

**AMOBILISASI ENZIM α -AMILASE DARI *Bacillus subtilis* ITBCCB148
MENGUNAKAN BENTONIT**

(Skripsi)

Oleh

EZRA RHEINSKY TIARSA



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2017**

ABSTRAK

AMOBILISASI ENZIM α -AMILASE DARI *Bacillus subtilis* ITBCCB148 MENGGUNAKAN BENTONIT

Oleh

Ezra Rheinsky Tiarsa

Pada penelitian ini telah dilakukan amobilisasi enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 menggunakan matriks bentonit. Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan kestabilan enzim dan agar enzim dapat digunakan secara berulang. Tahap penelitian ini meliputi proses produksi, isolasi, pemurnian, amobilisasi, dan karakterisasi enzim murni dan amobil. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas spesifik enzim α -amilase hasil pemurnian hingga tahap kromatografi penukar kation menggunakan CMC adalah $10387,11 \text{ U mg}^{-1}$ dan kemurniannya meningkat 12 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim. Enzim α -amilase hasil pemurnian memiliki suhu optimum 60°C , $K_M = 6,18 \text{ mg mL}^{-1}$ substrat, dan $V_{maks} = 909,09 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$. Enzim α -amilase hasil amobilisasi memiliki suhu optimum 75°C , $K_M = 12,19 \text{ mg mL}^{-1}$ substrat, dan $V_{maks} = 88,50 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$. Aktivitas sisa enzim murni dan enzim amobil dalam uji stabilitas termal pada suhu 60°C selama 100 menit berturut-turut sebesar 12% dan 43%. Enzim amobil dapat digunakan berulang hingga 5 kali. Data kinetika enzim hasil pemurnian diperoleh $t_{1/2} = 42,00 \text{ menit}$, $k_i = 0,0165 \text{ menit}^{-1}$, dan $\Delta G_i = 104,57 \text{ kJ mol}^{-1}$. Data kinetika enzim hasil amobilisasi diperoleh $t_{1/2} = 88,85 \text{ menit}$, $k_i = 0,0078 \text{ menit}^{-1}$, dan ΔG_i yaitu $106,65 \text{ kJ mol}^{-1}$. Berdasarkan penurunan nilai k_i , peningkatan nilai ΔG_i dan waktu paruh ($t_{1/2}$), diketahui bahwa amobilisasi menggunakan bentonit dapat meningkatkan stabilitas enzim α -amilase dari *B. subtilis* ITBCCB148.

Kata kunci: α -amilase, *Bacillus subtilis* ITBCCB148, amobilisasi, bentonit

ABSTRACT

THE IMMOBILIZATION OF α -AMYLASE FROM *Bacillus subtilis* ITBCCB148 BY USING BENTONITE

By

Ezra Rheinsky Tiarsa

In this study, the α -amylase from *Bacillus subtilis* ITBCCB148 was immobilized by using bentonite. The aims of this research were to increase the stability of α -amylase and to help in their economic reuse. The steps of this research were done as following: production, isolation, purification, immobilization, and characterization of purified and immobilized enzymes. The result showed that the purified enzyme from CMC cation column chromatography process has specific activity was 10387.11 U mg⁻¹. It was higher 12 times than the crude extract. The optimum temperature of purified enzyme was 60°C, $K_M = 6.18$ mg mL⁻¹ substrate, and $V_{max} = 909.09$ μ mol mL⁻¹ min⁻¹. The optimum temperature of immobilized enzyme was 75°C, $K_M = 12.19$ mg mL⁻¹ substrate, and $V_{max} = 88.50$ μ mol mL⁻¹ min⁻¹. Residual activities of purified and immobilized enzyme in the study of thermal stability on 60°C for 100 minutes approximately were 12% and 43%. The activity of immobilized enzyme was maintained significantly even after 5 reuses. The kinetic studies of purified enzyme were obtained $t_{1/2} = 42.00$ minutes, $k_i = 0.0165$ min⁻¹, and $\Delta G_i = 104.57$ kJ mol⁻¹. The kinetic studies of immobilized enzyme were obtained $t_{1/2} = 88.85$ minutes, $k_i = 0.0078$ min⁻¹, and $\Delta G_i = 106.65$ kJ mol⁻¹. Based on the increase of half-time ($t_{1/2}$), decrease of k_i , and increase of ΔG_i , the immobilization by using bentonite can improve the stability of α -amylase from *B. subtilis* ITBCCB148.

Keywords: α -amylase, *Bacillus subtilis* ITBCCB148, immobilization, bentonite

**AMOBILISASI ENZIM α -AMILASE DARI *Bacillus subtilis* ITBCCB148
MENGUNAKAN BENTONIT**

Oleh

EZRA RHEINSKY TIARSA

Skripsi

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

Pada

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



**UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2017**

Judul Skripsi

: **AMOBILISASI ENZIM α -AMILASE DARI *Bacillus subtilis* ITBCCB148 MENGGUNAKAN BENTONIT**

Nama Mahasiswa

: **Ezra Rheinsky Tjarsa**

Nomor Pokok Mahasiswa

: **1317011019**

Jurusan

: **Kimia**

Fakultas

: **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**

MENYETUJUI

Ketua Jurusan Kimia

FMIPA Universitas Lampung

Pembimbing

Dr. Eng. Surlipto 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

: **Prof. Wasinton Simanjuntak, Ph.D.**

Penguji

Bukan Pembimbing

: **Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si.**

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Prof. Warsito, S.Si., D.E.A., Ph.D.

NIP 19710212 199512 1 001



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **10 Juli 2017**

RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di kota Bandar Lampung pada tanggal 1 Januari 1995, sebagai putri bungsu dari pasangan Bapak Sarman dan Ibu Sutimah.

Penulis memulai pendidikan formal di SDN 2 Rawa Laut (Teladan) Bandar Lampung pada tahun 2001 dan sempat melalui program Binaan Khusus (BK) pada tahun 2003-2007. Setelah itu, menjalani program Rintisan Sekolah Bertaraf Internasional (RSBI) di SMPN 2 Bandar Lampung dan lulus pada tahun 2010. Kemudian, penulis menyelesaikan pendidikan di SMAN 2 Bandar Lampung melalui program Rintisan Sekolah Bertaraf Internasional (RSBI) pada tahun 2013. Selanjutnya, penulis diterima melalui jalur SBMPTN sebagai mahasiswa Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Lampung. Sejak semester III hingga semester VIII, penulis berkesempatan menjadi salah satu Beswan PT. Perusahaan Gas Negara (PGN) Indonesia.

Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif dalam berbagai kegiatan internal maupun eksternal kampus. Pada tahun 2013-2014, penulis aktif dalam UKM Koperasi Mahasiswa (Kopma) Unila, sebagai Garuda BEM FMIPA Unila, dan sebagai Kader Muda Himpunan Mahasiswa Kimia (Himaki) FMIPA Unila. Pada

tahun 2014-2015, penulis bergabung sebagai Anggota Biro Penerbitan Himaki. Selanjutnya, penulis berkesempatan menjadi Ketua Biro Penerbitan Himaki periode 2015-2016. Di samping itu, penulis secara mandiri aktif menjadi pengajar privat siswa SD-SMP.

Pada tahun 2016, penulis terpilih melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) dalam program Pengabdian dan Pemberdayaan Masyarakat (PPM) selama 40 hari di Desa Kediri, Kecamatan Gadingrejo, Kabupaten Pringsewu. Kemudian, penulis berkesempatan menjalani Praktek Kerja Lapangan (PKL) di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Unila. Selama menjalani masa PKL, penulis juga aktif menjadi asisten praktikum mata kuliah Biokimia untuk mahasiswa S1 Jurusan Biologi dan Kimia FMIPA Unila, pada mata kuliah Kimia Dasar untuk mahasiswa S1 Fakultas Pertanian Unila, serta pada mata kuliah Teknik Penelitian dan Rekayasa Biokimia untuk mahasiswa S1 Jurusan Kimia FMIPA Unila.

PERSEMBAHAN

Atas rahmat Allah SWT, kupersembahkan karya sederhana ini untuk kedua orang tuaku yang telah memberikan kasih sayang dan doa serta tiada lelah mendukung secara moril maupun materil.

Untuk dosen pembimbingku, Prof. Dr. Ir. Yandri A. S., M. S., sebagai orang tua kedua yang membimbingku selama penelitian.

Untuk Pembimbing Akademikku, Prof. Wasinton Simanjuntak, Ph.D., yang senantiasa memberikan dukungan, arahan, serta saran terbaik kepada penulis.

Untuk sahabat-sahabat terbaikku, Della, Kartika, Vicka, Nurul, Fathaniah, Yuni, dan Badiatul Niqmah, yang membuatku senantiasa dalam kebahagiaan dan selalu membantu serta menyemangatiku.

Untuk seluruh rekan penelitian Laboratorium Biokimia FMIPA Unila 2012-2013, terima kasih atas kerjasama dan bantuan yang diberikan untukku. Semoga karya ini dapat bermanfaat untuk generasi kami selanjutnya.

Untuk keluargaku, Kimia 2013.

Untuk almamaterku, Jurusan Kimia FMIPA Univeritas Lampung.

SANWACANA

Segala puji bagi Allah SWT yang telah menjadikan ilmu sebagai sifat kesempurnaan yang paling tinggi. Sholawat serta salam semoga selalu tercurah kepada Nabi Muhammad SAW, beserta keluarga dan para sahabatnya.

Alhamdulillah, rasa syukur kepada Allah SWT yang telah memberikan kemudahan, kelancaran, kemampuan, dan kekuatan sehingga skripsi dengan judul “Amobilisasi Enzim α -Amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 Menggunakan Bentonit” ini dapat selesai dengan baik.

Perjalanan pendidikan penulis hingga penyusunan skripsi ini tidaklah lepas dari bantuan, dukungan, serta motivasi dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada :

1. Ibunda Sutimah, ayahanda Bpk. Sarman, serta kakak-kakak tercinta Iftadzila Gartiwi Tiarsa, S.S. dan Rusman yang tiada henti memberikan kasih sayang dan doa serta tiada lelah mendukung secara moril maupun materil.
2. Prof. Dr. Ir. Yandri A. S., M. S., selaku Dosen Pembimbing yang senantiasa memberikan bimbingan, pendampingan, arahan, saran, serta solusi terbaik kepada penulis.

3. Prof. Wasinton Simanjuntak, Ph. D., selaku Pembimbing Akademik sekaligus Dosen Penguji I yang senantiasa memberikan dukungan, arahan, serta saran terbaik kepada penulis.
4. Dr. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M. Si., selaku Dosen Penguji II atas masukan dan saran demi kelancaran penelitian dan kesempurnaan skripsi ini.
5. Prof. Warsito, S. Si., D. E. A., Ph. D., selaku Dekan FMIPA Unila atas kelancaran yang diberikan selama studi hingga penyelesaian skripsi ini.
6. Dr. Eng. Suripto Dwi Yuwono, M. T., selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Unila atas bantuan dan kelancaran selama studi hingga penyelesaian skripsi ini.
7. Bapak/Ibu dosen terbaik Unila khususnya Jurusan Kimia yang telah memberikan bekal ilmu pengetahuan, wawasan, motivasi, serta pengalaman-pengalaman yang menginspirasi.
8. Sahabat-sahabat terbaik yang selalu melangkah bersama memberi semangat, tawa, kenyamanan, keyakinan, saran, ide, serta kritik yang membangun: Della Mita Andini, Kartika Agus Kusuma, Vicka Andini, Nurul Fatimah, Fathaniah Sejati, Sri Wahyuni, dan Badiatul Niqmah. Kita akan dipertemukan kembali dalam kesuksesan, aamiin.
9. Rekan-rekan terbaik *peergrup* Biokimia, terkhusus: Fathaniah Sejati, Maya Retna Sari, Khomsatun Khasanah, dan Sinta Dewi O yang saling menyemangati, saling berbagi, saling membantu, memberi kenyamanan, dan *partner sharing* selama penelitian di Laboratorium Biokimia.
10. Kakak-kakak terbaik di Laboratorium Biokimia, terkhusus: Bu Arum Widiasmara, Bu Emma, Aprilia Isma Denila, S. Si., Ana Febrianti

Wulandari, S. Si., Diani Iska Miranti, Fifi Ardhiyanti, Syathira Assegaf, dan Rizki Putriyana yang tak sungkan memberi bantuan, masukan, arahan, pendampingan, pengalaman, dan ilmu yang bermanfaat bagi penulis.

11. Bapak Jon Isman dan Ibu Gusniar, selaku laboran yang telah membantu penulis selama melakukan penelitian di Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Lampung.
12. Bapak Gani, Mas Nomo, pihak Jurusan Kimia, pihak Dekanat FMIPA Unila, Pak De kantin, dan seluruh pihak yang senantiasa membantu dalam kelancaran sistem akademik mengenai penelitian, penyusunan skripsi ini, dan selama penulis menjalani kuliah di Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
13. Sahabat-sahabat KKN terbaik yang telah memberi sepenggal kisah hidup yang manis dan tetap memberi semangat untuk penulis, terkhusus: Annisa Nur Fadhilah, Azmi Prilly Naisa, Citra Alam Puspita, Dea Raissa, Sidik Aryono, dan Romario Sihombing.
14. Rekan-rekan Himaki terbaik yang telah memberi sepenggal kisah hidup yang bermakna dan tetap memberi semangat kepada penulis, terkhusus: Vicka Andini, Yudha Ari Satria, Dona Mailani Pangestika, Arief Aulia Rahman, Fentri Haryanti, Della Mita Andini, Kartika Agus Kusuma, Nella Merliani, Hestianingsih Famela, Fikri Muhammad, serta Sofian Sumilat Rizki, S. Si. sebagai kakak terbaik yang senantiasa memberi masukan, dukungan, bahkan bantuan dalam penelitian kepada penulis.
15. Keluarga “Kimia 2013” yang menjadi rumah bagi penulis, tempat singgah, dan berbagi dalam segala keadaan.

16. Sahabat-sahabat SMA yang tetap memberi semangat dan motivasi untuk penulis, terkhusus: Anindita, Ririn Wirdayani, Filzah Tyas Malinda, Fairuz Khairunisa dan Ayu Sekar Pratiwi.

Terima kasih atas segala bantuan dan dukungan seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu. Semoga segala yang diberikan mendapat balasan pahala dari Allah SWT. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, tetapi semoga dapat bermanfaat bagi para pembaca khususnya rekan-rekan mahasiswa. Aamiin.

Bandar Lampung, Juli 2017
Penulis,

Ezra Rheinsky Tiarsa

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	i
DAFTAR GAMBAR	iii
DAFTAR TABEL	v
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Tujuan Penelitian.....	4
C. Manfaat Penelitian.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Enzim.....	5
B. Enzim α -Amilase	8
C. <i>Bacillus subtilis</i>	10
D. Isolasi dan Pemurnian Enzim	12
1. Sentrifugasi.....	12
2. Fraksinasi dengan amonium sulfat	12
3. Dialisis	13
4. Kromatografi kolom penukar ion	14
E. Uji Aktivitas Enzim α -Amilase.....	15
F. Penentuan Kadar Protein Metode Lowry	17
G. Kinetika Reaksi Enzim	18
H. Kestabilan Enzim.....	20
I. Amobilisasi Enzim	22
J. Bentonit.....	25
III. METODOLOGI PENELITIAN	28
A. Waktu dan Tempat Penelitian.....	28
B. Alat dan Bahan.....	28
C. Prosedur Penelitian	29
1. Pembiakan <i>B. subtilis</i> ITBCCB148 dan produksi enzim α -amilase..	29
2. Isolasi enzim α -amilase dari <i>B. subtilis</i> ITBCCB148.....	30
3. Pemurnian enzim α -amilase dari <i>B. subtilis</i> ITBCCB148.....	30

4. Uji Aktivitas Unit (AU) enzim α -amilase metode Fuwa	34
5. Uji Aktivitas Unit (AU) enzim α -amilase metode Mandels	35
6. Penentuan kadar protein metode Lowry	36
7. Amobilisasi enzim α -amilase menggunakan bentonit	37
8. Karakterisasi enzim α -amilase murni dan amobil	38
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	41
A. Isolasi Enzim	41
B. Pemurnian Enzim	42
1. Fraksinasi dengan amonium sulfat	42
2. Dialisis	44
3. Kromatografi kolom penukar ion menggunakan CMC	45
C. Penentuan pH Pengikatan Enzim Pada Matriks Pengamobil	48
D. Karakterisasi Enzim Murni dan Amobil	49
1. Penentuan suhu optimum	49
2. Penentuan stabilitas termal	51
3. Penentuan K_M dan V_{maks}	52
4. Pemakaian berulang enzim amobil	54
5. Konstanta laju inaktivasi termal (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i)	55
V. KESIMPULAN DAN SARAN	57
A. Kesimpulan	57
B. Saran	58
DAFTAR PUSTAKA	59
LAMPIRAN	63

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim.....	6
2. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim	7
3. Mekanisme katalisis reaksi hidrolisis pati oleh enzim α -amilase.....	10
4. Grafik Lineweaver-Burk.....	19
5. Ilustrasi metode amobilisasi enzim.....	25
6. Struktur bentonit	26
7. Skema fraksinasi bertingkat dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	31
8. Skema prosedur penelitian.....	40
9. Hubungan antara kejenuhan amonium sulfat (0-100)% dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>B. subtilis</i> ITBCCB148.....	43
10. Hubungan antara kejenuhan amonium sulfat (0-40)% dan (40-100)% dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>B. subtilis</i> ITBCCB148.....	44
11. Aktivitas unit enzim α -amilase pada berbagai pH pengikatan dengan matriks CMC.....	46
12. Kromatogram enzim α -amilase dari <i>B. subtilis</i> ITBCCB148 pada kolom CMC.....	47
13. Aktivitas unit enzim α -amilase pada berbagai pH pengikatan dengan matriks bentonit.....	49
14. Suhu optimum enzim hasil pemurnian dan amobilisasi.....	50
15. Stabilitas termal enzim murni dan enzim amobil.....	51
16. Grafik Lineweaver-Burk enzim α -amilase murni dan amobil	53
17. Pemakaian berulang enzim α -amilase hasil amobilisasi pada matriks bentonit	54

18. Grafik $\ln(E_i/E_o)$ enzim hasil pemurnian dan amobilisasi.....	55
19. Kurva standar Bovine Serum Albumin (BSA)	77
20. Kurva standar glukosa.....	78
21. <i>Bacillus subtilis</i> ITBCCB148 dalam medium agar miring	79
22. Media fermentasi	79
23. Ekstrak kasar enzim α -amilase.....	80
24. Fraksinasi enzim α -amilase dengan amonium sulfat	80
25. Dialisis enzim α -amilase	81
26. Kromatografi enzim α -amilase menggunakan CMC	81
27. Uji aktivitas enzim α -amilase hasil pemurnian dengan metode Fuwa.....	82
28. Uji kadar protein dengan metode Lowry	82
29. Uji aktivitas enzim α -amilase hasil amobilisasi dengan metode Mandels.....	83

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Pemurnian enzim α -amilase dari <i>B. subtilis</i> ITBCCB148.	48
2. Nilai K_M dan V_{maks} enzim murni dan amobil.....	52
3. Nilai k_i , ΔG_i , dan $t_{1/2}$ enzim murni dan amobil.....	55
4. Hubungan antara kejenuhan amonium sulfat (0-100)% dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>B. subtilis</i> ITBCCB148.....	64
5. Hubungan antara kejenuhan amonium sulfat (0-40)% dan (40-100)% dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>B. subtilis</i> ITBCCB148.....	64
6. Aktivitas unit enzim α -amilase pada berbagai pH pengikatan dengan matriks CMC saat pengikatan.....	65
7. Aktivitas unit enzim α -amilase pada berbagai pH pengikatan dengan matriks CMC saat pelepasan.....	65
8. Pola protein (A_{280nm}) dan aktivitas unit (U/mL) enzim α -amilase hasil kromatografi kolom penukar ion dengan menggunakan CMC.....	66
9. Aktivitas unit enzim α -amilase pada berbagai pH pengikatan dengan matriks bentonit saat pengikatan.....	68
10. Aktivitas unit enzim α -amilase pada berbagai pH pengikatan dengan matriks bentonit saat pelepasan.....	68
11. Hubungan antara suhu dengan aktivitas unit (U/mL) enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi	69
12. Hubungan antara suhu dengan aktivitas sisa (%) enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi	69
13. Hubungan antara aktivitas unit (U/mL) enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi selama inaktivasi termal 60°C	70
14. Hubungan antara aktivitas sisa (%) enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi selama inaktivasi termal 60°C.	70

15. Data untuk penentuan K_M dan V_{maks} enzim α -amilase hasil pemurnian berdasarkan persamaan Lineweaver-Burk.....	71
16. Data untuk penentuan K_M dan V_{maks} enzim α -amilase hasil amobilisasi berdasarkan persamaan Lineweaver-Burk.....	71
17. Hubungan antara pemakaian berulang enzim hasil amobilisasi dengan aktivitas unit (U/mL).....	72
18. Data $\ln(E_i/E_o)$ untuk penentuan k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim α -amilase hasil pemurnian selama inaktivasi termal 60°C	73
19. Data $\ln(E_i/E_o)$ untuk penentuan k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim α -amilase hasil amobilisasi selama inaktivasi termal 60°C	73
20. Absorbansi BSA pada berbagai konsentrasi.	77
21. Absorbansi glukosa pada berbagai konsentrasi	78

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kebutuhan enzim α -amilase secara komersial telah mencapai 30% dari total produksi enzim global (Choubane *et al.*, 2014; Nisa, dkk., 2013). Enzim ini menjadi enzim yang paling banyak digunakan sebagai biokatalisator dalam berbagai industri, antara lain: sirup, roti, permen, pengolah pati, kertas, tekstil, gula, detergen, bioetanol, obat-obatan, serta pengolahan limbah (Bal *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2012; Singh, 2014). Namun, kelemahan enzim yang mudah larut dalam air terutama pada proses *batch* skala industri menyebabkan kestabilan enzim menurun dan enzim hanya dapat digunakan untuk satu kali proses. Hal ini tentu mengakibatkan biaya produksi enzim menjadi tidak ekonomis. Industri pengolah pati, misalnya, perlu mengeluarkan biaya hingga \$62,2 juta/tahun hanya untuk memenuhi kebutuhan enzim ini (Bal *et al.*, 2016). Oleh karena itu, salah satu upaya yang dapat dilakukan adalah amobilisasi enzim. Penggunaan enzim amobil dapat menekan biaya pengeluaran industri karena enzim dapat digunakan secara berulang dan memiliki kestabilan yang lebih tinggi (Sirisha *et al.*, 2016).

Amobilisasi enzim α -amilase terus dipelajari secara ekstensif pada berbagai metode dan bahan pendukung. Adapun metode amobilisasi enzim yang telah dikembangkan, diantaranya: pengikatan pada matriks tidak larut (*carrier binding*),

penjebakan (*entrapment*), dan ikat silang (*cross linking*). Berdasarkan penelitian Sankalia *et al.* (2006), enzim α -amilase dapat diamobilisasi menggunakan matriks κ -karagenan melalui metode *entrapment*. Menurut penelitian Talebi *et al.* (2016), enzim α -amilase dapat diamobilisasi melalui penggabungan metode *entrapment* pada matriks nano-zeolit yang diikat silang (*cross linking*) oleh glutaraldehid. Enzim amobil tersebut dapat bekerja hingga suhu 85°C selama 120 menit dengan aktivitas sisa 85%. Berdasarkan penelitian Laila, dkk. (2007), enzim amilase hasil amobilisasi menggunakan matriks kitosan melalui metode *carrier binding* secara adsorpsi fisik dapat digunakan berulang hingga tiga kali dengan aktivitas sisa sebesar 50%.

Amobilisasi enzim pada penelitian ini dilakukan menggunakan matriks bentonit (Sigma-Aldrich) non-modifikasi. Bentonit merupakan mineral lempung atau tanah liat (*clay*) yang mengandung silika, aluminium oksida, dan hidroksida yang membentuk dua lapisan tetrahedral dan satu lapisan oktahedral (Ohtsuka, 1997). Bentonit telah diketahui dapat digunakan sebagai matriks anorganik dalam amobilisasi berbagai enzim, seperti enzim α -amilase (Sedaghat *et al.*, 2009), protease (Wulandari, 2016), xilanase (Sutrisno dan Mahdi, 2014), pektinase (Rosmanansari, dkk., 2013), dan lipase (Nopiani, 2015; Chrisnasari, dkk., 2014). Menurut penelitian Sedaghat *et al.* (2009), enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis* (Aldrich) yang diamobilisasi oleh Na-bentonit termodifikasi oleh *cetyl trimethylammonium bromide* (CTMAB) asal Salafchegan, Iran menghasilkan kestabilan enzim yang tinggi dan aktivitas sisa sebesar 80%.

Pemilihan bentonit sebagai bahan pendukung amobilisasi enzim didasarkan beberapa pertimbangan, diantaranya: tidak larut dalam air, memiliki daya tukar

ion yang besar, pH berkisar 4-7 (pH asam) sesuai pH optimum enzim α -amilase, mengandung kation bivalen (Ca^{2+}) yang dapat menstabilkan enzim, murah, tersedia cukup berlimpah di alam termasuk Indonesia, memiliki kestabilan mekanik dan termal, mampu meningkatkan kestabilan enzim, luas permukaan partikel yang besar, mudah diaktivasi, rigid, stabil (*inert*), serta bersifat non-toksik (Sedaghat *et al.*, 2009).

Metode amobilisasi tergantung pada sifat matriks pengamobil yang digunakan. Metode amobilisasi enzim menggunakan bentonit dilakukan melalui metode *carrier binding* secara adsorpsi fisik. Metode ini didasarkan pada sifat matriks bentonit yang tidak mudah larut dalam air, memiliki daya tukar ion yang besar, dan memiliki luas permukaan *interlayer* yang mampu melindungi struktur enzim. Pada metode tersebut, enzim diadsorpsi pada permukaan matriks melalui interaksi hidrofobik, ikatan hidrogen, dan gaya Van der Waals. Metode ini mudah dilakukan, ekonomis, tidak merusak konformasi enzim, dan penurunan aktivitas enzim cenderung rendah (Laila, dkk., 2007).

Pada penelitian ini, enzim α -amilase diisolasi dari bakteri isolat lokal *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dan dilakukan berbagai tahap pemurnian, antara lain: fraksinasi dengan amonium sulfat, dialisis, dan kromatografi penukar kation menggunakan matriks *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) sehingga diperoleh enzim α -amilase dengan aktivitas dan kemurnian yang tinggi. Menurut penelitian Yandri *et al.* (2010), enzim α -amilase yang diisolasi dari *B. subtilis* ITBCCB148 pada pH optimum 6,0 menghasilkan aktivitas spesifik sebesar 269,6 U/mg dan meningkat hingga 6229,5 U/mg setelah tahap kromatografi penukar anion

menggunakan matriks DEAE-selulosa. Berdasarkan hasil Kerja Praktik yang telah dilakukan pada bulan September-Oktober 2016, diperoleh pH 6,5 sebagai pH optimum fermentasi produksi enzim α -amilase dari *B. subtilis* ITBCCB148 pada penelitian ini.

B. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memperoleh enzim α -amilase dari *B. subtilis* ITBCCB148 dengan aktivitas dan tingkat kemurnian yang tinggi.
2. Meningkatkan kestabilan enzim α -amilase dari *B. subtilis* ITBCCB148 melalui amobilisasi menggunakan bentonit.
3. Memperoleh enzim α -amilase yang dapat digunakan secara berulang.

C. Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari hasil penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memberikan informasi tentang nilai aktivitas, suhu optimum, K_M , V_{maks} , k_i , $t_{1/2}$, dan ΔG_i enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil amobilisasi.
2. Memberikan informasi tentang pengaruh amobilisasi menggunakan bentonit terhadap stabilitas enzim α -amilase dari *B. subtilis* ITBCCB148.
3. Memperoleh enzim α -amilase dari *B. subtilis* ITBCCB148 dengan kestabilan yang tinggi dan dapat digunakan berulang sehingga lebih ekonomis dalam upaya mengurangi biaya produksi dalam proses industri.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Enzim

Enzim merupakan protein aktif yang memiliki sisi aktif dimana dapat mengalami lekukan (*folding*) karena berinteraksi dengan sisi aktif suatu substrat sehingga dapat mengkatalisis perubahan senyawa tertentu menjadi senyawa lain. Fungsi enzim sebagai biokatalisator adalah mempercepat reaksi kimia dengan cara menurunkan energi bebas pengaktifan (ΔG) sehingga dihasilkan keadaan transisi lebih rendah (Wirahadikusumah, 1977). Suatu enzim dapat mempercepat reaksi hingga 10^8 sampai 10^{11} kali lebih cepat dibandingkan reaksi tanpa katalis (Poedjiadi, 2010). Keunggulan enzim sebagai biokatalisator dibandingkan dengan katalis sintetik, antara lain: (1) enzim bekerja secara selektif dan spesifik, (2) tidak menghasilkan produk samping yang tidak diinginkan, (3) mudah diproduksi (4) ramah lingkungan, (5) bekerja pada kondisi tekanan, suhu, dan pH fisiologis, serta (6) dapat digunakan ulang melalui proses amobilisasi (Sirisha *et al.*, 2016).

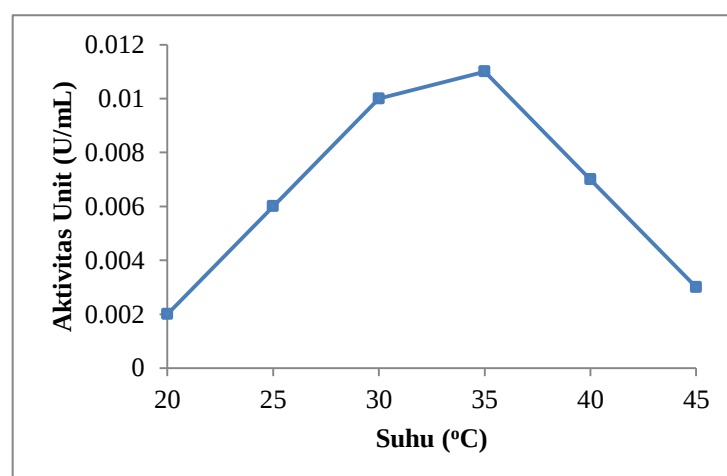
Fungsi katalitik suatu enzim ditentukan oleh bentuk strukturnya. Protein yang mempunyai fungsi sebagai enzim adalah protein yang memiliki struktur tersier. Struktur ini mempunyai sisi aktif atau sisi pengikatan enzim yang spesifik terhadap substrat untuk membentuk kompleks enzim-substrat. Sisi aktif tersebut berupa rantai samping asam-asam amino pembentuk protein yang mengandung

gugus-gugus reaktif, seperti: gugus kation, anion, hidroksil aromatik, hidroksil alifatik, karbonil, amina, amida, tiol, dan gugus heterosiklik. Jenis-jenis ikatan kimia yang menstabilkan struktur tersier enzim adalah ikatan-ikatan kimia yang terbentuk akibat lekukan (*folding*) rantai polipeptida menghasilkan konformasi tiga dimensi protein, antara lain: ikatan peptida, hidrogen, hidrofob, elektrostatis, disulfida, dan ikatan Van der Waals (Wirahadikusumah, 1977).

Faktor -faktor yang mempengaruhi kerja enzim, antara lain:

1. Suhu

Peningkatan suhu akan meningkatkan energi kinetik molekul sehingga kecepatan reaksi turut meningkat. Namun, dalam suhu yang terlalu tinggi, peningkatan energi tersebut dapat memecah ikatan hidrogen ataupun hidrofobik yang berperan dalam menjaga konformasi molekul enzim. Perubahan konformasi akan merusak sisi aktif enzim sehingga mengalami denaturasi. Enzim bekerja optimum pada suhu tertentu yang disebut suhu optimum (Wirahadikusumah, 1977). Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim dapat dilihat pada Gambar 1.

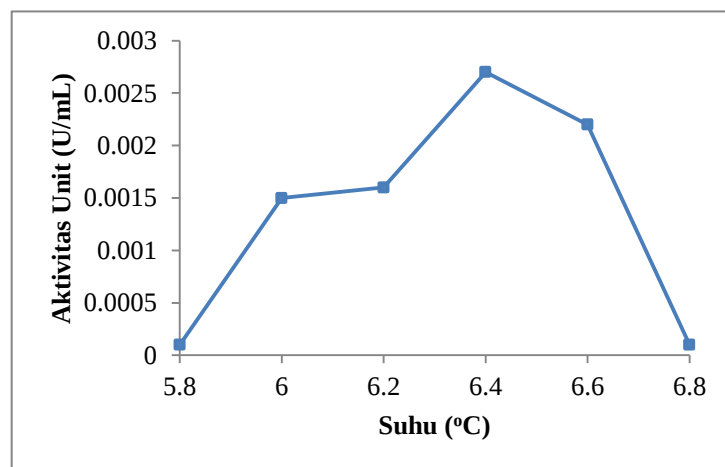


Gambar 1. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim (Dali, dkk., 2013).

2. pH

Reaksi enzimatik akan menghasilkan aktivitas optimum pada pH optimum mediumnya (Wirahadikusumah, 1977). Pada pH optimum, enzim memiliki struktur tiga dimensi yang sangat tepat untuk berikatan dengan substrat.

Perubahan pH akan menyebabkan perubahan muatan residu asam amino yang menyusun sisi aktif enzim dan substrat sehingga efektivitas pengikatan enzim dengan substrat tersebut akan menurun (Talekar *et al.*, 2010). Enzim akan mengalami protonasi dan kehilangan muatan negatifnya pada pH yang terlalu rendah, sedangkan substrat akan terionisasi dan kehilangan muatan positifnya pada pH yang terlalu tinggi (Kusumadjaja dan Dewi, 2005). Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim (Dali, dkk., 2013).

3. Konsentrasi substrat

Aktivitas enzim berbanding lurus dengan konsentrasi substrat. Bila konsentrasi enzim cukup besar maka konsentrasi substrat harus disesuaikan agar semua enzim terikat pada substrat dalam bentuk kompleks, sehingga diperoleh laju reaksi yang maksimum, V_{maks} (Wirahadikusumah, 1977).

4. Konsentrasi enzim

Konsentrasi enzim harus sesuai dengan konsentrasi substrat. Penambahan konsentrasi enzim akan meningkatkan laju reaksi bila substrat tersedia secara berlebih. Dalam reaksi enzimatik, laju reaksi permulaan berbanding lurus dengan konsentrasi enzim, sehingga faktor pembatas laju reaksi yang sebenarnya adalah konsentrasi enzim (Wirahadikusumah, 1977).

5. Inhibitor

Inhibitor merupakan senyawa atau ion yang dapat menghambat aktivitas enzim, baik secara *reversible* maupun *irreversible*. Inhibitor *reversible* terdiri dari tiga jenis, yaitu inhibitor kompetitif, non-kompetitif, dan unkompetitif (Wirahadikusumah, 1977).

B. Enzim α -Amilase

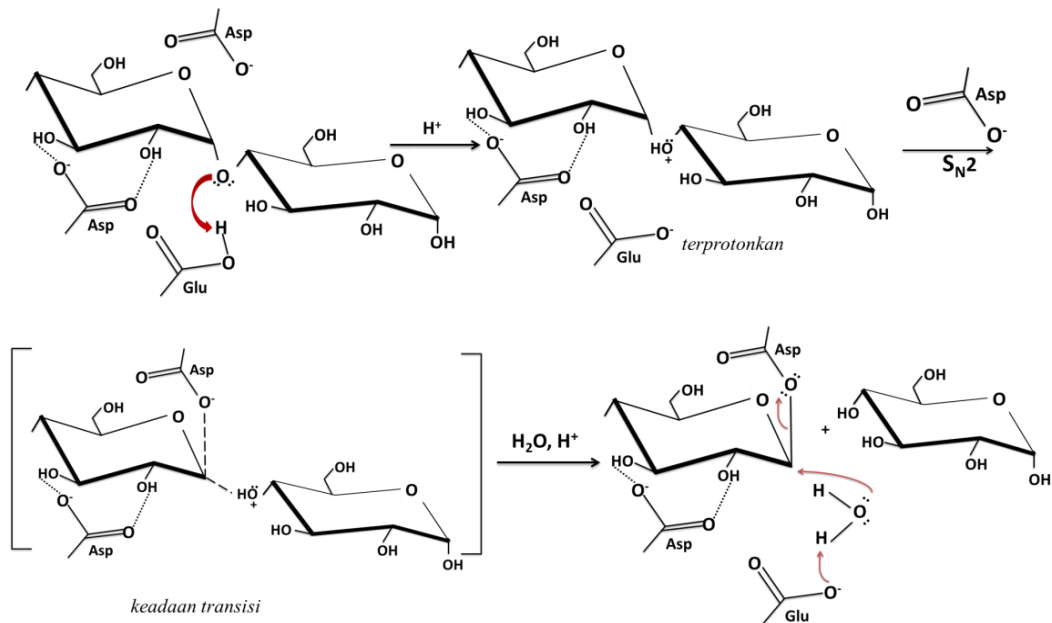
Enzim α -amilase atau α -1,4-glukan-4-glukanohidrolase termasuk golongan endoenzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis ikatan α -1,4 glikosidik pada bagian dalam unit amilosa menjadi maltosa dan glukosa ataupun amilopektin menjadi dekstrin (Dali, dkk., 2013; Fessenden dan Fessenden, 1986; Rajagopalan and Krishnan, 2008). Enzim ekstraseluler ini memiliki berat molekul sebesar 67 kDa (Yandri *et al.*, 2010).

Pati berperan sebagai substrat enzim α -amilase dan sebagai sumber karbon bagi pertumbuhan mikroba penghasil enzim tersebut. Pati merupakan suatu karbohidrat golongan polisakarida yang tersusun atas lebih dari delapan satuan monosakarida. Pati merupakan polimer yang tersusun dari monomer α -D-glukosa yang dihubungkan oleh ikatan α -1,4 glikosidik dan ikatan α -1,6 glikosidik pada

percabangan rantainya. Secara alami, pati merupakan campuran dari amilosa dan amilopektin sebagai polimer dari α -D-glukosa (Fessenden dan Fessenden, 1986).

Berdasarkan reaksi yang dikatalisis, enzim α -amilase digolongkan sebagai enzim hidrolase (Wirahadikusumah, 1977). Mekanisme katalisis reaksi hidrolisis substrat pati oleh enzim α -amilase ditunjukkan pada Gambar 3. Reaksi tersebut berlangsung dalam beberapa tahap, yaitu: tahap protonasi, serangan nukleofilik, pembentukan keadaan transisi, dan hidrolisis. Dalam menghidrolisis substrat, ada tiga residu asam amino yang penting yaitu satu molekul asam glutamat dan dua molekul asam aspartat (Kuriki *and* Imanaka, 1999). Residu asam glutamat berperan sebagai katalis asam, salah satu residu asam aspartat bertindak sebagai nukleofil, sedangkan residu aspartat yang lain berfungsi untuk mengikat substrat. Mekanisme reaksi diawali dengan pengikatan substrat pada sisi aktif enzim. Pengikatan terjadi melalui ikatan hidrogen yang terbentuk antara atom O dari satu molekul aspartat dengan atom H dari gugus hidroksil ($-OH$) posisi kedua dan ketiga pada substrat pati. Selain untuk mengikat substrat, kedua ikatan hidrogen tersebut juga mengganggu kestabilan substrat sehingga lebih mudah dihidrolisis. Di sisi lain, residu asam glutamat memprotonasi atom O pada ikatan glikosidik. Pada saat yang sama, satu residu aspartat lain yang tidak membentuk ikatan hidrogen melakukan serangan nukleofilik melalui atom oksigennya terhadap atom C_1 pada residu glukosa yang terprotonasi oleh asam glutamat. Tahap ini diikuti dengan pembentukan keadaan transisi. Residu aspartat yang mengikat atom C_1 pun terlepas. Pada tahap hidrolisis, terjadi pemutusan ikatan glikosidik yang telah terprotonasi, sehingga fragmen glukosa (produk) meninggalkan sisi aktif enzim.

Molekul air hasil hidrolisis selanjutnya memasuki sisi aktif enzim. Atom H dari molekul air diserang oleh oksigen dari ion glutamat sehingga glutamat kembali berada dalam bentuk asam, dan proses terulang kembali (Uitdehaag *et al.*, 1999).



Gambar 3. Mekanisme katalisis reaksi hidrolisis pati oleh enzim α -amilase (Uitdehaag *et al.*, 1999).

C. *Bacillus subtilis*

Menurut Hadioetomo (1993) klasifikasi genus *Bacillus* adalah sebagai berikut:

Kingdom : Procaryotae
 Divisi : Bacteria
 Kelas : Schizomycetes
 Ordo : Eubacteriales
 Family : Bacillaceae
 Genus : *Bacillus*

Bakteri *Bacillus* merupakan bakteri gram positif, berbentuk batang (basil), beberapa spesies bersifat aerob obligat dan bersifat anaerobik fakultatif, serta memiliki endospora sebagai struktur pelindung saat kondisi lingkungan tidak mendukung. Beberapa spesies dari jenis *Bacillus* bersifat mesofilik misalnya *Bacillus subtilis*. *B. subtilis* merupakan spesies bakteri dari genus *Bacillus* penghasil enzim α -amilase yang paling umum dan mudah diidentifikasi. Bakteri yang bersifat saprofit ini mudah ditemukan karena hidup di tanah (Jawetz dan Adelberg, 2005).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa pH optimum fermentasi produksi enzim α -amilase dari *B. subtilis* berkisar antara: pH 6,0 pada suhu optimum 60°C (Yandri *et al.*, 2010) dan pH 6,4 pada 35°C (Dali, dkk., 2013). Secara umum, enzim α -amilase yang diisolasi dari bakteri dapat stabil pada pH 5,5 – 8,0 dengan aktivitas optimum berada pada pH 4,8 – 6,5. Di samping itu, aktivitas enzim α -amilase yang dihasilkan *B. subtilis* lebih tinggi dibandingkan yang dihasilkan *Aspergillus niger* (Oyeleke *et al.*, 2011).

Media fermentasi bakteri penghasil enzim α -amilase memerlukan komposisi unsur nutrisi, diantaranya: karbon (C) sebagai unsur penyusun biomolekul (karbohidrat, lipid, protein, dan asam nukleat) dalam membran sel dan nukleus; nitrogen (N) digunakan dalam sintesis protein dan asam nukleat; fosfor (P) digunakan dalam sintesis gugus fosfat pada asam nukleat maupun fosfolipid; sulfur (S) digunakan untuk membentuk jembatan disulfida (S-S) dalam struktur tiga dimensi protein globular; serta magnesium (Mg) yang merupakan mikronutrien sebagai ko-faktor enzim dalam metabolisme karbohidrat (Thieman and Palladino, 2009).

D. Isolasi dan Pemurnian Enzim

1. Sentrifugasi

Enzim dapat diisolasi secara ekstraseluler dan intraseluler. Enzim intraseluler langsung digunakan di dalam sel dan sering ditemukan pada bagian membran dari sebuah organel sel, sedangkan enzim ekstraseluler dilepas dari sel ke lingkungan untuk menghidrolisis polimer di lingkungan (Maier *et al.*, 2000). Adapun enzim α -amilase merupakan enzim ekstraseluler yang dapat dikeluarkan dari sel bakteri melalui sentrifugasi, tanpa perlu memecah sel. Prinsip sentrifugasi yaitu memisahkan substansi berdasarkan berat jenis molekul dengan cara memberikan gaya sentrifugal, sehingga substansi yang lebih berat akan berada di dasar, sedangkan substansi yang lebih ringan akan berada di atas (Faatih, 2009). Sel-sel mikroba biasanya akan mengalami sedimentasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit (Santos *et al.*, 2015). Hasil sentrifugasi diperoleh *pellet* (endapan pengotor) dan supernatan (ekstrak kasar enzim). Proses sentrifugasi dilakukan pada suhu dingin 2–4°C untuk mencegah denaturasi enzim karena proses tersebut akan melepaskan panas (Suhartono, 1989).

2. Fraksinasi dengan amonium sulfat

Pemurnian enzim bertujuan memisahkan enzim yang dikehendaki dari protein (enzim) lain yang tidak diinginkan. Fraksinasi merupakan proses pengendapan protein (enzim) dengan penambahan senyawa elektrolit seperti garam amonium sulfat, natrium klorida, atau natrium sulfat. Fraksinasi dilakukan secara bertingkat guna menghilangkan protein-protein lain yang mudah larut serta mengendapkan protein (enzim) lebih banyak pada suatu konsentrasi garam tertentu.

Dalam proses fraksinasi, saat konsentrasi garam lebih tinggi maka kelarutan enzim dalam air menjadi lebih rendah. Kekuatan ion garam yang lebih tinggi menghasilkan muatan yang dapat membentuk ikatan kovalen dengan air. Akhirnya, sebagian air yang menghidrasi molekul enzim akan tertarik oleh garam sehingga enzim akan mengendap. Peristiwa ini disebut *salting out* (Wirahadikusumah, 1977).

Amonium sulfat memiliki keunggulan, diantaranya: kelarutan yang tinggi dalam air, tidak mempengaruhi aktivitas enzim, mempunyai molaritas tinggi dalam keadaan jenuh sehingga memiliki daya pengendapan yang efektif, memiliki efek penstabil terhadap enzim, panas pelarutannya rendah sehingga panas yang dihasilkan mudah hilang, dapat digunakan pada berbagai pH, larutan pekatnya dapat mencegah pertumbuhan bakteri, dalam larutan amonium sulfat sebagian besar protein terlindungi dari denaturasi, dan pada larutan jenuhnya (4,04 M pada 20°C) memiliki kerapatan yang tidak cukup besar (sekitar 1,235 g/cm³) sehingga tidak mengganggu sedimentasi protein saat sentrifugasi (Scopes, 1987).

Berdasarkan penelitian Yandri *et al.* (2010), aktivitas spesifik enzim α -amilase dari *B. subtilis* ITBCCB148 hasil pemurnian melalui fraksinasi dengan amonium sulfat memberikan hasil lebih baik sebesar 1534 U/mg, dibandingkan dengan ekstrak kasarnya sebesar 269,6 U/mg.

3. Dialisis

Dialisis merupakan pemurnian enzim berdasarkan difusi ion-ion garam yang berlangsung pada suatu membran semipermeabel, yaitu kantong selofan. Proses ini terjadi karena adanya perbedaan tekanan osmotik antara cairan yang ada di

dalam dan di luar membran. Ion-ion garam yang memiliki tekanan osmotik lebih tinggi akan menuju luar membran, sedangkan molekul H^+ dari buffer yang memiliki tekanan osmotik lebih rendah akan masuk ke dalam membran. Enzim yang memiliki berat molekul lebih besar akan tertahan di dalam membran, sedangkan ion-ion garam yang kecil akan keluar melalui pori-pori membran. Proses dialisis perlu dilakukan dalam suhu $2-4^{\circ}C$ untuk mencegah denaturasi enzim (Suhartono, 1989). Untuk mencapai keseimbangan osmotik, maka dapat dilakukan beberapa cara untuk mempercepat pergerakan molekul yaitu:

- a. Pergantian larutan buffer dengan konsentrasi rendah secara kontinu pada selang waktu tertentu sampai ion-ion garam dalam membran dapat diabaikan (Lehninger, 1982).
- b. Membuat luas permukaan membran sebesar mungkin, misalnya menambah panjang kantong selofan (Nopiani, 2015).
- c. Mengubah lapisan larutan yang berhubungan langsung dengan membran secara terus menerus dengan mengaduk buffer menggunakan *stirrer* (Nopiani, 2015).

4. Kromatografi kolom penukar ion

Pada kromatografi kolom ini, suatu fluida dialirkan ke dalam kolom yang mengandung matriks. Pemisahan komponen didasarkan pada perbedaan daya ikat molekul-molekul terhadap matriks yang berbeda muatan. Kromatografi penukar ion adalah penukaran protein (enzim) yang mengandung muatan ion tertentu dengan suatu *counter ion* yang mengandung muatan lebih kecil. *Counter ion* awalnya terikat pada matriks yang berbeda muatan. Kromatografi ini berfungsi untuk memisahkan protein-protein yang tidak diinginkan. Keunggulan

kromatografi penukar ion yaitu murah, sederhana, dan matriks dapat diregenerasi. Kelemahan metode ini yaitu perlunya pengikatan enzim-matriks pada pH yang sesuai, rentan terhadap pH ekstrim, dan perlu penentuan pH optimum enzim (Suhartono, 1989).

Kromatografi penukar ion terdiri dari dua jenis, yaitu kromatografi penukar anion dan penukar kation. Pada kromatografi penukar kation, digunakan matriks yang memiliki gugus bermuatan negatif. Matriks tersebut terikat secara kovalen dengan *counter ion* yang bermuatan positif. Pada kromatografi ini berlangsung penukaran *counter ion* positif dengan gugus R protein (enzim) yang memiliki muatan lebih positif. Matriks yang umum digunakan yaitu *Carboxymethyl Cellulose* (CMC). Gugus karboksimetil (CM) atau $\text{O-CH}_2\text{-COO}^-$ bermuatan negatif pada pH asam, sehingga dapat menarik gugus R protein yang lebih positif dibandingkan *counter ion* yang terikat pada matriks (Ferialiana, 2011).

Berdasarkan penelitian Yandri *et al.* (2010), aktivitas spesifik enzim α -amilase dari *B. subtilis* ITBCCB148 hasil pemurnian dengan kromatografi menggunakan CMC memberikan hasil lebih baik sebesar 7500 U/mg, dibandingkan dengan kromatografi menggunakan DEAE-selulosa sebesar 6229,5 U/mg.

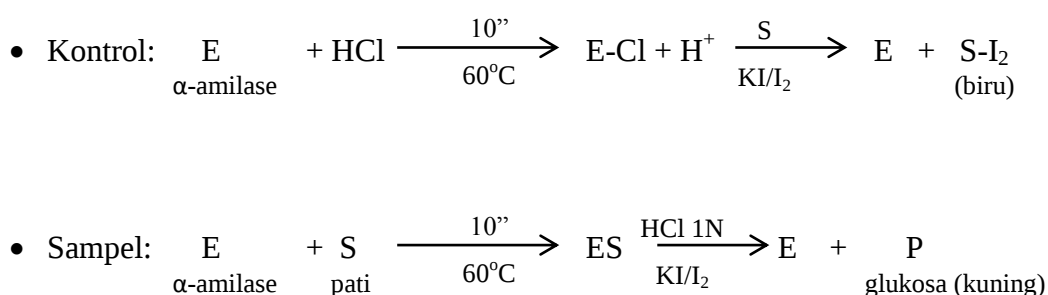
E. Uji Aktivitas Enzim α -Amilase

Aktivitas Unit (AU) enzim adalah jumlah enzim yang menyebabkan transformasi substrat 1 μmol /menit dalam keadaan optimum. Kemurnian enzim dinyatakan dalam Aktivitas Spesifik (AS) yaitu jumlah Unit Aktivitas (AU) per miligram protein. Jumlah enzim dalam ekstrak suatu jaringan dapat ditentukan secara

kuantitatif berdasarkan efek katalisis enzim tersebut melalui dua pendekatan, yaitu berdasarkan pengukuran substrat yang berkurang ataupun produk yang terbentuk.

Pengujian aktivitas α -amilase dilakukan dengan metode Fuwa dan metode Mandels. Aktivitas enzim dihitung sebagai fungsi absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Metode Fuwa digunakan pada tahap isolasi dan pemurnian enzim α -amilase. Adapun metode Mandels digunakan dalam penentuan data kinetika enzim α -amilase yaitu nilai K_M , V_{maks} , $t_{1/2}$, k_i , dan ΔG_i (Ferialiana, 2011). Metode Mandels didasarkan pada pembentukan produk (glukosa) hasil hidrolisis substrat pati yang akan mengalami oksidasi setelah penambahan reagen DNS menghasilkan larutan berwarna merah. Warna tersebut akan menyerap cahaya monokromatis pada λ_{maks} 510 nm (Fessenden dan Fessenden, 1986). Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan menggunakan kurva standar glukosa (Mandels *et al.*, 2009). Adapun metode Fuwa didasarkan atas berkurangnya substrat pati yang terhidrolisis dan menghasilkan warna biru setelah penambahan iodine. Warna tersebut akan menyerap cahaya monokromatis pada λ_{maks} 610 nm (Fuwa, 1954; Fessenden dan Fessenden, 1986).

Berikut ini ilustrasi reaksi enzimatik pada metode Fuwa:



Pada kontrol, iodine (I_2) terperangkap dalam rantai spiral substrat (amilosa) menghasilkan larutan berwarna biru. Enzim sejak awal sudah dinaktivasi oleh HCl sehingga substrat tetap utuh karena tidak dihidrolisis oleh enzim, maka larutan akan tetap berwarna biru. Pada sampel, enzim akan mengikat substrat membentuk kompleks enzim-substrat. Kompleks tersebut akan bereaksi dengan larutan iodine membentuk larutan berwarna kuning yang dapat diukur secara spektrofotometri. Semakin banyak substrat yang dihidrolisis oleh enzim, maka warna larutan akan semakin kuning bening. Hal ini dikarenakan substrat pati yang berikatan dengan iodine dan enzim semakin berkurang dan berubah menjadi produk, yaitu glukosa. Selain itu, enzim melepas ikatan spiral antara iodine dan substrat sehingga warna menjadi kuning bening (Fuwa, 1954).

F. Penentuan Kadar Protein Metode Lowry

Penentuan kadar protein bertujuan untuk mengetahui bahwa protein (enzim) masih terdapat pada tiap fraksi pemurnian dengan aktivitas yang tetap baik (Ferialiana, 2011). Pengukuran didasarkan pada kurva standar BSA sebagai protein standar yang mengandung asam amino tirosin dan triptofan. Asam amino tersebut memiliki ikatan konjugasi yang mengalami transisi elektronik pada λ 280 nm (Boyer, 2012). Pada metode Lowry, ion $Cu(II)$ bereaksi dengan ikatan peptida pada protein (enzim) membentuk senyawa kompleks. Selanjutnya, kompleks Cu^{2+} dengan protein yang terbentuk tersebut akan tereduksi menjadi Cu^+ pada kondisi alkalis. Kemudian, Cu^+ yang terikat pada rantai samping tirosin, triptofan, atau sistein dari protein (enzim) akan bereaksi dengan reagen *folin-ciocelteau* yang akan mengikat protein. Reaksi ini secara perlahan akan

mereduksi reagen tersebut menjadi heteromolibdenum menghasilkan warna hijau-kebiruan yang akan menyerap cahaya monokromatis pada λ_{maks} 750 nm.

Intensitas warna yang dihasilkan tergantung pada kandungan triptofan dan tirosin pada protein (enzim) (Lowry *et al.*, 1951).

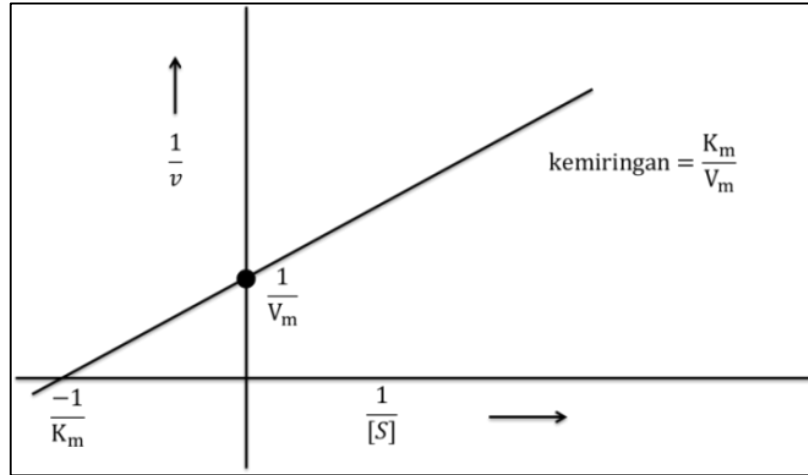
Metode spektrofotometri UV-Vis diaplikasikan pada metode Fuwa, Mandels, dan Lowry. Prinsip metode spektrofotometri UV-Vis adalah ketika cahaya polikromatis dengan berbagai panjang gelombang mengenai suatu larutan berwarna, maka cahaya monokromatis dengan panjang gelombang tertentu saja yang akan diserap. Jika zat menyerap cahaya tampak (*visible*) dan UV maka akan terjadi perpindahan elektron dari keadaan dasar menuju keadaan tereksitasi. Perpindahan elektron ini disebut transisi elektronik. Cahaya yang diserap diukur sebagai absorbansi (A), yang dinyatakan dengan hukum Lambert-Beer yaitu “jumlah radiasi cahaya tampak yang diserap oleh suatu larutan merupakan suatu fungsi linier dari konsentrasi zat dan tebal larutan” (Harvey, 2000).

G. Kinetika Reaksi Enzim

Untuk mengetahui konsentrasi substrat yang dapat menghasilkan laju reaksi maksimum, diperlukan penentuan tetapan Michaelis-Menten (K_M). K_M merupakan konstanta yang menunjukkan afinitas enzim terhadap substrat.

Semakin kecil harga K_M maka interaksi enzim dan substrat semakin baik dan laju reaksi semakin cepat. Bila konsentrasi substrat cukup besar sehingga semua enzim terikat kepadanya dalam bentuk kompleks enzim-substrat, maka akan didapat laju reaksi maksimum, V_{maks} (Wirahadikusumah, 1977). Nilai K_M dapat

ditentukan dengan mengekstrapolasikan data eksperimental ke dalam grafik persamaan Lineweaver-Burk, seperti pada Gambar 4.



Gambar 4. Grafik Lineweaver-Burk (Wirahadikusumah, 1977).

Persamaan Lineweaver-Burk merupakan persamaan kebalikan berganda yang linier dari persamaan Michaelis-Menten.

Persamaan Michaelis-Menten, $v = \frac{V_{\text{maks}}[S]}{K_M + [S]}$(G.1)

Persamaan Lineweaver-Burk, $\frac{1}{v_o} = \left(\frac{K_M}{V_{\text{maks}}}\right)\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{maks}}}$(G.2)

(Wirahadikusumah, 1977).

Amobilisasi enzim dapat meningkatkan maupun menurunkan nilai K_M enzim.

Peningkatan nilai K_M pada enzim hasil amobilisasi berimplikasi bahwa konsentrasi substrat yang lebih tinggi dibutuhkan untuk mencapai laju reaksi maksimum ataupun laju reaksi yang sama pada enzim murni. Perubahan konformasi pada molekul enzim dapat meningkatkan nilai K_M dikarenakan menurunnya daya gabung antara enzim dan substrat. Perubahan konformasi

enzim tersebut dapat disebabkan oleh perubahan kimiawi pada proses pengikatan kovalen enzim dan matriks bentonit serta ukuran partikel enzim yang terlalu besar sehingga mempengaruhi difusi substrat (Suhartono, 1989).

Berdasarkan penelitian Nopiani (2015), enzim lipase hasil pemurnian mempunyai nilai K_M dan V_{maks} berturut-turut yaitu $86,177 \text{ mg mL}^{-1}$ substrat dan $35,714 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$. Adapun enzim lipase setelah diamobilisasi menggunakan bentonit memiliki nilai K_M dan V_{maks} berturut-turut yaitu $4,742 \text{ mg mL}^{-1}$ substrat dan $4,854 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$. Menurut penelitian Wulandari (2016), enzim protease hasil pemurnian mempunyai nilai K_M dan V_{maks} berturut-turut yaitu $6,2 \text{ mg mL}^{-1}$ substrat dan $200 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$, sedangkan enzim protease setelah diamobilisasi menggunakan bentonit memiliki nilai K_M dan V_{maks} berturut-turut yaitu $4,285 \text{ mg mL}^{-1}$ substrat dan $142,857 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$. Pada penelitian yang dilakukan Sedaghat *et al.* (2009), enzim α -amilase hasil pemurnian mempunyai nilai K_M dan V_{maks} berturut-turut yaitu $5,69 \text{ g L}^{-1}$ dan $5,86 \text{ mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$, sedangkan enzim hasil amobilisasi dengan bentonit memiliki nilai K_M dan V_{maks} berturut-turut yaitu sebesar 23 g L^{-1} dan $0,94 \text{ mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$.

H. Kestabilan Enzim

Kestabilan enzim diartikan sebagai kestabilan aktivitas enzim selama penggunaan, penyimpanan, serta kemantapan struktur terhadap pengaruh kondisi fisiologis.

Kestabilan enzim meliputi kestabilan termal dan kestabilan pH. Kestabilan ini sangat penting terutama saat aplikasi dalam industri yang bekerja pada pH dan suhu ekstrim. Penggunaan kondisi ekstrim tersebut dimaksudkan agar laju reaksi lebih tinggi, mengurangi kontaminan, serta mengurangi masalah viskositas.

Stabilitas termal enzim ditentukan dari aktivitas sisa enzim tersebut setelah diinkubasi selama waktu tertentu.

$$\text{Aktivitas sisa} = \frac{\text{Aktivitas unit enzim pada } t_i}{\text{Aktivitas unit enzim pada } t_o} \times 100\% \dots \dots \dots (H.1)$$

Stabilitas enzim dapat dilihat pula dari nilai waktu paruh ($t_{1/2}$), konstanta laju reaksi inaktivasi (k_i), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i). Penentuan nilai waktu paruh ($t_{1/2}$) didasarkan pada persamaan laju reaksi inaktivasi (k_i) orde satu antara aktivitas sisa enzim pada t_o ($[E]_o$) dan pada t_i ($[E]_i$).

$$\ln \frac{[E]_i}{[E]_o} = -k_i \cdot t_{1/2} \dots \dots \dots (H.2)$$

Adapun penentuan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim diturunkan dari persamaan termodinamika:

$$\Delta G_i = -RT \ln \frac{k_i \cdot h}{k_B \cdot T} \dots \dots \dots (H.3)$$

Keterangan:

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

T = suhu absolut (K)

k_i = konstanta laju inaktivasi termal

h = konstanta Planck ($6,625 \times 10^{-34} \text{ J.det}$)

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

(Yandri *et al.*, 2010).

Peningkatan nilai ΔG_i pada enzim amobil mengindikasikan bahwa konformasi struktur enzim menjadi lebih *folding* dari semula yang menyebabkan struktur enzim lebih kaku dan kurang fleksibel, sehingga energi yang diperlukan untuk

mendenaturasi enzim tersebut semakin tinggi. Adapun penurunan nilai k_i diperkirakan karena kondisi enzim yang kurang fleksibel dalam larutan air, sehingga ketidakterlipatan (*unfolding*) protein menjadi berkurang dan kestabilan enzim meningkat (Yandri dan Wulandari, 2009).

Berdasarkan penelitian Nopiani (2015), enzim lipase hasil pemurnian mempunyai nilai k_i , $t_{1/2}$, dan ΔG_i berturut-turut $0,023 \text{ menit}^{-1}$, 30,130 menit, dan 95,669 kJ/mol. Adapun enzim lipase hasil amobilisasi menggunakan bentonit mempunyai nilai k_i , $t_{1/2}$, dan ΔG_i berturut-turut sebesar $0,018 \text{ menit}^{-1}$, 38,500 menit, dan 96,296 kJ/mol. Menurut penelitian Wulandari (2016), enzim protease hasil pemurnian mempunyai nilai k_i , $t_{1/2}$, dan ΔG_i berturut-turut sebesar $0,055 \text{ menit}^{-1}$, 12,6 menit, dan 98,115 kJ/mol. Adapun enzim protease tersebut setelah diamobilisasi dengan bentonit mempunyai nilai k_i , $t_{1/2}$, dan ΔG_i berturut-turut yaitu $0,03 \text{ menit}^{-1}$, 23,1 menit, dan 101,295 kJ/mol. Berdasarkan penurunan nilai k_i , peningkatan waktu paruh ($t_{1/2}$) dan nilai ΔG_i , diketahui bahwa amobilisasi menggunakan bentonit dapat meningkatkan stabilitas enzim.

I. Amobilisasi Enzim

Amobilisasi enzim adalah proses pengikatan enzim secara fisik pada suatu matriks tertentu yang tidak larut dalam air. Keuntungan teknik amobilisasi diantaranya: dapat meningkatkan stabilitas enzim, memudahkan pengendalian kondisi reaksi, enzim dapat digunakan berulang, dan kemurnian enzim maupun produk lebih tinggi. Namun, kekurangan teknik amobilisasi yaitu terjadinya penurunan aktivitas katalitik enzim dan terjadinya pergeseran pH atau suhu optimum dari enzim pada beberapa kasus (Sirisha *et al.*, 2016).

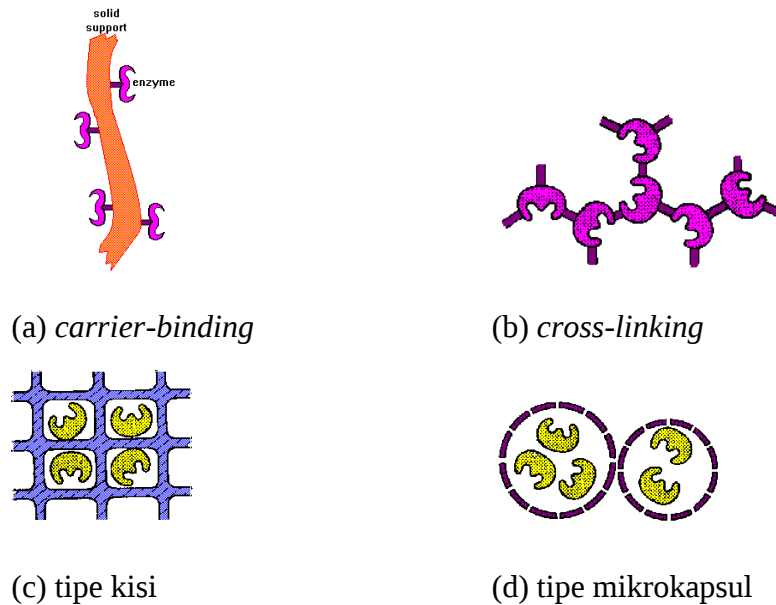
Amobilisasi dapat diklasifikasikan dalam tiga kategori, yaitu:

1. Metode pengikatan (*carrier-binding*) yang didasarkan pada pengikatan enzim dengan *carrier* atau matriks yang tidak larut dalam air. Aktivitas enzim amobil dipengaruhi oleh ukuran partikel dan luas permukaan matriks.

Pengikatan dapat dilakukan dengan cara:

- a. Adsorpsi fisik yaitu enzim diadsorpsi pada permukaan matriks melalui ikatan hidrofobik, ikatan hidrogen, dan gaya Van der Waals. Metode ini mudah dilakukan, ekonomis, tidak merusak konformasi enzim, dan penurunan aktivitas enzim cenderung rendah. Namun, kekuatan ikatan antara enzim dan matriks cukup lemah dan rentan terhadap perubahan pH. Jika pH atau kekuatan ion berubah, maka akan terjadi kebocoran matriks. Matriks yang dapat digunakan, contohnya: bentonit, silika gel, zeolit, kitosan, dan alumina. Enzim dan matriks dapat dipisahkan kembali melalui filtrasi maupun sentrifugasi (Suhartono, 1989). Menurut penelitian Sedaghat *et al.* (2009), amobilisasi enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis* (Aldrich) menggunakan Na-bentonit termodifikasi oleh CTMAB memiliki kestabilan yang tinggi.
- b. Ikatan kovalen antara gugus fungsi enzim yaitu α atau β -amino; α , β , atau γ -karboksil; sulfohidril; hidroksil; imidazol; dan fenolik dengan matriks yang mengandung gugus reaktif seperti diazonium; asam azida; isosianat; dan halida. Ikatan yang terbentuk cukup kuat dalam mencegah kebocoran matriks. Namun, jika konformasi berubah maka aktivitas enzim akan hilang. Matriks yang digunakan pun sulit diregenerasi.

- c. Ikatan ionik antara gugus karboksil enzim bermuatan negatif dengan gugus amina suatu matriks bermuatan positif pada matriks yang tidak larut dalam air. Kelebihan dan kekurangan cara ini sama dengan cara adsorpsi fisik.
2. Metode ikatan silang (*cross-linking*) antara molekul enzim dengan pereaksi bergugus fungsi ganda. Kedua gugus fungsi tersebut akan mengikat molekul enzim. Pereaksi yang biasa digunakan yaitu glutaraldehid. Untuk meningkatkan stabilitas enzim, metode ini umumnya dipadukan dengan metode adsorpsi. Berdasarkan penelitian Laila, dkk. (2007), enzim amilase yang diamobilisasi menggunakan matriks kitosan yang terikat oleh glutaraldehid, dapat digunakan berulang hingga tiga kali dengan penurunan aktivitas 50%.
 3. Metode penjebakan (*entrapment*) yaitu penggabungan enzim ke dalam kisi-kisi gel maupun polimer semipermeabel (mikrokapsul). Matriks gel yang dapat digunakan, antara lain: poliakrilamida, κ -karagenan, dan alginat. Polimer yang umum digunakan yaitu selulosa asetat dan amilum. Keunggulan metode ini yaitu tidak terjadinya perubahan konformasi dan inaktivasi enzim karena enzim tidak berikatan dengan matriks gel. Namun, kemampuan pembentukan kompleks enzim-substrat cukup rendah apalagi jika berat molekul terlalu besar karena terhalang kisi gel (Sirisha *et al.*, 2016). Berdasarkan penelitian Sankalia *et al.* (2006), enzim α -amilase dapat diamobilisasi menggunakan matriks κ -karagenan melalui metode *entrapment*. Posisi enzim dalam berbagai metode amobilisasi dapat dilihat pada Gambar 5.



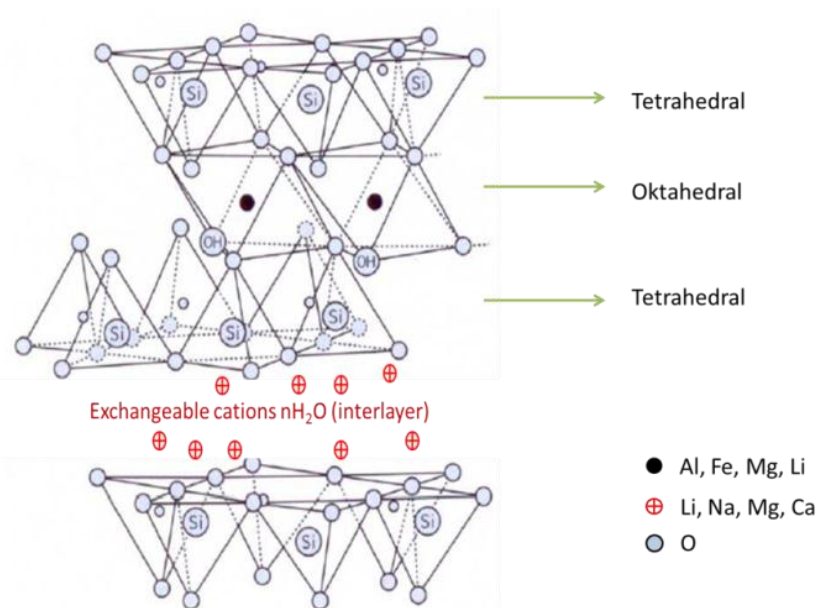
Gambar 5. Ilustrasi metode amobilisasi enzim.

J. Bentonit

Bentonit merupakan lempung atau tanah liat (*clay*) yang sebagian besar mengandung mineral montmorillonit. Montmorillonit adalah mineral yang tergolong ke dalam kelompok *smectit* yang terdiri dari silika, aluminium oksida, dan hidroksida yang mengikat air. Montmorillonit merupakan penyusun terbesar bentonit yaitu sebesar 85%. Rumus kimia bentonit adalah $(\text{Mg}, \text{Ca})_x\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot y\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ dengan nilai n sekitar 8 dan x, y adalah nilai perbandingan antara Al_2O_3 dan SiO_2 . Cadangan bentonit di Indonesia cukup berlimpah sebesar ± 380 juta ton merupakan aset potensial yang harus dimanfaatkan sebaik-baiknya (Wulan, 2012). Bentonit umum digunakan dalam industri sabun, zat pengisi aspal, farmasi, pengisi resin, dan semen.

Struktur bentonit terdiri dari dua lapisan tetrahedral dan satu lapisan oktahedral, dimana dua lapisan tetrahedral akan saling bergabung pada ujung kisi silikat

dengan hidroksil pada lapisan oktahedral, sehingga terbentuk tiga susunan lapisan tetrahedral-oktahedral-tetrahedral (TOT). Diantara lapisan oktahedral dan tetrahedral terdapat kation *monovalent* maupun *bivalent*, seperti Na^+ , Ca^{2+} , dan Mg^{2+} , disebut juga *interlayer exchangeable cations* (Ohtsuka, 1997). Kation-kation tersebut akan mengimbangi muatan negatif pada permukaan bentonit. Struktur bentonit dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Struktur bentonit (Ohtsuka, 1997).

Pemilihan bentonit sebagai bahan pendukung amobilisasi enzim didasarkan beberapa pertimbangan dasar, diantaranya: tidak larut dalam air, memiliki daya tukar ion yang besar, pH berkisar 4-7 (pH asam) sesuai pH optimum enzim α -amilase, mengandung kation bivalen (Ca^{2+}) yang dapat menstabilkan enzim, murah, tersedia cukup berlimpah di alam termasuk Indonesia, memiliki kestabilan mekanik dan termal, luas permukaan partikel yang besar sehingga dapat mengikat enzim dalam jumlah besar, tidak mengganggu reaksi enzimatik yang dikehendaki, rigid, stabil (*inert*), dan non-toksik (Sedaghat *et al.*, 2009).

Amobilisasi enzim menggunakan bentonit dilakukan melalui metode *carrier-binding* secara adsorpsi fisik, dimana melibatkan pertukaran kation pada lapisan *interlayer* bentonit dengan RNH_3^+ yang berasal dari enzim. Selain itu, terdapat juga gaya Van der Waals sehingga interaksi yang terjadi antara bentonit dan enzim menghasilkan ikatan yang lemah dan enzim mudah terlepas kembali (Rosmanansari, dkk., 2013). pH optimum enzim yang terikat pada matriks bentonit pada umumnya akan mengalami pergeseran ke arah asam dikarenakan bentonit mengandung banyak kation (polikationik) yang akan mengubah pH lingkungan enzim pada permukaan matriks (Wulandari, 2016).

III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari 2017 – Mei 2017, bertempat di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Analisis spektrofotometri UV-Vis dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer UV-Vis (Cary 100), neraca analitik (Ainsworth AA-160 Denver Instrument Company), inkubator (Precistern P Selecta), *autoclave* (S-90-N Electric Steroclave), *sentrifuse* (Sentrifus Fisher 225), tabung sentrifus, mikropipet (100 μ L - 1000 μ L), *Laminar Air Flow* (9005-FL Crumair), *waterbath* (Mettler W 350), *shaker incubator* (Environ Shaker-Lab Line), *magnetic stirrer*, oven, jarum ose, bunsen, kompor, *freezer*, spatula, termometer, batang pengaduk, pipet tetes, tabung reaksi, rak tabung reaksi, erlenmeyer (50 mL - 2000 mL), *beaker glass* (100 mL - 1000 mL), gelas ukur (5 mL - 1000 mL), labu ukur (5 mL - 500 mL), corong gelas, statif, dan kolom kromatografi.

Mikroorganisme yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dari Laboratorium Mikrobiologi dan Teknologi Fermentasi ITB.

Bahan-bahan yang digunakan adalah bentonit (Sigma-Aldrich), kapas lemak, kasa, *Nutrient Agar* (2 g/100 mL), pati (amilum), *yeast extract*, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, akuades, buffer fosfat (NaH_2PO_4 dan Na_2HPO_4), pereaksi iodin (KI/I_2), HCl pekat, NaOH, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Na/K tartarat, *folin ciocelteau*, larutan Bovine Serum Albumin (BSA), larutan glukosa, *Carboxymethyl Cellulase* (CMC), DNS (*dinitrosalicylic acid*), fenol, Na_2SO_3 , Na_2CO_3 , kantong selofan, alkohol 70%, aluminium foil, kertas, tisu, karet gelang, kertas pH universal, es, dan kertas saring.

C. Prosedur Penelitian

1. Pembiakan *B. subtilis* ITBCCB148 dan produksi enzim α -amilase

Dibuat media agar miring: 1 g NA dan 0,5 g pati dilarutkan dalam 50 mL akuades (Sarah, dkk., 2010). Pembiakan dilakukan secara aseptis dalam *Laminar Air Flow* (LAF). Setelah agar mengeras dan bebas kontaminan, diambil satu tarikan ose biakan murni *B. subtilis* ITBCCB148 lalu digoreskan secara *zig-zag* ke permukaan media agar miring (Hadioetomo, 1993). Biakan baru *B. subtilis* ITBCCB148 kemudian ditumbuhkan dalam inkubator ± 3 hari.

Dibuat 3000 mL buffer fosfat 0,2 M pH 6,5 dengan komposisi, yaitu:

- Larutan Stok A: 60 g NaH_2PO_4 ($M_r = 120$ g/mol) dilarutkan dalam 2500 mL akuades hingga homogen.

- Larutan Stok B: 14,2 g Na_2HPO_4 ($M_r = 142 \text{ g/mol}$) dilarutkan dalam 500 mL akuades hingga homogen (Feraliana, 2011).

Selanjutnya, dicampurkan stok A dan stok B berturut-turut 2500 mL dan 500 mL.

Media inokulum dan media fermentasi yang terdiri dari 0,5% pati; 0,5% *yeast extract*; 0,05% KH_2PO_4 ; 0,02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; dan 0,01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam buffer fosfat 0,2 M (pH 6,5) sambil dipanaskan. Media inokulum dibuat dalam 100 mL, sedangkan media fermentasi dalam 3000 mL. Setelah itu, media disterilisasi dalam *autoclave* selama 15 menit, lalu didiamkan dalam kondisi aseptis ± 12 jam. Selanjutnya, dipindahkan 3 tarikan ose biakan dari media agar miring ke dalam media inokulum secara aseptis. Inokulum diinkubasi sambil dikocok dalam *shaker incubator* selama 24 jam. Setelah itu, dipindahkan ke media fermentasi sebanyak 2% dari volume media fermentasi. Kemudian, dikocok dalam *shaker incubator* selama 72 jam (Yandri *et al.*, 2010).

2. Isolasi enzim α -amilase dari *B. subtilis* ITBCCB148

Inokulum hasil fermentasi disentrifugasi dingin selama 20 menit dengan kecepatan 5000 rpm (Yandri *et al.*, 2010). Filtrat yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim α -amilase, selanjutnya diuji aktivitasnya dengan metode Fuwa dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.

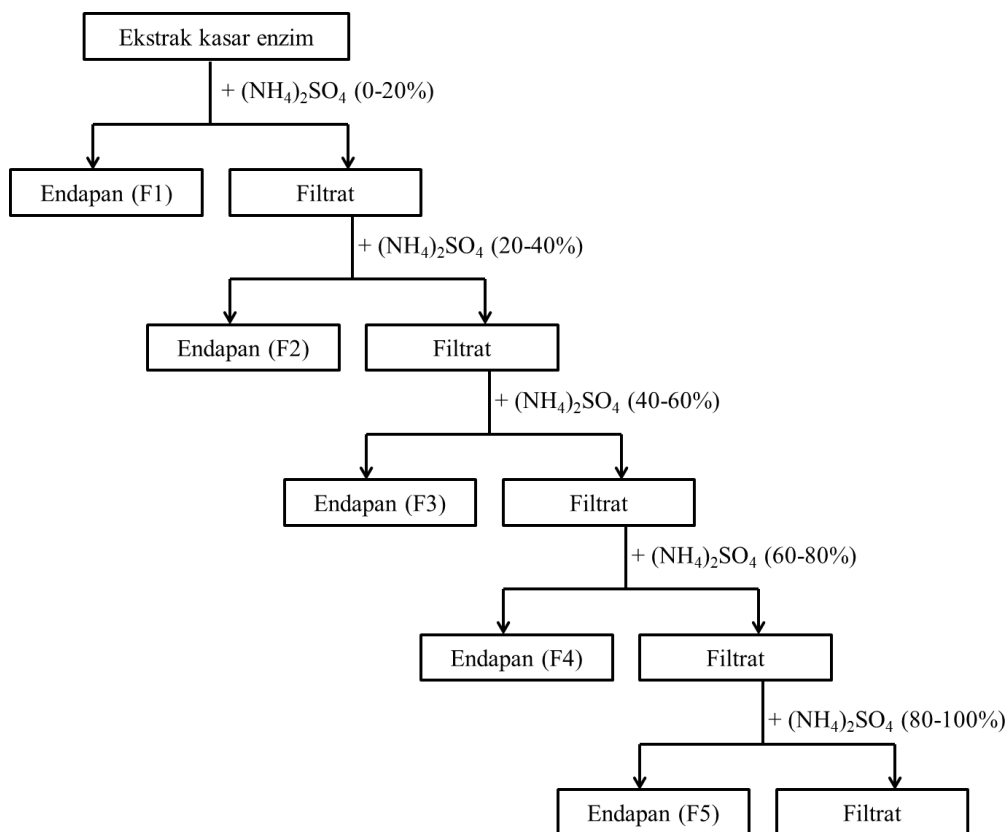
3. Pemurnian enzim α -amilase dari *B. subtilis* ITBCCB148 (Feraliana, 2011)

a. Fraksinasi dengan amonium sulfat

Ekstrak kasar enzim yang telah diperoleh selanjutnya diendapkan dari larutannya dengan amonium sulfat $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ pada berbagai derajat

kejenuhan yaitu (0-20)%; (20-40)%; (40-60)%; (60-80)%; dan (80-100)%.

Skema fraksinasi dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Skema fraksinasi bertingkat dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Ferialiana, 2011).

Endapan protein enzim yang didapatkan pada tiap fraksi kejenuhan amonium sulfat, dipisahkan dari filtratnya melalui sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Endapan yang diperoleh dilarutkan dengan buffer fosfat 0,1 M pH 6,5 dan diuji aktivitasnya dengan metode Fuwa dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.

b. Dialisis

Enzim hasil fraksinasi dengan aktivitas tertinggi kemudian dimurnikan melalui dialisis pada membran semipermeabel (kantong selofan). Endapan

tersebut dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis menggunakan buffer fosfat 0,01 M pH 6,5 selama 24 jam pada suhu dingin. Selama dialisis, dilakukan pergantian buffer selama 4 jam agar konsentrasi ion-ion di dalam kantong dialisis dapat dikurangi (Ferialiana, 2011). Selanjutnya dilakukan uji aktivitas dengan metode Fuwa dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.

c. Kromatografi penukar kation

- Pengembangan dan pencucian CMC

CMC direndam dalam akuades dan dibiarkan mengembang pada suhu kamar. Partikel halus dipisahkan dengan cara dekantasi. Setelah itu, ditambahkan larutan NaOH 0,5 M sebanyak dua kali volume bubuk CMC sambil sesekali diaduk perlahan, kemudian diendapkan selama 30 menit. Bubur CMC selanjutnya didekantasi dan dilakukan pencucian dengan akuades sampai air cucian menunjukkan pH 8. Kemudian, ditambahkan larutan HCl 0,5 M sebanyak dua kali volume bubuk CMC sambil sesekali diaduk perlahan, kemudian diendapkan selama 30 menit. Bubur CMC selanjutnya didekantasi dan dilakukan pencucian dengan akuades sampai air cucian menunjukkan pH netral.

- Penentuan pH buffer pengikatan dan pelepasan enzim-matriks

Sebanyak 4 mL bubuk CMC yang sudah mengembang, dimasukkan ke dalam tabung sentrifus dalam keadaan yang tidak terlalu kental. Bubur CMC dipisahkan dari larutannya melalui sentrifugasi selama 10 menit. Setelah itu, bubuk CMC distabilkan menggunakan buffer fosfat 0,05 M

dengan variasi pH yaitu 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0. Kemudian, ke dalam matriks ditambahkan 1 mL enzim dialisis dan 1 mL buffer fosfat 0,05 M sesuai variasi pH masing-masing. Campuran tersebut diaduk lalu dibiarkan hingga CMC mengendap. Supernatan dipisahkan melalui sentrifugasi 10 menit lalu ditentukan aktivitasnya dengan metode Fuwa.

CMC yang baru digunakan langsung dicuci dengan 2 mL campuran buffer fosfat pH 7 dan larutan NaCl 1 M (1:1). Campuran tersebut diaduk lalu dibiarkan hingga CMC mengendap. Supernatan dipisahkan melalui sentrifugasi 10 menit lalu ditentukan aktivitas unitnya. pH buffer yang dapat memberi aktivitas enzim terendah saat pengikatan enzim-matriks sekaligus memberi aktivitas yang tinggi saat pelepasan enzim-matriks ditetapkan sebagai pH buffer pengikatan-pelepasan enzim-matriks.

- Penyiapan kolom gel

Kolom berukuran 1,5 x 50 cm dibubuhi kapas pada ujung bawah. Kolom dipasang tegak lurus. Bubur gel yang telah mengembang selanjutnya dimasukkan ke dalam kolom dengan kondisi tidak terlalu kental.

- Penstabilan gel

Gel dalam kolom distabilkan dengan mengalirkan buffer fosfat pH pengikatan enzim sampai kondisi pH pengikatan tercapai. Pengatur dibuka hingga kecepatan tetesan 1-2 mL/menit.

- Penempatan cuplikan enzim ke dalam kolom

Enzim hasil dialisis dimasukkan ke dalam kolom kromatografi yang

telah berisi CMC yang telah distabilkan. Enzim diikat dengan buffer awal dan eluat ditampung sebanyak masing-masing 20 mL untuk fraksi 1-25. Selanjutnya, dielusi dengan buffer elusi. Eluat ditampung sebanyak masing-masing 20 mL untuk fraksi 26-50. Fraksi pertama dimulai pada saat cuplikan enzim dimasukkan. Seluruh fraksi ditentukan pola protein pada λ 280 nm lalu diuji aktivitas enzimnya menggunakan metode Fuwa dan ditentukan kadar proteinnya dengan metode Lowry.

4. Uji Aktivitas Unit (AU) enzim α -amilase metode Fuwa

a. Pembuatan pereaksi:

- Pereaksi iodin

Dimasukkan 1 g KI dalam labu ukur 50 mL dan dilarutkan dalam 5 mL akuades. Lalu ditambahkan 0,1 g I₂. Kemudian ditambahkan akuades hingga batas meniskus.

- Larutan pati 0,1%

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

- Larutan HCl 1 N

Dilakukan pengenceran HCl pekat 12 N menjadi 1 N. Artinya, sebanyak 4,17 mL HCl pekat dilarutkan dalam akuades hingga batas meniskus pada labu ukur 50 mL.

b. Uji Aktivitas Unit (AU)

Sebanyak 0,25 mL enzim ditambahkan 0,25 mL larutan pati 0,1%, lalu diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit. Untuk kontrol, pati ditambahkan setelah enzim diinaktivasi dengan HCl 1N. Setelah diinkubasi,

reaksi enzim dan substrat pati dihentikan dengan penambahan 0,25 mL HCl 1 N, selanjutnya ditambahkan 0,25 mL pereaksi iodin dan 4 mL akuades. Kemudian, campuran diaduk rata dan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ 600 nm (Fuwa, 1954). Aktivitas Unit (AU) dihitung melalui rumus:

$$\text{Aktivitas Unit (AU)} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{kontrol}}} \times \frac{1}{V_{\text{enzim}}} \times \frac{1}{t_{\text{inkubasi}}} \times \frac{1000 \times \text{FP}}{Mr_{\text{produk}}}$$

(FP = faktor pengenceran; V = volume enzim = 0,25 mL; T = waktu inkubasi = 10 menit; Mr produk = massa relatif molekul glukosa = 180 g/mol).

5. Uji Aktivitas Unit (AU) enzim α -amilase metode Mandels

a. Pembuatan pereaksi (Mandels *et al.*, 2009)

Ke dalam labu ukur 100 mL, dimasukkan 1 g DNS (*Dinitrosalisilic Acid*), selanjutnya ditambahkan 1 g NaOH lalu dikocok hingga larut, kemudian ditambahkan 1 mL larutan Na(K)-tartarat 40%, 0,2 g fenol dan 0,05 g Na₂SO₃ kemudian dilarutkan dengan 100 mL aquades hingga tanda batas.

b. Uji aktivitas (Mandels *et al.*, 2009)

Sebanyak 0,25 mL enzim ditambahkan 0,25 mL larutan pati 0,1%. Setelah itu, diinkubasi selama 30 menit pada suhu 60°C. Untuk kontrol, pati ditambahkan setelah inkubasi. Kemudian, ditambahkan 1 mL pereaksi DNS dan dididihkan selama 10 menit pada penangas air. Selanjutnya dibiarkan hingga suhu ruang dan ditambahkan 1,5 mL akuades. Setelah itu, serapannya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ 510 nm.

Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan dengan menggunakan kurva standar glukosa. Aktivitas Unit (AU) dihitung melalui rumus:

$$\text{Aktivitas Unit (AU)} = \frac{(A_{\text{sampel}} - A_{\text{kontrol}}) - b}{a} \times \frac{1}{V_{\text{enzim}}} \times \frac{1}{t_{\text{inkubasi}}} \times \frac{1000 \times \text{FP}}{M_{\text{r produk}}}$$

(FP = faktor pengenceran; V = volume enzim = 0,25 mL; T = waktu inkubasi = 30 menit; Mr produk = massa relatif molekul glukosa = 180 g/mol; b dan a = *intercept* dan *slope* kurva standar glukosa).

6. Penentuan kadar protein metode Lowry

a. Pembuatan pereaksi:

- Pereaksi A : 2 g Na₂CO₃ dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 N.
- Pereaksi B : 5 mL larutan CuSO₄·5H₂O 1% ditambahkan ke dalam 5 mL larutan Na/K tartarat 1%.
- Pereaksi C : 2 mL pereaksi B + 100 mL pereaksi A.
- Pereaksi D : reagen *folin ciocelteau* dengan akuades (1:1).
- Larutan standar : larutan Bovine Serum Albumin (BSA) dengan kadar 20, 40, 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm.

b. Penentuan kadar protein

Sebanyak 0,1 mL enzim dilarutkan dalam 0,9 mL akuades, lalu direaksikan dengan 5 mL pereaksi C. Campuran diaduk rata, kemudian dibiarkan selama 10 menit pada suhu kamar. Setelah itu, ditambahkan dengan cepat 0,5 mL pereaksi D, lalu diaduk sempurna. Larutan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Untuk kontrol, 0,1 mL enzim diganti oleh 0,1 mL akuades, selanjutnya perlakuannya sama seperti sampel. Kemudian

absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ 750 nm (Feraliana, 2011; Lowry *et al.*, 1951). Kadar protein (x) ditentukan dengan kurva standar larutan BSA yang diukur pada λ 280 nm berdasarkan persamaan regresi linier.

7. Amobilisasi enzim α -amilase menggunakan bentonit

Amobilisasi enzim dilakukan melalui metode adsorpsi fisik, dengan prosedur sebagai berikut:

- Penentuan pH buffer pengikatan dan pelepasan enzim-matriks

Sebanyak 0,25 g serbuk bentonit dimasukkan ke dalam tabung sentrifus lalu distabilkan menggunakan buffer fosfat 0,1 M dengan variasi pH yaitu 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; dan 7,5. Kemudian matriks dipisahkan dari larutannya melalui sentrifugasi lalu ditambahkan 0,5 mL enzim hasil dialisis dan 2 mL buffer fosfat 0,1 M sesuai variasi pH masing-masing. Campuran tersebut diaduk lalu dipisahkan melalui sentrifugasi. Enzim kemudian dielusi dari matriks menggunakan 2 mL campuran buffer fosfat elusi pH 8,5 dan NaCl 1 M (1:1), lalu disentrifugasi. Supernatan yang diperoleh ditentukan aktivitasnya dengan metode Fuwa. pH buffer yang dapat memberi aktivitas enzim terendah saat pengikatan enzim-matriks sekaligus memberi aktivitas yang tinggi saat pelepasan enzim-matriks ditetapkan sebagai pH buffer pengikatan dan pelepasan enzim-matriks.

- Amobilisasi enzim

Enzim yang telah terikat dalam matriks bentonit pada pH optimum pengikatan, kemudian ditambahkan substrat pati dan diinkubasi pada suhu 60°C selama 30

menit. Setelah itu, enzim amobil dipisahkan dari matriksnya melalui sentrifugasi selama 45 menit dan diuji aktivitasnya menggunakan metode Mandels.

8. Karakterisasi enzim α -amilase murni dan amobil

a. Penentuan suhu optimum

Untuk mengetahui suhu optimum kerja enzim murni dan amobil dilakukan dengan memvariasikan suhu inkubasi yaitu 55; 60; 65; 70; 75; 80; dan 85°C selama 30 menit. Selanjutnya, diuji dan dibandingkan aktivitas sisa (%) enzim murni dan amobil menggunakan metode Mandels.

b. Pemakaian berulang enzim amobil

Enzim amobil yang telah dipakai (direaksikan dengan substrat) dicuci dengan buffer fosfat 0,1 M pH pengikatan optimum lalu disentrifugasi. Kemudian endapan enzim amobil direaksikan dengan substrat yang baru. Selanjutnya, diuji dan dibandingkan aktivitas sisa (%) enzim amobil sebelum dan sesudah pemakaian berulang menggunakan metode Mandels.

c. Penentuan K_M dan V_{maks}

Konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) enzim murni dan amobil ditentukan dengan memvariasikan konsentrasi substrat 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1% pada suhu 60°C selama 30 menit. Selanjutnya, diukur aktivitas sisa (%) enzim dengan metode Mandels. Data hubungan antara laju reaksi enzim terhadap konsentrasi substrat diplotkan ke dalam kurva Lineweaver-Burk.

d. Uji stabilitas termal enzim

Penentuan stabilitas termal enzim dilakukan dengan mengukur aktivitas sisa (%) enzim setelah diinkubasi dengan variasi waktu inkubasi 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, dan 100 menit pada suhu 60°C.

$$\text{Aktivitas sisa} = \frac{\text{Aktivitas unit enzim pada } t_i}{\text{Aktivitas unit enzim pada } t_0} \times 100\%$$

(Yandri *et al.*, 2010).

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

Penentuan nilai konstanta laju inaktivasi termal (k_i) dan $t_{1/2}$ didasarkan pada persamaan laju reaksi inaktivasi (k_i) orde satu antara aktivitas sisa enzim pada t_0 ($[E]_0$) dan aktivitas sisa enzim pada t_i ($[E]_i$), yaitu:

$$\ln \frac{[E]_i}{[E]_0} = -k_i \cdot t_{1/2}$$

Adapun penentuan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim murni dan enzim amobil, diturunkan dari persamaan termodinamika:

$$\Delta G_i = -RT \ln \frac{k_i \cdot h}{k_B \cdot T}$$

Keterangan:

R = konstanta gas ideal (8,315 JK⁻¹ mol⁻¹)

T = suhu absolut (K)

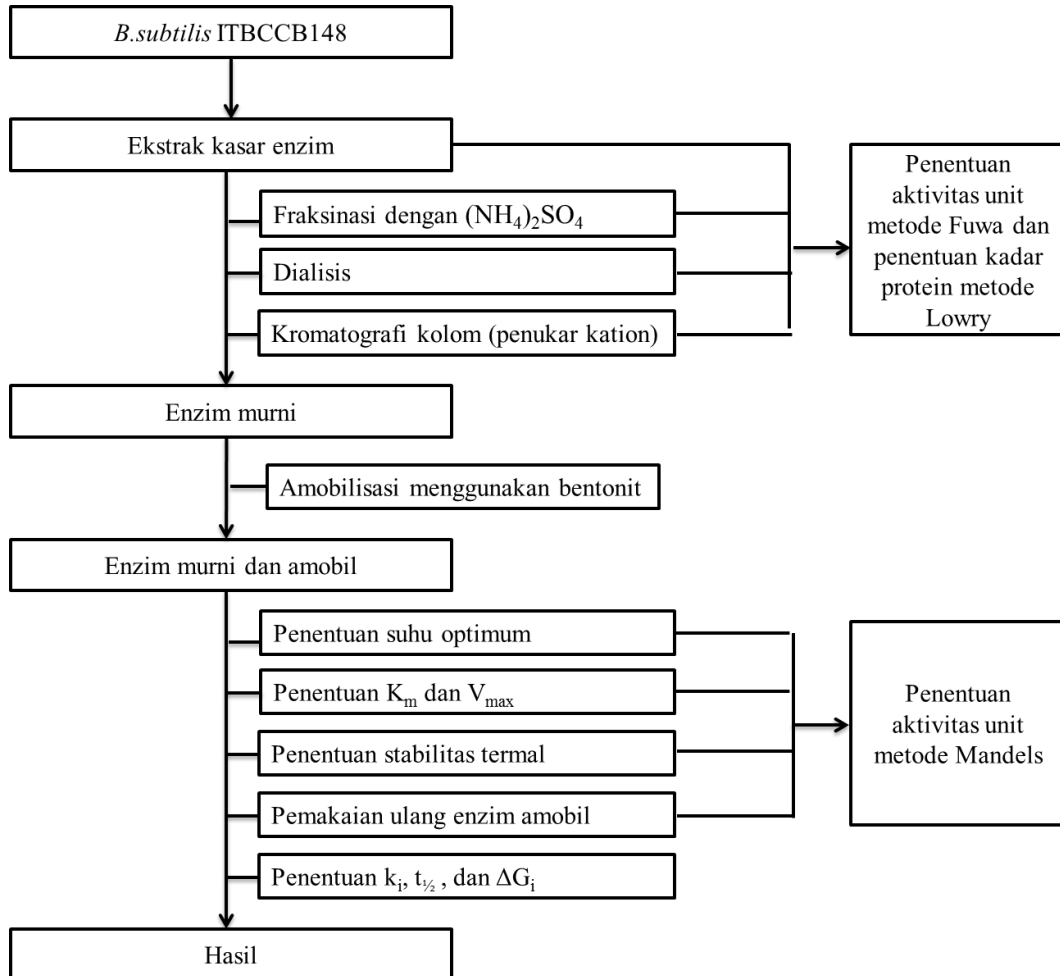
k_i = konstanta laju inaktivasi termal

h = konstanta Planck (6,625 × 10⁻³⁴ J.det)

k_B = konstanta Boltzman (1,381 × 10⁻²³ JK⁻¹)

(Yandri *et al.*, 2010).

Skema singkat mengenai prosedur penelitian yang dilakukan dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Skema prosedur penelitian.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Aktivitas spesifik enzim α -amilase hasil pemurnian hingga tahap kromatografi kolom menggunakan CMC adalah $10387,11 \text{ U mg}^{-1}$ dan kemurniannya meningkat hingga 12 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim dengan perolehan 6,41%.
2. Enzim α -amilase hasil pemurnian memiliki suhu optimum 60°C , $K_M = 6,18 \text{ mg mL}^{-1}$ substrat, $V_{\text{maks}} = 909,09 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$, dan aktivitas sisa pada uji stabilitas dalam suhu 60°C selama 100 menit sebesar 12%.
3. Enzim α -amilase hasil amobilisasi memiliki suhu optimum menjadi 75°C , $K_M = 12,19 \text{ mg mL}^{-1}$ substrat, $V_{\text{maks}} = 88,50 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$, dan aktivitas sisa pada uji stabilitas dalam suhu 60°C selama 100 menit sebesar 43%.
4. Enzim amobil dapat digunakan berulang hingga lima kali pengulangan.
5. Uji stabilitas enzim hasil pemurnian pada suhu 60°C memiliki nilai $t_{1/2} = 42,00$ menit, $k_i = 0,0165 \text{ menit}^{-1}$, dan $\Delta G_i = 104,57 \text{ kJ mol}^{-1}$.
6. Uji stabilitas enzim hasil amobilisasi pada suhu 60°C memiliki nilai $t_{1/2} = 88,85$ menit, $k_i = 0,0078 \text{ menit}^{-1}$, dan ΔG_i yaitu $106,65 \text{ kJ mol}^{-1}$.

B. Saran

Dari hasil penelitian yang diperoleh, maka disarankan untuk melakukan tahap pemurnian enzim α -amilase selanjutnya melalui kromatografi penukar anion menggunakan matriks DEAE-selulosa sehingga didapatkan enzim murni dengan aktivitas unit yang lebih tinggi serta penelitian lebih lanjut mengenai penggunaan matriks bentonit teraktivasi oleh panas, asam, maupun basa.

DAFTAR PUSTAKA

- Bal, E., O. Pinar, D. Kazan, Hasan, and A. Sayar. 2016. Immobilization of α -amylase from *Bacillus subtilis* SDP1 isolated from the Rhizosphere of *Acacia cyanophylla* Lindey. *Electronic J. Biol.* **12** (2): 115-121.
- Boyer, R. F. 2012. *Biochemistry Laboratory: Modern Theory and Techniques Second Edition*. Pearson Education, Inc. USA.
- Choubane, S., O. Khelil, and B. A. Cheba. 2014. *Bacillus sp.* R2 and *Bacillus cereus* immobilized amylase for glucose syrup production. *J. Procedia Tech.* **19** (1): 972-979.
- Chrisnasari, R., R. K. Widi, B. A. Halim, dan M. G. M. Purwanto. 2014. Imobilisasi Enzim Lipase pada Ca-Bentonit serta Aplikasinya pada Produksi Asam Lemak Omega-3 dari Limbah Minyak Ikan. *Prosiding. Program Studi Biologi Fakultas Teknobiologi Universitas Surabaya*. Surabaya.
- Dali, S., R. Arfah, A. Karim, dan A. R. Patong. 2013. Karakterisasi Enzim Amilase dari Isolat Bakteri Termofilik *Bacillus subtilis*. *Prosiding. Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin*. Makassar.
- Faatih, M. 2009. Isolasi dan digesti DNA kromosom. *J. Saintek.* **10** (1): 61-67.
- Fessenden, R.J. dan J.S. Fessenden. 1986. *Kimia Organik Edisi Ketiga Jilid 2, Alih Bahasa: Aloysius Hadyana Pudjaatmaka, Ph.D.* Erlangga. Jakarta.
- Feraliana, 2011. Amobilisasi Enzim α -Amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dengan menggunakan Karboksi Metil Sephadex C-50 (CM-Sephadex C-50). *Skripsi. Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Lampung*. Bandar Lampung.
- Fuwa, H. 1954. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylase as the substrate. *J. Biochem.* **41** (5): 583-603.
- Hadioetomo, R. S. 1993. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Gramedia. Jakarta.

- Harvey, D. 2000. *Modern Analytical Chemistry*. The McGraw-Hill Companies, Inc. USA.
- Jawetz, M. dan Adelberg. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran edisi 23 Alih Bahasa: Huriwati Hartanto dkk.* Buku Kedokteran ECG. Jakarta.
- Kuriki, T. and T. Imanaka. 1999. The concept of the α -amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism. *J. Biosci. Bioeng.* **87** (5): 557-565.
- Kusumadjaja, A. P. dan R. P. Dewi. 2005. Penentuan kondisi optimum enzim papain dari pepaya burung varietas Jawa (*Carica papaya*). *J. Chem.* **5** (2): 147-151.
- Laila, A., A. Fetra, J. Hendri, dan I. G. Suka. 2007. Peningkatan stabilitas enzim amilase melalui amobilisasi pada polimer kitosan. *J. Sains MIPA.* **13** (2): 119-126.
- Lehninger, A. L. 1982. *Dasar-Dasar Biokimia*. Erlangga. Jakarta.
- Li, S., X. Yang, S. Yang, M. Zhu, and X. Wang. 2012. Technology prospecting on enzymes: application, marketing, and engineering. *Comp. Struct. Biotech. J.* **2** (3): 1-11.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** (1): 265-275.
- Maier, R., I. Pepper, and C. P. Gerba. 2000. *Environmental Microbiology*. Academic Press. London.
- Mandels, M., D. E. Eveleigh, R. Andreotti, and C. Roche. 2009. Measurement of saccharifying cellulose. *J. Biotech. Biofuel.* **2** (21): 1-8.
- Nisa, K., Wuryanti, dan Taslimah. 2013. Isolasi, karakterisasi dan amobilisasi α -amilase dari *Aspergillus niger* FNCC 6018. *J. Chem. Info.* **1** (1): 141-149.
- Nopiani. 2015. Peningkatan Kestabilan Enzim Lipase dari *Pseudomonas aeruginosa* 27853 dengan Amobilisasi Menggunakan Bentonit. *Tesis. Program Pascasarjana Magister Kimia Fakultas MIPA Universitas Lampung.* Bandar Lampung.
- Ohtsuka, K. 1997. Preparation and properties of two-dimensional microporous pillared interlayered solids. *J. Chem. Mater.* **9** (1): 2039-2050.

- Oyeleke, S. B., O. A. Oyewole, and E. C. Egwim. 2011. Production of protease and amylase from *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger* using *Parkia biglobosa* (Africa locust beans) as substrate in solid state fermentation. *J. Adv. Life Sci.* **1** (2): 49-53.
- Poedjiadi, A. 2010. *Dasar-Dasar Biokimia Edisi Revisi*. UI Press. Jakarta.
- Rajagopalan, G. and C. Krishnan. 2008. Alpha-amylase production from catabolite depressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. *J. Bior. Tech.* **99** (8): 3044-3050.
- Rosmanansari, N. S. D., A. Roosdiana, dan Sutrisno. 2013. Optimasi amobilisasi pektinase dari *Bacillus subtilis* menggunakan bentonit. *J. Kim. Student.* **1** (2): 243-249.
- Sankalia, M. G., R. C. Mashru, J. M. Sankalia, and V. B. Sutariya. 2006. Stability improvement of alpha-amylase entrapped in kappa-carrageenan beads: Physicochemical characterization and optimization using composite index. *Int. J. Pharm.* **312** (1): 1-14.
- Santos, A. S., N. Rosa, M. Souza, H. K., Philippsen, and E. Medeiros. 2015. Thermal-stability of enzyme activity and its application in the hydrolysis of starchy residue from *Mandioca* processing. *Int. J. Sci. Res.* **4** (10): 2277-8179.
- Sarah, S. R. Putra, dan H. S. Putro. 2010. Isolasi α -amilase termostabil dari bakteri termofilik *Bacillus stearothermophilus*. *Prosiding. Jurusan Kimia Fakultas MIPA Institut Teknologi Sepuluh Nopember*. Surabaya.
- Scopes, R. K. 1987. *Protein Purification: Principles and Practice*. Springer Verlag. New York.
- Sedaghat, M. E., H. Aghaei, and S. Soleimanian-Zad. 2009. Enzyme immobilization. Part 3: Immobilization of α -amylase on Na-bentonite and modified bentonite. *J. Clay.* **46** (1): 125-130.
- Singh, S. 2014. A comparative study on immobilization of alpha amylase enzyme on different matrices. *Int. J. Plant Anim. Env. Sci.* **4** (3): 193-198.
- Sirisha, V. L., A. Jain, and A. Jain. 2016. *Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes*. Elsevier Inc. India.
- Suhartono, M. T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Sutrisno, M. dan C. Mahdi. 2014. Optimasi amobilisasi xilanase dari *Trichoderma viride* menggunakan matriks bentonit. *J. Kim. Student.* **2** (1): 435-440.

- Talebi, M., S. Vaezifar, F. Jafary, M. Fazilati, and S. Motamedi. 2016. Stability improvement of immobilized α -amylase using nano pore zeolite. *Iran J. Biotech.* **14** (1): 1261-1267.
- Talekar, S., A. Ghodake, N. Kate, C. Kumar, and S. Gadagkar. 2010. Preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates of *Saccharomyces cerevisiae* invertase, *Aust. J. Basic Appl. Sci.* **4** (10): 4760-4765.
- Thieman, W.J. and M. A. Palladino. 2009. *Introduction to Biotechnology, Second Edition*. Pearson Education, Inc. New York.
- Uitdehaag, J., R. Mosi, K. Kalk, B. Van der Veen, L. Dijkhuizen, S. Withers, and B. W. Dijkstra. 1999. X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the α -amylase family. *J. Nat. Struct. Biol.* **6** (5): 432–436.
- Wirahadikusumah, M. 1977. *Biokimia: Protein, Enzim, dan Asam Nukleat*. ITB. Bandung.
- Wulan, R. 2012. Modifikasi Bentonit Terpillar Al Menggunakan Poli(Dialildimetilamonium) dan Polistiren Sulfonat sebagai Adsorben Ion Co(II) Dalam Limbah Cair. *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Indonesia. Depok.
- Wulandari, A. F. 2016. Amobilisasi Enzim Protease dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 Menggunakan Bentonit. *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Yandri, A. S. dan P. Wulandari. 2009. Pengaruh penambahan sorbitol terhadap stabilitas termal enzim α -amilase dari *Rhizopus oryzae*. *J. Sains MIPA*. **15** (2): 111-118.
- Yandri, A.S., T. Suhartati, and S. Hadi. 2010. Purification and characterization of extracellular α -amilase enzyme from locale bacteria isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148. *Eur. J. Sci. Res.* **39** (1): 64-74.