

## Studi Penambahan Ion Kalsium terhadap Aktivitas dan Stabilitas $\alpha$ -Amilase *Bacillus stearothermophilus* TII<sub>12</sub>

### *Study of the Addition Calcium Ion to $\alpha$ -Amylase Activity and Stability from *Bacillus stearothermophilus* TII<sub>12</sub>*

ROSMIMIK\*, NUR RICHANA, PUJI LESTARI & DJOKO SAID DAMARDJATI

Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Jalan Tentara Pelajar No. 3A, Bogor 16111

The effect of storage in liquid or freeze dried condition and calcium ion addition to activity and stability of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus stearothermophilus* TII<sub>12</sub> have been carried out. The enzyme was stored under several condition: (i) enzyme was freeze dried, (ii) enzyme was precipitated by acetone and resoluble in phosphate citrate buffer, (iii) enzyme was freeze dried after acetone precipitation and resolubilization in phosphate citrate buffer, (iv) enzyme precipitated by acetone, resoluble in phosphate citrate buffer and added by 5 mM calcium ion, and (v) enzyme was freeze dried after acetone precipitation, resolubilization in phosphate citrate buffer and added by 5 mM calcium ion. Results show after nine month storage that the best enzyme obtained in the addition of calcium ion in the freeze dried condition (79.5%).

Key words:  $\alpha$ -amylase, *Bacillus stearothermophilus*, calcium ion

Enzim adalah suatu protein yang bertindak sebagai katalisator reaksi biologi. Di antara sekian banyak enzim yang digunakan dalam industri, enzim untuk industri pangan merupakan enzim yang menguasai pasar dunia. Pada saat ini enzim yang sangat besar penggunaannya untuk biokonversi bahan berpati ialah amilase. Selain dimanfaatkan dalam industri pangan, terutama gula cair, amilase juga digunakan dalam industri tekstil dan detergen.  $\alpha$ -Amilase merupakan salah satu jenis amilase yang banyak digunakan dalam industri makanan dan minuman.  $\alpha$ -Amilase merupakan enzim komersial yang aktif pada substrat pati. Golongan  $\alpha$ -amilase yang tahan pada suhu tinggi umumnya digunakan pada proses likuifikasi, sedangkan  $\alpha$ -amilase yang bersifat labil digunakan dalam proses sakarifikasi pada pembuatan gula cair. Kegunaan  $\alpha$ -amilase dalam berbagai kondisi sangat dipengaruhi oleh stabilitas enzim tersebut.  $\alpha$ -Amilase yang tidak stabil akan tidak efektif memecah substrat karena aktivitasnya menurun. Umumnya kestabilan enzim berubah jika disimpan cukup lama.

Stabilitas enzim, termasuk  $\alpha$ -amilase dapat dipertahankan antara lain dengan teknik imobilisasi dan modifikasi kimia. Penambahan bahan tambahan atau aditif diketahui dapat pula mempertahankan stabilitas enzim. Muchtadi *et al.* (1992) menggolongkan aditif menjadi beberapa kelompok, yaitu substrat atau koenzim, ion logam, garam dan anion, gula, dan glikol, serta aditif lainnya.

*Bacillus stearothermophilus* TII<sub>12</sub> merupakan isolat unggul penghasil  $\alpha$ -amilase termotabil. Enzim ini diharapkan dapat dimanfaatkan pada proses hidrolisis pati yang bersuhu tinggi.

Tujuan penelitian ini mengetahui pengaruh penambahan bahan aditif ion kalsium terhadap stabilitas dan aktivitas  $\alpha$ -amilase.

#### BAHAN DAN METODE

**Mikroorganisme dan Media.** *Bacillus stearothermophilus* TII<sub>12</sub> yang digunakan berasal dari lumpur kawah Pegunungan Dieng, Jawa Tengah, hasil isolasi dan seleksi Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan. Media yang digunakan ialah media amilum termodifikasi (Gao *et al.* 1984) terdiri atas ekstrak ragi 0.5%, bacto tripton 0.5%, MgSO<sub>4</sub> 0.05%, CaCl<sub>2</sub> 0.5%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05%, NaCl 0.1%, dan pati ubi kayu 1%.

**Produksi Enzim.** Media amilum termodifikasi sebanyak 300 ml, pH 6.5 di dalam erlenmeyer ukuran satu liter diinokulasi dua ose TII<sub>12</sub> berumur 24 jam. Media tersebut diinkubasikan pada *orbital shaker* pada suhu 50°C, kecepatan 150 rpm selama 24 jam (Kim *et al.* 1995). Kultur *B. stearothermophilus* TII<sub>12</sub> hasil propagasi dimasukkan ke dalam fermentor ukuran lima liter yang berisi 27 l media steril yang ditambahi anti buih silikon 0.075%. Kultur dalam fermentor diinkubasi selama dua hari. Proses fermentasi dilakukan dalam kondisi terkontrol pada suhu 50°C dan pH 6.5, agitasi 300 rpm, dan aerasi 1.5 vvm.

**Perlakuan Penyimpanan.** Penyimpanan dilakukan selama sembilan bulan dan dicobakan pada lima macam perlakuan: (i) Sebanyak 100 ml enzim kasar dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian langsung dikeringbekukan pada suhu 4°C dan disimpan; (ii) 100 ml enzim kasar diendapkan dengan aseton dingin (perbandingan 2:3), didiamkan selama 24 jam pada suhu 4°C, kemudian disentrifugasi selama 30 menit. Endapan dicuci dengan air, disentrifugasi kemudian ditambahi 10 ml bufer fosfat

\* Penulis untuk korespondensi, Tel. +62-251-337975, Fax. +62-251-338820

sitrat standar (BFS) dengan pH 7, dan selanjutnya disimpan; (iii) 100 ml enzim kasar diendapkan dengan aseton dingin (perbandingan 2:3), didiamkan selama 4 jam pada suhu 4°C, kemudian disentrifugasi selama 30 menit. Endapan dicuci dengan air, disentrifugasi dan ditambahi 10 ml BFS pH 7, dikeringbekukan pada suhu 4°C dan selanjutnya disimpan; (iv) 100 ml enzim kasar diendapkan dengan aseton dingin (perbandingan 2:3), didiamkan selama 4 jam pada suhu 4°C, kemudian disentrifugasi selama 30 menit. Endapan dicuci dengan air, disentrifugasi, ditambahi 10 ml BFS pH 7, dan CaCl<sub>2</sub> 5 mM, selanjutnya disimpan pada suhu 4°C; (v) 100 ml enzim kasar diendapkan dengan aseton dingin (perbandingan 3:2), didiamkan selama 24 jam pada suhu 4°C, kemudian disentrifugasi selama 30 menit. Endapan dicuci dengan air, disentrifugasi ditambahi 10 ml BFS dengan pH 7, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, dan dikeringbekukan pada suhu 4°C.

**Pengamatan.** Pengamatan meliputi aktivitas enzim mengikuti metode Benfeld (1955). Satu unit amilase didefinisikan sebagai sejumlah enzim yang dapat menghasilkan gula reduksi sebanyak 1 µmol/menit pada kondisi pengujian. Kandungan protein ditentukan mengikuti metode Bollag dan Edelstein (1991). Aktivitas spesifik dihitung berdasarkan pada perbandingan antara aktivitas enzim dengan protein terlarut dan aktivitas sisa merupakan perbandingan antara aktivitas enzim setelah dan sebelum inkubasi.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Penyimpanan selama sembilan bulan menyebabkan penurunan aktivitas α-amilase dari berbagai macam perlakuan. Aktivitas α-amilase sebelum penyimpanan sebesar 1241.11 U/ml, setelah penyimpanan pada bulan ke-1 sampai bulan ke-9 memberikan hasil yang bervariasi (Tabel 1).

Mulai dari penyimpanan bulan ke-4 perlakuan 1 memberikan nilai aktivitas yang paling rendah dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Hal ini disebabkan enzim perlakuan 1 merupakan hasil supernatan saja tanpa mengalami proses lainnya seperti penambahan aseton dan bufer fosfat sitrat

Tabel 1. Aktivitas enzim α-amilase *Bacillus stearothermophilus* pada beberapa perlakuan penyimpanan.

Bulan	Perlakuan				
	1	2	3	4	5
1	1173.60	1109.15	1215.15	1184.89	1224.39
2	1237.47	1227.37	1270.35	1254.41	1298.73
3	1290.07	1264.72	1310.05	1268.78	1311.87
4	969.75	1297.31	1392.73	1270.24	1397.79
5	851.83	1301.47	1175.87	1451.66	1459.74
6	798.37	10322.73	939.30	1172.72	1179.37
7	698.31	987.38	807.99	1036.67	1048.19
8	636.68	876.13	796.37	980.34	998.76
9	621.67	784.31	720.31	872.69	987.36

1. Enzim kasar dikeringbekukan pada suhu 4°C; 2. enzim kasar diendapkan dengan aseton dingin, kemudian ditambahi 10 ml BFS pH 7; 3. sama dengan perlakuan 2, kemudian dikeringbekukan pada suhu 4°C; 4. enzim kasar diendapkan dengan aseton dingin, kemudian ditambahi 10 ml BFS pH 7 dan CaCl<sub>2</sub> 5 mM; 5. sama dengan perlakuan 4, kemudian dikeringbekukan pada suhu 4°C.

sehingga banyak protein kontaminan yang mengakibatkan aktivitas enzim menjadi rendah. Penyimpanan enzim dengan perlakuan 2 dan 3 memberikan nilai aktivitas enzim yang tidak begitu berbeda, ini disebabkan proses perlakuannya sama, yaitu sama-sama diendapkan dengan aseton dan ditambah dengan BFS. Aktivitas enzim yang disimpan dalam bentuk cair memberikan aktivitas yang sedikit lebih besar dari enzim yang disimpan dalam bentuk padat, perbedaan ini hanya disebabkan oleh bentuk fisik. Ion kalsium dapat mempertahankan stabilitas dan meningkatkan aktivitas enzim, peningkatannya mencapai 58%. Aditif seperti ion kalsium memberikan pengaruh yang lebih baik dalam meningkatkan aktivitas enzim (Muchtadi *et al.* 1992). Pada penambahan ion kalsium bentuk kering lebih mempertahankan stabilitas.

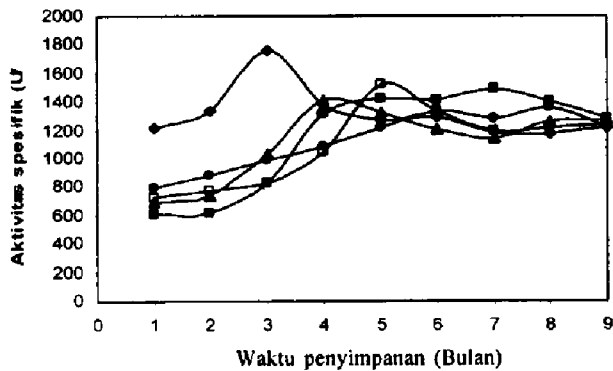
Kandungan protein terlarut dari enzim dengan beberapa bentuk penyimpanan menyebabkan penurunan protein serta memberikan nilai yang bervariasi. Sebelum penyimpanan protein terlarut cukup tinggi, yaitu 1.952 mg/ml. Protein terlarut mengalami penurunan selama penyimpanan 9 bulan (Tabel 2)

Pada akhir penyimpanan secara umum semua perlakuan mengalami penurunan protein terlarut. Protein enzim pada perlakuan 1 memberikan hasil yang paling kecil di dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Ini disebabkan karena protein enzim perlakuan 1 murni supernatan sehingga menyebabkan banyak protein kontaminan yang akan menurunkan nilai kandungan protein. Sedangkan penyimpanan enzim yang lain diikuti dengan penambahan perlakuan lain seperti penambahan aseton. Menurut Viccaro *et al.* (1972) pemakaian aseton dingin sebanyak 1.5 kali volume awal digunakan untuk pemurnian protein enzim. Aseton dingin untuk pengendapan amilase dilaporkan menunjukkan aktivitas yang cukup baik Trinovia (1997) dan Ahmadi (1998). Pada akhir penyimpanan penambahan ion kalsium menghasilkan protein terlarut tertinggi, hal ini menunjukkan bahwa bahan aditif mampu menjaga perubahan protein dibandingkan dengan perlakuan lain. Ion kalsium juga dapat mencegah denaturasi protein sehingga protein terlarut tetap tinggi pada akhir penyimpanan.

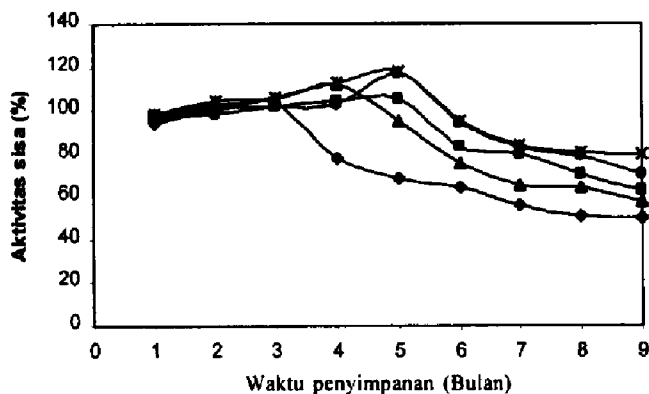
Tabel 2. Kandungan protein terlarut enzim α-amilase *Bacillus stearothermophilus* pada beberapa perlakuan penyimpanan.

Bulan	Perlakuan				
	1	2	3	4	5
1	0.962	1.980	1.750	1.501	1.684
2	0.925	1.980	1.630	1.432	1.680
3	0.731	1.537	1.273	1.284	1.597
4	0.701	0.983	0.985	1.167	1.342
5	0.672	0.912	0.884	0.967	0.958
6	0.617	0.732	0.776	0.875	0.880
7	0.592	0.665	0.711	0.810	0.873
8	0.541	0.625	0.631	0.720	0.819
9	0.510	0.613	0.565	0.710	0.795

1. Enzim kasar dikeringbekukan pada suhu 4°C; 2. enzim kasar diendapkan dengan aseton dingin, kemudian ditambahi 10 ml BFS pH 7; 3. sama dengan perlakuan 2, kemudian dikeringbekukan pada suhu 4°C; 4. enzim kasar diendapkan dengan aseton dingin, kemudian ditambahi 10 ml BFS pH 7 dan CaCl<sub>2</sub> 5 mM; 5. sama dengan perlakuan 4, kemudian dikeringbekukan pada suhu 4°C.



Gambar 1. Aktivitas spesifik beberapa perlakuan. ◆ perlakuan 1 enzim kasar dikeringbekukan pada suhu 4°C; ■ perlakuan 2 enzim kasar diendapkan dengan aseton dingin, kemudian ditambah 10 ml BFS pH 7; ▲ perlakuan 3 sama dengan perlakuan 2, kemudian dikeringbekukan pada suhu 4°C; ● perlakuan 4 enzim kasar diendapkan dengan aseton dingin, kemudian ditambah 10 ml BFS pH 7 dan 5 mM CaCl<sub>2</sub>; □ perlakuan 5 sama dengan perlakuan 4, kemudian dikeringbekukan pada suhu 4°C.



Gambar 2. Aktivitas sisa beberapa perlakuan. ◆ perlakuan 1 enzim kasar dikeringbekukan pada suhu 4°C; ■ perlakuan 2 enzim kasar diendapkan dengan aseton dingin, kemudian ditambah 10 ml BFS pH 7; ▲ perlakuan 3 sama dengan perlakuan 2, kemudian dikeringbekukan pada suhu 4°C; ● perlakuan 4 enzim kasar diendapkan dengan aseton dingin, kemudian ditambah 10 ml BFS pH 7 dan 5 mM CaCl<sub>2</sub>; □ perlakuan 5 sama dengan perlakuan 4, kemudian dikeringbekukan pada suhu 4°C.

Aktivitas spesifik lima macam perlakuan memberikan hasil yang bervariasi, karena aktivitas enzim dan kandungan protein terlarut masing perlakuan berbeda.

Selama penyimpanan terjadi penurunan aktivitas enzim maka aktivitas sisa juga menurun dan berbeda-beda tiap perlakuan (Gambar 2). Penyimpanan menyebabkan terjadinya penurunan aktivitas sisa pada tiap bulan.

Ion kalsium berpengaruh terhadap stabilitas termal  $\alpha$ -amilase *B. stearotermophilus* TII<sub>12</sub>. Fenomena ini didukung oleh Ivanova *et al.* (1993) dan Kim *et al.* (1995) bahwa ion kalsium umumnya ditambahkan dalam bentuk CaCl<sub>2</sub> mampu

mengaktivasi  $\alpha$ -amilase. Shih dan Labbe (1995) juga menyatakan bahwa adanya Ca<sup>2+</sup> 5 mM dapat meningkatkan aktivitas optimum amilase *Clostridium perfringens* tipe A, demikian juga pada *Streptococcus equinus* (Boyer & Hartman 1971). Dengan demikian hampir semua  $\alpha$ -amilase memerlukan ion kalsium karena selain dapat meningkatkan aktivitas enzim, juga berfungsi sebagai stabilisator enzim (Vihinen & Mantsala 1989).

Berdasarkan hasil penelitian ini,  $\alpha$ -amilase *B. stearotermophilus* TII<sub>12</sub> termasuk termostabil dan lebih stabil dengan adanya ion kalsium. Enzim termostabil lebih kaku dibandingkan dengan enzim termolabil. Kekakuan ini menyebabkan kecenderungannya membentuk struktur yang tidak stabil lebih rendah. Ion kalsium membantu mempertahankan kondisi kaku tersebut. Oleh karena itu, enzim lebih tahan terhadap lingkungan ekstrem (Vihinen & Mantsala 1989). Pernyataan tersebut sangat mendukung hasil penelitian ini bahwa termostabil dengan adanya ion kalsium ternyata menyebabkan  $\alpha$ -amilase *Bacillus stearotermophilus* TII<sub>12</sub> aktivitas sisa tertinggi dalam penyimpanan. Aktivitas enzim sisa selama sembilan bulan penyimpanan dari perlakuan 4 dan 5 dengan penambahan ion kalsium memberikan hasil sebesar 70% atau lebih.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmadi MD. 1997. Karakterisasi enzim amilase dari isolat bakteri termofilik lokal MII<sub>10</sub>. [Skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Benfeld P. 1955. Amylase  $\alpha$  and  $\beta$ . Di dalam: Colowik SP, Kaplan NO (ed). *Methods in Enzymology and Related in Biochemistry*. Vol 1. New York: Acad Pr. hlm 149-155.
- Bollag DM, Edelstein SJ. 1991. *Protein Methods*. New York: John Wiley and Sons. hlm 52-55.
- Boyer EW, Hartman PA. 1971. Extracellular transglucocyclase and alfa-amilase of *Streptococcus equinus*. *J Bacteriol* 106:561-570.
- Gao XL, Yu Y, Linko P. 1984. Glucoamilase and  $\alpha$ -amilase production by immobilized. *Biotech* 6:645-650.
- Ivanova VM, Dobrova EP, Emanuilova EI. 1993. Purification and characterization of thermostable alfa amylase from *Bacillus licheniformis*. *J Biotech* 8:277-289.
- Kim TV, Gu BG, Jeong JY, Byun SM, Shin YC. 1995. Purification and characterization of maltotetraose-forming alkaline  $\alpha$ -amylases from an alkalophilic *Bacillus* Strain GM 8901. *Environ Microbiol* 61:3105-3112.
- Muchtadi DNS, Palupi, Astawan M. 1992. *Enzim dalam Industri Pangan*. PAU Pangan dan Gizi.
- Shih NJ, Labbe RG. 1995. Purification and characterization of extracellular  $\alpha$ -amylases from *Clostridium perfringens* Type A. *Appl Environ Microbiol* 61:1776-1779.
- Trinovia D. 1997. Enzim amilase dari beberapa strain bakteri indigenus. [Skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Viccaro JP, Jamaica NY, Weaver JM, Rock NJG. 1972. Method of producing Dextranase. US Patent No. 3.663.371.
- Vihinen MM, Mantsala P. 1989. Microbial amylolytic Enzymes. *Critical Rev Biochem Molec Biol* 24:329-418.