

## ISOLASI, PURIFIKASI DAN KARAKTERISASI $\alpha$ -AMILASE DARI *Trichoderma viride* FNCC 6013

Dwi Surya Atmaja, Wuryanti, Khairul Anam

Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan, Universitas Diponegoro

### ABSTRAK

Isolasi, purifikasi dan karakterisasi  $\alpha$ -amilase dari *Trichoderma viride* FNCC 6013 dilakukan untuk mendapatkan  $\alpha$ -amilase yang diisolasi dari *Trichoderma viride* FNCC 6013, mengetahui aktivitas spesifik  $\alpha$ -amilase hasil isolasi sebelum dan sesudah purifikasi filtrasi gel serta mengetahui karakteristik enzim tersebut yang meliputi waktu inkubasi, pH dan suhu optimum. Alfa amilase merupakan kelompok enzim amilolitik yang menghidrolisis amilosa menjadi gula sederhana seperti maltosa. Alfa amilase yang berhasil diisolasi dipurifikasi awal menggunakan pengendapan garam amonium sulfat dan diteruskan dengan pemurnian lebih lanjut menggunakan metode kromatografi filtrasi gel. Pengukuran aktivitas spesifik  $\alpha$ -amilase setelah dipurifikasi menggunakan kromatografi filtrasi gel menunjukkan kenaikan sebesar 381,91% dibandingkan dengan aktivitas spesifik sebelum filtrasi gel, dimana aktivitas spesifik sebelum dan sesudah purifikasi filtrasi gel berturut-turut sebesar 1,631 Unit/mg protein dan 7,860 Unit/mg protein. Hasil karakterisasi  $\alpha$ -amilase menunjukkan waktu inkubasi optimum enzim ini sebesar 28 menit, pH optimum 4,7 dan suhu optimum sebesar 28 °C.

Kata kunci: *Trichoderma viride*,  $\alpha$ -amilase, filtrasi gel, dan karakterisasi.

### ABSTRACT

Isolation, purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from *Trichoderma viride* FNCC 6013 were doing to get an  $\alpha$ -amylase from *Trichoderma viride* FNCC 6013, to get value of specific activity before and after purification by gel filtration and to know the characteristic this enzyme like time incubation, pH and optimum temperature. Alpha amylase is amylolytic enzyme that hydrolysis soluble starch to produce simple sugar like maltose. Alpha amylase was isolated continued with first purification using ammonium sulphate and chromatograph gel filtration. The measured specific activity of  $\alpha$ -amylase after purified by gel filtration show increased 381.91% more than before purified by gel filtration whereas specific activity before and after purification by gel filtration is 1.631 Unit/mg protein and 7.860 Unit/mg protein. The characteristic of  $\alpha$ -amylase show that optimum time incubation is 28 minute, value of optimum pH is 4.7 and optimum temperature is 28 °C.

Key words: *Trichoderma viride*,  $\alpha$ -amylase, gel filtration, and characterization.

### 1. PENDAHULUAN

Alfa amilase (EC 3.2.1.1,  $\alpha$ -1,4-glucan-glucanohydrolase) adalah enzim yang menghidrolisis amilosa menghasilkan gula sederhana seperti maltosa dan dekstrin. Enzim tersebut memecah pati secara acak pada ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosida, akan tetapi tidak memberikan efek terhadap ikatan  $\alpha$ -1,6-glikosida yang terdapat pada struktur amilopektin<sup>[8]</sup>. Alfa amilase banyak digunakan dalam industri seperti industri gula, industri bir, dan monosodium glutamat (MSG)<sup>[1]</sup>. Kebutuhan  $\alpha$ -amilase sangat besar, sekitar 30% dari total produksi enzim dunia adalah  $\alpha$ -amilase, oleh karena itu meskipun telah banyak

diisolasi dan dikristalisasi, eksplorasi sumber  $\alpha$ -amilase yang lebih efisien masih dibutuhkan<sup>[2]</sup>.

Alfa amilase dapat ditemukan dari beberapa sumber diantaranya tumbuhan, hewan (saliva dan pankreas), dan mikroorganisme. Akan tetapi sumber yang berasal dari mikroorganisme dianggap lebih menguntungkan karena mudah ditumbuhkan pada kondisi yang terkontrol dengan baik serta mampu menghasilkan enzim dalam jumlah yang lebih banyak<sup>[10]</sup>. Alfa amilase yang dihasilkan dari kapang lebih stabil terhadap modifikasi seperti proses imobilisasi jika dibandingkan

dengan  $\alpha$ -amilase dari kelompok bakteri<sup>[9]</sup>. Hal tersebut mendukung perlunya mencari jenis kapang yang potensial menghasilkan  $\alpha$ -amilase.

Penelitian sebelumnya<sup>[7]</sup>, menunjukkan bahwa genus *Trichoderma* mampu menghasilkan  $\alpha$ -amilase dan glukoamilase dari berbagai jenis sumber amilum. Hal ini mendasari dilakukannya isolasi amilase dari genus *Trichoderma* dan lebih spesifik terhadap spesies *Trichoderma viride*.

Penggunaan  $\alpha$ -amilase hasil isolasi secara langsung dinilai kurang efektif karena aktivitas enzimnya masih rendah, sehingga diperlukan proses yang dapat meningkatkan aktivitas enzim. Salah satu cara untuk meningkatkan aktivitas enzim yaitu dengan memurnikan enzim tersebut. Pemurnian dalam penelitian ini dilakukan dengan kromatografi filtrasi gel menggunakan matriks *sephadex G-100*. Penggunaan kromatografi filtrasi gel untuk pemurnian enzim lebih menguntungkan karena pada proses tersebut tidak terjadi ikatan antara enzim yang akan dipisahkan dengan matriksnya, sehingga struktur dan aktivitas enzim relatif tidak berubah oleh pengaruh matriks<sup>[4]</sup>.

Aktivitas enzim dalam mendegradasi substrat menjadi produk selain dipengaruhi oleh tingkat kemurniannya, juga dipengaruhi oleh kondisi lingkungan. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan karakterisasi  $\alpha$ -amilase hasil isolasi untuk menentukan kondisi waktu inkubasi pH dan suhu optimum  $\alpha$ -amilase dalam menghidrolisis amilosa.

## 2. METODOLOGI

### 2.1 Alat dan Bahan

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

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biakan murni kapang *Trichoderma viride* FNCC 6013, aquades, media *PDA* (*potato dextros agar*), amilosa

1%, larutan *follin ciocalteau*, *yeast extract*, pepton,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{I}_2$  dalam KI, larutan maltosa, *DNS* (*3,5 dinitrosalisilat acid*),  $\text{NaOH}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , *BSA* (*Bovin Serum Albumin*),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{BaCl}_2$ , *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  $121^\circ\text{C}$  tekanan 2 atm selama 20 menit, termasuk dalam hal ini media cair untuk produksi enzim  $\alpha$ -amilase

### 2.3 Peremajaan *Trichoderma viride* FNCC 6013

*Trichoderma viride* FNCC 6013 yang berasal dari isolat murni diambil sebanyak satu kawat ose dan diinokulasikan pada media agar miring *PDA* (*potato dextro agar*) secara berulang sampai tiga kali. Setelah itu dilakukan pemindahan inokulum pada erlenmeyer yang berisi media fermentasi cair secara aseptik. Media fermentasi tersebut kemudian diinkubasi pada inkubator bergoyang.

**Tabel 1:** Komposisi media fermentasi<sup>[11]</sup>

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

### 2.4 Penentuan Kurva Pertumbuhan *Trichoderma viride* FNCC 6013

Sebanyak 13 buah tabung masing-masing diisi dengan 50 mL media fermentasi dalam bufer asetat pH 5 kemudian disterilisasi. Sebanyak 12 buah tabung masing-masing ditambahkan 1 mL inokulum kapang *Trichoderma viride*

FNCC 6013 secara aseptik dan satu buah yang lain dijadikan sebagai kontrol. Kemudian 13 tabung tersebut diinkubasi menggunakan inkubator bergoyang pada suhu ruang. Selanjutnya sampel diambil

tiap 24 jam sekali selama kurun waktu 12 hari untuk diukur berat keringnya.

### 2.5 Produksi $\alpha$ -amilase

Sebanyak 1 mL inokulum *Trichoderma viride* FNCC 6013 hasil peremajaan dipindahkan secara aseptik kedalam media fermentasi dengan volume 100 mL sebagai starter. Sebanyak 5 mL starter *Trichoderma viride* FNCC 6013 dipindahkan secara aseptik kedalam media fermentasi dengan volume 500 mL sebagai kultur produksi. Media fermentasi ini diinkubasi selama sembilan hari sesuai dengan kurva pertumbuhan. Setelah itu, media pertumbuhan tersebut disaring dengan kertas saring lalu disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 15 menit untuk memisahkan filtrat dan endapan.

### 2.6 Fraksinasi $\alpha$ -amilase dengan Amonium Sulfat

Kedalam larutan ekstrak kasar enzim ditambahkan amonium sulfat sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan lambat, hingga mencapai tingkat kejenuhan tertentu dimana tingkat kejenuhan 0-20% dikelompokkan menjadi fraksi 1 (F1), 20-40% fraksi 2 (F2), 40-60% fraksi 3 (F3), 60-80% fraksi 4 (F4) dan 80-100% fraksi 5 (F5). Selanjutnya endapan dibiarkan selama satu malam untuk mencapai kesetimbangan. Setelah itu disentrifugasi pada suhu 4 °C dengan kecepatan 4000 rpm selama 20 menit. Hasil sentrifugasi akan terpisah antara filtrat dan endapan. Filtrat yang diperoleh dilanjutkan untuk tahap fraksinasi selanjutnya, sedangkan endapan dilarutkan dengan bufer asetat 0,05 M pH 5.

### 2.7 Dialisis $\alpha$ -amilase Hasil Fraksinasi

Proses dialisis dilakukan dengan memasukkan masing-masing fraksi kedalam membran selofan dan merendamnya dalam bufer asetat 0,05 M dan diaduk dengan *magnetic stirrer* pada suhu 5 °C. Bufer asetat diganti tiap dua jam sekali hingga tidak ada amonium sulfat yang tersisa. Pengujian adanya amonium

sulfat dalam bufer dilakukan dengan menambahkan larutan BaCl<sub>2</sub>.

### 2.8 Penentuan Aktivitas $\alpha$ -amilase

Penentuan aktivitas  $\alpha$ -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.

### 2.9 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.

### 2.10 Kromatografi kolom filtrasi gel

Sebanyak 2 mL fraksi enzim dengan nilai aktivitas spesifik tertinggi yang diperoleh dari pengendapan amonium sulfat (F3), dimasukkan ke dalam kolom dengan matriks *sephade 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.

### 2.11 Karakterisasi $\alpha$ -Amilase

Karakterisasi  $\alpha$ -amilase meliputi penentuan waktu inkubasi optimum, pH dan suhu optimum. Penentuan waktu inkubasi optimum dilakukan dengan mereaksikan 0,1 mL  $\alpha$ -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 variasi pH yang digunakan antara 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

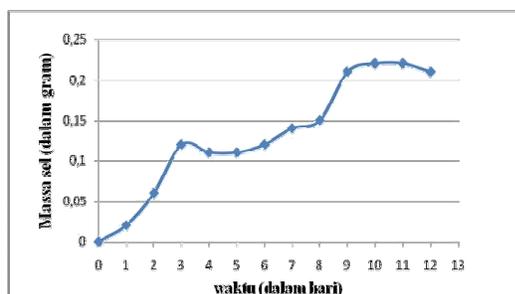
### 3.1 Peremajaan *Trichoderma viride* FNCC 6013

Proses peremajaan *Trichoderma viride* FNCC 6013 dilakukan dengan memindahkan isolat murni ke dalam media *PDA (potato dextro agar)* secara aseptik dan berulang. Perlakuan pemindahan secara berulang dilakukan untuk memastikan jenis mikroba yang digunakan serta menghindari kontaminasi atau mutasi. Setelah dilakukan pemindahan pada media padat, inokulum *Trichoderma viride* FNCC 6013 dipindahkan pada media fermentasi cair agar menjadi aktif dan siap untuk digunakan sebagai *starter* dalam proses fermentasi selanjutnya. Komposisi media fermentasi cair mengandung amilosa sebagai sumber karbon agar *Trichoderma viride* FNCC 6013 menghasilkan enzim  $\alpha$ -amilase.

### 3.2 Pembuatan kurva pertumbuhan *Trichoderma viride* FNCC 6013

Kurva pertumbuhan merupakan kurva yang menggambarkan fase pertumbuhan dari mikroorganisme dan pembuatannya bertujuan untuk mengetahui waktu panen paling baik dalam proses fermentasi. Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan berdasarkan berat kering sel. Hal ini dilakukan karena kapang *Trichoderma viride* FNCC 6013 tidak homogen dalam medium pertumbuhannya sehingga tidak memungkinkan dilakukan pengukuran pertumbuhan dengan metode spektroskopi *UV-Vis*. Pengukuran berat kering

*Trichoderma viride* FNCC 6013 dilakukan setiap 24 jam dimana media tumbuh disaring, dikeringkan dengan oven dan desikator secara berulang sampai massanya tetap kemudian ditimbang massanya. Gambar I. berikut merupakan fase pertumbuhan *Trichoderma viride* FNCC 6013.



**Gambar I.** Kurva pertumbuhan *Trichoderma viride* FNCC 6013

Berdasarkan kurva tersebut, hari pertama merupakan fase adaptasi. Hari kedua sampai hari kesembilan merupakan fase eksponensial yang ditandai dengan kenaikan massa sel dari *Trichoderma viride* FNCC 6013 secara signifikan, hal tersebut mengindikasikan bahwa pada range waktu tersebut *Trichoderma viride* FNCC 6013 membelah dengan cepat. Fase eksponensial yang ditandai dengan pembelahan sel secara cepat membutuhkan gula sederhana sebagai sumber energi dalam jumlah yang banyak pula, sehingga pada fase ini mikroba akan menyekresikan  $\alpha$ -amilase yang berperan dalam pemecahan amilosa menjadi gula sederhana seperti maltosa dalam jumlah yang banyak. Hal ini yang mendasari dilakukannya massa panen pada fase eksponensial yang berada pada hari kesembilan. Hari ke 10 sampai hari ke 12 merupakan fase stasioner.

### 3.3 Produksi $\alpha$ -amilase

Produksi  $\alpha$ -amilase diawali dengan membuat *starter*. *Starter* disiapkan sebagai sumber mikroba yang akan mengawali fermentasi dalam proses produksi enzim  $\alpha$ -amilase. *Starter Trichoderma viride* FNCC 6013 diambil 5 mL dan diinokulasikan dalam media fermentasi sebanyak 500 mL. Selanjutnya media fermentasi diinkubasi selama sembilan hari sesuai dengan data kurva pertumbuhan dimana *Trichoderma viride* FNCC 6013 mencapai puncak fase eksponensial pada hari kesembilan. Selanjutnya setelah mencapai waktu sembilan hari, media fermentasi tersebut disaring dengan kertas saring untuk memisahkan massa selnya. Filtrat hasil

saringan dilanjutkan dengan sentrifugasi untuk memisahkan spora atau sel mikroba yang lolos pada saat penyaringan. Filtrat yang diperoleh dari hasil sentrifugasi merupakan ekstrak kasar  $\alpha$ -amilase ekstraseluler.

### 3.4 Fraksinasi dengan Amonium Sulfat

Ekstrak kasar  $\alpha$ -amilase diendapkan dengan menambahkan garam amonium sulfat pada berbagai tingkat kejenuhan. Selanjutnya endapan dibiarkan selama satu malam dalam kondisi dingin untuk mencegah terjadinya kerusakan enzim serta untuk mencapai kesetimbangan. Setelah itu dilakukan sentrifugasi pada suhu 4 °C dengan kecepatan 4000 rpm selama 20 menit untuk memisahkan protein yang terendapkan pada tingkat kejenuhan sebelumnya. Filtrat yang diperoleh diteruskan dengan tingkat kejenuhan yang berbeda. Amonium sulfat pada konsentrasi tinggi akan mengendapkan komponen protein (termasuk enzim) sehingga diperoleh enzim bebas dari komponen non protein. Amonium sulfat banyak digunakan untuk mengendapkan protein karena kelarutannya tinggi, harga murah, dan umumnya tidak mempengaruhi struktur protein<sup>[9]</sup>. Enzim yang diperoleh pada tahap ini adalah enzim yang lebih murni dari ekstrak kasar enzim  $\alpha$ -amilase.

### 3.5 Dialisis

Proses dialisis dalam penelitian ini dilakukan untuk membebaskan protein dari garam amonium sulfat. Hal ini dilakukan karena adanya amonium sulfat dalam protein enzim akan menghambat kerja katalisis enzim. Prinsip dialisis adalah difusi, yakni terjadinya aliran zat terlarut dari konsentrasi tinggi ke konsentrasi rendah yang melalui membran semi permeabel. Membran selofan memiliki ukuran tertentu yang hanya akan melewatkan ion-ion berukuran kecil seperti ion amonium dan sulfat tetapi protein yang memiliki ukuran besar akan tertahan di dalam membran. Proses difusi ini akan mencapai kesetimbangan saat laju aliran

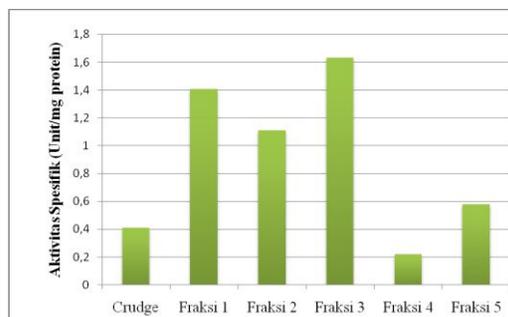
amonium sulfat keluar membran sama dengan laju kembalinya amonium sulfat kedalam membran. Saat mencapai kestimbangan, bufer yang digunakan sebagai pelarut harus diganti agar proses dialisis tetap berjalan sampai semua amonium sulfat yang ada dalam suspensi protein dapat keluar. Identifikasi bebasnya amonium sulfat dilakukan dengan menambahkan larutan  $BaCl_2$  ke dalam bufer yang digunakan. Proses ini dihentikan sampai tidak terbentuk endapan putih pada saat penambahan  $BaCl_2$ .

### 3.6 Uji Aktivitas $\alpha$ -amilase

Hidrolisis amilosa oleh  $\alpha$ -amilase mengakibatkan amilosa dikonversi menjadi maltosa dan maltotriosa. Hidrolisis maltotriosa dalam keadaan miskin substrat adalah reaksi lanjutan yang menghasilkan glukosa [9].

Aktivitas  $\alpha$ -amilase diukur dengan menggunakan metode Bernfeld<sup>[3]</sup>, dimana total gula pereduksi ditentukan menggunakan reagen *DNS* (3,5-dinitrosalicylic acid). Aktivitas enzim didasarkan perhitungan pada kurva standar maltosa (untuk penentuan unit aktivitas enzim) dan kurva standar protein (untuk penentuan kandungan protein).

Fraksi dengan nilai aktivitas spesifik tertinggi merupakan fraksi dengan jumlah enzim paling banyak dibandingkan fraksi lain, sehingga kemungkinan menemukan enzim lebih besar dimana aktivitas spesifik merupakan rasio antara unit aktivitas enzim dengan total protein dalam miligram. Hal ini berarti aktivitas spesifik menggambarkan tingkat kemurnian suatu enzim. Unit aktivitas dalam penelitian ini didefinisikan sebagai kemampuan  $\alpha$ -amilase untuk menghidrolisis amilosa menjadi maltosa sebanyak 1 mg/mL. Berikut adalah diagram masing-masing fraksi dengan nilai aktivitas spesifiknya.



**Gambar II.** Diagram aktivitas spesifik tiap fraksi

Berdasarkan diagram diatas, maka fraksi ketiga merupakan fraksi dengan nilai aktivitas spesifik tertinggi sebesar 1,631 Unit/mg protein. Hal ini mengindikasikan bahwa pada fraksi tersebut keberadaan protein enzim paling banyak dibandingkan dengan fraksi lain. Tahap selanjutnya fraksi tersebut akan diteruskan pemurniannya menggunakan kromatografi filtrasi gel sedangkan fraksi lain disimpan sebagai koleksi.

### 3.7 Pemurnian $\alpha$ -amilase dengan Filtrasi Gel

Proses filtrasi gel ini menggunakan bufer asetat 0,05 M sebagai eluen. Sedangkan fase diam yang digunakan adalah *sephadex G-100* dengan kisaran pemisahan 4-150 kD<sup>[11]</sup>. Matriks *Sephadex G-100* tersusun atas ikatan silang dekstran dengan epiklorhidrin. Porositas dari matriks merupakan penentu batasan dari molekul yang dapat dipisahkan, struktur *sephadex G-100* terdiri dari bagian hidrofobik (dapat larut dalam pelarut non polar) dan bagian hidrofilik (dapat larut dalam pelarut polar)<sup>[11]</sup>. Protein yang teradsorbsi dalam *sephadex G-100* mengalami ikatan hidrogen, tarikan dipol-dipol dan gaya london. Semua pergerakan partikel zat terlarut dan pelarut terjadi dalam jarak antar partikel gel, sedangkan didalam partikel gel tidak ada pergerakan zat terlarut. Aliran larutan bufer memutuskan interaksi antara *sephadex G-100* dengan protein secara perlahan, sehingga protein itu terbawa sampai ke dasar kolom.

Molekul dalam larutan pada filtrasi gel dipisahkan berdasarkan perbedaan ukurannya ketika molekul itu melewati gel *sephadex*

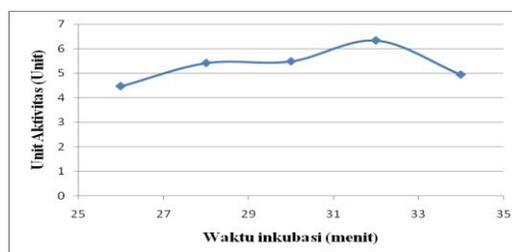
yang memiliki ukuran pori tertentu. Molekul dengan ukuran pori yang lebih kecil akan terperangkap dalam matriks dan molekul dengan ukuran yang lebih besar akan terelusi bersama eluen. Laju elusi proses filtrasi gel diatur sedemikian rupa sehingga laju alirnya sebesar 6 tetes tiap menit, hal ini dilakukan untuk menghindari efek gravitasi. Jika laju alirnya terlalu besar, maka proses filtrasi menjadi tidak optimal.

### 3.8 Aktivitas $\alpha$ -amilase Hasil Pemurnian dengan Filtrasi Gel

Aktivitas  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dengan filtrasi gel memiliki aktivitas spesifik yang lebih besar jika dibandingkan dengan aktifitas  $\alpha$ -amilase sebelum dilakukan pemurnian. Perbedaan aktivitas enzim terlihat secara signifikan, hal ini terjadi karena tingkat kemurnian enzim sebelum dan sesudah dilakukan purifikasi berbeda. Fraksi dengan aktivitas tinggi hasil purifikasi menggunakan filtrasi gel terdapat pada fraksi 10 dan 11 dengan nilai aktivitas spesifik masing-masing sebesar 7,860 Unit/mg protein dan 7,122 Unit/mg protein. Selain itu terdapat tiga fraksi lain yang nilai aktivitas spesifiknya mendekati fraksi terbaik yaitu fraksi 24, 25 dan 26 dengan nilai aktivitas spesifik masing-masing sebesar 6,570 Unit/mg protein, 6,360 Unit/mg protein, 6,860 Unit/mg protein. Fraksi terbaik hasil purifikasi menggunakan filtrasi gel dikelompokkan menjadi satu, hal ini didasarkan pada asumsi bahwa nilai aktivitas spesifik yang berdekatan dalam fraksi yang berturut-turut adalah kelompok protein enzim yang sama karena proses filtrasi gel memisahkan protein berdasarkan bobot molekulnya. Fraksi 10 dan 11 digabung menjadi satu dan dikelompokkan menjadi fraksi T1 dengan aktivitas spesifik sebesar 7,320 Unit/mg protein sedangkan fraksi 24, 25, dan 26 digabung menjadi satu dan dikelompokkan menjadi fraksi T2 dengan aktivitas spesifik sebesar 6,336 Unit/mg protein.

### 3.9 Karakterisasi $\alpha$ -amilase Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Waktu inkubasi merupakan waktu kontak antara enzim dan substrat untuk menghasilkan produk. Waktu inkubasi yang terlalu singkat mengakibatkan hanya sedikit enzim yang berikatan dengan substrat, sedangkan pada waktu inkubasi yang terlalu panjang seluruh enzim telah terjenuhi oleh substrat sehingga tidak terjadi penambahan produk dan memungkinkan terjadinya reaksi balik terurainya kompleks enzim substrat menjadi enzim bebas dan substrat kembali sehingga produk yang dihasilkan semakin sedikit. Selain itu dalam beberapa kasus, penambahan produk juga memungkinkan terjadinya inhibisi balik pada enzim.



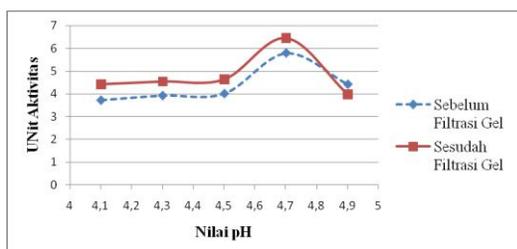
**Gambar III.** Waktu inkubasi optimum  $\alpha$ -amilase dalam menghidrolisis substrat amilosa menjadi maltosa

Grafik diatas menggambarkan pengaruh waktu inkubasi enzim dengan substrat. Unit aktivitas tertinggi dicapai pada waktu inkubasi selama 32 menit dengan nilai unit aktivitas sebesar 6,34 Unit/mL. Setelah waktu tersebut seluruh enzim telah terjenuhi substrat sehingga tidak terjadi penambahan aktivitas.

### Penentuan pH Optimum

Penentuan pH optimum dalam penelitian ini dilakukan terhadap enzim sebelum dan sesudah purifikasi filtrasi gel. Kondisi pH berpengaruh terhadap aktivitas enzim, dimana aktivitas  $\alpha$ -amilase baik sebelum maupun setelah purifikasi lanjutan menggunakan filtrasi gel mengalami peningkatan sampai pada pH 4,7 (pH optimum) dengan unit aktivitas setelah purifikasi sebesar 6,46 Unit/mL dan unit

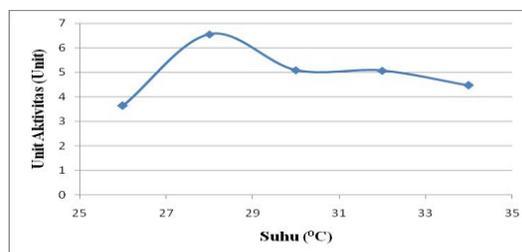
aktivitas sebelum purifikasi sebesar 5,79 Unit/mL. Perubahan pH mempengaruhi muatan total protein enzim yang dapat mempengaruhi aktivitasnya, baik dengan perubahan struktur maupun dengan perubahan muatan pada residu asam amino yang berfungsi mengikat substrat [6]. Berikut adalah grafik unit aktivitas terhadap perubahan pH masing-masing hasil pengujian dari fraksi terbaik sebelum dan sesudah purifikasi menggunakan filtrai gel.



**Gambar IV.** Nilai pH optimum  $\alpha$ -amilase sebelum dan sesudah filtrasi gel dalam menghidrolisis substrat amilosa menjadi maltosa.

#### Penentuan Suhu Optimum

Suhu berperan dalam meningkatkan interaksi antara substrat dengan enzim dalam suatu reaksi enzimatik. Aktivitas  $\alpha$ -amilase mengalami peningkatan sampai pada suhu 28<sup>0</sup> C (suhu optimum) dengan unit aktivitas sebesar 6,55 Unit/mL. Kenaikan aktivitas enzim di bawah suhu optimum disebabkan karena kenaikan energi kinetika molekul-molekul yang bereaksi. Kondisi dimana suhu tetap dinaikkan terus, mengakibatkan energi kinetik molekul-molekul enzim menjadi besar sehingga memecahkan ikatan lain selain ikatan kovalen seperti ikatan hidrogen yang mempertahankan enzim dalam bentuk aslinya, akibatnya struktur sekunder dan tersier hilang sehingga aktivitas enzim menurun. Berikut adalah grafik unit aktivitas terhadap perubahan suhu.



**Gambar V.** Suhu optimum  $\alpha$ -amilase dalam menghidrolisis substrat amilosa menjadi maltosa.

#### 4. KESIMPULAN

Alfa amilase dapat diisolasi dari *Trichoderma viride* FNCC 6013 menggunakan media fermentasi dengan keberadaan amilosa sebagai sumber karbonnya. Tingkat kemurnian  $\alpha$ -amilase yang teramati sebagai aktivitas spesifik mengalami kenaikan sebesar 381,91%. Kondisi kerja optimum  $\alpha$ -amilase hasil isolasi yaitu waktu inkubasi selama 32 menit, pH 4,7 dan suhu 28<sup>0</sup> C.

#### 5. DAFTAR PUSTAKA

- [1] Afifi A.F., Kamel E.M., Khalil A.A., Foad M.A., Fawzi E.M., dan Houseny M.M., 2008, *Purification and Characterization of  $\alpha$ -amylase from Penicillium olsonii under the Effect of Some Antioxidant Vitamins*, Global Journal of Biotechnology and Biochemistry 3 (1): 14-21.
- [2] Ahmadi A., Ghobadi S., Khajeh K., Nomanpour B., dan Badoei A.D., 2010, *Purification of  $\alpha$ -amylase from Bacillus sp. GHA1 and it's Partial Characterization*, J. Iran. Chem. Soc., vol. 7, No. 2, June 2010, pp. 432-440.
- [3] Bernfeld, P., 1955, *Amylases  $\alpha$  and  $\beta$* , Dalam Colowick, S.P. and N.O. Kaplan (Eds), *Methods in Enzymology and Related of Biochemistry*. Academic Press, New York.
- [4] El-Safey E.M., dan Ammar M.S., 2004, *Purification and Characterization of  $\alpha$ -amylase Isolated from Aspergillus falvus var. Columnaris*, Ass. Univ. Bull. Environ. Res. Vol. 7 No. 1, 93-99.
- [5] Harsono Y., 2001, *Pemurnian enzim  $\alpha$ -amilase dengan Menggunakan Filtrasi Gel*, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Bogor, 7-9.
- [6] Murray, R.K., Granner, D.K., and Victor, R.W. 2009. *Biokimia Harper*. EGC Penerbit Buku Kedokteran Jakarta. 68-69.
- [7] Pacheco R.A.C., Carvalho J.C.M., Converti A., Perego P., Tavares L.C., dan Sato S., 2004,

- Production of  $\alpha$ -amylase and Glucoamylase from Different Starches by a New Trichoderma sp. Isolate*, Annals of Microbiology, 54 (2), 169-180.
- [8] 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*, SAGE-Hindawi access to research, enzyme research, volume 2011, Article ID 157294, 2-5.
- [9] Suganthi, R., Benazir, J.F., Santhi R., Kumar R.V., Hari A., Meenakshi N., Nidhiya K.A., Kavitha G., dan Lakshmi R., 2011, *Amylase Production by Aspergillus niger under Solid State Fermentation Using Agroindustrial Wastes*, Internentional Journal of Engineering Science and Technology (IJEST), 1736-1739.
- [10] Suhartono, M.T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor. 172-220.
- [11]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.
- [12]Wijaya, Rudi, 2005, *Karakteristik Enzim Serupa Tripsin dari Cacing Tanah*, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor, 24-39.