, and Nazalan, N. 1994. Purification And Characterization of α -Amylase from *Aspergillus flavus*. *Folia Microbial*. 39. 392-298.
- Kwon, D.Y. and Rhee, J.S. 1986. A Simple and Rapid Colometric Method for Determination of Free Fatty Acid for Lipase Assay. *J.A.O.C.S.* **63**. 69-92.
- Lay, B. W. dan Sugyo, H. 1992. *Mikrobiologi*. Rajawali Pers. Jakarta. 107-112.
- Lehninger, A. L. 1982. *Dasar-Dasar Biokimia* Jilid 1. Alih bahasa oleh Maggy Thenawidjaya. Erlangga. Jakarta. 255-257.
- Lehninger, A.L. 1982. *Dasar–Dasar Biokima*. Erlangga. Jakarta. Halaman 369.

- Lowry, O. H., N. J., Rosebrough, A. L., Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry*. 193-265.
- Maarel, M., Van der Veen, B., Uitdeehag, H., Lee, H.H. and Dijkhvizen, L. 2002. Properties and application of starch converting enzymes α - amylase family. *J. Biotechnol.* 94. 137-155.
- Mandels, M., and R. Raymond., 1976. *Measurment of saccharifying cellulose. Biotech & Bioeng.symp.* No 6. John Willey & Sons Inc.
- Martoharsono, S. 1993. *Biokimia*. Jilid I. UGM-Press. Yogyakarta. 81-83.
- Maton, A., H. Jean, L. William, J. Susan, and Maryanna, QW. 1993. *Human Biology and Health*. Englewood cliffs, Prentic Hall. New Jersey.
- Montgomery, R. 1993. *Biokimia*. UGM Press. Yogyakarta. 181-182.
- Mosan, P. and D. Combes. 1984. Stabilization of enzyme activity. *The Proceedings of Biotechnology Europe Online*. Online Publication Ltd. London.
- Ngili, Y. 2008. *Mikrobiologi*. Graha Ilmu. Yogyakarta. 282-283.
- Nigam, P. and Singh, D. 1995. Enzyme and Microbial System Involved in Starch Processing Enzyme Microb, *Technology*. 17. 570-573.
- Oliveira. 2008. Rhizobia Amylase Production Using Various Starchy Substances as Carbon Substrates. <http://www.scielo.br/pdf/bjm/v31n4/a11v31n4.pdf>. Tanggal akses 05 Mei 2008.
- Page, D.S. 1989. *Prinsip-Prinsip Biokimia*. Erlangga. Jakarta. 111-115.
- Page, D.S. 1997. *Prinsip-Prinsip Biokimia*. Erlangga. Jakarta. Halaman 465.
- Perry, H. Robert, and D.W. Green. 1999. *Chemical Engineering Handbook* 7th Edition. McGraw-Hill Book Company. New York.
- Poedjiadi, A. 2006. *Dasar-Dasar Biokimia*. UI Press. Jakarta. 155, 158-160.
- Pohl, T. 1990. Concentration of Protein Removal of Salute dalam M.P. Deutscher, *Methods of Enzymology. Guide to Protein Purification*. 182. Academic Press. New York.
- Priest, F.G. 1993. *Biotechnology*. VCH Verlag sgesel schaft mbH. New York.

- Rodwell, V.W. 1987. *Harper's Review of Biochemistry*. EGC Kedokteran. Jakarta.
- Sariningsih, R. 2000. Produksi Enzim Protease oleh *Bacillus subtilis* BAC-4. (*Skripsi*). Universitas Padjajaran. Bandung.
- Schelege, H.G. and K. Schmidt. 1994. *Mikrobiologi Umum*. UGM. Yogyakarta.
- Schwimmer, S. 1981. *Source Book of Food Enzymology*. AVI Publishing Co., Inc. Connecticut.
- Shahib, M.N. 2005. *Biologi Molekuler Medik I*. Universitas Padjajaran Press. Bandung. 164-167.
- Shaw. 2008. Purification And Properties of An Extracellular α -Amylase From *Thermus* sp. <http://ejournal.sinica.edu.tw/bbas/content/1995/3/bot363-08.html>. Tanggal akses 17 Mei 2008.
- Smith, J.E. 1990. *Prinsip Bioteknologi*. PT Gramedia. Jakarta.
- Suhartono, M.T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Dirjen DIKTI, PAU Bioteknologi IPB. Bogor. Halaman 322.
- Suhartono, M.T., A. Suwanto, dan H. Widjaja. 1992. Diklat Struktur dan Biokimiawi Protein. *Penelitian Antar Universitas*. IPB. Bogor.
- Virdianingsih, R. 2002. Mempelajari Stabilitas Termal Enzim Protease dari *Bacillus pumilus* y1 dalam Pelarut Heksana, Toluena, dan Benzena. (*Skripsi*). Institute Pertanian Bogor. Bogor.
- Watson, J. D. 1987. *Molecular Biology of the Gene*. CSHL Press. USA.
- Webb, E.C. and M. Dixon. 1979. *Enzymes*. Academic Press. New York.
- Winarno, F.G. 1986. *Kimia Pangan dan Gizi*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Winarno, F.G. 1989. *Kimia Pangan dan Gizi*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Winarno, F.G. 2002. *Kimia Pangan dan Gizi*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Wirahadikusumah, M. 2001. *Biokimia : Protein, Enzim dan asam Nukleat*. ITB Press. Bandung.

- Wiramargana, M. 1991. Pengaruh Penggunaan Aditif Terhadap Stabilitas Enzim Protease *Bacillus subtilis* Selama Penyimpanan. (Skripsi). FATETA-IPB, Bogor.
- Wiseman, A. 1985. *Handbook of Enzymes Biotechnology 2nd Ed.* Ellis Harwood Lim. Chicester.
- Wulandari, P. 2008. Studi Pengaruh Penambahan Poliol Terhadap Stabilitas Termal Enzim α -amilase dari *Rhizopus oryzae*. (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Yandri, D. Herasari, T. Suhartati, and S. Hadi. 2009. The effect of chemical modification on the thermal stability of protease from local isolate bacteria, *Bacillus subtilis* ITBCCB148. *Nature and Science*, 7(2): p. 68-75.
- Yandri, A.S., T. Suhartati, and S. Hadi. 2010. Purification and Characterization of Extracellular α -Amilase Enzyme from Locale Bacteria Isolate *Bacillus Subtilis* ITBCCB148. *European Journal of Scientific Research*. 39. 64-74.
- Yandriano, V. 2006. Isolasi dan Karakterisasi Enzim Amilase dari Bakteri Alkaloterion Asal Limbah Cair Tapioka di Daerah Karang Rejo Jati Agung Lampung Selatan. (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Yang, Z., D. M., A. Robert., X. Y. Fang., and J.R. Alan., 1996. *Enzyme Microbial Technology*. Polyethylene Glycol-Induced Stabilization of Subtilisin. 18. 82-89.