

# Purifikasi Menggunakan Prep Cell dan Karakterisasi $\alpha$ -amilase dari Isolat *Bacillus* sp. MII-10

Nur Richana<sup>1</sup>, M.D. Ahmadi<sup>2</sup>, R. Masrina<sup>2</sup>, D.S. Damardjati<sup>1</sup>, dan U. Murdiyatmo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor

<sup>2</sup>Alumni Institut Pertanian Bogor

<sup>3</sup>Pusat Penelitian dan Pengembangan Gula Indonesia, Pasuruan

## ABSTRAK

Purifikasi enzim  $\alpha$ -amilase dari isolat *Bacillus* sp. MII-10 telah dilakukan dengan menggunakan alat preparative electrophoresis Prep Cell 491 BioRad. Karakterisasi enzim meliputi kondisi katalitik (pH dan suhu) optimum, kestabilan, kinetik, bobot molekul, inhibisi dan aktivitasnya terhadap beberapa senyawa kimia, serta kemampuan menghidrolisis pati ubi kayu. Hasil pemurnian ternyata mencapai peningkatan kemurnian enzim sebesar 4,6 kali dan perolehan kembali sebesar 11,2%. Aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase dari isolat *Bacillus* sp. MII-10 memerlukan pH optimum 7,0 dan suhu optimum 50-60°C. Enzim  $\alpha$ -amilase tersebut stabil pada pH 7,0 selama 24 jam pada suhu 4°C dan pada suhu 70°C selama 5 menit. Sifat kinetika enzim yang ditunjukkan oleh nilai  $K_m$  adalah 0,169% terhadap substrat *soluble starch* setara dengan 1,69 mg/ml. Enzim tersebut memiliki afinitas cukup baik terhadap substrat dan mampu mencapai kecepatan katalitik maksimum pada konsentrasi substrat yang rendah (1,5% berat/volume). Inhibisi enzim  $\alpha$ -amilase yang terjadi disebabkan oleh  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2 mM) 82,5%,  $\text{AgNO}_3$  (2 mM) 22%, EDTA (0,5 mM) 78%, sedangkan glukosa (2 mM) 98% dan malto-sa 94%. Berdasarkan pendugaan bobot molekul dengan elektroforesis menggunakan gel poli-akrilamid, amilase dari *Bacillus* sp. MII-10 merupakan enzim yang aktif dalam persenyawaan dari empat subunit rantai protein, yang masing-masing berukuran sama (tetramer). Bobot molekul monomernya adalah 424,6 Dalton dan 168.413,8 Dalton untuk bobot molekul dalam persenyawaan tetramer. Hasil analisis jenis gula menunjukkan bahwa enzim amilase tersebut adalah  $\alpha$ -amilase, karena menghasilkan glukosa, maltosa, campuran oligosakarida, dan dekstrin, sama dengan  $\alpha$ -amilase perbandingan. Variasi waktu reaksi dari 0 sampai 24 jam menunjukkan produk yang tetap beragam, sehingga dapat disimpulkan pola hidrolisis oleh enzim adalah endo  $\alpha$ -amilase. Amilase kasar dari isolat *Bacillus* sp. MII-10 menghasilkan nilai dekstroza ekuivalen (DE) 9,96.

**Kata kunci:** Purifikasi,  $\alpha$ -amilase, *Bacillus* sp. MII-10

## ABSTRACT

Purification  $\alpha$ -amylase of *Bacillus* sp. MII-10 was carried out using preparative electrophoresis apparatus Prep Cell 491 BioRad. Characterization of this enzyme covered optimum (pH and temperature) catalytic, stability, and kinetic condition, molecular weight, inhibition, activity to some chemical compound and capability to hydrolyse of cassava starch. Purification increase pure enzyme (4.6 times) and enzyme recovery (11.2%). Activity of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. MII-10 required optimum pH 7.0 and temperature 50-60°C. Enzyme  $\alpha$ -amylase stable along 24 hour at pH 7.0 and 4°C and 5 minutes at 70°C. Enzyme kinetics showed by value of  $K_m$  (0.169%) to soluble starch substrate equivalent 1.69 mg/ml. This enzyme has moderate affinity reaction to substrate and achieved maximum catalytic velocity in low substrate concentration (1.5% weight/volume). Inhibition of  $\alpha$ -amylase enzyme

occured due to Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 mM) 82.5%, AgNO<sub>3</sub> (2 mM) 22%, EDTA(0.5 M) 78%, glucose (2 mM) 98%, and maltose 94%. Base on assesment of moleculer weight by gel poly-acrylamide electrophoresis,  $\alpha$ -amylase of *Bacillus* sp. MII-10 is an enzyme activity to compose compound four subunit of protein chains. Their monomer have similar size (tetramer) and moleculair weight of monomer 424.6 Dalton on the other hand tetramer compound has moleculair weight 168.413,8 Dalton. Result of hydrolysis of starch determination, showed similar kinds of sugar (glucose, maltose, mixture of olygosaccharide, and dextrin) yielded by standard  $\alpha$ -amylase. Range of time reaction from 0-24 hours still showed variability of products, concluded hydrolityc pattern of this enzyme is endo- $\alpha$ -amylase. Crude  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. MII-10 resulted dextrose equivalent (DE) 9.96.

**Key words:** Purification,  $\alpha$ -amylase, *Bacillus* sp. MII-10

## PENDAHULUAN

Penggunaan enzim untuk industri di Indonesia meningkat dari tahun ke tahun. Enzim banyak dibutuhkan dalam industri pangan dan tekstil. Saat ini, enzim yang penggunaannya cukup besar dalam industri makanan dan minuman adalah enzim amilase ( $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase, dan glukamilase) dan glukosa isomerase. Kebutuhan impor enzim untuk industri di Indonesia pada tahun 1995 mencapai 4.693.400 dolar Amerika (BPS, 1998).

Penerapan bioteknologi melalui aplikasi enzim amilase dapat membantu usaha meningkatkan nilai ekonomi bahan berpati. Perkembangan bioteknologi ini harus terus dipacu, karena Indonesia banyak menghasilkan substrat bahan berpati seperti singkong dan sagu. Pada tahun 1997, Indonesia menghasilkan 15,7 juta ton pati singkong (BPS, 1998).

Enzim-enzim tersebut pada umumnya diproduksi oleh mikroba melalui proses fermentasi. Jenis mikroba penghasil enzim amilase terutama adalah kapang dan bakteri seperti genus *Aspergillus*, *Rhizopus*, dan *Bacillus* (Kulp, 1975). Kedua kelompok mikroba tersebut mampu mensekresikan beberapa jenis enzim amilase ekstraseluler dalam jumlah yang relatif besar. Kualitas dan aktivitas enzim yang di-hasilkan bakteri, tidak lebih rendah bila dibandingkan dengan enzim dari kapang, apalagi jika ditinjau dari pertumbuhan bakteri yang relatif lebih cepat. Kemampuan berkembang biak secara aseksual yang dimiliki bakteri dan terutama kemampuan-nya membentuk endospora yang tahan terhadap proses pemanasan menjadi keunggulan bakteri dalam produksi enzim amilase melalui fermentasi.

Kendala utama untuk produksi enzim di Indonesia di antaranya adalah be-lum tersedianya galur mikroba (bakteri) unggul penghasil enzim tersebut. Di lain pihak, para ahli mikrobiologi dari negara maju mengakui bahwa Indonesia memi-likii biodiversitas mikroba yang cukup tinggi, namun belum dimanfaatkan secara optimal.

Telah banyak dilakukan penelitian isolasi dan skrining dengan maksud men-dapatkan mikroba penghasil enzim amilase terutama yang berasal dari tempat yang berciri sangat khas (eksotik) seperti tempat yang mengandung

limbah pati atau tapioka. Pujoyuwono *et al.* (1997) telah mengisolasi bakteri penghasil amilase *Bacillus* sp. MII-10 yang diisolasi dari tanah yang berasal dari Ujung Kulon. Dari ka-wah Dieng telah diperoleh bakteri termofilik *Bacillus* sp. TII-12 dan TVII-6 yang menghasilkan enzim amilase bersuhu optimum 95°C. Hal tersebut mendorong di-lakukannya penelitian lebih lanjut terhadap isolat-isolat lokal tersebut. Setelah mendapatkan isolat mikroba lokal serta mengetahui ciri-cirinya maka diharapkan ciri-ciri dan perilaku enzim amilase yang dihasilkan dapat diketahui.

Dalam pemanfaatan enzim untuk skala industri, mutlak diperlukan pengeta-huan mengenai karakteristik dari enzim yang digunakan, mengingat kondisi ling-kungan katalisis pada skala industri berbeda dengan lingkungan skala laborato-rium. Karakter enzim yang penting adalah aktivitas yang dapat diinhibisi/diaktivasi oleh inhibitor dan aktivatornya.

Penelitian-penelitian mengenai enzim umumnya dilakukan untuk keperluan analitik. Penelitian ini dilakukan pada skala preparatif (bukan analitik) agar hasil-nya dapat langsung ditujukan untuk penggunaan enzim kasar (*crude enzyme*) da-lam industri.

Penelitian bertujuan untuk mengetahui karakteristik enzim amilase yang dihasilkan bakteri isolat lokal MII-10 meliputi bobot molekul, kondisi katalitik (ak-tivitas) optimum (pH dan suhu), kinetika enzimatik ( $K_m$  dan  $V_{maks}$ ), kestabilan en-zim, serta sifat dan perilaku inhibisi dan aktivasinya.

## BAHAN DAN METODE

Isolat bakteri penghasil amilase unggul hasil isolasi dan seleksi Balai Peneliti-an Bioteknologi Tanaman Pangan, yaitu isolat bakteri mesofilik *Bacillus* sp. MII-10 yang digunakan untuk produksi enzim amilase. Produksi amilase dilakukan pada media cair dengan komposisi: ekstrak khamir 1 g/l, bakto tripton 1 g/l,  $(NH_4)_2SO_4$  0,5 g/l,  $MgCl_2$  0,1 g/l,  $CaCl_2$  0,2 g/l,  $KH_2PO_4$  0,2 g/l, NaCl 0,2 g/l,  $K_2HPO_4$  0,4 g/l, dan sebagai sumber karbon adalah pati ubi kayu 10 g/l (Gao *et al.*, 1984 termodifikasi). Fermentasi dihentikan setelah 48 jam dan dilanjutkan dengan pemisahan bio-massa bakteri dari cairan fermentasi (*broth*). Pemisahan ini dilakukan dengan sen-trifus pada 8000 rpm suhu 4°C dalam kondisi vakum, selama 15 menit. Supernatan kemudian dipisahkan dari endapannya dan sebagian disisihkan untuk keperluan analisis aktivitas dan protein. Produksi diulang tiga kali.

Protein dalam cairan supernatan ini kemudian diendapkan dengan menam-bahkan etanol dengan perbandingan 1 : 2. Pengadukan dilakukan selama 15 menit pada suhu dingin (4°C), selanjutnya didiamkan semalam. Endapan yang diperoleh dipisahkan dengan cara sentrifusi. Endapan yang dihasilkan lebih dulu dicuci menggunakan akuades untuk menghilangkan sisa etanol. Endapan kemudian di-larutkan ke dalam bufer fosfat sitrat (pH 7,0).

Dalam hal ini tidak digunakan bufer yang mengandung  $\text{Ca}^{2+}$  agar dapat diteliti dengan baik pengaruh penambahan ion  $\text{Ca}^{2+}$  pada enzim.

Penentuan pH optimum dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim kasar pada berbagai kondisi pH. Kondisi pH katalitik optimum diperlukan dengan melarutkan enzim dalam bufer fosfat-sitrat pH 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; dan 9,0 dengan masa inkubasi 30 menit dan suhu  $50^{\circ}\text{C}$ . Pengenceran juga dilakukan dengan bufer pH yang sama.

Penentuan suhu reaksi optimum, dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim pada berbagai suhu reaksi, yaitu 30, 40, 50, 60, dan  $70^{\circ}\text{C}$  dengan masa inkubasi 30 menit dan pH reaksi 7,0.

Pemurnian enzim dilakukan dengan *Tubular Polyacrilamide Gel Electrophoresis* menggunakan alat *preparative electrophoresis* (Prep Cell 491 BioRad). Gel poliakrilamid native-PAGE (non SDS-PAGE) digunakan untuk menghilangkan protein kontaminan. Konsentrasi gel yang digunakan untuk native-PAGE, yaitu 5,3% *separating gel* dan 4% *stacking gel*. Pemurnian dalam gel dengan alat ini memerlukan waktu kurang lebih delapan jam, dengan arus sebesar 40 mA (12 watt *constant power*). Hasil pemurnian yang berupa fraksi amilase dikumpulkan dengan *fraction collector*.

Aktivitas amilase dan fraksi amilase diuji secara kualitatif dengan menggunakan metode *radial diffusion*. Uji didasarkan pada kemampuan amilase dan fraksinya dalam menghidrolisis pati (*amilolitik*). Untuk memperjelas daerah hidrolisis (*clear zone*) dilakukan pewarnaan dengan iodium.

Penentuan bobot molekul enzim dilakukan dengan metode elektroforesis menggunakan gel poliakrilamid SDS-PAGE. Alat yang dipakai adalah empat jam, dengan arus sebesar 30 mA (*constant current*). Standar bobot molekul yang digunakan adalah SDS 6H *low range protein marker* (97,4; 66,2; 45; 31; 21; dan 14,4 kD). Bobot molekul dari masing-masing protein monomer ditentukan dengan cara menghitung nilai  $R_f$  dari masing-masing pita protein yang tampak, kemudian dibandingkan dengan nilai  $R_f$  dari standar bobot molekul yang digunakan.

Nilai  $V_{\text{maks}}$  dan  $K_m$  dari amilase diperoleh dari uji hidrolisis dengan substrat pati terlarut (*soluble starch*) pada interval konsentrasi 0-2% (b/v). Gula pereduksi yang terbentuk diukur dengan metode pengukuran aktivitas standar. Penentuan nilai  $V_{\text{maks}}$  dan  $K_m$  dilakukan terhadap enzim kasar berdasarkan grafik Lineweaver-Burk (Dixon dan Webb, 1979).

Pengaruh pH terhadap stabilitas amilase dengan cara menginkubasi enzim tersebut pada bufer pH 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; dan 9,0 dengan suhu  $4^{\circ}\text{C}$  selama 0, 18, dan 24 jam. Sedangkan pengaruh suhu terhadap stabilitas amilase diuji dengan menginkubasi enzim pada suhu 40, 50, 60, dan  $70^{\circ}\text{C}$  selama 5, 10, dan 15 menit. Aktivitas sisa amilase diukur dengan metode standar.

Pengaruh logam terhadap aktivitas enzim dilakukan dengan menginkubasi cairan enzim kasar dengan ion logam dan senyawa lain pada konsentrasi akhir 0,1-10 mM. Ion logam berat yang dicobakan adalah  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{2+}$ , dan ion  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ , pada konsentrasi 2,0, 4,0, dan 10,0 mM dalam per-senyawaan garamnya. Sedangkan untuk EDTA konsentrasinya ditetapkan 0,1, 0,2, dan 0,5 mM. Pada penelitian ini juga diperiksa pengaruh hasil hidrolisis oleh enzim yang berupa gula-gula reduksi. Senyawa yang dimaksud adalah glukosa, maltosa, dan sukrosa yang ditetapkan konsentrasinya sebesar 2, 4, dan 10 mM. Inkubasi dilakukan selama 30 menit pada suhu 50°C dan aktivitas enzim diukur dalam kondisi standar. Tingkat inhibisi/aktivasi relatif ditentukan dengan perbandingan antara aktivitasnya dengan inhibitor/aktivator terhadap aktivitas enzim tanpa inhibitor/ aktivator.

Pengujian jenis enzim dengan melakukan liquifikasi. Pada tahap awal membuat suspensi pati 2% dan pH diatur 6,0-6,5 dengan  $\text{CaCO}_3$ , kemudian ditambahkan produk enzimatis yang diperoleh dengan ukuran tertentu. Larutan dipanaskan pada suhu 60°C selama 60 menit sambil diaduk dan diautoklaf 105°C selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan uji iod, jika menghasilkan warna biru berarti masih bentuk amilosa, sedangkan bila menghasilkan warna coklat berarti mengandung dekstran. Larutan yang telah dipanaskan, didinginkan sampai 80°C dan ditambahkan arang aktif 2% dari bobot pati yang digunakan dan dibiarkan selama satu jam, kemudian disaring dengan penyaring vakum dan dipekatkan sampai 70% dengan evaporator vakum. Hasil dari proses tersebut siap dianalisis menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) untuk mengetahui jenis enzim yang dihasilkan.

Analisis KLT menggunakan silika gel 60 sebagai fase diam. Sebagai eluen digunakan isopropanol, aseton, dan asam laktat dengan perbandingan 4 : 4 : 2. Sebagai *reagen spraying* digunakan anilin sebanyak 4 ml,  $\alpha$ -diphenylamine 4 g, aseton 200 ml, dan 80%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , sehingga akan diperoleh bentuk plot yang menunjukkan komponen yang ada.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

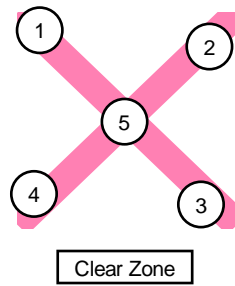
### Purifikasi Enzim

Tahapan pengendapan dengan pelarut organik, diperoleh protein sebanyak 23,22 g setelah melalui pemisahan dengan sentrifugasi. Enzim tersebut segera dilarutkan ke dalam 12 ml bufer fosfat sitrat sehingga diperoleh ekstrak enzim kasar (*crude enzyme*) yang berwarna kecoklatan. Pelarutan ini bertujuan untuk memberikan efek larutan penyangga, untuk menghindari kerusakan protein. Volume larutan yang digunakan sebanyak 1/250 dari volume awal (supernatan), dengan demikian diharapkan meningkatkan kadar proteinnya.

Purifikasi ekstrak secara elektroforesis menggunakan Prep Cell 491 BioRad. Aktivitasnya secara difusi. Hasil uji ditunjukkan dalam Gambar 1.

Hasil pengamatan kelompok fraksi dan pengukuran diameter daerah bening paling lebar adalah 4,6; 2,5; dan 4,58 kali dibandingkan dengan ekstrak kasarnya. Sedangkan perolehan kembali sebesar 3,29; 3,75; dan 4,15%, dengan total perolehan kembali sebesar 11,19%.

Selama pergepungan terpisahkan berdasarkan potensial listrik pada fraksi adalah 4,6; 2,5; dan 4,58 kali dibandingkan dengan ekstrak kasarnya. Sedangkan perolehan kembali sebesar 3,29; 3,75; dan 4,15%, dengan total perolehan kembali sebesar 11,19%.



selanjutnya dimurnikan menggunakan *polyacrylamide gel*, kemudian diuji menggunakan metode *radial diffusion* (daerah bening (*clear zone*)).

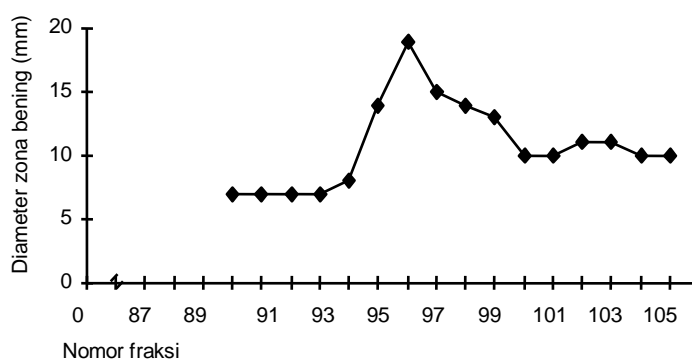
Hasil yang diperoleh tiga kali pengulangan adalah 105 berdasarkan pengukuran diameter daerah bening paling lebar adalah 4 (fraksi ke-95, 96, dan 97).

Hasil pengamatan kelompok fraksi dan pengukuran diameter daerah bening paling lebar adalah 4,6; 2,5; dan 4,58 kali dibandingkan dengan ekstrak kasarnya. Sedangkan perolehan kembali sebesar 3,29; 3,75; dan 4,15%, dengan total perolehan kembali sebesar 11,19%.

**Tabel 1.** Hasil pemurnian amilase MII-10 menggunakan Prep Cell 491 BioRad

Bahan	Volume (ml)	Kadar protein (mg/ml)	Aktivitas UA/ml	Aktivitas spesifik (UA/mg)	Tingkat kemurnian	Perolehan kembali ( <i>recovery</i> ) (%)
Supernatan	3000	0,2900	3288,79	11186,38	-	100,00
Crude I	60	4,8000	25952,79	5406,83	-	15,78
Crude II	12	12,4000	53860,65	4343,60	1,00	41,51
Fraksi I	45	0,0236	471,85	19993,89	4,60	3,29
Fraksi II	45	0,0495	539,11	10891,08	2,51	3,75
Fraksi III	54	0,0250	496,86	19874,35	4,58	4,15

1 dan 4 = fraksi ke-95-97, 2 = fraksi ke-93-94, 3 = fraksi ke-97-100, 5 = fraksi ke-101-105

**Gambar 1.** Zona bening pada uji kualitatif dengan *radial diffusion***Gambar 2.** Uji kualitatif hasil pemurnian amilase MII-10 dengan *radial diffusion*

Hasil pemurnian menggunakan Prep Cell ini lebih baik dibandingkan dengan hasil pemurnian analitik menggunakan Sephacryl S-300 oleh Hayashida *et al.* (1988), yang mencapai perolehan kembali sebesar 6,3% (Tabel 1.). Sedangkan menurut Sakano *et al.* (1983) yang menggunakan kolom *polybuffer exchanger* PBE TM 94 dan Sephadex 6-100 mencapai perolehan kembali 6,98% (fraksi F1 3,58% dan fraksi F2 3,4%).

Pemilihan nilai pH bufer elektroda pada dasarnya berpedoman pada nilai pI (*point Isoelectric*) protein (enzim) yang dikehendaki. Untuk keperluan itu harus dilakukan terlebih dulu *Isoelectric focussing*. Pemurnian dengan menggunakan bufer elektroda pada nilai pH mendekati nilai pI, berlangsung cukup lama, namun memiliki resolusi yang tinggi.

## Karakterisasi Enzim

### a. Stabilitas Amilase MII-10

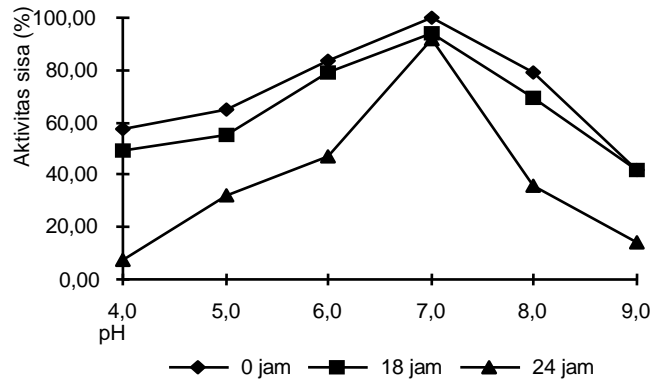
Hasil penelitian aktivitas amilase MII-10 optimum pada pH 7,0 dan suhu 50°C, yaitu sebesar 68.448,80 UA/ml. Kondisi suhu optimum dibutuhkan amilase untuk membentuk kompleks enzim-substrat pada semua sisi enzim. Setiap enzim memiliki kisaran suhu optimum tertentu untuk melangsungkan aktivitasnya. Suhu optimum enzim sangat tergantung pada pH, kekuatan ionik, konsentrasi substrat, serta konsentrasi protein total (Mountenecourt *et al.*, 1985). Hasil penelitian Shih dan Labbe (1995), menunjukkan bahwa aktivitas maksimum  $\alpha$ -amilase dari *Clostridium perfringens* dicapai pada suhu 30°C tanpa  $\text{Ca}^{2+}$  atau pada 40°C mengandung  $\text{Ca}^{2+}$ .

Kestabilan enzim terhadap kondisi pH dan suhu adalah kemampuan enzim menjaga konformasinya sehingga mampu mempertahankan aktivitasnya pada kondisi tertentu. Amilase MII-10 stabil pada pH 7,0 setelah inkubasi selama 24 jam sedangkan pada kondisi pH lainnya aktivitas menurun dengan tajam (Gambar 3). Menurut Godfrey dan Reichelt (1983), perubahan pH akan mempengaruhi struktur protein enzim sehingga stabilitas enzim akan terganggu, enzim terdenaturasi, dan secara tetap akan kehilangan aktivitasnya.

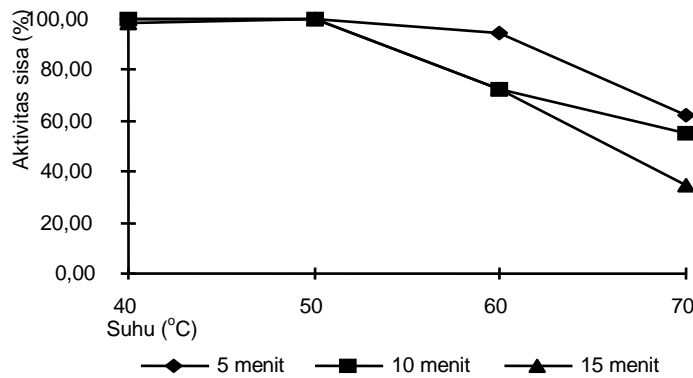
Pada masa inkubasi 18 jam dan 24 jam, amilase MII-10 stabil pada kisaran pH 6,0-8,0. Kisaran ini tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian Shih dan Labbe (1995)  $\alpha$ -amilase dari *C. perfringens* mempunyai kisaran pH 5-9,5 dan stabil pada pH 9. Menurut Sakano *et al.* (1983) amilase dari *Pseudomonas stutzeri* stabil pada pH 5,5-11,0, suhu 30°C (dengan aktivator  $\text{Ca}^{2+}$ ) dan pada pH 6,5-8,5 tanpa  $\text{Ca}^{2+}$ .

Aktivitas amilase MII-10 dipertahankan setelah inkubasi 70°C selama lima menit dengan aktivitas sisa sebesar 61,9%. Sedangkan dengan inkubasi selama 15 menit pada suhu 70°C aktivitasnya menurun tajam hingga tersisa 34,7%. Grafik stabilitas suhu (Gambar 4), menunjukkan bahwa amilase MII-10 stabil pada suhu 60°C, dengan inkubasi 15 menit. Hal ini ditunjukkan dengan tingginya aktivitas sisa amilase MII-10 yang mencapai 72,1% setelah diinkubasi 60°C selama 15 menit. Rendahnya aktivitas setelah inkubasi pada suhu tertentu diakibatkan oleh telah berubahnya konformasi amilase sehingga jumlah amilase yang aktif berkurang. Kemungkinan terbesar adalah berubahnya konformasi pada sisi aktif enzim, yang menyebabkan tidak terjadinya ikatan enzim-substrat.





Gambar 3. Stabilitas pH enzim amilase MII-10



Gambar 4. Stabilitas suhu enzim amilase MII-10

Banyak faktor yang mempengaruhi stabilitas suhu (*thermostability*) amilase, termasuk di antaranya tingkat kemurnian, kandungan kalsium, substrat, dan senyawa penstabil lain. Efek penstabil dari substrat berasal dari dua hal. Pati sebagai substrat biasanya mengandung kalsium dan diperkirakan pada saat mengikat substrat konformasi enzim menjadi lebih kaku dan stabil terhadap kondisi denaturasi. Dilaporkan hanya beberapa amilase yang tidak terstabilkan oleh pati (Vihinen dan Mantsala, 1989).

Suhu dan pH stabilitas amilase MII-10 sangat menguntungkan, karena dengan mengatur pH awal media pada pH 7,0 dari beberapa kali fermentasi selama 48 jam dengan pH tidak terkontrol, tercatat pH akhir cairan fermentasi berkisar 6,9. Sehingga amilase MII-10 relatif stabil dalam biakan cair (*broth*) maupun dalam supernatan.

## b. Pengaruh Ion Logam dan Senyawa Lain

Dari sejumlah pengujian, aktivitas amilase MII-10 meningkat dengan adanya beberapa ion logam pada konsentrasi rendah (2 mM), kecuali oleh adanya pengaruh  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{AgNO}_3$ , dan EDTA. Besar pengaruh tersebut tergantung pada konsentrasi ion. Ion  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^+$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ag}^{2+}$ , dan  $\text{Mn}^{2+}$  konsentrasi 2 mM meningkatkan aktivitas amilase MII-10, namun pada konsentrasi lebih tinggi (10 mM) berpengaruh negatif, yaitu dengan menurunkan aktivitas enzim (Tabel 2).

Kenyataan ini diduga karena pengaruh kelebihan aktivator. Sampai dengan konsentrasi tertentu (maksimum) senyawa aktivator meningkatkan kecepatan reaksi katalitik enzim. Kelebihan aktivator dapat menyebabkan kompetisi aktivator bebas dengan kompleks aktivator-substrat sehingga menyebabkan turunnya aktivitas enzim. Menurut Dixon dan Webb (1979) kelebihan aktivator dapat mengakibatkan terjadinya penghambatan kompetitif (*competitive inhibitor*).

Aktivator ion  $\text{Ca}^{2+}$  memiliki pengaruh aktivasi terbesar terhadap amilase MII-10. Aktivasi sebesar 135,5% mampu dicapai amilase MII-10 dengan pengaruh  $\text{Ca}^{2+}$  (dalam senyawa klorin) pada konsentrasi 4 mM. Hal ini sesuai dengan karakter amilase, yaitu hampir semua amilase memiliki efek positif dengan adanya pengaruh ion  $\text{Ca}^{2+}$ .

**Tabel 2.** Pengaruh senyawa yang mengandung ion logam dan senyawa lain terhadap aktivitas amilase MII-10

Bahan	Konsentrasi (mM)	Aktivitas relatif (%)	Bahan	Konsentrasi (mM)	Aktivitas relatif (%)
$\text{ZnSO}_4$	2	108,3	$\text{CoCl}_2$	2	123,6
$\text{ZnSO}_4$	4	108,2	$\text{CoCl}_2$	4	92,4
$\text{ZnSO}_4$	10	77,6	$\text{CoCl}_2$	10	92,1
$\text{FeCl}_3$	2	123,6	$\text{CuSO}_4$	2	101,4
$\text{FeCl}_3$	4	108,2	$\text{CuSO}_4$	4	111,1
$\text{FeCl}_3$	10	93,4	$\text{CuSO}_4$	10	48,3
$\text{MgSO}_4$	2	104,0	$\text{CaCl}_2$	2	117,3
$\text{MgSO}_4$	4	102,7	$\text{CaCl}_2$	4	135,5
$\text{MgSO}_4$	10	92,8	$\text{CaCl}_2$	10	89,6
$\text{MgCl}_2$	2	102,7	$\text{NaCl}$	2	105,5
$\text{MgCl}_2$	4	105,4	$\text{NaCl}$	4	100,0
$\text{MgCl}_2$	10	98,7	$\text{NaCl}$	10	93,4
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	2	82,5	$\text{MnSO}_4$	2	117,3
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	4	97,4	$\text{MnSO}_4$	4	84,7
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	10	47,0	$\text{MnSO}_4$	10	78,5
$\text{AgNO}_3$	1	22,4	Glukosa	2	98,7
$\text{AgNO}_3$	2	74,9	Glukosa	4	87,7
$\text{AgNO}_3$	4	77,9	Glukosa	10	67,6
EDTA	0,1	92,4	Maltosa	2	94,8
EDTA	0,2	85,2	Maltosa	4	94,8
EDTA	0,5	77,8	Maltosa	10	94,5
			Sukrosa	2	104,1
			Sukrosa	4	105,4
			Sukrosa	10	81,3

Sukrosa pada konsentrasi rendah juga menyebabkan aktivitas amilase MII-10 meningkat. Senyawa yang mengandung maltosa dan glukosa pada konsentrasi rendah berpengaruh negatif terhadap aktivitas amilase MII-10. Diduga senyawa-senyawa tersebut mempengaruhi sisi aktif dan sisi spesifik yang secara langsung berhubungan dengan aktivitas enzim dan kecepatan katalitiknya.

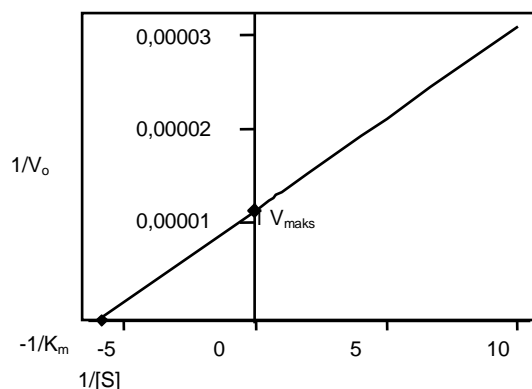
Dengan ditemukannya sedikit senyawa yang berpengaruh menghambat (inhibitor) terhadap aktivitas amilase MII-10, yaitu  $Ag^{2+}$ , maltosa, dan glukosa maka merupakan keunggulan bagi enzim MII-10 ini.

### c. Sifat Kinetik Amilase MII-10 ( $K_m$ dan $V_{maks}$ )

Konstanta  $V_{maks}$  dan  $K_m$  amilase MII-10 ditentukan dengan metode Lineweaver-Burk (Dixon dan Webb, 1979) dengan menghubungkan kecepatan katalitik ( $V_o$ ) dan konsentrasi substrat. Hasil perhitungan menunjukkan bahwa amilase MII-10 dalam penelitian ini memiliki nilai  $V_{maks}$  85,186 Mol/menit (standar maltosa) dan nilai  $K_m$  1,695 mg/ml setara dengan 0,169% terhadap substrat *soluble starch*, yaitu pati yang dapat larut air dari E-merk (Gambar 5).

Hasil tersebut tidak berbeda nyata dengan nilai  $K_m$  *Bacillus* sp. 11-IS 1,64 mg/ml (Uchino, 1982) dan dengan  $K_m$  *B. acidocaldarius* A-2 1,6 mg/ml terhadap pati (Kanno, 1986). Dibandingkan dengan nilai  $K_m$  *B. licheniformis* BLM-1777 0,8 mg/ml terhadap pati (Chiang *et al.*, 1979), maka nilai  $K_m$  amilase MII-10 lebih tinggi dua kali lipat. Hal tersebut menunjukkan bahwa untuk mencapai kecepatan maksimum, amilase MII-10 membutuhkan konsentrasi substrat dua kali lipat lebih tinggi daripada *B. licheniformis* BLM-1777. Namun demikian, hasil penelitian ini jauh lebih rendah dibandingkan dengan nilai  $K_m$  dari *C. perfringens*, yaitu 23,92 mg/ml (Shih dan Labbe, 1995).

Nilai  $K_m$  yang tinggi menunjukkan afinitas terhadap substrat yang rendah. Semakin kecil nilai  $K_m$  semakin tinggi afinitasnya terhadap substrat,



Gambar 5. Penentuan  $V_{maks}$  dan  $K_m$  menurut Lineweaver-Burk

sehingga semakin rendah konsentrasi substrat yang diperlukan untuk mencapai kecepatan reaksi katalitik maksimumnya ( $V_{maks}$ ).

Rendahnya afinitas ekstrak enzim kasar disebabkan masih adanya protein (enzim) kontaminan yang juga memiliki afinitas terhadap pati, sehingga tidak semua rantai amilum diputus menjadi gula-gula reduksi. Kemungkinan lain adalah adanya induser. Kemungkinan ini ada jika amilase MII-10 memiliki afinitas yang lebih tinggi terhadap induser tersebut daripada substrat.

#### d. Penentuan Bobot Molekul Amilase MII-10

Bobot molekul amilase MII-10 yang diperoleh dengan metode nondenaturasi (native-PAGE) adalah 168413,8 Dalton (Tabel 3), sedangkan yang diperoleh dengan metode denaturasi (SDS-PAGE) adalah 42454,6 Dalton (Tabel 4).

Penentuan bobot molekul dengan metode non-denaturasi menghasilkan nilai berkisar empat kali bobot molekul dengan metode denaturasi. Hal ini menunjukkan bahwa amilase MII-10 adalah enzim yang merupakan senyawa *tetramer* (terdiri dari empat subunit rantai protein, yang berukuran sama).

Posisi pita enzim amilase MII-10 terletak antara pita *marker* ke-3 (45 kD) dan pita ke-4 (31 kD) pada hasil elektroforesis menggunakan SDS-PAGE (Gambar 6). Hasil estimasi bobot molekul dalam penelitian ini cukup baik, mengingat bobot molekul amilase tidak jauh berbeda dan tidak selalu ditemukan dalam monomer. Menurut Vihinen dan Mantsala (1989), bobot molekul  $\alpha$ -amilase bervariasi dari 10.000-130.000 Dalton, namun pada

**Tabel 3.** Hasil penentuan bobot molekul amilase MII-10 dengan native-PAGE

Enzim	Migrasi (cm)	dye (cm)	Rf (cm)	BM (Dalton)
Marker 1	6,4	10,6	0,6038	66000,0
Marker 2	3,5	10,6	0,3302	132000,0
Amilase MII-10	1,9	10,6	0,1792	168413,8

Rf = perbandingan antara jarak pusat bercak dari garis awal dan jarak akhir elusi dari garis awal kromatografi, BM = bobot molekul

**Tabel 4.** Hasil penentuan bobot molekul amilase MII-10 dengan SDS-PAGE

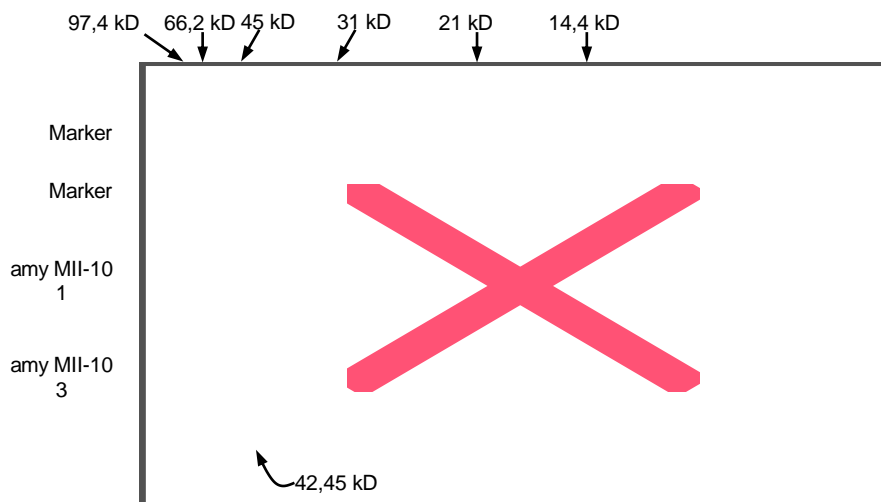
Enzim	Migrasi (cm)	dye (cm)	Rf (cm)	BM (Dalton)
Marker 1	0,5	11,5	0,0435	97400,0
Marker 2	0,8	11,5	0,0696	66200,0
Marker 3	1,3	11,5	0,1130	45000,0
Marker 4	2,4	11,5	0,2087	31000,0
Marker 5	4,2	11,5	0,3652	21500,0
Marker 6	5,8	11,5	0,5043	14400,0
Amilase MII-10	1,5	11,5	0,1304	42454,6

Rf = perbandingan antara jarak pusat bercak dari garis awal dan jarak akhir elusi dari garis awal kromatografi, BM = bobot molekul

umumnya  $\alpha$ -amilase (dari mikroba) memiliki bobot molekul antara 50.000-60.000 Dalton yang diperoleh melalui analisis gen  $\alpha$ -amilase dan pengurutan asam amino. Chiang *et al.* (1979) melaporkan bahwa  $\alpha$ -amilase dari *B. licheniformis* BLM 1777 mempunyai bobot molekul 62.000 Dalton kemudian dari *B. licheniformis* NCIB 6346, berbobot molekul 62.650 Dalton (Morgan dan Priest, 1981). Sedangkan Ivanova *et al.* (1993) dari *B. licheniformis* 44MB82A sebesar 58.000 Dalton.

### e. Penentuan Jenis Enzim

Analisis jenis gula dari contoh menggunakan metode KLT dengan mengamati luas bercak. Intensitas warna bercak sebanding dengan konsentrasi. Makin kuat intensitas warna bercak, konsentrasi makin tinggi. Bila intensitas warna bercak sama, bercak dengan luas lebih besar akan mempunyai konsentrasi lebih tinggi (Tabel 5.) Hasil tersebut menunjukkan bahwa pola



**Gambar 6.** Hasil elektroforesis vertikal dengan SDS-PAGE

**Tabel 5.** Interpretasi data dari pengamatan kromatografi lapis tipis

Komponen	1	2	3	4	5	6	7
$\alpha$ -amilase	••	•••	••••	•	•••••	••••	•••
MII-10 0 jam	-	-	-	-	-	-	•
1/6 jam	•	•	•	•	••	-	••
1/2 jam	•	•	•	••	••	-	••
1 jam	••	••	••	••	••	-	•••
2 jam	••	••••	•••••	••••	••	-	•••
24 jam	-	•••••	••••••	•••	•	-	•••
<i>Rf</i>	0,75	0,70	0,60	0,48	0,36	0,25	0,07

• = menunjukkan adanya bercak atau intensitas warna, *Rf* = perbandingan antara jarak pusat bercak dari garis awal dan jarak akhir elusi dari garis awal kromatografi

kromatogram lapis tipis dari larutan pembanding  $\alpha$ -amilase adalah maltosa, oligosakarida 1, oligosakarida 3, oligosakarida 4, dan dekstrin. Glukosa dan oligosakarida 2 terbentuk dengan intensitas warna yang lebih lemah. Hasil ini sesuai dengan pernyataan Fullbrook (1984), yaitu produk akhir hidrolisis pati dengan  $\alpha$ -amilase dari *B. licheniformis* adalah maltosa, oligosakarida, maltotriosa, dan maltopentosa. Pola kromatogram contoh MII-10 menunjukkan adanya maltosa, oligosakarida 1, oligosakarida 2, dan dekstrin. Glukosa dan oligosakarida 3 terbentuk dengan intensitas warna yang lebih lemah. Pola kromatogram seperti ini menunjukkan bahwa amilase MII-10 sebagai enzim endo  $\alpha$ -amilase. Hal ini diperkuat dengan pernyataan Khanok-Ratanakhanokchai *et al.* (1992), yaitu enzim  $\beta$ -amilase pembanding dari ubi jalar hanya menunjukkan bercak maltosa dan dekstrin dari pola kromatogram dari hasil hidrolisis *soluble starch* selama satu jam inkubasi. Sedangkan menurut Winarno (1986), amiloglukosidase hanya menghasilkan glukosa sebagai produk hidrolisis pati. Demikian juga menurut Kimura dan Chiba (1983) pada hidrolisis pati ubi jalar oleh  $\alpha$ -amilase menghasilkan glukosa,  $\beta$ -maltosa, dan oligosakarida lain. Sedangkan  $\beta$ -amilase menghasilkan  $\beta$ -maltosa.

Dekstrosa ekivalen (DE) rata-rata MII-10 adalah 9,96, jauh lebih rendah dari pada DE larutan pembanding sebesar 23,33. Rendahnya nilai DE tersebut diduga belum murninya amilase contoh yang digunakan. Peningkatan nilai DE dapat dilakukan dengan meningkatkan nilai aktivitas spesifik enzimnya melalui pemurnian enzim.

### KESIMPULAN

1. Pemurnian amilase dari isolat bakteri *Bacillus* sp. MII-10 menggunakan Prep Cell 491 cukup efisien, yaitu mencapai tingkat kemurnian tertinggi (4,6 kali) dan perolehan kembali sebesar 11,2%.
2. Karakter amilase yang dihasilkan dari fermentasi *Bacillus* sp. MII-10 pada suhu 38°C mempunyai pH optimum 7 dan suhu aktivitas optimum 50-60°C. Kestabilan enzim  $\alpha$ -amilase dicapai pada pH 7 selama 24 jam pada suhu 4°C, demikian pula pada suhu 70°C selama 5 menit. Sedangkan sifat kinetika enzim ditunjukkan oleh nilai Km sebesar 0,169% terhadap substrat *soluble starch* yang setara dengan 1,69 mg/ml. Inhibisi enzim  $\alpha$ -amilase yang terjadi disebabkan oleh Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 mM) 82,5%, AgNO<sub>3</sub> (2 mM) 22%, EDTA (0,5 mM) 78%, glukosa (2 mM) 98%, dan maltosa 94%. Bobot molekul monomer enzim  $\alpha$ -amilase sebesar 424,6 Dalton dan tetramer 168.413,8 Dalton.
3. Enzim amilase yang dihasilkan adalah  $\alpha$ -amilase dengan pola hidrolisis endo- $\alpha$ -amilase. Amilase kasar dari isolat *Bacillus* sp. MII-10 menghasilkan nilai dekstrosa ekivalen (DE) 9,96.

## DAFTAR PUSTAKA

- Biro Pusat Statistik.** 1998. Statistik Indonesia. Statistical Year Book of Indonesia. Jakarta.
- Bollag, D.M. and S.J. Edelstein.** 1991. Protein methods. John Wiley and Sons. New York.
- Chiang, J.P., J.E. Alter, and M. Sternberg.** 1979. Purification and characterization of thermostable  $\alpha$ -amilase from *Bacillus licheniformis*. Starch/Stärke 31:86-92.
- Dixon, M. and E.C. Webb.** 1979. Enzymes. Longman Group Ltd. London
- Fullbrook, P.D.** 1984. The enzymatic production of glucose syrup. *In* Dziedzić (Ed). Glucose Syrups. Science and Technology. Elsevier Applied Science Publishers, London.
- Gao, X.L., Y. Yu, and P. Linko.** 1984. Glucoamylase and  $\alpha$ -amylase production by immobilized. Biotech. 6:645-650.
- Godfrey, T. and J. Reichelt.** 1983. Industrial Enzymology. The Applications of Enzymes in Industry. The Nature Press. New York.
- Hayashida S., Y. Teramoto, and T. Inoue.** 1988. Production and characteristics of raw-potato-starch-digesting  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* 65. Appl. Environ. Microbiol. 54:960-965.
- Ivanova, V.M., E.P. Dobрева, and E.I. Emanuilova.** 1993. Purification and characterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis*. J. Biotech. 28:277-289.
- Kanno, M.** 1986. A *Bacillus acidocaldarius*  $\alpha$ -amylase that is highly stable to heat under acidic Conditions. Agric. Biol. Chem. 50(2):177-179.
- Khanok-Ratanakhanokchai, J. Kaneko, Y. Kamiro, and K. Izaki.** 1992. Purification and properties of maltotetraose-producing amylase from *Chloroflexus auranticus*. Appl. Environ. Microbiol. 58(8):2490-2494.
- Kimura, A. and S. Chiba.** 1983. Quantitative study of anomeric forms of maltose produced by  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylase. J. Agric. Biol. Chem. 47(8):1747-1753.
- Kulp, K.** 1975. Carbohydrases. *In* Reed, G. (Ed). Enzymes in Food Processing. Academic Press. Orlando.

- Mountenecourt, B.S., J.O. Carrol, and R.P. Lanzilotta. 1985.** Assay of industrial microbial enzyme. *In* Moo-Young *et al.* (Eds.). Comprehensive Biotechnology: The Principles Applications and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine. The Practice of Biotechnology: Speciality Product and Service Activities. Pergamon Press. Oxford.
- Morgan, F.J. and F.G. Priest. 1981.** Characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* RP01. *J. Appl. Bacteriol.* 50:104-107.
- Pujoyuwono, M., D. Trinovia, N. Richana, D.S. Damardjati, dan U. Murdiyatmo. 1997.** Karakterisasi enzim amilase dari beberapa strain bakteri indigenous Indonesia. Prosiding Seminar Teknologi Pangan Denpasar, Bali.
- Sakano, Y., E. Kashiya, and T. Kobayashi. 1983.** Purification of  $\alpha$ -maltotetraose-forming exo-amylase of *Pseudomonas stutzeri*. Two forms of the amylase and their enzymatic properties. *J. Agric. Biol. Chem.* 47(8):1761-1768.
- Shih, N-J. dan R.G. Labbe. 1995.** Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase from *Clostridium perfringens* Type A. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 6(15):1776-1779.
- Uchino, F. 1982.** A thermophilic and unusually achidophilic amylase produced by a thermophilic achidophilic *Bacillus* sp. *Agricultural Biological Chemistry* Vol. 46.
- Vihinen, M. and P. Mantsala. 1989.** Critical reviews in biochemistry and molecular biology. Vol. 24. Issue 4. Department of Biochemistry, University of Turku.
- Winarno. F.G. 1986.** Enzim Pangan. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.