

Pemurnian α -Amilase *Bacillus stearothermophilus* dengan Membran Ultrafiltrasi

Purification of α -Amylase from Bacillus stearothermophilus by Ultrafiltration Membrane

PUJI LESTARI^{1*}, NUR RICHANA¹ & UNTUNG MURDIYATMO²

¹Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Jalan Tentara Pelajar No. 3A, Bogor 16111

²PTPN XI Surabaya, Jalan Merak No. 1, Surabaya

The objective of this experiment was to evaluate the optimum conditions of α -amylase of *Bacillus stearothermophilus* purification by ultrafiltration and the step of α -amylase purification from indigenous isolate. Culture filtrate from bioreactor was separated by microfiltration membrane with a pore size of 0.2 μ m. The supernatant was purified again by ultrafiltration system (membrane with cut off 30 000 Dalton). Treatments of α -amylase purified by ultrafiltration were carried out at flow rate of 30, 45 and 60 ml/minute, and concentrated by about 5, 10 and 15 times. The crude enzymes resulted from ultrafiltration were precipitated with acetone. The results showed that the optimum condition of ultrafiltration was using flow rate of 30 ml/minute and concentrated by about 10 times. At the optimum condition of ultrafiltration, the specific activity of α -amylase was of 6 686.6 U/mg with 2.3 fold purification factor. The effect of flow rate decreased the total enzyme activity, specific activity and yield. The concentration disposal could decrease total activity and protein, but not always reduced specific activity of the enzyme. Purification of crude enzyme by ultrafiltration and acetone reduced the total activity, total protein and yield, but specific activity and purification factor increased. Ultrafiltration followed by acetone precipitation, gave enzyme specific activity of 18155.4 U/mg, purification factor of 6.3 and yield of 20%, respectively. Zymogram analysis using Native-Polyacrylamide Agarose Gel Electrophoresis indicated α -amylase of approximately 192 932.8 Da.

Key words: α -amylase, *Bacillus stearothermophilus*, ultrafiltration

Indonesia banyak menghasilkan bahan berpati di antaranya ubi kayu dan sagu. Ubi kayu merupakan tanaman pangan yang murah dan potensial dikembangkan di Indonesia. Produksi ubi kayu pada tahun 1997 mencapai 15.1 juta ton (Biro Pusat Statistik 1997). Ubi kayu selain dimanfaatkan untuk bahan pangan juga diolah menjadi tapioka. Pengembangan secara enzimatik pada bahan berpati tersebut diharapkan dapat meningkatkan nilai tambahnya. Bahan berpati termasuk pati ubi kayu sering digunakan sebagai substrat untuk memproduksi α -amilase.

Enzim α -amilase dewasa ini dapat digunakan untuk campuran makanan ternak dan pembuatan gula cair. Meskipun potensi penggunaan α -amilase cukup besar, namun saat ini enzim ini masih harus diimpor dengan harga cukup mahal. Untuk memproduksi sendiri juga masih menghadapi beberapa kendala, antara lain tidak tersedianya galur mikroba unggul penghasil amilase dan kurangnya pengetahuan tentang teknologi produksi enzim.

Produksi enzim biasa dilakukan menurut metode *in vitro* yaitu dengan menumbuhkan mikroba penghasil enzim pada media dan kondisi tertentu, selanjutnya enzim yang dihasilkan dipisahkan dengan cara tertentu (Aunstrup 1978). Fermentasi menggunakan media cair dalam kultur

terendam banyak dipilih untuk memproduksi enzim karena mudah dikontrol, biaya pekerjaan relatif cukup rendah, dan tidak memerlukan tempat luas. Produksi enzim dengan cara tersebut dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain seleksi mikroorganisme, komposisi media untuk fermentasi, serta faktor lingkungan seperti pH, suhu, agitasi atau aerasi (Whitaker 1972). Penggandaan skala industri biasanya dikerjakan dalam fermentor yang dilengkapi dengan agitator atau aerator.

Pemurnian merupakan tahap yang penting setelah enzim diisolasi. Pemurnian enzim termasuk α -amilase dapat dilakukan dengan beberapa cara antara lain dengan cara pengendapan dalam garam organik (*salting out*) atau pelarut organik (aseton), dan melalui membran ultrafiltrasi. Menurut Fogarty (1983) penggunaan amonium sulfat untuk *salting out* memiliki keuntungan antara lain harga relatif murah, kelarutannya tinggi, pH larutan tidak berubah secara ekstrem, dan tidak bersifat toksik. Kerugiannya ialah konsentrasi garam yang tertinggal dalam produk tinggi dan kurang efisien dalam menghilangkan pencemar. Pengendapan protein dengan pelarut organik seperti aseton akan menghasilkan produk dengan aktivitas tinggi, tetapi kondisi reaksi harus dipertahankan pada suhu rendah (< -5°C) untuk mencegah denaturasi protein. Dari hasil penelitian yang telah dilakukan (Damardjati *et al.* 1997) ternyata enzim kasar α -amilase yang dihasilkan dari pengendapan dengan aseton

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

memiliki aktivitas enzim lebih tinggi dibandingkan pelarut organik lainnya. Di samping itu aseton lebih murah karena dapat diperoleh dan digunakan lagi setelah melalui proses destilasi. Metode pemurnian enzim lainnya ialah ultrafiltrasi. Membran ultrafiltrasi lebih kecil pengaruhnya terhadap denaturasi protein dibandingkan presipitasi dengan polietilen glikol ataupun *salting out*. Selain itu pemisahan enzim skala besar lebih menguntungkan melalui membran ultrafiltrasi dibandingkan sentrifugasi karena membutuhkan waktu dan biaya lebih rendah. Enzim α -amilase diharapkan dapat terpisahkan dengan membran ultrafiltrasi yang berukuran 30 000 Dalton tersebut.

Saat ini sudah cukup banyak mikroba yang mampu menghasilkan α -amilase berhasil diisolasi dan dimurnikan, seperti *Bacillus stearothermophilus* (Manning & Campbell 1981), *Streptococcus bovis* JB 1 (Freer 1993), dan *Lactobacillus plantarum* (Giraud *et al.* 1994). Isolat bakteri lokal unggul penghasil α -amilase juga berhasil diisolasi Damardjati *et al.* (1997), yaitu bakteri mesofil *Bacillus sp.* MII10 dan DKW8 dan bakteri termofil *B. stearothermophilus* TIII2 dan *B. licheniformis* TVII6. Tujuan penelitian ini untuk mendapatkan kondisi optimum pemurnian α -amilase dengan membran ultrafiltrasi dan mempelajari tahapan proses pemurnian α -amilase dari isolat lokal.

BAHAN DAN METODE

Produksi Enzim. Isolat yang digunakan untuk memproduksi α -amilase ialah *B. stearothermophilus* TIII2 yang diisolasi dari Kawah Gunung Dieng dan merupakan isolat koleksi Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor. Media yang digunakan untuk memproduksi α -amilase terdiri dari tripton 0.5%, ekstrak ragi 0.25%, KH_2PO_4 0.1%, NaCl 0.1%, MgSO_4 0.24%, CaCl_2 0.01%, dan pati ubi kayu 1%. Produksi enzim diawali dengan membuat kultur propagasi sebanyak 300 ml, pH 6.5 yang diinkubasi dalam inkubator bergoyang pada suhu 50°C, putaran 150 rpm selama 24 jam. Kultur propagasi ditransfer ke dalam fermentor lima liter yang berisi 2 700 ml sehingga volume total menjadi tiga liter dan diinkubasi pada kondisi optimum yaitu pada suhu 50°C, pH 6.5, aerasi 1.5 vvm (volume udara per vessel per menit), agitasi 300 rpm, konsentrasi antibiuh silikon 0.075% selama 24 jam kultivasi.

Isolasi Enzim. Fermentasi dihentikan setelah 24 jam dan dilanjutkan dengan memisahkan supernatan dari sel bakterinya. Pemisahan sel ini dilakukan dengan melewati kultur hasil fermentasi sebanyak tiga liter ke dalam membran mikrofiltrasi yang memiliki diameter 0.2 μm dengan volume umpan lima liter. Proses mikrofiltrasi tersebut dilakukan pada tekanan 0.5 kg/cm^2 atau laju aliran 10 ml/menit.

Pemurnian α -Amilase. Supernatan yang diperoleh dimurnikan dengan membran ultrafiltrasi dan hanya protein yang berukuran lebih dari 30 000 Dalton tertinggal di atas membran. Pemurnian enzim melalui membran ultrafiltrasi

tersebut dilakukan dengan perlakuan laju aliran 30, 45, dan 60 ml/menit pada pemekatan 10 kali. Hasil perlakuan laju aliran yang optimum terhadap aktivitas spesifik α -amilase, selanjutnya diperlakukan pemekatan 5, 10, dan 15 kali. Enzim hasil membran ultrafiltrasi selanjutnya diendapkan dengan aseton dingin (-20°C) dengan perbandingan 2 : 3. Pengadukan dilakukan selama 15 menit pada suhu 4°C dan selanjutnya diinkubasi semalam pada suhu 4°C. Setelah disentrifugasi, endapan yang diperoleh dicuci dengan air suling untuk menghilangkan sisa aseton. Endapan tersebut kemudian dilarutkan dengan bufer fosfat sitrat pH 7.0.

Pengamatan. Pada setiap perlakuan dan tahapan pemurnian enzim dilakukan pengukuran protein terlarut dengan metode Bradford (Kruger 1991). Aktivitas α -amilase ditentukan dengan metode 3,5-dinitrosalicic acid. Satu unit aktivitas enzim α -amilase dinyatakan sebagai satu mikromol α/β maltosa yang terbentuk per menit pada suhu dan pH aktivitasnya (Bernfeld 1955).

Pewarnaan α -Amilase pada Gel Native Poli-akrilamid. Enzim kasar hasil ultrafiltrasi yang diendapkan dengan aseton dimigrasikan pada *Native Polyacrylamide Agarose Gel Electrophoresis* (N-PAGE). *Native-PAGE* dilakukan pada gel separasi 8% dan *stacking* 4% sesuai prosedur yang direkomendasikan oleh Biorad Elektroforesis. Gel yang telah dielektroforesis direndam dalam *coomasie brilliant blue R-250* (Bollag & Edelstein 1991), yaitu gel direndam dalam larutan pewarna (0.005% *coomasie brilliant blue* dalam etanol 10% dan asam asetat glasial 5%) selama semalam, kemudian gel direndam dalam larutan peluntur warna (etanol 10% dan asam asetat glasial 5%) sampai gel menjadi bening. Protein standar yang digunakan ialah bovine serum albumin (66 & 132 kDa). Untuk mengetahui aktivitas α -amilase setelah dielektroforesis dengan N-PAGE, gel hasil N-PAGE direndam dalam 1% *soluble starch* yang dilarutkan dalam Tris-HCl pH 6.8 dan diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit pada penggoyang dan digoyang secara perlahan. Pita α -amilase divisualisasikan dengan merendam gel dalam larutan iodin (I_2/KI) dengan komposisi KI 0.5% dan I_2 0.05% (Kim *et al.* 1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Kondisi Optimum pada Ultrafiltrasi. Peningkatan laju aliran menyebabkan penurunan aktivitas total enzim selama ultrafiltrasi. Pada laju aliran 30 ml/menit aktivitas total α -amilase mencapai nilai tertinggi (1 176 398 U). Hal ini disebabkan laju aliran yang tinggi menyebabkan protein-protein yang seharusnya tidak melewati membran menjadi ikut lolos dari membran karena tekanan yang tinggi. Semakin tinggi laju aliran, tekanan yang digunakan semakin besar. Berdasarkan protein terlarut total terjadi variasi perubahan yang tidak terlalu jauh satu sama lain yaitu masing-masing 185, 228, dan 182 mg untuk perlakuan laju aliran 30, 45 dan 60 ml/menit (Tabel 1).

Tabel 1. Pengaruh laju aliran terhadap aktivitas dan protein α -amilase *Bacillus stearothermophilus* pada kadar pemekatan 10 kali volume umpan selama ultrafiltrasi

| Laju aliran (ml/mnt) | Volume (l) | Aktivitas total (U) | Protein total (mg) | Aktivitas spesifik (U/mg) | Kemurnian(kali) | Rendemen (%) |
|----------------------|------------|---------------------|--------------------|---------------------------|-----------------|--------------|
| Mikro-filtrasi | 2 000 | 2 062 120 | 702.0 | 2 864.0 | 1.0 | 100.0 |
| 30.0 | 200 | 1 176 398 | 185.4 | 6 345.2 | 2.2 | 57.0 |
| 45.0 | 200 | 989 030 | 228.0 | 4 337.9 | 1.5 | 48.0 |
| 60.0 | | 723 857 | 182.0 | 3 976.4 | 1.4 | 35.0 |

Aktivitas spesifik α -amilase menunjukkan hasil tertinggi pada laju aliran 30 ml/menit (6 345.19 U/mg protein) dan semakin menurun dengan meningkatnya laju aliran. Laju aliran yang tinggi menyebabkan aktivitas total enzim menurun sehingga otomatis aktivitas spesifik juga menurun. Aktivitas spesifik semakin tinggi mengakibatkan terjadinya peningkatan kemurnian enzim. Pada laju aliran 30, 45, dan 60 ml/menit selama ultrafiltrasi menghasilkan kemurnian α -amilase masing-masing 2.2, 1.5, dan 1.4 kali enzim kasar mikrofiltrasi.

Berdasarkan rendemen α -amilase, laju aliran 30 ml/menit memiliki nilai tertinggi dibandingkan perlakuan laju aliran lain yaitu sebesar 57%. Perlakuan laju aliran 45 ml/menit telah menghasilkan rendemen di bawah 50%. Tahapan pemurnian enzim ini sangat mempengaruhi penurunan aktivitas α -amilase, walaupun aktivitas spesifik meningkat karena protein kontaminan menurun. Ditinjau dari aktivitas spesifik, perubahan tingkat kemurnian dan rendemen α -amilase dapat dinyatakan bahwa laju aliran 30 ml/menit merupakan kondisi optimum untuk memurnikan α -amilase dengan membran ultrafiltrasi.

Laju aliran 30 ml/menit ini dikombinasikan dengan perlakuan kadar pemekatan. Volume umpan yang diberikan ialah 2 000 ml sehingga setelah dipekatkan masing-masing enzim tinggal 400, 200, dan 133 ml untuk perlakuan 5, 10, dan 15 kali (Tabel 2). Laju aliran optimum yaitu 30 ml/menit yang dikombinasikan dengan kadar pemekatan diharapkan menghasilkan kondisi optimum pada proses ultrafiltrasi sehingga aktivitas spesifik enzim tinggi, tingkat kemurnian meningkat, dan rendemen α -amilase tetap tinggi.

Tabel 2. Pengaruh kadar pemekatan terhadap aktivitas dan protein α -amilase *Bacillus stearothermophilus* pada laju aliran 30 ml/menit selama ultrafiltrasi

| Kadar pemekatan | Volume (l) | Aktivitas total (U) | Protein total (mg) | Aktivitas spesifik (U/mg) | Kemurnian (kali) | Rendemen (%) |
|-----------------|------------|---------------------|--------------------|---------------------------|------------------|--------------|
| Mikro-filtrasi | 2 000 | 2 062 120 | 702.0 | 2 864.0 | 1.0 | 100.0 |
| 5 x | 400 | 1 645 396 | 311.2 | 5 287.9 | 1.8 | 80.0 |
| 10 x | 200 | 1 194 768 | 178.7 | 6 686.6 | 2.3 | 58.0 |
| 15 x | 133 | 678 646 | 142.8 | 4 752.4 | 1.7 | 33.0 |

Kadar pemekatan α -amilase selama ultrafiltrasi berpengaruh terhadap aktivitas total α -amilase. Peningkatan kadar pemekatan menyebabkan aktivitas total α -amilase menurun. Aktivitas total α -amilase tertinggi pada pemekatan lima kali yaitu 1 645 396 U. Kadar pemekatan yang semakin tinggi akan membutuhkan proses ultrafiltrasi lebih lama sehingga menyebabkan aktivitas α -amilase banyak yang hilang selama proses. Hilangnya aktivitas enzim selama tahap pemurnian sudah banyak terbukti (Kawaguchi *et al.* 1992, Ivanova *et al.* 1993, Suhartono *et al.* 1994, dan Kawakatsu *et al.* 1995). Whitaker (1972) melaporkan bahwa proses pemurnian menyebabkan hilangnya kofaktor yang penting sehingga menyebabkan hilangnya aktivitas enzim. Selain itu dapat pula terjadi denaturasi protein akibat pengaruh suhu dan pH selama pemurnian berlangsung.

Protein terlarut total juga menurun dengan meningkatnya kadar pemekatan enzim. Pada pemekatan lima kali, protein total menurun hingga 44% dibandingkan supernatan hasil mikrofiltrasi, yaitu dari nilai 702 mg menjadi 311 mg. Pada pemekatan rendah menyebabkan enzim dalam keadaan encer dan konsentrasi protein rendah karena protein-protein lain selain α -amilase semakin sedikit.

Aktivitas spesifik α -amilase tertinggi pada laju aliran 30 ml/menit dan pemekatan 10 kali yaitu 6 686.6 U/mg. Pada pemekatan lima kali aktivitas spesifik lebih rendah, demikian juga pada 15 kali volume umpan. Rendahnya aktivitas spesifik yang dihasilkan disebabkan menurunnya aktivitas dan protein total yang terkandung dalam sejumlah volume enzim tersebut tinggi. Peningkatan aktivitas spesifik berkorelasi positif dengan tingkat kemurnian enzim yang dihasilkan. Apabila aktivitas spesifik tinggi maka tingkat kemurnian enzimnya juga tinggi. Tingkat kemurnian α -amilase paling tinggi pada kadar pemekatan 10 kali yaitu 2.3 kali enzim kasar hasil mikrofiltrasi. Dengan demikian kadar pemekatan 10 kali dan laju aliran 30 ml/menit merupakan kondisi optimum pemurnian α -amilase dengan membran ultrafiltrasi.

Pada umumnya pemisahan enzim dari sel bakteri dipisahkan dengan sentrifugasi yang dilakukan pada suhu dingin dan putaran kecepatan tertentu. Pada skala besar pemisahan endapan protein dan supernatan, terutama bila perbedaan densitas rendah, akan memerlukan kecepatan putaran tinggi dengan waktu lebih lama sehingga menyebabkan tidak efisien. Penggunaan membran ultrafiltrasi akan sangat menghemat, walapun tidak semua protein dapat dipisahkan dengan membran ultrafiltrasi yang memiliki ukuran membran tertentu. Menurut Bollag & Edelstein (1991) prinsip pemisahan dengan proses ultrafiltrasi ialah memisahkan komponen berdasarkan bobot molekul. Meskipun retensi molekul merupakan fungsi dari ukuran molekul, namun terbukti bobot molekul dapat digunakan sebagai peubah yang lebih praktis, khususnya pada molekul dengan bobot molekul tinggi. Karena itulah dalam pemisahan dan pemurnian α -amilase *B. stearothermophilus* TH12 dari fermentor lima liter tersebut menggunakan membran mikrofiltrasi dan ultrafiltrasi.

Pemisahan enzim dengan membran ultrafiltrasi pada kondisi optimum ini diharapkan hanya untuk protein yang berukuran lebih kecil dari 30 000 Dalton. Hasil pemisahan supernatan dengan membran ultrafiltrasi menghasilkan retentat dan permeat. Permeat merupakan protein yang dapat melewati membran dan berukuran lebih kecil dari 30 000 Dalton, sedangkan retentat adalah protein yang berukuran lebih besar dari 30 000 Dalton sehingga tidak dapat melewati membran. Enzim α -amilase dalam retentat yang berukuran lebih dari 30 000 Dalton dapat dipisahkan. Beberapa peneliti melaporkan proses pemurnian dan pemisahan suatu materi dengan ultrafiltrasi, antara lain α -amilase (Boyer & Hartman 1971, Shih & Labbe 1995), ekstraksi teh hijau melalui berbagai jenis membran ultrafiltrasi (Kawakatsu *et al.* 1995), dan pemisahan protein kedelai (Devereux *et al.* 1986).

Dalam penelitian ini pemurnian α -amilase menggunakan membran ultrafiltrasi yang berbahan selulosa dan berbentuk *hollow fiber*. Menurut Lillford (1986) *hollow fiber* berbentuk *gelling bath* dan presipitasi diawali dari pusat *fiber*. Jarum *fiber* terkumpul paralel untuk menghasilkan area membran yang kompak. Enzim α -amilase dari ultrafiltrasi diendapkan dengan aseton dingin sebanyak 1.5 kali volume supernatan dan dibiarkan semalam pada suhu 4°C. Pemakaian bahan pengendap aseton tersebut juga telah dilaporkan oleh Viccaro *et al.* (1972) untuk dekstranase sebanyak 1.5 kali volume awal.

Tahapan Pemurnian α -Amilase. Hasil enzim yang dimurnikan melalui membran ultrafiltrasi tersebut dilanjutkan pemurniannya dengan mengendapkan enzim dalam aseton dingin (-20°C) selama semalam pada suhu 4°C. Hasil aktivitas dan protein terlarut α -amilase yang diendapkan dengan aseton dingin tercantum dalam Tabel 3.

Enzim α -amilase yang dimurnikan melalui membran ultrafiltrasi pada beberapa perlakuan laju aliran dan diendapkan dengan aseton dingin menunjukkan bahwa pada laju aliran 30 ml/menit paling optimum pemurnian enzimnya. Hal ini dapat diketahui berdasarkan aktivitas total α -amilase, protein terlarut total, aktivitas spesifik, tingkat kemurnian enzim, dan rendemen α -amilase yang menunjukkan nilai tertinggi dibandingkan laju aliran 45 dan 60 ml/menit. Hasil pengamatan beberapa peubah yang menunjukkan tahapan pemurnian enzim menunjukkan pemurnian α -amilase melalui membran ultrafiltrasi saja dan perlakuan pengendapan dengan aseton dingin pada enzim hasil ultrafiltrasi memberikan hasil yang sama. Laju aliran

Tabel 3. Pengaruh pengendapan aseton pada α -amilase hasil membran ultrafiltrasi terhadap aktivitas dan protein α -amilase *Bacillus stearothermophilus*

| Laju aliran (ml/mnt) | Volume (l) | Aktivitas total (U) | Protein total (mg) | Aktivitas spesifik (U/mg) | Kemurnian (kali) | Rendemen (%) |
|----------------------|------------|---------------------|--------------------|---------------------------|------------------|--------------|
| 30.0 | 100 | 405 048 | 22.3 | 18 155.4 | 6.3 | 20.0 |
| 45.0 | 100 | 373 170 | 24.8 | 15 065.4 | 5.3 | 18.0 |
| 60.0 | 100 | 330 969 | 31.5 | 10 520.3 | 3.7 | 16.0 |

30 ml/menit adalah kondisi optimum pemurnian α -amilase.

Aktivitas total α -amilase dan protein terlarut total tertinggi pada laju aliran 30 ml/menit yaitu 405 048 U dan 22.3 mg. Berdasarkan aktivitas dan konsentrasi protein tersebut diperoleh aktivitas spesifik 18 155.4 U/mg. Aktivitas spesifik lebih tinggi pada enzim yang telah diendapkan dengan aseton daripada sebelum pengendapan. Peningkatan aktivitas spesifik menyebabkan kemurnian enzim juga meningkat, yaitu masing-masing 6.3, 5.3, dan 3.7 kali untuk laju aliran 30, 45, dan 60 ml/menit. Namun, penurunan rendemen α -amilase yang drastis hingga 20% untuk laju aliran 30 ml/menit setelah diendapkan dengan aseton terjadi. Pengendapan dengan pelarut organik seperti aseton menunjukkan penurunan aktivitas enzim. Pengaruh utama ialah reduksi aktivitas air. Kekuatan pelarutan air untuk suatu muatan dan molekul enzim hidrofilik akan berkurang dengan meningkatnya konsentrasi pelarut organik.

Pemurnian menyebabkan penurunan aktivitas dan protein total. Penurunan aktivitas enzim pada tahap pemurnian disebabkan karena sebagian protein terdenaturasi dan rusak oleh pengaruh perlakuan selama pemurnian. Suhu yang terlalu tinggi dan bahan pengendap sangat berpengaruh terhadap aktivitas α -amilase. Boyer dan Hartman (1971) melaporkan bahwa pemurnian α -amilase melalui ultrafiltrasi menyebabkan penurunan aktivitas dan protein total, tetapi kemurnian enzim meningkat 2.3 dan 4.2 kali untuk perlakuan ultrafiltrasi dan dialisis. Hasil pemurnian enzim dengan ultrafiltrasi tersebut sama dengan hasil yang dicapai dalam penelitian ini.

Kehilangan protein terjadi selama pemurnian enzim setelah melalui beberapa tahap pemisahan. Pada tahap ultrafiltrasi telah terpisahkan protein-protein yang lolos dan tak dapat melalui membran. Protein dengan bobot molekul lebih dari 30 000 Dalton tidak dapat melewati membran. Proses pengendapan dengan aseton memisahkan protein yang mengendap dari yang tidak terendapkan akibat perbedaan kelarutan. Hal tersebut berakibat terhadap penurunan rendemen α -amilase. Ahmadi (1998) dalam melakukan pemisahan amilase dari isolat bakteri lokal MII10 memperoleh penurunan jumlah protein setelah pengendapan dengan aseton, begitu pula Manning dan Campbell (1981) dalam memurnikan enzim α -amilase dari *B. stearothermophilus*.

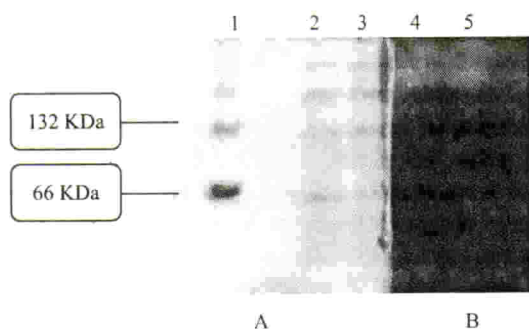
Aktivitas α -amilase tertinggi yang sudah diendapkan dengan aseton yaitu 18 155.4 U/mg dengan tingkat kemurnian 6.3 kali enzim kasar hasil mikrofiltrasi (Tabel 4). Aktivitas spesifik α -amilase dalam penelitian ini ternyata jauh lebih tinggi daripada aktivitas spesifik α -amilase *S. bovis* JB 1 yaitu 2 650 U/mg (Freer 1993) dan α -amilase termotabil *B. licheniformis* yaitu 4 300 U/mg (Ivanova *et al.* 1993). Rendemen α -amilase *B. licheniformis* dalam penelitian ini turun drastis hingga 58% dengan ultrafiltrasi dan sangat tajam pada pengendapan dengan aseton yaitu 20%. Kondisi terbaik agar rendemen α -amilase tetap tinggi selama tahap pemurnian perlu dicari.

Tabel 4. Pemurnian α -amilase *Bacillus stearothermophilus*

| Tahap | Volume (ml) | Aktivitas total (U) | Protein total (mg) | Aktivitas spesifik (U/mg) | Kemurnian (kali) | Rendemen (%) |
|----------------|-------------|---------------------|--------------------|---------------------------|------------------|--------------|
| Mikro filtrasi | 2000 | 2 062 120 | 702.0 | 2 864.0 | 1.0 | 100.0 |
| Ultra filtrasi | 200 | 1 194 768 | 178.7 | 6 686.6 | 2.3 | 58.0 |
| Aseton | 100 | 405 048 | 22.8 | 18 155.4 | 6.3 | 20.0 |

Pada tahap selanjutnya enzim hasil pengendapan dengan aseton dimigrasikan melalui elektroforesis gel akrilamid. Tujuannya untuk mengetahui banyaknya jenis protein enzim kasar secara kualitatif yaitu yang membentuk pita-pita protein pada gel elektroforesis. Teknik ini dapat menganalisis bahan dalam jumlah yang sangat kecil dengan kepekaan yang tinggi dan waktu pemisahan yang singkat. Pemisahan protein dengan elektroforesis dikembangkan atas dasar prinsip bahwa setiap ion atau gugus yang bermuatan akan bergerak sesuai dengan muatannya bila diberikan medan listrik.

Karakterisasi protein berdasarkan bobot molekul enzim kasar hasil ultrafiltrasi dan aseton dingin dilakukan pada N-PAGE (Gambar 1). Pita yang menunjukkan zona jernih ialah pita protein α -amilase. Zona jernih yang timbul disebabkan oleh aktivitas α -amilase dalam menghidrolisis pati. Berdasarkan hasil pengamatan tersebut diketahui bahwa α -amilase adalah pita protein pertama yang berzona jernih dengan perkiraan bobot molekul 192 932.8 Dalton. Visualisasi α -amilase pada N-PAGE juga telah dilakukan oleh Kim *et al.* (1995) yaitu α -amilase alkalin dari *Bacillus galur* GM8901.



Gambar 1. Analisis zimogram dengan *Native*-PAGE dari α -amilase *Bacillus stearothermophilus*: A. Sumur 1: *Marker bovine serum albumine* (66 dan 132 Da), 2 dan 3: Enzim kasar α -amilase hasil ultrafiltrasi yang diendapkan dengan aseton; B. Sumur 4 dan 5: α -amilase dengan zona bening yang menunjukkan hidrolisis pati dengan bobot molekul 192 932 Dalton.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmadi, M.D. 1998. Karakterisasi amilase dari isolat bakteri lokal MII-10. Skripsi. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian IPB.
- Aunstrup, K. 1978. Enzyme of industrial interest: traditional product, hlm. 241-272. Di dalam: G.T. Tsao (ed.). *Annual Reports of Fermentation Process*, vol. 6. New York: Acad. Press.
- Bernfeld, P. 1955. Amylases α - and β , hlm. 149-158. Di dalam: S.P. Colowick & N.O. Kaplan (ed.), *Methods in Enzymology and Related of Biochemistry*, vol. 1. New York: Acad. Press.
- Biro Pusat Statistik. 1997. *Statistika Industri Besar dan Sedang Indonesia. Statistical Year Book of Indonesia*. Jakarta: BPS.
- Bollag, D.M. & S.J. Edelstein. 1991. *Protein Methods*. New York: John Wiley.
- Boyer, E.W. & P.A. Hartman. 1971. Extracellular transglucosylase and α -amylase of *Streptococcus equinus*. *J. Bacteriol.* 106:561-570.
- Damardjati, D.S., U. Murdiyato, N. Richana, Pujoyuwono, N. Azizah, D. Andriani, P. Lestina & D. Kusdiningsih. 1997. Kloning gen-gen amilase dari isolat bakteri indigenous untuk proses biokonversi bahan berpati. Laporan Hasil Penelitian. Bogor: Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan.
- Devereux, N., M. Hoare & P. Dunnill. 1986. Membrane separation of protein precipitates: Unstirred batch studies. *Biotech. Bioeng.* 28:88-96.
- Fogarty, W.M. 1983. *Microbial Enzymes and Biotechnology*. London: Appl. Sci.
- Freer, S.N. 1993. Purification and characterization of the extracellular α -amylase from *Streptococcus bovis* JB 1. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1398-1402.
- Giraud, E., A. Champailler & M. Rainbault. 1994. Degradation of raw starch by wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:4319-4323.
- Ivanova, V.N., E.P. Dobreva & E.I. Emanuilova. 1993. Purification and characterization of a thermostable α -amylase from *Bacillus licheniformis*. *J. Biotechnol.* 28:277-289.
- Kawaguchi, T., H. Hagal, S. Murao & M. Arai. 1992. Purification and some properties of a haim-sensitive α -amylase from newly isolated *Bacillus sp.* No. 195. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56:1792-1796.
- Kawakatsu, T., T. Kabayashi, Y. Sano & M. Nakajima. 1995. Clarification of green tea extract by microfiltration and ultrafiltration. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59:1016-1020.
- Kim, T.U., B.G. Gu, J.Y. Yeong, S.M. Byunand & Y.C. Shin. 1995. Purification and characterization of a maltotetraose forming alkaline α -amylase from an alkalophilic *Bacillus* strain GM 8901. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3105-3112.
- Kruger, N.J. 1991. The Bradford method for protein quantitation, hlm. 49-55. Di dalam: J.M. Walker (ed.). *The Protein Protocols Handbook*. New Jersey: Humana Press.
- Lillford, P.J. 1986. Large scale methods for protein separation and isolation, hlm. 444-468. Di dalam: F. Franks (ed.), *Characterization of Protein*. New York: Humana Press.
- Manning, G.B. & L.L. Campbell. 1981. Thermostable α -amylase of *B. stearothermophilus*. *J. Biol. Chem.* 263:2957.
- Shih, N.J. & R.G. Labbe. 1995. Purification and characterization of an extracellular α -amylase from *Clostridium perfringens* type A. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1776-1779.
- Suhartono, M.T., F. Wibowo & T.T. Irawadi. 1994. Pemurnian protease *Bacillus stearothermophilus* NRRLB 1172. *Bul. Teknol. Indus. Pang.* 5:56-60.
- Viccaro, J.P., N.Y. Jamarca, J.M. Weaver & N.J.G. Rock. 1972. *Method of Producing Dextranase*. New York: US Patent.
- Whitaker, J.R. 1972. *Principles of Enzymology for The Food Services*. New York: Marcel Dekker.