

## Peningkatan Kestabilan Enzim $\alpha$ -amilase dengan Penambahan Sorbitol

### Increasing Stability of $\alpha$ -amylase with The Addition of Sorbitol

Yandri<sup>1</sup>, Fitri Wahyuningsih<sup>1</sup>, Tati Suhartati<sup>1</sup>, Heri Satria<sup>1</sup>, dan Sutopo Hadi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Lampung, Jl. Sumantri Brojonegoro 1, Bandar Lampung-35145, Indonesia

\*The corresponding author : [yandri.as@fmipa.unila.ac.id](mailto:yandri.as@fmipa.unila.ac.id)

**Abstrak.** Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh penambahan sorbitol terhadap kestabilan enzim  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dari *Aspergillus fumigatus*. Pemurnian enzim dilakukan dengan fraksinasi menggunakan ammonium sulfat dan dialisis. Aktivitas enzim ditentukan dengan metode Fuwa dan Mandels, kadar protein ditentukan dengan metode Lowry. Hasil penelitian menunjukkan enzim hasil pemurnian memiliki pH optimum 5,0 dan suhu optimum 50 °C. Aktivitas spesifik enzim  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian, yaitu 0,1297 U/mg, meningkat 2,3 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim yang mempunyai aktivitas spesifik 0,0544 U/mg. Enzim setelah penambahan sorbitol 0,5; 1; dan 1,5 M memiliki pH optimum dan suhu optimum yang sama, yaitu pH 5,5 dan suhu 50 °C. Stabilitas termal enzim hasil pemurnian ditunjukkan dengan nilai: konstanta laju inaktivasi ( $k_i$ ) = 0,018 menit<sup>-1</sup>; waktu paruh ( $t_{1/2}$ ) = 38,5 menit; dan perubahan energi akibat denaturasi ( $\Delta G_i$ ) = 101,1 kJ/mol. Stabilitas termal enzim setelah penambahan sorbitol 0,5 M ditunjukkan dengan nilai:  $k_i$  = 0,013 menit<sup>-1</sup>,  $t_{1/2}$  = 53,3 menit,  $\Delta G_i$  = 101,9 kJ/mol; sorbitol 1 M:  $k_i$  = 0,015 menit<sup>-1</sup>,  $t_{1/2}$  = 46,2 menit,  $\Delta G_i$  = 101,6 kJ/mol; dan sorbitol 1,5 M:  $k_i$  = 0,01 menit<sup>-1</sup>,  $t_{1/2}$  = 69,3 menit,  $\Delta G_i$  = 102,6 kJ/mol. Penambahan sorbitol pada enzim  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dari *A. fumigatus* dapat meningkatkan kestabilan termal enzim sebanyak 1,2-1,8 kali dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian yang ditunjukkan dengan peningkatan waktu paruh, peningkatan  $\Delta G_i$ , dan penurunan nilai  $k_i$ .

**Kata kunci:**  $\alpha$ -amilase, sorbitol, *Aspergillus fumigatus*.

**Abstract.** This study aims to study the effect of sorbitol addition on the stability of the  $\alpha$ -amylase enzyme purified from *A. fumigatus*. The enzyme purification was carried out by fractionation using ammonium sulfate and dialysis. Enzyme activity was determined by the Fuwa and Mandels methods, protein content was determined by the Lowry method. The results showed that the purified enzyme had an optimum pH of 5.0 and an optimum temperature of 50°C. The specific activity of the purified  $\alpha$ -amylase, namely 0.1297 U/mg, increased 2.3 times compared to the crude extract of the enzyme which had a specific activity of 0.0544 U/mg. The enzyme resulted from the addition of sorbitol 0.5; 1; and 1.5 M has the same optimum pH and optimum temperature, namely pH 5.5 and temperature of 50 °C. The thermal stability of the purified enzyme was indicated by the values: constant rate of inactivation ( $k_i$ ) = 0.018 min<sup>-1</sup>; half-life ( $t_{1/2}$ ) = 38.5 min; and the energy change due to denaturation ( $\Delta G_i$ ) = 101.1 kJ/mol. The thermal stability of the enzyme after the addition of 0.5 M sorbitol was shown by the values:  $k_i$  = 0.013 min<sup>-1</sup>,  $t_{1/2}$  = 53.3 min,  $\Delta G_i$  = 101.9 kJ/mol; sorbitol 1 M:  $k_i$  = 0.015 min<sup>-1</sup>,  $t_{1/2}$  = 46.2 min,  $\Delta G_i$  = 101.6 kJ/mol; and 1.5 M sorbitol:  $k_i$  = 0.01 min<sup>-1</sup>,  $t_{1/2}$  = 69.3 min,  $\Delta G_i$  = 102.6 kJ/mol. The addition of sorbitol to the  $\alpha$ -amylase enzyme purified from *A. fumigatus* can increase the thermal stability of the enzyme 1.2-1.8 times compared to the enzyme purified as indicated by an increase in half-life, increase in  $\Delta G_i$ , and decrease in the value of  $k_i$ .

**Keywords:**  $\alpha$ -amylase, *A. fumigatus*, sorbitol.

## 1. Pendahuluan

Enzim merupakan biokatalisator yang banyak dimanfaatkan dalam dunia industri dan dapat bekerja pada reaksi-reaksi dalam proses konversi suatu senyawa menjadi senyawa lain tanpa menimbulkan senyawa-senyawa lain yang berbahaya dan dapat menyebabkan terjadinya pencemaran lingkungan. Enzim pada umumnya bekerja pada kondisi fisiologis, bekerja selektif dan spesifik, dan tidak membutuhkan energi yang tinggi [1], dan dapat meningkat laju reaksi yang luar biasa dibandingkan katalis biasa, menghasilkan produk beribu kali lebih tinggi, bekerja pada pH dan suhu yang tidak terlalu ekstrim, serta bersifat spesifik dan selektif terhadap substrat tertentu [2] dan dapat digunakan secara berulang melalui proses amobilisasi [3, 4, 5, 6, 7, 8].

Enzim  $\alpha$ -amilase adalah enzim yang menghidrolisis pati secara acak dari tengah atau dari bagian dalam molekul, oleh sebab itu disebut enzim endo amilase [9]. Enzim  $\alpha$ -amilase dapat dihasilkan dengan mengisolasi dari berbagai jenis mikroorganisme baik bakteri maupun jamur. Jamur dalam kelompok *Aspergillus* khususnya memiliki kemampuan dalam proses metabolik perubahan senyawa-senyawa, terutama dapat memproduksi protein dengan baik, sehingga memudahkan untuk proses isolasi dan pemurniannya. *A. fumigatus* merupakan kelompok *Aspergillus* dan mikroorganisme ini dapat digunakan dengan baik dalam bidang industri [10] untuk menghasilkan enzim  $\alpha$ -amilase yang selanjutnya dapat digunakan sebagai katalis industri.

Pada proses-proses di industri diperlukan enzim, yaitu enzim yang bekerja secara optimum pada suhu antara 60–125°C [11], dan dapat bekerja pada pH yang asam maupun basa. Misalnya pada pembuatan sirup gula cair dari pati, untuk mengubah pati menjadi dekstrin diperlukan enzim yang dapat bertahan dan mempunyai aktivitas yang tinggi pada suhu sekitar 60°C [12]. Kondisi ini tidak dimiliki sebagian besar enzim, karena umumnya enzim hanya dapat bekerja pada kondisi biasa dan akan mengalami denaturasi dan kehilangan aktivitasnya pada suhu dan pH yang ekstrim [13]. Untuk memenuhi kebutuhan industri terhadap enzim yang stabil pada kondisi ekstrim tersebut dapat dilakukan dengan peningkatan stabilitas enzim. Penambahan zat aditif merupakan salah satu cara yang dapat dipilih untuk meningkatkan kestabilan enzim.

Beberapa jenis zat aditif yang dapat digunakan untuk meningkatkan kestabilan enzim di antaranya sorbitol, xilitol, maltodekstrin, PEG 6000, gliserol, sukrosa, dan beberapa jenis poliol lainnya. Pada penelitian ini digunakan zat aditif berupa sorbitol dikarenakan memiliki beberapa kelebihan di antaranya dapat mempertahankan konformasi enzim, meningkatkan stabilitas, dan dapat menjaga struktur enzim dari degradasi oleh suhu.

Pemilihan poliol ini didasarkan pada penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Yandri dan Wulandari [14] tentang penambahan sorbitol terhadap kestabilan enzim  $\alpha$ -amilase dari *Rhizopus oryzae*, dan hasil penelitian menunjukkan bahwa enzim dengan penambahan sorbitol meningkat kestabilannya 5 kali dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Penelitian terhadap enzim tripsin menunjukkan penambahan sorbitol dapat meningkatkan kestabilan enzim tripsin sebanyak 16 kali [15]. Sedangkan penambahan sorbitol pada enzim selulase *Aspergillus niger* L-51 dapat meningkatkan kestabilan enzim 1,5 – 1,6 kali [16].

Pada penelitian ini penambahan sorbitol pada enzim  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dari *A. fumigatus* dapat meningkatkan kestabilan termal enzim sebanyak 1,2-1,8 kali dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian.

## 2. Bahan dan Metode

### 2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah: alat-alat gelas, jarum ose, pembakar spiritus, autoclave model S-90N, laminar air flow CURMA model 9005-FL, neraca analitik, mikropipet Eppendroff, spatula, batang pengaduk, sentrifuga, lemari pendingin, shaker incubator, water bath, pH meter, termometer, pengaduk magnet, penangas, kantong selofan, dan spektrofotometer UV-Vis Hitachi U2010.

## 2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah: Ammonium sulfat, kalium dihidrogen fosfat, urea, magnesium sulfat, ferro klorida berair kristal, seng sulfat berair kristal, kobalt klorida, kalsium klorida, Pati kentang, pepton, aquades, larutan BSA (*Bovine Serum Albumin*), natrium karbonat, natrium hidroksida, kupri sulfat berair kristal, *follin ciocalteau*, natrium kalium tartrat, natrium dihidrogen fosfat, dinatrium hidrogen fosfat, larutan I<sub>2</sub>, asam klorida 1N, kalium iodida, DNS (*3,5-Dinitrosalicylic acid*), NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, fenol, kantong selofan, kertas saring, sorbitol dan bahan kimia lain yang berderajat pro analisis. Jamur *A. fumigatus* yang digunakan diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi jurusan Biologi Universitas Lampung.

## 2.3 Prosedur Penelitian

### 2.3.1 Isolasi dan pemurnian enzim

Enzim  $\alpha$ -amilase diisolasi menggunakan sentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 20 menit untuk memisahkan enzim yang larut dari komponen lain yang tidak larut. Larutan yang peroleh disebut ekstrak kasar enzim. Enzim  $\alpha$ -amilase dimurnikan dengan pengendapan menggunakan ammonium sulfat dengan berbagai tingkat kejenuhan dan dilanjutkan dengan dialisis [17].

### 2.3.2 Penentuan aktivitas enzim dan kadar protein enzim

Aktivitas enzim ditentukan berdasarkan penurunan intensitas kompleks pati dengan iodium menggunakan metode Fuwa [18] dan berdasarkan glukosa yang terbentuk menggunakan metode Mandels [19], sedangkan kadar protein enzim ditentukan dengan metode Lowry [20].

### 2.3.3 Penambahan sorbitol pada enzim hasil pemurnian

Larutan sorbitol ditambahkan pada enzim hasil pemurnian dengan konsentrasi 0,5 M; 1 M; dan 1,5 M dengan perbandingan 1:1, menghasilkan enzim hasil pemurnian dan sorbitol 0,5 M (Sorbitol 0,5 M), enzim hasil pemurnian dan sorbitol 1 M (Sorbitol 1 M), serta enzim hasil pemurnian dan sorbitol 1,5 M (Sorbitol 1,5 M).

## 2.4 Karakterisasi enzim $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dan setelah penambahan sorbitol

### 2.4.1 Penentuan pH optimum enzim $\alpha$ -amilase hasil pemurnian

Penentuan pH optimum enzim  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dilakukan dengan memvariasikan pH dengan variasi: 4; 4,5; 5,0; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; dan pH 8. Enzim dengan masing-masing variasi pH diinkubasi selama 30 menit pada suhu optimum enzim hasil pemurnian pada suhu 50°C. Aktivitas enzim ditentukan berdasarkan glukosa yang terbentuk menggunakan metode Mandels. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 510 nm.

### 2.4.2 Penentuan suhu optimum enzim $\alpha$ -amilase hasil pemurnian

Suhu optimum enzim  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian ditentukan dengan memvariasikan suhu dengan variasi: 35; 40; 45; 50; 55; 60; 65; dan 70°C. Enzim dengan masing-masing variasi suhu diinkubasi selama 30 menit pada pH optimum enzim hasil pemurnian pada pH 5,0. Aktivitas enzim ditentukan berdasarkan glukosa yang terbentuk menggunakan metode Mandels dan absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 510 nm.

### 2.4.3 Penentuan pH optimum enzim setelah penambahan sorbitol

Penentuan pH optimum enzim setelah penambahan sorbitol dengan konsentrasi 0,5; 1; dan 1,5 M (Sorbitol 0,5 M; Sorbitol 1 M dan Sorbitol 1,5 M), dilakukan dengan memvariasikan pH dengan variasi: 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; dan pH 8. Enzim setelah penambahan sorbitol diinkubasi selama 30 menit pada suhu 50 °C. Aktivitas enzim ditentukan berdasarkan glukosa yang terbentuk menggunakan metode Mandels. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 510 nm.

### 2.4.4 Penentuan suhu optimum enzim setelah penambahan sorbitol

Suhu optimum enzim setelah penambahan sorbitol dengan konsentrasi 0,5; 1; dan 1,5 M (Sorbitol 0,5M; Sorbitol 1 M; dan Sorbitol 1,5 M), ditentukan dengan memvariasikan suhu dengan variasi: 35; 40; 45; 50; 55; 60; 65; dan 70°C. Enzim setelah penambahan sorbitol diinkubasi selama 30 menit pada pH 5,5. Aktivitas enzim ditentukan berdasarkan glukosa yang terbentuk menggunakan metode Mandels dan absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 510 nm.

#### 2.4.5 Penentuan stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan setelah penambahan sorbitol

Kestabilan termal enzim ditentukan dengan mengukur aktivitas sisa enzim [21], setelah diinkubasi selama periode waktu 100 menit pada suhu dan pH optimum enzim hasil pemurnian dan setelah penambahan sorbitol. Aktivitas enzim diukur tiap interval waktu inkubasi 10 menit berdasarkan glukosa yang terbentuk menggunakan metode Mandels dan absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 510 nm.

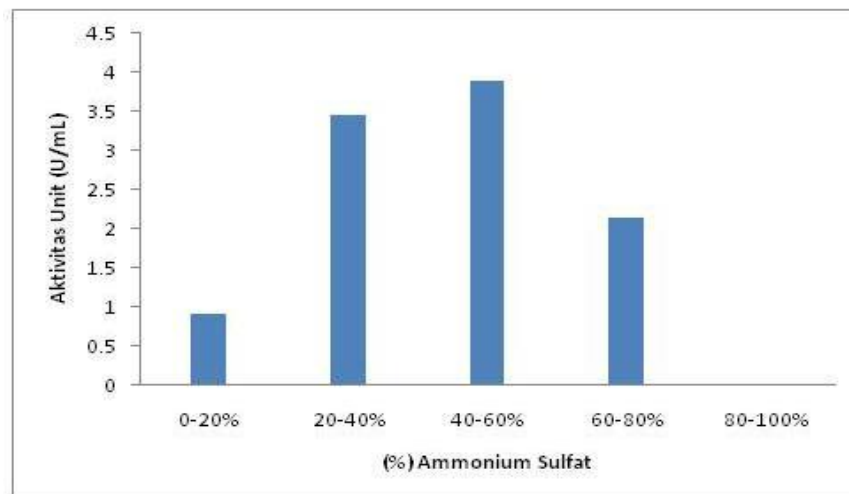
Penentuan waktu paruh ( $t_{1/2}$ ), konstanta laju inaktivasi ( $k_i$ ), dan perubahan energi akibat denaturasi ( $\Delta G_i$ ), dilakukan dengan menggunakan persamaan kinetika inaktivasi orde 1 [22].

### 3. Hasil Penelitian dan Pembahasan

#### 3.1 Isolasi dan pemurnian enzim $\alpha$ -amilase

Isolasi enzim  $\alpha$ -amilase dari *A. fumigatus* dilakukan dengan memisahkan ekstrak kasar enzim dari komponen seluler lainnya dengan menggunakan sentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 5.000 rpm. Ekstrak kasar enzim diuji aktivitasnya menggunakan metode Fuwa yang menghasilkan aktivitas unit sebesar 2,2677 U/mL dan aktivitas spesifik sebesar 0,0544 U/mg.

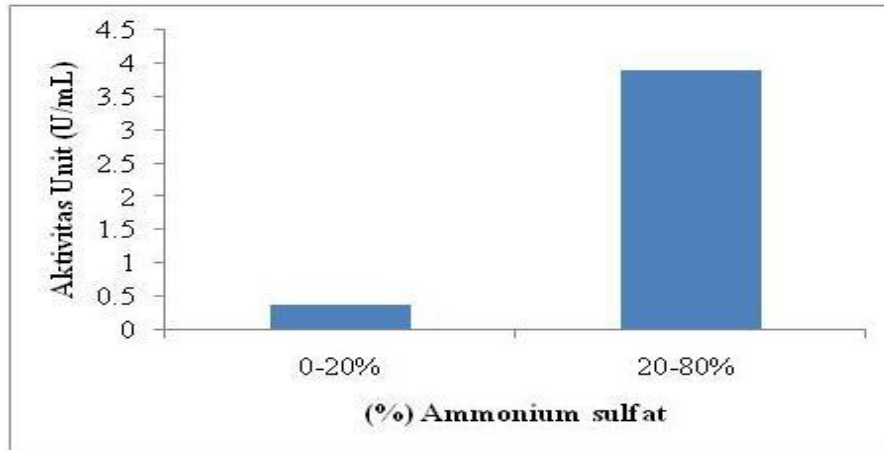
Pemurnian enzim menggunakan ammonium sulfat bertujuan untuk memisahkan enzim dari protein lain dengan cara mengendapkan protein (enzim) dengan penambahan garam ammonium sulfat. Endapan yang dihasilkan dilarutkan dengan buffer fosfat pH 6,5. Hubungan antara (%) ammonium sulfat dengan aktivitas unit enzim dengan tingkat kejenuhan 0 – 100% dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 23. Hubungan antara aktivitas unit enzim dengan tingkat kejenuhan ammonium sulfat 0-100%

Gambar 1 menunjukkan enzim  $\alpha$ -amilase memiliki aktivitas unit tertinggi pada fraksi 40-60%, yaitu sebesar 3,893 U/mL. Sedangkan aktivitas unit pada fraksi 20-40% sebesar 3,44 U/mL, dan fraksi 60-80% memiliki aktivitas unit sebesar 2,14 U/mL. Hasil yang hampir sama dilaporkan Yandri *et al.* [17] yang melakukan pemurnian pada enzim  $\alpha$ -

amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 menggunakan ammonium sulfat dan menghasilkan enzim  $\alpha$ -amilase memiliki aktivitas tertinggi pada fraksi 40 – 60%. Fraksi 20-40% dan fraksi 60-80% menunjukkan aktivitas unit yang cukup besar, sehingga untuk proses selanjutnya fraksinasi dibagi menjadi 2 tahap, yaitu 0-20% dan 20-80% agar kehilangan enzim dapat diminimalkan sehingga perolehan enzim dapat dipertahankan. Hubungan antara (%) ammonium sulfat dengan aktivitas unit enzim dengan tingkat kejenuhan 0 – 80% dapat dilihat pada Gambar 2. Gambar 2 menunjukkan enzim  $\alpha$ -amilase pada fraksi 20-80% memiliki aktivitas unit sebesar 3,9024 U/mL. Sedangkan fraksi 0-20% menunjukkan aktivitas yang kecil, yaitu 0,38 U/mL. Fraksi 20-80% digunakan untuk tahap pemurnian selanjutnya, yaitu proses dialisis.



Gambar 2. Hubungan antara aktivitas unit enzim dengan tingkat kejenuhan ammonium sulfat 0-80%.

Enzim hasil pengendapan dengan garam ammonium sulfat selanjutnya dilakukan dialisis untuk memisahkan garam yang masih ada dalam larutan enzim. Enzim hasil dialisis memiliki aktivitas unit dan aktivitas spesifik berturut-turut sebesar 3,2039 U/mL dan 0,1297 U/mg. Enzim hasil dialisis memiliki tingkat kemurnian hingga 2,3 kali lebih murni dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim. Hasil pemurnian enzim  $\alpha$ -amilase dari *A. fumigatus* dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 4. Hasil pemurnian enzim  $\alpha$ -amilase dari *A. fumigatus*

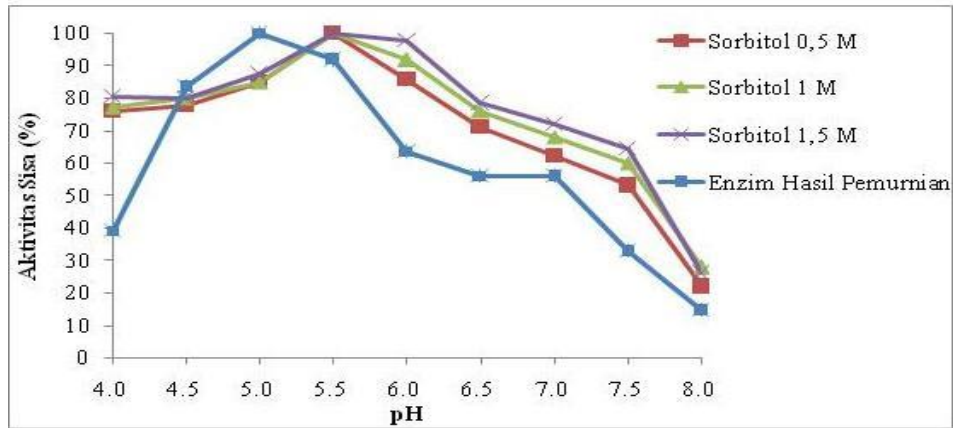
Tahap	Volume Enzim (mL)	Aktivitas Unit (U/mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Aktivitas Total (U)	Kemurnian (kali)	Hasil (%)
Ekstrak kasar	2500	2,2677	41,65	0,0544	5.669,2	1	100
Dialisis	330	3,2039	24,7	0,1297	1.057,2	2,3	19

Berdasarkan Tabel 1 dapat dilihat bahwa pemurnian enzim  $\alpha$ -amilase pada tahap dialisis menghasilkan aktivitas spesifik 0,1297 U/mg, meningkat 2,3 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim dengan perolehan 19%. Proses pemurnian sudah berlangsung dengan baik dengan terjadinya peningkatan kemurnian enzim 2,3 kali dibandingkan ekstrak kasar enzim, walaupun dengan perolehan (hasil) yang sangat kecil. Hasil ini lebih kecil dari yang dilaporkan Yandri *et al.* [17] yang melakukan pemurnian pada enzim  $\alpha$ -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148. Hasil penelitian menunjukkan terjadi peningkatan kemurnian enzim hasil fraksinasi dengan ammonium sulfat sebesar 5,7 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim dengan perolehan 47,9%. Perolehan yang sangat kecil ini kemungkinan disebabkan tidak semua enzim terendapkan pada saat fraksinasi menggunakan ammonium sulfat dan enzim banyak kehilangan aktivitas selama proses pemurnian.

### 3.2 Karakterisasi enzim $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dan setelah penambahan sorbitol

#### 3.2.1 Penentuan pH optimum enzim hasil pemurnian dan setelah penambahan sorbitol

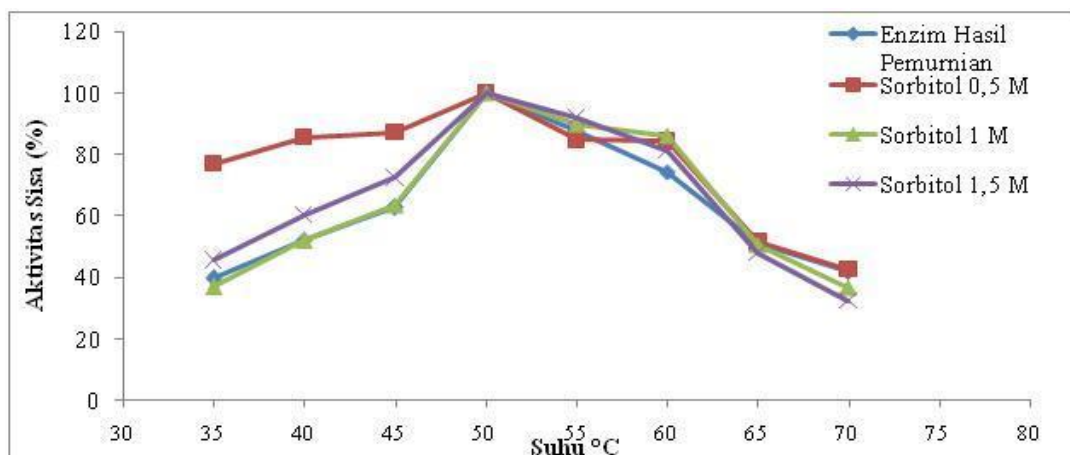
Gambar 3 menunjukkan hubungan antara pH dengan aktivitas sisa enzim hasil pemurnian dan setelah penambahan sorbitol. Terjadi pergeseran pH optimum enzim setelah penambahan sorbitol menjadi pH 5,5, sedangkan pH optimum enzim hasil pemurnian adalah pH 5,0. Gambar 3 juga menunjukkan terjadinya peningkatan kestabilan enzim  $\alpha$ -amilase setelah penambahan sorbitol pada rentang pH 6,0-7,5. Aktivitas sisa enzim setelah penambahan sorbitol pada rentang pH tersebut lebih tinggi dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian.



Gambar 3. Hubungan antara pH dan aktivitas sisa (%) enzim hasil pemurnian dan setelah penambahan sorbitol

#### 3.2.2 Penentuan suhu optimum enzim hasil pemurnian dan setelah penambahan sorbitol

Hubungan antara suhu dan aktivitas sisa enzim  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dan enzim setelah penambahan sorbitol dapat dilihat pada Gambar 4, yang menunjukkan enzim setelah penambahan sorbitol mempunyai suhu optimum yang sama dengan enzim  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian, yaitu 50°C. Meskipun tidak terjadi kenaikan suhu optimum enzim setelah penambahan sorbitol, terjadi peningkatan kestabilan enzim terutama pada suhu 55-60°C. Pada suhu 60°C, aktivitas enzim (%) hasil pemurnian sebesar 74,32% dan enzim setelah penambahan sorbitol dengan variasi (0,5; 1; dan 1,5 M) berturut-turut adalah 84,72%, 86,20%, dan 81,21%. Hasil ini menunjukkan enzim dengan penambahan sorbitol lebih stabil dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian.

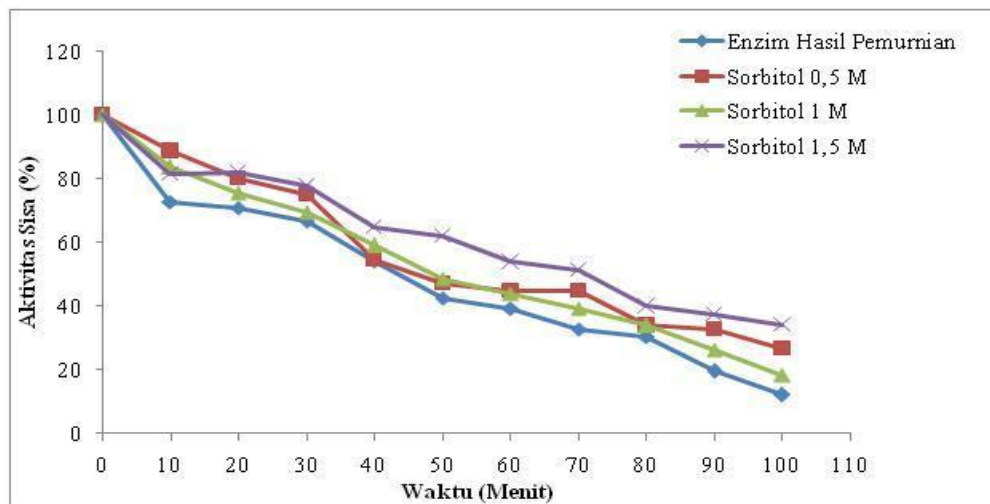


Gambar 4. Hubungan antara suhu dan aktivitas sisa (%) enzim hasil pemurnian dan enzim setelah penambahan sorbitol



### 3.2.3 Penentuan kestabilan termal enzim hasil pemurnian dan setelah penambahan sorbitol

Gambar 5 menunjukkan hubungan antara waktu dan aktivitas sisa enzim  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dan enzim setelah penambahan sorbitol. Aktivitas sisa enzim hasil pemurnian setelah inkubasi pada suhu 50 °C selama 100 menit, yaitu 12,14% dan enzim setelah penambahan sorbitol (0,5; 1; dan 1,5 M) memiliki aktivitas sisa berturut-turut, yaitu 26,73; 18,45; dan 34,22%. Hasil ini menunjukkan enzim setelah penambahan sorbitol memiliki stabilitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Enzim setelah penambahan dengan sorbitol 1,5 M memiliki kestabilan termal yang lebih baik dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian dan setelah penambahan sorbitol 0,5 M dan 1,0 M. Penambahan sorbitol pada enzim hasil pemurnian menyebabkan terbentuknya ikatan ikatan non kovalen lemah terutama ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik yang menyebabkan protein mengalami *folding* sehingga enzim menjadi lebih stabil dibandingkan dengan keadaan *unfolding*.



Gambar 5. Hubungan antara waktu dan aktivitas sisa (%) enzim  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dan enzim setelah penambahan sorbitol

### 3.2.4 Penentuan konstanta laju inaktivasi ( $k_i$ ), waktu paruh ( $t_{1/2}$ ), dan perubahan energi akibat denaturasi ( $\Delta G_i$ ), enzim hasil pemurnian dan setelah penambahan sorbitol

Nilai konstanta laju inaktivasi ( $k_i$ ), waktu paruh ( $t_{1/2}$ ), dan perubahan energi akibat denaturasi ( $\Delta G_i$ ) dapat dilihat pada Tabel 2. Nilai  $k_i$  enzim hasil pemurnian lebih tinggi dibandingkan dengan setelah penambahan sorbitol, hal ini menunjukkan bahwa enzim setelah penambahan sorbitol lebih stabil dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Penurunan nilai  $k_i$  enzim setelah penambahan sorbitol sebesar 1,8 kali dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Kazan *et al.*, (1997 [22]) melaporkan bahwa konstanta kecepatan inaktivasi ( $k_i$ ) enzim hasil modifikasi dengan dekstran-71000-dialdehid selalu lebih rendah dari konstanta kecepatan inaktivasi ( $k_i$ ) Penisilin G asilase (PGA) alami. Penurunan konstanta kecepatan inaktivasi ( $k_i$ ) PGA yang dimodifikasi dengan dekstran-71000-dialdehid adalah 7 kali. Nilai  $k_i$  semakin rendah menunjukkan bahwa enzim  $\alpha$ -amilase setelah penambahan sorbitol semakin kurang fleksibel dalam air, sehingga terjadinya *unfolding* enzim semakin berkurang [21].

Peningkatan waktu paruh dari enzim setelah penambahan sorbitol dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian menunjukkan bahwa dibutuhkan waktu yang lebih lama agar aktivitas enzim turun menjadi setengahnya. Semakin lama waktu paruh yang dimiliki enzim, maka kestabilan enzim tersebut semakin baik. Enzim setelah penambahan sorbitol pada konsentrasi 0,5 M mampu meningkatkan waktu paruh dari

38,5 menit menjadi 53,30 menit, sorbitol dengan konsentrasi 1 M meningkat dari 38,5 menit menjadi 46,2 menit, dan sorbitol dengan konsentrasi 1,5 M meningkat dari 38,5 menit menjadi 69,3 menit (1,8 kali). Hernaiz *et al.* (1999) [23] melaporkan hasil yang hampir sama, yang melakukan modifikasi kimia pada enzim lipase dari *Candida rugosa* menggunakan PEG teraktivasi, yaitu NPC-PEG, terjadi peningkatan waktu paruh enzim hasil modifikasi pada suhu 50°C dibandingkan enzim tanpa dimodifikasi dari 12 jam menjadi 25 jam (2 kali).

Peningkatan nilai  $\Delta G_i$  pada enzim setelah penambahan sorbitol, menyebabkan peningkatan kestabilan termal enzim (1,2 – 1,8 kali) dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Kenaikan  $\Delta G_i$  yang tidak terlalu besar ini juga dilaporkan oleh Kazan *et al.*, (1997) [22], yang menunjukkan terjadi peningkatan  $\Delta G_i$  enzim sebelum modifikasi (92,0 kJ mol<sup>-1</sup>) dan sesudah modifikasi (97,7 kJ mol<sup>-1</sup>), dengan peningkatan kestabilan termal enzim sebesar 7 kali. Peningkatan ( $\Delta G_i$ ) ini disebabkan karena struktur enzim setelah penambahan sorbitol menjadi lebih kaku dan tidak fleksibel, dan struktur enzim semakin kokoh sehingga diperlukan energi yang besar untuk mendenaturasi enzim tersebut.

*Tabel 5. Nilai ( $k_i$ ), ( $t_{1/2}$ ), dan ( $\Delta G_i$ ) enzim hasil pemurnian dan setelah penambahan sorbitol*

Enzim	$k_i$ (1/menit)	$t_{1/2}$ (menit)	$\Delta G_i$ (kJ/mol)
Enzim Hasil Pemurnian	0,018	38,5	101,1
Sorbitol 0,5 M	0,013	53,3	101,9
Sorbitol 1 M	0,015	46,2	101,6
Sorbitol 1,5 M	0,01	69,3	102,6

#### **4 Kesimpulan**

Enzim  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian memiliki aktivitas spesifik 0,1297 U/mg meningkat sebanyak 2,3 kali dibanding ekstrak kasar enzim yang memiliki aktivitas spesifik sebesar 0,00544U/mg. Enzim hasil pemurnian memiliki pH optimum 5,0; suhu optimum 50 °C;  $k_i = 0,018 \text{ menit}^{-1}$ ;  $t_{1/2} = 38,5 \text{ menit}$ ; dan  $\Delta G_i = 101,1156 \text{ kJ/mol}$ . Enzim setelah penambahan sorbitol 0,5; 1; dan 1,5 M memiliki pH optimum 5,5; suhu optimum 50°C. Untuk sorbitol 0,5 M:  $k_i = 0,013 \text{ menit}^{-1}$ ;  $t_{1/2} = 53,3 \text{ menit}$ ; dan  $\Delta G_i = 101,9906 \text{ kJ/mol}$ . Untuk sorbitol 1 M:  $k_i = 0,015 \text{ menit}^{-1}$ ;  $t_{1/2} = 46,2 \text{ menit}$ ; dan  $\Delta G_i = 101,6052 \text{ kJ/mol}$ . Untuk sorbitol 1,5 M:  $k_i = 0,01 \text{ menit}^{-1}$ ;  $t_{1/2} = 69,3 \text{ menit}$ ; dan  $\Delta G_i = 102,6942 \text{ kJ/mol}$ . Enzim setelah penambahan sorbitol 0,5; 1; dan 1,5 M memiliki aktivitas sisa berturut-turut sebesar 26,73%; 18,45%; dan 34,22% setelah diinkubasi pada suhu 50 °C selama 100 menit. Sedangkan enzim hasil pemurnian pada uji stabilitas termal pada suhu 50 °C selama 100 menit memiliki aktivitas sisa sebesar 12,14%. Penambahan sorbitol pada enzim  $\alpha$ -amilase dapat meningkatkan kestabilan enzim sebanyak 1,2-1,8 kali dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian ditunjukkan dengan dengan penurunan nilai  $k_i$ , peningkatan  $t_{1/2}$ , dan  $\Delta G_i$ .

#### **Ucapan Terima Kasih**

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Deputi Riset dan Pengembangan, Kementerian Riset, dan Teknologi/Badan Riset dan dan Inovasi Nasional, atas dukungan dana dalam bentuk Penelitian Dasar Sesuai dengan Kontrak Penelitian No.: 179/SP2H/ADM/LT/DRPM/2020.



**Daftar Pustaka**

- [1] Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., and Wang, X., Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, **2**(3): 1-11, 2012.
- [2] Boyer, R. F., *Modern Experimental Biochemistry*. Benjamin Cumming Publishing Company. San Francisco. 147-149, 2000.
- [3] Sirisha, V.L., Jain, A., and Jain, A., Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes. *Advances in Food and Nutrition Research*, **79**:179-211, 2016.
- [4] Yandri, Suhartati, T., Hadi, S., Immobilization of  $\alpha$ -amylase from Locale Bacteria Isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148 with Diethylaminoethyl Cellulose (DEAE-Cellulose), *Materials Research Science India*, **7** (1), 123 – 128, 2010.
- [5] Yandri, Susanti, D., Suhartati, T., and Hadi, S., Immobilization of  $\alpha$ -amylase from Locale Bacteria Isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148 with Carboxymethyl Cellulose (CM-Cellulose), *Modern Applied Science*, **6** (3), 81 – 86, 2012.
- [6] Yandri, Amalia, P., Suhartati, T., and Hadi, S., Effect of Immobilization Towards Thermal Stability of  $\alpha$ -Amylase Isolates from Locale Bacteria Isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148 with Calcium Alginate, *Asian Journal of Chemistry*, **25** (12), 6897-6899, 2013.
- [7] Yandri, Suhartati, T., Yuwono, S. D., Qudus, H.I., Tiarsa, E.R., and Hadi, S., Immobilization of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* ITBCCB148 Using Bentonit, *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*, **20** (2), 487-492, 2018.
- [8] Yandri, Suhartati, T., Satria, H., Widaymara, A., and Hadi, S., Increasing Stability of  $\alpha$ -amylase Obtained from *Bacillus subtilis* ITBCCB148 by Immobilization with Chitosan, *Mediterranean Journal of Chemistry*, **10**(2), 155-161, 2020.
- [9] Fogarty, W.M. and Kelly, C.T., *Enzyme and Fermentation Biotechnology*, Ellis Horwood Limited, West Sussex, England, 45-52, 1979
- [10] Evstatieva, Y., Nikolova, D., Getov, L., Ilieva, S., and Savov, V., Identification and Characterization of  $\alpha$ -Amylase and Endoxylanase Produced by *Aspergillus* Mutant Strains. *Biotechnology*, **24** (2):613-617, 2010.
- [11] Vieille, C. and Zeikus, J. G., Thermozymes: Identifying Molecular Determinant of Protein Structural and Functional Stability, *Tibtech.*, **14** (6), 183-189, 1996.
- [12] Godfrey, T. and Reichelt, J., *The Application of Enzymes in Industry*, Macmillan, Hampshire, 5-6, 1983.
- [13] Goddette, D.W., Terri, C., Beth, F.L., Maria, L., Jonathan, R. M., Cristian, P., Robert, B. R., Shioh, S.Y., and Wilson, C. R., Strategy and Implementation of a System for Protein Engineering, *Journal of Biotechnology*, **28**:41-54, 1993.
- [14] Yandri, dan Wulandari, P., Pengaruh Penambahan Sorbitol Terhadap Stabilitas Termal Enzim  $\alpha$ -Amilase dari *Rhizopus oryzae*, *Jurnal Sains MIPA*, **15**(2):111-118, 2009.
- [15] Pazhang, M., Mehrnejad, F., Pazhang, Y., Falahati, H., and Chaparzadeh, N., Effect of Sorbitol and Glycerol on The Stability of Trypsin and Difference Between Their Stabilization Effects in The Various Solvents, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **63**: 157-299, 2015.
- [16] Yuliasri, N.P dan Yandri, Studi Pengaruh Penambahan Sorbitol Terhadap Stabilitas Enzim Selulase dari *Aspergillus niger* L-51. *Prosiding SNSMAIPIII*. 978-602-98559-1-3, 2012.
- [17] Yandri, Suhartati, T., and Hadi, S., Purification and Characterization of Extracellular  $\alpha$ -Amilase Enzyme from Locale Bacteria Isolate *Bacillus Subtilis* ITBCCB148, *European Journal of Scientific Research*, **39**(1), 64-74, 2010.
- [18] Fuwa, H., A New Method for Microdetermination of Amylase Activity by the Use of Amylase as the Substrate, *Journal of Biochemistry*, Tokyo, **41**:583-603, 1954.
- [19] Mandels, M., Raymond, A., and Charles, R., Measurement of Saccharifying Cellulose. *Biotech and Bioeng. Symp.* No. 6, John Willey and Sons, New York, 1976.
- [20] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. R., and Randall, R. J., Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193-265, 1951.

- [21] Yang, Z., Michael, D., Robert, A., Fang, X.Y., and Alan, J.R., Polyethylene Glycol-induced Stabilization of Subtilisin, *Enzyme and Microbial Technology*, **18**, 82-89, 1996.
- [22] Kazan, D., Ertan, H., and Erarslan, A., Stabilization of *Escherichia coli* Penicillin G Acylase Against Thermal Inactivation by Cross-linking with Dextran Dialdehyde Polymers, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **48**: 191-197, 1997.
- [23] Hernaiz, M.J., Montero, J.M.S., and Sinisterra, J.V., Modification of Purified Lipases from *Candida rugosa* with Polyethylene Glycol: A systematic study, *Enzyme and Microbial Technology*, **24**, 181-190, 1999.