

ISOLASI, PURIFIKASI DAN KARAKTERISASI α -AMILASE DARI *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012

Dewi Permata Sari, Wuryanti, Khairul Anam.

Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas
Diponegoro dhe_uwieata@yahoo.co.id

ABSTRAK

Isolasi α -amilase dari *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012 dilakukan untuk mendapatkan α -amilase dari *Saccharomyces cerevisiae* FNCC yang kemudian dipurifikasi lebih lanjut menggunakan metode kromatografi filtrasi gel dengan membandingkan aktivitas spesifik sebelum dan setelah purifikasi dan ditentukan karakteristiknya yang meliputi waktu inkubasi, pH, dan suhu optimum. Alfa amilase didapatkan dari beberapa tahap diantaranya peremajaan, pembuatan kurva pertumbuhan dan proses isolasi dengan menggunakan metode sentrifugasi. Alfa amilase yang dihasilkan dari *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012 terdapat di fraksi 5 pada proses pemurnian menggunakan amonium sulfat dengan konsentrasi kejenuhan 80-100% dengan aktivitas spesifik 7,28 unit/mg protein. Proses purifikasi α -amilase menggunakan kromatografi filtrasi gel menggunakan *sephadex* G-100 memberikan peningkatan aktivitas spesifik sebesar 8,56 %. Alfa amilase dari *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012 memiliki karakteristik berupa waktu inkubasi optimum sebelum purifikasi dan setelah purifikasi berturut-turut sebesar 42 menit dan 40 menit, pH optimum dan suhu optimum setelah purifikasi sebesar 4,9 dan 23°C.

Kata kunci : *Saccharomyces cerevisiae*, α -amilase, kromatografi filtrasi gel, karakterisasi.

ABSTRACT

Isolation α -amylase from *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012 were doing to get α -amylase that purified by gel filtration chromatograph method and was determined their characteristic like time incubation, pH and optimum temperature. Alpha amylase was got from any step like refresh, growth curve and isolation process using centrifugation. Alpha amylase was produced by *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012 was found in fraction 5 in purified process used ammonium sulphate salt in saturated level 80-100% with specific activity 7.28 Unit/mg protein. purification process of α -amylase used gel filtration chromatograph used *sephadex* G-100 was increased specific activity up to 8.56 %. Alpha amylase from *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012 have characteristic optimum time incubation before and after purified successively 42 minute and 40 minute, optimum pH 4.9 and optimum temperature is 23°C.

Key word : *Saccharomyces cerevisiae*, α -amylase, gel filtration chromatograph, characterisation.

1. Pendahuluan

Alfa amilase EC 3.2.1.1 adalah enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis ikatan α -1,4 glikosida pada amilosa secara acak menghasilkan campuran dekstrin, maltosa dan glukosa^[10]. Alfa amilase tidak memberikan efek pemutusan pada ikatan α -1,6 glikosida yang terdapat pada struktur amilopektin^[12]. Amilase digunakan secara luas dalam bidang industri seperti industri bioetanol, tekstil, kertas, dan industri makanan^[2]. Kebutuhan produksi α -amilase mencapai 30% dari total produksi enzim dunia^[11], hal ini mendukung perlunya eksplorasi sumber α -amilase yang lain.

Alfa amilase dapat ditemukan dari berbagai sumber diantaranya, tumbuhan, hewan dan mikroorganisme. Sumber α -amilase yang banyak digunakan berasal dari mikroorganisme karena mikroorganisme mudah tumbuh tanpa dipengaruhi musim, cepat menghasilkan enzim dan lingkungan tumbuhnya dapat dikontrol sesuai dengan kebutuhan. Salah satu jenis mikroorganisme yang mampu menghasilkan α -amilase adalah *Saccharomyces cerevisiae*^[17].

Saccharomyces cerevisiae telah digunakan dalam jangka waktu yang lama untuk proses fermentasi, Pada proses fermentasinya, *Saccharomyces cerevisiae* terbukti tidak menghasilkan produk samping

pirogen atau bahan lain yang bersifat toksik, sehingga diharapkan α -amilase yang diisolasi dari *Saccharomyces cerevisiae* juga tidak memberikan efek kontaminan yang berbahaya atau toksik^[6].

Alfa amilase hasil isolasi memiliki aktivitas yang relatif masih rendah, sehingga perlu dilakukan proses purifikasi α -amilase hasil isolasi. Penggunaan kromatografi filtrasi gel untuk pemurnian enzim lebih menguntungkan karena pada proses filtrasi gel tidak terjadi ikatan antara enzim yang akan dipisahkan dengan matriksnya, sehingga struktur dan aktivitas enzim relatif tidak berubah oleh pengaruh matriks dan kondisi elusi dapat disesuaikan dengan tipe sampel^[5].

Pada proses hidrolisis amilosa, α -amilase dipengaruhi oleh kondisi lingkungan diantaranya pH, suhu dan waktu kontak dengan substrat, oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan karakterisasi α -amilase hasil isolasi yang meliputi pH, suhu, dan waktu inkubasi optimum.

2.METODELOGI

2.1.Peralatan dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat autoklaf (*Napco Model 8000-DSE*), inkubator (*Memmert*), mikropipet (*Nichiryo Model 5000F*), sentrifus (*Centrif-228*), magnetik stirer (*Thermolyne Cimarec*), *shaker* (*KS-260 Basic Merk Ika*), spektrofotometer *UV-VIS*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Biakan murni khamir *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012, aquades, media *PDA* (*potato dextros agar*), Amilosa 1%, larutan folin ciocalteau, *Yeast ekstrak*, *Pepton*, CaCl_2 , MgSO_4 , FeSO_4 , Na_2CO_3 , I_2 , larutan maltosa, *DNS* (*3,5 dinitrosalisilat acid*), NaOH , Na_2SO_3 , *BSA* (*Bovin Serum Albumin*), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, BaCl_2 , *sephadex G-100* dan *aquabides*.

2.2. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat dari kaca dibungkus menggunakan aluminium foil dan plastik lalu diautoklaf pada suhu 121°C tekanan 2 atm selama 20 menit, termasuk dalam hal ini media cair yang digunakan untuk produksi α -amilase.

2.3 Peremajaan *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012

Jarum ose yang telah disterilkan, disentuhkan pada biakan murni sel

Saccharomyces cerevisiae FNCC 3012 dari stok awal media agar miring sebanyak satu kali. Secara aseptik biakan tersebut diinokulasikan pada media *PDA* miring. Media kemudian diinkubasi selama 3 hari dalam inkubator dengan temperatur ruang. Pengulang selama 3 kali. Selanjutnya dilakukannya pemindahan inokulum kedalam erlenmeyer yang berisi media fermentasi secara aseptik kemudian diinkubasi pada inkubator *shaker* selama 3 hari dengan kecepatan 50 rpm pada suhu ruang.

Tabel 2.1. Komposisi media fermentasi^[18]

Komposisi	Jumlah (g/L)
<i>Yeast extract</i>	30
Pepton	20
(amilosa)	10
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,0
CaCl_2	2,0
MgSO_4	0,5
FeSO_4	0,1
Bufer asetat	Sampai 1000 mL

2.3. Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012

Sebanyak 11 buah tabung masing-masing diisi dengan 50 mL media tumbuh yang berisi amilosa dalam bufer asetat pH 5 kemudian disterilisasikan. Pada 10 buah tabung masing-masing ditambahkan 1% inokulum

Saccharomyces cerevisiae FNCC 3012 secara aseptik dan 1 buah tabung yang lain dijadikan sebagai kontrol. Kemudian ke-11 tabung tersebut dimasukkan dalam inkubator *shaker* pada suhu ruang, selanjutnya sampel diambil tiap 12 jam sekali diukur berat keringnya

2.4.Produksi α -amilase

Dalam pembuatan produksi enzim langkah awal yang dilakukan adalah pembuatan starter. Kemudian stok *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012 hasil peremajaan dipindahkan secara aseptik ke dalam media fermentasi dengan volume media fermentasi 500 mL sebagai kultur produksi. Media fermentasi ini diinkubasi pada inkubator *shaker*

selama 72 jam (sesuai dengan data kurva pertumbuhan). Selanjutnya setelah media fermentasi telah mencapai 72 jam, media fermentasi disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Hasil yang diperoleh berupa filtrat (ekstrak kasar enzim) dan endapannya. Bagian yang diambil adalah filtratnya karena α -amilase merupakan ekstrak kasar.

2.5. Fraksinasi dengan Garam Amonium Sulfat

Kebutuhan amonium Sulfat ditimbang sesuai dengan tingkat kejenuhan. Selanjutnya amonium sulfat ditambahkan kedalam ekstrak kasar sedikit demi sedikit sesuai dengan volume ekstrak kasar enzim, sambil diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer*. Campuran tersebut didiamkan selama satu malam dalam keadaan dingin. Selanjutnya disentrifus selama 20 menit dengan kecepatan 4000 rpm pada suhu 4⁰C. Endapan dipisahkan dan disuspensikan dengan bufer asetat 0,05 M pH 5. Endapan tersebut merupakan fraksi pemurnian amonium sulfat. selanjutnya filtrat tersebut dilanjutkan dengan perlakuan yang sama untuk fraksi berikutnya. Pengelompokan fraksi berdasarkan tingkat kejenuhannya dimana tingkat kejenuhannya 0-20% dikelompokkan menjadi fraksi 1, 20-40% fraksi 2, 40-60% fraksi 3, 60-80% fraksi 4 dan 80-100% fraksi 5.

2.6. Dialisis α -amilase dengan membran selofan

Membran selofan direbus selama 30 menit dengan larutan EDTA alkali, kemudian dicuci dengan aquades dan bufer. Salah satu ujung selofan diikat dengan benang kemudian kedalam selofan diisi α -amilase, karena selama dialisis volume larutan dapat meningkat, maka pengisian kantong selofan jangan terlalu penuh. Selanjutnya tiap fraksi α -amilase dimasukkan kedalam masing-masing membran selofan yang berbeda. Proses dialisis dilakukan dengan merendam kantong selofan dalam bufer asetat dan diaduk menggunakan *magnetik stirrer* pada suhu 5⁰C. Tiap dua jam bufer diganti serta diuji kandungan amonium sulfatnya dengan BaCl₂.

2.7. Uji aktivitas α -amilase

Penentuan aktivitas α -amilase diawali dengan penentuan panjang gelombang maksimum larutan standar maltosa dan penentuan kurva standar maltosa. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan mereaksikan 1 mL maltosa 0,2 mg/mL dengan reagensia *DNS* dan diukur serapannya dengan spektrofotometer *UV-Vis* pada rentang panjang gelombang 400-600 nm. Penentuan kurva standar maltosa dilakukan serupa dengan penentuan panjang gelombang maksimum dimana pada penentuan kurva standar dilakukan dengan membuat variasi konsentrasi dari 0,2-0,5 mg/mL dengan rentang konsentrasi 0,05 mg/mL dan diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum. Penentuan aktivitas enzim dilakukan dengan mereaksikan 0,1 mL enzim dengan 1 mL amilosa dan diinkubasi selama 30 menit. Hasil inkubasi ditambahkan dengan *DNS* dan diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum.

2.8 Penentuan Kadar protein

Penentuan kadar protein diawali dengan penentuan panjang gelombang larutan standar *BSA* dan pembuatan kurva standar *BSA*. Penentuan panjang gelombang maksimum larutan standar *BSA* dilakukan dengan membuat larutan *BSA* 2,00 mg/mL dan direaksikan dengan reagensia Lowry kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer *UV-Vis* pada rentang panjang gelombang 600-800 nm. Pembuatan kurva standar *BSA* dilakukan serupa dengan penentuan panjang gelombang maksimum dimana pembuatan kurva standar dilakukan dengan membuat variasi konsentrasi larutan *BSA* antara 2,00-4,25 mg/mL dengan rentang 0,25 mg/mL dan diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum. Penentuan kadar protein dilakukan dengan mereaksikan 0,1 mL enzim dengan reagensia Lowry dan diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum.

2.9. Kromatografi kolom filtrasi gel

Sebanyak 2 mL fraksi α -amilase dengan nilai aktivitas spesifik tertinggi yang diperoleh dari pengendapan amonium sulfat, dimasukkan

ke dalam kolom dengan matriks *sephadex G-100* (panjang kolom 35 cm dan diameter 1 cm) yang telah disetimbangkan dengan bufer asetat 0,05 M pH 5 dan diatur laju elusinya 6 tetes tiap menit. Selanjutnya sampel dielusi dengan bufer yang sama. Volume tiap fraksi yang dikumpulkan sebanyak 3,0 mL dengan total pengelompokkan 50 fraksi dimana setiap fraksi diukur kadar protein dan aktivitas enzimnya. Fraksi dengan aktivitas spesifik tinggi dikelompokkan menjadi satu dan diuji kembali aktivitas enzimnya.

2.10. Karakterisasi α -amilase

Karakterisasi α -amilase meliputi penentuan waktu inkubasi optimum, pH dan suhu optimum. Penentuan waktu inkubasi optimum dilakukan dengan mereaksikan 0,1 mL α -amilase terhadap 1 mL amilosa pada pH 5 dan suhu ruang dengan membuat variasi waktu inkubasi antara 20 sampai 40 menit dengan rentang 5 menit. Hasil inkubasi ditambahkan dengan DNS dan diukur untuk mengetahui unit aktivitas tertinggi antara rentang tersebut. Perlakuan ini diulang terhadap waktu inkubasi yang memberikan unit aktivitas tertinggi dengan rentang yang lebih kecil (2 menit). Hal serupa dilakukan terhadap penentuan pH dan suhu optimum inkubasi dimana rentang pH yang digunakan adalah 4,0-6,0 dengan interval 0,5 dan diteruskan terhadap pH yang memberikan hasil uji unit aktivitas tertinggi dengan interval 0,2. Demikian juga dengan penentuan suhu optimum dilakukan inkubasi pada variasi kondisi suhu antara 20-40 °C dengan interval 5 °C dan diteruskan terhadap suhu yang memberikan hasil uji unit aktivitas tertinggi dengan interval 2°C.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

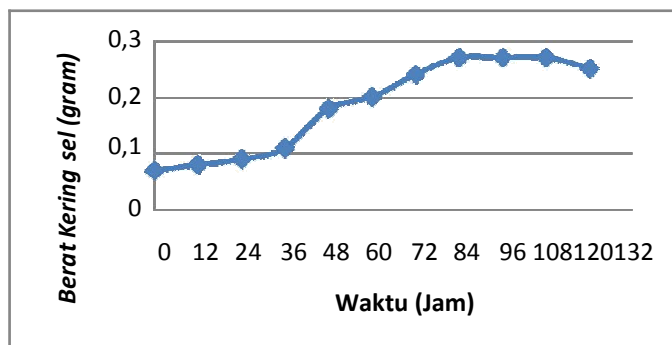
3.1 Peremajaan *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012

Isolat *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012 diremajakan terlebih dahulu agar menghasilkan α -amilase secara optimal. Tahap selanjutnya isolat khamir *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012 dipindahkan dari media isolat murni kedalam media agar miring PDA secara berulang sebanyak tiga kali. Perlakuan tersebut bertujuan untuk memastikan jenis

mikroba yang digunakan serta menghindari kontaminasi atau mutasi. Proses pemindahan pada media padat dilakukan untuk menyiapkan nutrisi bagi mikroba dalam proses penyimpanan. Langkah selanjutnya dilakukan pemindahan pada media fermentasi cair tujuannya untuk mengaktifkan *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012 dan siap untuk digunakan dalam proses fermentasi.

3.2 Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012

Proses isolasi α -amilase dari *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012 perlu dilakukan pembuatan kurva pertumbuhan. Kurva pertumbuhan merupakan kurva yang menggambarkan fase pertumbuhan dari mikroorganisme selain itu untuk mengetahui waktu terjadinya fase eksponensial yang akan digunakan dalam proses isolat α -amilase. Grafik kurva pertumbuhan khamir *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012 dapat dilihat pada Gambar 3.1



Gambar 3.1 Kurva pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012 yang dihitung setiap 12 jam.

Berdasarkan kurva pertumbuhan diatas jam ke 12 terjadi fase adaptasi sedangkan pada jam ke 24 sampai 72 terjadi fase eksponensial, dimana puncak fase eksponensial terjadi pada jam ke 72 yang ditandai dengan kenaikan masa sel *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012. Fase eksponensial ditandai dengan pembelahan sel secara cepat membutuhkan gula sederhana sebagai sumber energi dalam jumlah yang banyak pula, sehingga pada fase ini mikroba akan menyekresikan α -amilase yang berperan dalam pemecahan amilosa menjadi gula sederhana.

3.3. Produksi α -Amilase

Langkah awal dalam proses produksi α -amilase yaitu pembuatan *starter* khamir *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012.

Kemudian pemberian media *starter* pada media fermentasi dengan volume yang lebih besar. Komposisi media produksi tersebut memiliki komposisi yang sama dengan media fermentasi dalam proses peremajaan (tabel 2.1). Pada media ini amilosa digunakan sebagai sumber karbon untuk memproduksi α -amilase.

Isolat *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012 ditumbuhkan sampai waktu eksponensialnya, yaitu 72 jam atau 3 hari (sesuai dengan data kurva pertumbuhan dimana *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012). Pemanenan yang dilakukan pada waktu yang terlalu singkat akan menghasilkan enzim yang sedikit karena, mikroba yang belum beradaptasi dengan lingkungannya^[9]. Nutrien yang berbentuk polimer tidak dapat memasuki sel mikroba secara langsung. Polimer ini akan dicerna terlebih dahulu oleh enzim-enzim ekstraseluler yang di sekresikan oleh mikroba (Suhartono, 1989). Produksi enzim-enzim mikrobial memanfaatkan amilosa sebagai substrat untuk menghasilkan α -amilase.

Hasil produksi α -amilase dilanjutkan dengan disentrifugasi untuk memisahkan media yang mengandung α -amilase dengan sel

Saccharomyces cerevisiae FNCC 3012 sehingga dihasilkan filtrat yang berisi ekstrak kasar enzim dan terpisah dari sel khamir serta sisa-sisa media yang tidak larut. Sentrifugasi pada suhu dingin bertujuan untuk meminimalkan kerusakan enzim. Sel

Saccharomyces cerevisiae FNCC 3012 yang berukuran lebih besar dibandingkan dengan enzim ekstraselulernya akan mengalami gaya sentrifugal yang lebih besar pada kecepatan radial dan jarak putar yang sama^[9]. Akibatnya, sel akan mengendap dan enzim akan tetap berada pada bagian filtrat.

3.4. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat

Pemurnian protein dengan menggunakan amonium sulfat merupakan salah satu metode pemurnian awal pada enzim. Pemilihan amonium sulfat didasarkan pada tingkat kelarutan garam amonium sulfat yang

besar sehingga mudah berinteraksi dengan molekul air^[5]. Ekstrak kasar α -amilase yang bebas sel, diendapkan dengan amonium sulfat. Pengendapan α -amilase dilakukan dengan variasi tingkat kejenuhan amonium sulfat yaitu, 0-20% (Fraksi 1), 20-40% (fraksi 2), 40-60% (fraksi 3), 60-80% (fraksi 4), dan 80-100% (fraksi 5).

Pengendapan dengan garam menggunakan prinsip *salting out* dimana kelarutan protein akan berkurang pada konsentrasi garam yang tinggi. Konsentrasi garam yang meningkat mengakibatkan air akan lepas dari protein yang menyebabkan terjadinya penempelan ikatan hidrofobik dari satu protein dengan protein yang lain menghasilkan endapan^[5]. Penambahan garam dilakukan secara perlahan pada suhu dingin sambil dilakukannya pengadukan, pengkondisian suhu dingin dilakukan karena terjadi peningkatan suhu akibat proses pelarutan yang di bantu dengan *magnetic stirrer*. Supernatan enzim yang bebas sel yang telah di tambahkan dengan amonium sulfat didiamkan selama semalam. Pemisahan supernatan dan endapan protein dilakukan dengan sentrifugasi.

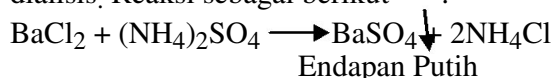
3.5 Dialisis Enzim dengan Membran Selofan

Proses dialisis dilakukan untuk memisahkan atau menghilangkan molekul garam amonium sulfat dan ion-ion pengganggu lainnya. Kantung ini akan melewati zat terlarut dengan berat molekul di bawah 10000 D. Bufer yang ada diluar kantung memiliki konsentrasi lebih rendah dari pada konsentrasi bufer yang ada di dalam kantung.

Menghindari kontaminan dari bahan logam, maka kantung dialisis terlebih dahulu direbus selama 10 menit dalam larutan EDTA alkali lalu dicuci dan direbus kembali dengan air bebas ion^[7]. Dialisis dilakukan di lingkungan yang dingin untuk mengurangi terjadinya penurunan aktivitas enzim. Pengadukan dengan kecepatan rendah bertujuan untuk mempermudah keluarnya molekul berukuran kecil dari kantung dialisis dan mencegah molekul tersebut terkonsentrasi disekitar kantung.

Pada proses dialisis keberadaan amonium sulfat diharapkan sudah tidak ada

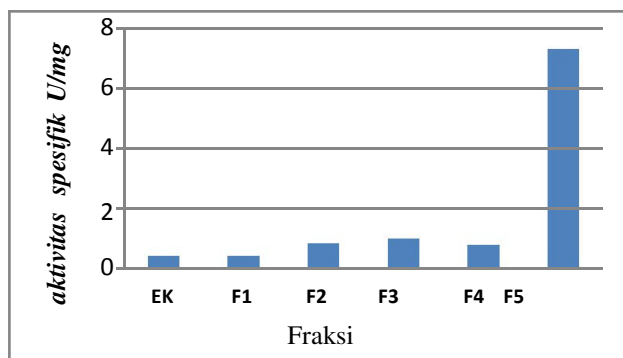
karena amonium sulfat akan mengganggu kerja enzim. Keberadaan amonium sulfat didalam katong dialisis diuji dengan menambahkan BaCl₂ kedalam larutan bufer yang berada diluar kantung dialisis. Reaksi sebagai berikut^[17] :



Endapan putih yang nampak dalam percobaan adalah endapan BaSO₄ yang berwarna putih. Garam BaSO₄ memiliki tingkat kelarutan yang rendah dalam pelarut air sehingga akan tampak sebagai endapan putih..

3.6 Penentuan Aktivitas α -Amilase

Unit aktivitas enzim didasarkan perhitungan pada kurva standar maltosa dengan DNS (3,5-dinitrosalisilat) menggunakan metode Bernfeld^[2]. Penentuan jumlah kadar protein didasarkan pada perhitungan pada kurva standar BSA. Penentuan aktivitas spesifik α -amilase dengan membandingkan unit aktivitas enzim dengan kadar protein. Berikut hasil aktivitas spesifik enzim dari tiap fraksi α -amilase



Gambar.4.2 Aktivitas spesifik α -amilase dari *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012

Data pada Gambar 4.2 menunjukkan bahwa fraksi dengan nilai aktivitas tertinggi berada pada fraksi 5 sebesar 7,28 Unit/mg protein, hal ini mengindikasikan bahwa pada fraksi tersebut keberadaan α -amilase paling banyak. Aktivitas spesifik merupakan rasio antara unit aktivitas enzim dengan kadar protein total dalam miligram. Unit aktivitas enzim dalam penelitian ini didefinisikan sebagai kemampuan α -amilase untuk menghidrolisis amilosa menjadi maltosa sebanyak 1 mg/mL.

3.7. Pemurnian Kromatografi Filtrasi Gel

Enzim yang mempunyai aktivitas yang tinggi dilakukan pemurnian lebih lanjut dengan menggunakan filtrasi gel. Matriks yang digunakan adalah *sephadex* G-100. *Sephadex* G-100 dapat digunakan untuk memisahkan protein yang memiliki berat molekul 4000-150000 D^[16], oleh karena itu, *sephadex* G-100 cukup baik digunakan karena berat molekul dari α -amilase adalah 50.000 D - 10.000 D.

Hasil purifikasi menggunakan kromatografi filtrasi gel terdiri dari 50 fraksi yang kemudian diukur unit aktivitas α -amilase dan kadar proteinnya. Hasil yang diperoleh pada fraksi 21, 22, 23 (T₁) dan 39, 40 (T₂). Kemunculan aktivitas pada 2 fraksi yang berbeda diakibatkan karena, berat molekul α -amilase memiliki 2 jenis yakni α -amilase yang memiliki berat molekul sekitar 50.000 D dan setiap molekulnya mengandung 1 ion Ca²⁺, serta dimer α -amilase yang memiliki berat molekul sekitar 100.000 Dalton. Enzim dengan BM 50.000 merupakan monomer α -amilase. Enzim dimer terjadi bila ada ion Zn²⁺ dan kedua enzim dihubungkan melalui ion Zn²⁺ tersebut^[16] efek munculnya dimer α -amilase mengakibatkan aktivitas α -amilase meningkat pada dua kelompok fraksi yang berlainan.

Hasil pemurnian menunjukkan bahwa aktivitas spesifik dari penggabungan fraksi 21, 22, 23 memiliki yang tinggi yaitu sebesar 7,91 unit/mg protein, sehingga gabungan fraksi yang dikarakterisasi.

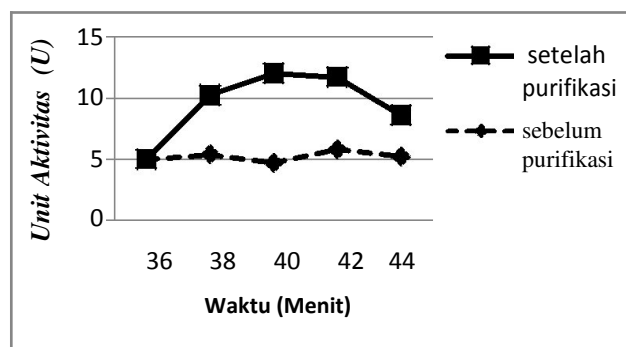
3.8 Karakterisasi A-amilase

Karakterisasi α -amilase bertujuan untuk menentukan kondisi optimum kerja enzim agar reaksi enzimatik dapat berjalan dengan optimal.

3.8.1 Waktu inkubasi Optimum

Pada reaksi enzimatik waktu inkubasi merupakan waktu kontak antara enzim dan substrat sehingga produk yang dihasilkan juga sedikit. Bertambahnya waktu kontak memungkinkan seluruh enzim berperan untuk merubah substrat menjadi produk, akan terjenuhi oleh substrat sehingga tidak terjadi penambahan produk dan memungkinkan terjadinya reaksi balik terjadinya kompleks

substrat menjadi enzim bebas. Penentuan waktu inkubasi optimum dilakukan dengan mengujikan α -amilase pada berbagai variasi.

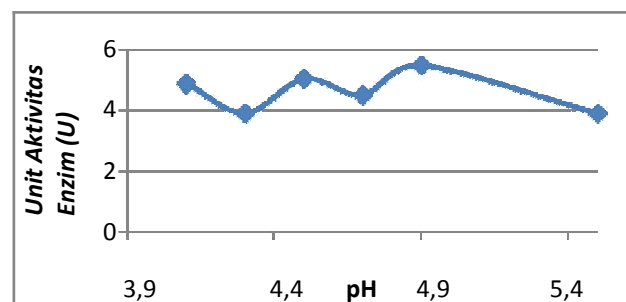


Gambar. 4.6 Pengaruh waktu inkubasi sebelum purifikasi α -amilase dari *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012

Berdasarkan pada Gambar 4.6, menunjukkan bahwa waktu inkubasi optimum sebelum purifikasi adalah 42 menit sedangkan waktu inkubasi optimum setelah purifikasi adalah 40 menit. Hal ini dikarenakan, α -amilase sebelum dipurifikasi masih banyak senyawa lain yang menghambat kerja, sehingga reaksi enzimatisnya akan lebih lama dibandingkan dengan α -amilase setelah purifikasi. Unit aktivitas pada waktu inkubasi optimum α -amilase sebelum purifikasi dan setelah purifikasi berturut-turut 5,8 U dan 7,33 U.

8.2 Nilai pH Optimum

Kondisi pH reaksi enzimatis mempengaruhi kemampuan enzim dalam menghidrolisis substrat, oleh karena itu, diperlukan penggunaan bufer untuk menjaga kondisi pH reaksi. Nilai pH bufer yang tidak tepat dapat menyebabkan terganggunya interaksi antara substrat dengan enzim^[7].



Gambar. 4.5 Pengaruh variasi pH α -amilase hasil dari isolasi *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012.

Gambar 4.5 menunjukkan bahwa α -amilase setelah purifikasi memiliki aktivitas optimum pada pH 4,9. Unit aktivitas enzim pada pH 4,9 ini adalah 5,5 unit

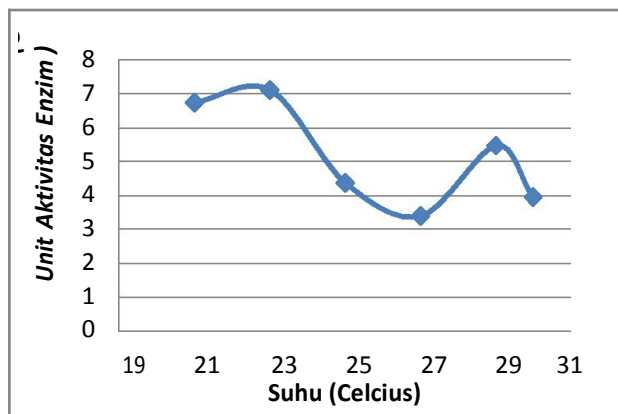
Kondisi pH berpengaruh terhadap aktivitas enzim, karena perubahan muatan dapat mempengaruhi aktivitasnya akan terganggu, dimana perubahan tersebut berakibat pada perubahan muatan residu asam amino yang berfungsi mengikat substrat. Perubahan ion H^+ yang ada dalam larutan enzim memberikan efek pada bagian katalitik dan konformasi enzim. Pemilihan pH bufer yang tidak tepat dapat menyebabkan terganggunya interaksi substrat dengan enzim. Perubahan pH yang ekstrim akan menyebabkan enzim mengalami denaturasi karena terganggunya interaksi-interaksi non kovalen yang menjaga kestabilan struktur tiga dimensi enzim.

3.8.3 Suhu Optimum

Pada reaksi enzimatis, suhu berperan dalam meningkatkan interaksi antara substrat dengan enzim. Penelitian ini dilakukan penentuan suhu optimum pada α -amilase pada rentang suhu, 21°C sampai 30°C.

Grafik 4.4 menunjukkan bahwa suhu inkubasi optimum berada pada suhu 23°C yang ditandai dengan peningkatan aktivitas enzim setelah melewati suhu 23°C aktivitas enzim mengalami penurunan. Aktivitas enzim pada suhu 23°C adalah 7,125 U.

Aktivitas enzim akan semakin meningkat sejalan dengan kenaikan suhu sampai tingkat optimalnya dan sesudah itu aktivitas enzim akan mengalami penurunan karena enzim mengalami denaturasi protein. Gambar 4.4 menunjukkan kenaikan aktivitas kembali pada suhu 29°C, hal tersebut dimungkinkan karena adanya kelompok enzim amilase yang lain seperti glukamilase.



Gambar. 4.4. Pengaruh suhu terhadap unit aktivitas α -amilase hasil dari isolasi *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012

4. KESIMPULAN

Penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa. α -amilase dapat diisolasi dari khamir *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012. Aktivitas spesifik α -amilase hasil isolasi dari *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012 mengalami kenaikan sebesar 8,65 % setelah dilakukan purifikasi Kondisi optimum kerja α -amilase yaitu waktu inkubasi optimum sebelum dan setelah purifikasi filtrasi gel berturut-turut sebesar 42 menit dan 40 menit, suhu optimum setelah purifikasi 23⁰C, dan pH optimum setelah purifikasi sebesar 4,9.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Behal,A, Singht,J, Sarma, Puri,P, Batra.,2006, Characterization of Alkaline α -amilase from *Bacillus sp.* ab 04, International Journal of Agiculture and Biologi, 80-83.
- [2] Bernfeld, P., 1955, *Amylases α and β* , Dalam Colowick, S.P. and N.O. Kaplan (Eds), *Methods in Enzymology and Related of Biochemistry*. Academic Press, New York.
- [3] Dynnar.N., 2011, *Pemurnian dan karakterisasi enzim katepsin dan ikan bandeng (Chanos chanos Forskall)*. Skripsi Institut Pertanian Bogor.
- [4] El-Safey E.M., dan Ammar M.S., 2004, *Purification and Characterization of α -amilase Isolated from Aspergillus falvus var. Columnaris*, Ass. Univ. Bull. Environ. Res. Vol. 7 No. 1, March 2004.
- [5] Harris ELV. 1989. *Protein Purification Methods: A Practical Approach*. England:IRS Press, 152-170.
- [6] Ozcan, Numan. 2001. *Heterologous Expression of Genes in the Yeast Saccharomyces cerevisiae*. Turk J Agric, 45-49.
- [7] Puspita, 2007, *Studi Karakterisasi Kitosanase dari Isolat Bacillus licheniformis MB-2* , Skripsi Institut Pertanian Bogor, 30-61.
- [8] Pacheco R.A.C., Carvalho J.C.M., Converti A., Perego P., Tavares L.C., dan Sato S., 2004, *Production of α -amilase and Glucoamilase from Different Starches by a New Trichoderma sp. Isolate*, Annals of Microbiology, 54 (2), 169-180 (2004).
- [9] Rachmadani, D., 2007. *Mempelajari Pemurnian Enzim Kitosanase Termotabil dari Isolat Bacillus licheniformis MB-2 Asal Tampaso, Manado, Sulawesi Utara*, Skripsi Institut Pertanian Bogor, 25-39.
- [10] Reddy NS, Nimmagadda A & Rao KR. 2003., *An overview of themicrobial α -Amylase family*,
- [11] Sivaramakrishnan.S., Gangadharan.D., Madhavan. K., Ricardo,C., Pandey.A., 2006, *α -amilase from microbial souces – An Overview on Recent Developments*, ISSN 1330-9862, 173-174.
- [12] Sobreira A.G., Nascimento R.S., Taborda M.L., CunhaMorales A.A., Pepe deMoraes L., Araripe F.G.T., SoniaMaria dan Jos' e C.U., 2011, *Biochemical And Structural Characterization Of Amy1: An Alpha-Amylase Fromcryptococcus Flavus Expressed In Saccharomyces Cerevisiae*, AGE-Hindawi access to research. Springer-Verlag, 2-5.
- [13] Suhartono, M. T., 1989, *Enzim dan Bioteknologi*, Pusat Antar Universitas, IPB Bogor, 172-220.
- [14] Svehla, G., 1990, *Buku Teks Analisis Anorganik Kualitatif Makro dan Semimikro*, PT Kalman Media Pustaka, Jakarta, 295-297.
- [15] Walsh, G. 2002, *Protein (Biochemistry and Biotechnology)*, John Willey & Sons, LTD.
- [16] Winarno,F.G. 1986, *Enzim Pangan*, PT. Gramedia, Jakarta, 57-58.
- [17] Zaenudin, R., 2005, *Pemanfaatan Khamir saccharomyces cerevisiae*, wartazoa vot. 15 no. I
- [18] Ul-Haq-Ikram, Abdullah Roheena, Ashraf Hamad dan Hussain Athar Shah, 2002, *Isolation and Screening of Fungi for Biosynthesis of Alpha Amilase*, Biotechnology, Volume 1 Number 2-4, 61-66.