

PEMURNIAN ENZIM AMILASE TERMOFILIK DENGAN SISTEM DUA FASE

Oleh

YUWILDA FETRIMARNI

F03495015



2000
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

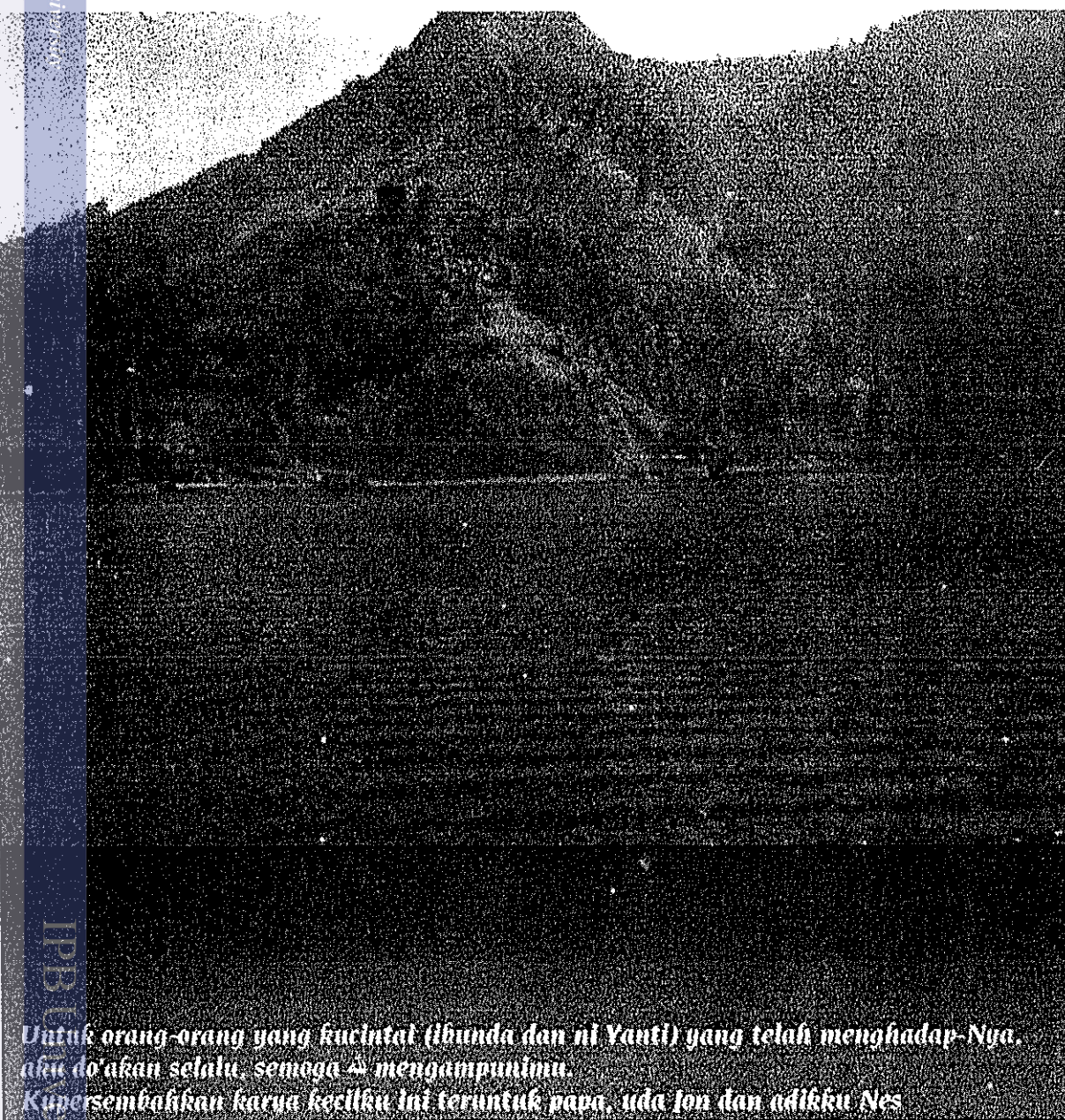
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



Tidaklah kamu memperhatikan bahwa sesungguhnya kapal itu berlayar di laut dengan nikmat ﷻ, supaya diperlihatkan-Nya kepadamu sebagian dari tanda-tanda (kekuasaan-Nya). Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda-tanda bagi semua orang yang sangat sabar lagi banyak bersyukur (Luqman : 31)

@Hak cipta milik IPB University



**Untuk orang-orang yang kucintai (ibunda dan ni Yanti) yang telah menghadap-Nya, aku do'akan selalu, semoga ﷻ mengampunimu.
Kupersembahkan karya kecilku ini teruntuk papa, uda Jon dan adikku Nes**

FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR

**PEMURNIAN ENZIM α -AMILASE TERMOFILIK
DENGAN SISTEM DUA FASE**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN
pada Jurusan Teknologi Industri Pertanian
Fakultas Teknologi Pertanian
Institut Pertanian Bogor

Oleh

YUWILDA FETRI MARNI
F0349501

Dilahirkan pada tanggal 27 Maret 1977

di Padang

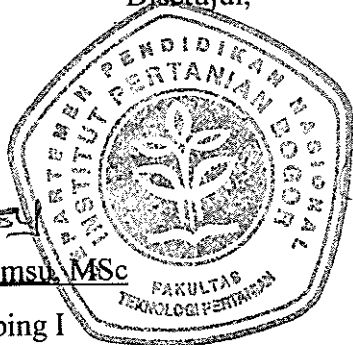
Tanggal Lulus : 3 Mei 2000

Bogor, Mei 2000

Disetujui,


Dr. Ir. Khaswar Syamsu, MSc

Dosen Pembimbing I




Ir. Nur Richana, MS

Dosen Pembimbing II



Yuwilda Fetri Marni. F03495015. Pemurnian enzim α -amilase termofilik dengan sistem dua fase. Dibawah bimbingan Khaswar Syamsu dan Nur Richana

RINGKASAN

Setiap tahunnya penggunaan enzim terus meningkat. Enzim yang banyak digunakan adalah enzim amilase, baik oleh industri yang bergerak dibidang pangan diantaranya industri permen, maupun non pangan seperti industri farmasi, dan industri detergen. Indonesia sendiri belum memiliki industri yang memproduksi enzim, sehingga untuk memenuhi kebutuhan enzim selama ini masih di impor. Menurut data BPS (1997), impor enzim tahun 1996 sebesar 2 490 396 kg dengan harga 12 181 608 US\$. Harga tersebut sebelum krisis moneter melanda Asia, tentu harga sekarang bisa naik sampai 200 %.

Melihat fenomena tersebut dan kondisi Indonesia yang subur dan kaya akan sumber mikrohayati, maka untuk mendapatkan sumber enzim tidaklah sulit. Yang menjadi kendala adalah teknologi produksi dan pemurnian enzim.

Tujuan penelitian ini adalah mempelajari pemurnian enzim α -amilase termofilik dengan sistem dua fase pada berbagai perbandingan berat molekul PEG, dan mempelajari fraksinasi protein dari hasil pemurnian dengan sistem dua fase pada filtrasi gel. Untuk menentukan pengaruh volume enzim kasar I yang ditambahkan terhadap volume enzim yang terekstraksi di fase atas digunakan rancangan percobaan acak lengkap.

Tahapan penelitian ini adalah produksi enzim, pemurnian dengan sistem dua fase, pengendapan dan filtrasi gel. Pada pemurnian dengan sistem dua fase ditentukan konsentrasi optimal PEG-garam fosfat. Konsentrasi PEG yang digunakan adalah 6,7%, 13,3 %, 20 %, 26 %, dan 41,7% serta garam fosfat dengan konsentrasi 3,5%, 7,1%, 10,7%, 21,4%, 27,3%, dan 54,5 %. Parameter yang digunakan untuk menentukan konsentrasi optimal pemurnian dengan sistem dua fase adalah terbentuknya dua lapisan dan banyaknya enzim kasar I yang terekstraksi pada fase atas. Setelah didapatkan konsentrasi optimal PEG-garam fosfat, tahapan selanjutnya adalah menentukan banyaknya enzim kasar I dapat terekstrak di fase atas. Volume enzim yang ditambahkan sebanyak 50 dan 70 ml. Pada setiap tahapan proses dilakukan uji aktivitas enzim, kadar protein, aktivitas spesifik, dan kemurnian.

Aktivitas enzim setelah kultivasi berkisar 629,1 sampai 906,6 unit/ml. Sedangkan total protein berkisar 0,03 sampai 2,44 mg/ml, sehingga diperoleh aktivitas spesifik sebesar 5375,2 sampai 24313,5 unit/mg.



Konsentrasi optimal pada pemisahan dua fase adalah 13,3 % PEG, dan 7,1 % garam fosfat serta 70 ml enzim kasar I. Pada pemurnian dengan sistem dua fase aktivitas spesifik enzim fase atas pada PEG 600 adalah 24313,5 u/mg, sedangkan pada fase bawah aktivitas spesifik enzim sebesar 612,21 u/mg sehingga dihasilkan koefisien partisi sebesar 39,7. Aktivitas spesifik enzim fase atas pada PEG 3350 adalah 7414,4 u/mg dan fase bawah aktivitas spesifik enzimnya sebesar 659,35 u/mg dengan koefisien partisi 11,2

Pada pemurnian dengan sistem dua fase, aktivitas spesifik enzim pada PEG 600 sebesar 9541,39 u/mg dengan kemurnian 1,4 kali dan rendemen 92 %. Pada PEG 3350 aktivitas spesifik enzim sebesar 8563,46 u/mg dengan kemurnian 1,2 kali dan rendemen 82 % dan pada PEG 8000 aktivitas spesifik enzim sebesar 8210,82 u/mg, dengan kemurnian 1,19 kali dan rendemen 99 %.

Pada proses pengendapan aktivitas spesifik enzim yang tertinggi pada PEG 600 yaitu sebesar 9502,45 u/mg dengan kemurnian 1,4 dan aktivitas spesifik enzim pada PEG 3350 sebesar 8950 u/mg dan kemurnian 1,3 kali serta aktivitas spesifik enzim pada PEG 8000 sebesar 2927,42 u/mg dengan kemurnian 0,42 kali.

Pemurnian dengan filtrasi gel menghasilkan aktivitas spesifik enzim tertinggi pada PEG 600 yaitu sebesar 27585,7 u/mg dan kemurnian 4 kali. Pada PEG 3350 aktivitas spesifik enzim sebesar 6296,3 u/mg dengan kemurnian 0,91 kali sedangkan pada PEG 8000 aktivitas spesifik enzim sebesar 10914,3 dengan kemurnian 1,6 kali. Dari hasil analisis ragam menunjukkan bahwa volume enzim yang ditambahkan tidak berpengaruh terhadap banyaknya enzim yang terekstraksi di fase atas.

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT, karena rahmat, dan hidayah-Nyalah penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul Pemurnian Enzim α -Amilase Termofilik dengan Sistem Dua Fase. Skripsi ini dibuat berdasarkan penelitian yang penulis lakukan di Balai Penelitian Bioteknologi (BALITBIO) Tanaman Pangan, Cimanggu-Bogor selama kurang lebih 6 bulan (Maret-Agustus) pada tahun 1999.

Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan studi pada jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Selama menuntut ilmu di jurusan Teknologi Industri Pertanian, begitu banyak pengalaman yang penulis dapatkan, baik itu pengalaman secara langsung maupun tidak.

Penulis menyadari begitu banyak kekurangan dalam penyelesaian skripsi ini. Sesungguhnya hanya Allah yang maha sempurna dan apapun yang diciptakan-Nya tidaklah sia-sia. Atas segala kekurangan yang ada, maka kritik dan saran untuk penyempurnaannya sangat diharapkan. Mudah-mudahan skripsi ini dapat bermanfaat bagi yang membacanya.

Bogor, Mei 2000

Penulis

UCAPAN TERIMA KASIH

Selama penulis menuntut ilmu, melakukan penelitian sampai tersusunnya skripsi ini, penulis telah banyak menerima bantuan, bimbingan, dan arahan dari berbagai pihak, baik moril maupun materil. Untuk itulah pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Ibunda (alm) dan papa yang telah mencurahkan kasih sayang, perhatian, dorongan, serta selalu mendo'akan penulis.
2. Kakanda Yoherman dan adinda Yohanes Saherman yang telah banyak memberikan bantuan, semangat kepada penulis serta nenek yang selalu mendo'akan penulis.
3. Tante dan om serta adik-adikku Irfan, Indah, Irsyad dan riri yang selalu membantu penulis baik secara langsung maupun tidak.
4. Saudara-saudara di Bukittinggi yang selalu membantu dan mendo'akan penulis.
5. Dr. Ir. Khaswar Syamsu, MSc selaku dosen pembimbing utama yang telah memberikan arahan dan bimbingan kepada penulis selama menyelesaikan pendidikan di Jurusan Teknologi Industri Pertanian, IPB.
6. Ir. Nur Richana, MS selaku dosen pembimbing kedua, atas perhatian, bimbingan serta fasilitas selama penulis melakukan penelitian di BalitBio Cimanggu-Bogor.
7. Dr. Ir. Djumali M., DEA yang telah bersedia sebagai dosen penguji
8. Pak Tanthowi yang telah banyak membantu selama penelitian

10. Rekan-rekan angkatan 32 yang selalu menyemangati penulis dalam penyelesaian skripsi ini.

11. Rekan-Rekan seperjuangan Tatit dan Dedi, atas bantuan dan kerjasamanya.

12. Warga Cendrawasih, yang selalu memberikan semangat dan keceriaan kepada penulis dalam penyusunan skripsi ini.

13. Tak lupa pula rekan-rekan TIN 16 atas kebersamaan kita selama ini dan kompak selalu.

14. Rekan-rekan dan adik-adik IKASUMANTRI yang selalu kompak dan ceria

@Hak cipta milik IPB University

IPB University



DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	i
UCAPAN TERIMA KASIH.....	ii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Tujuan	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
A. Amilase	4
B. Produksi dan Cara Kerja Enzim	6
C. Pemurnian.....	9
D. Pemurnian dengan sistem dua fase.....	13
E. Metode Filtrasi Gel	16
III. BAHAN DAN METODE	19
A. Alat dan Bahan	19
1. Alat	19
2. Bahan	19

B. Metodologi	20
1. Penyegaran Isolat	20
2. Penyiapan Isolat	21
3. Produksi Enzim	22
4. Pemurnian dengan sistem dua fase.....	23
5. Pengendapan	24
6. Pemurnian	25
C. Perlakuan	26
1. Penentuan konsentrasi optimal pemurnain dengan sistem dua fase	26
2. Penentuan volume enzim kasar I optimal	27
D. Rancangan Percobaan	27
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	29
A. Produksi Enzim	29
B. Pemurnian dengan sistem dua fase	31
C. Pengendapan	40
D. Pemurnian	44
V. KESIMPULAN DAN SARAN	47
DAFTAR PUSTAKA.....	49
LAMPIRAN	52

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang menjiplak dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Polimer pada sistem dua fase cair.....	14
Tabel 2. Komposisi substrat.....	21
Tabel 3. Penentuan konsentrasi pemurnian dengan sistem dua fase.....	32
Tabel 4. Volume optimal pemurnian dengan sistem dua fase	34
Tabel 5. Perbandingan aktivitas dan protein enzim pada dua fase.....	36
Tabel 6. Pengaruh BM PEG terhadap aktivitas enzim dan protein.....	38
Tabel 7. Pengaruh pengendapan terhadap aktivitas enzim dan protein.....	41
Tabel 8. Aktivitas enzim dan protein hasil filtrasi gel	48

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Skema Penyegaran Isolat.....	20
Gambar 2. Skema Pembuatan Media Peremajaan	21
Gambar 3. Skema Proses Produksi Enzim	23
Gambar 4. Skema Pemurnian dengan Sistem dua fase	24
Gambar 5. Skema Pengendapan Enzim	25
Gambar 6. Skema Pemurnian dengan Filtrasi Gel	26
Gambar 7. Pemurnian dengan Sistem Dua Fase	35
Gambar 8. Pengaruh Berat Molekul PEG terhadap aktivitas enzim	39
Gambar 9. Pengaruh pengendapan terhadap aktivitas spesifik enzim.....	43
Gambar 10. Pengaruh pemurnian terhadap aktivitas spesifik enzim	46

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Prosedur Analisa Enzim	52
Lampiran 2. Prosedur Perhitungan Hasil Analisis	53
Lampiran 3. Kurva Standar Aktivitas Enzim	54
Lampiran 4. Kurva Standar Protein (BSA)	55
Lampiran 5. Grafik Hasil Filtrasi Gel pada PEG 600	56
Lampiran 6. Grafik Hasil Filtrasi Gel pada PEG 3350	57
Lampiran 7. Grafik Hasil Filtrasi Gel pada PEG 8000	58
Lampiran 8. Hasil Perhitungan Filtrasi gel	59
Lampiran 9. Lanjutan Perhitungan Filtrasi gel	60
Lampiran 10. Hasil Perhitungan rancangan acak lengkap	61
Lampiran 11. Gambar Pemisahan 2 fase PEG 600	62
Lampiran 12. Gambar Pemisahan 2 fase PEG 3350	63
Lampiran 13. Gambar Pemisahan 2 fase PEG 8000	64
Lampiran 14. Alat Filtrasi Gel	65
Lampiran 15. Rekapitulasi Data	66
Lampiran 16. Rekapitulasi Perhitungan	67
Lampiran 17 Perhitungan Data	68
Lampiran 18 Pengaruh Tahapan Proses terhadap Aktivitas Spesifik Enzim	69

I. PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Enzim adalah suatu protein yang berfungsi sebagai katalisator. Enzim berfungsi dengan baik pada kondisi suhu dan pH optimal. Enzim amilase yang kita kenal terdiri dari dua golongan yaitu enzim yang tahan suhu tinggi (termostabil) dan enzim yang bersifat labil (termolabil).

Indonesia belum memiliki industri yang menghasilkan enzim, sehingga kebutuhan enzim terutama bagi industri yang menggunakan enzim harus di impor. Setiap tahun impor enzim terus meningkat, karena sangat diperlukan dalam proses produksi. Menurut BPS (1997) impor enzim tahun 1996 sebanyak 2 490 396 dengan harga 12 181 608 dolar US.

Enzim yang pertama kali dikenal sebagai biokatalis adalah enzim yang dapat menghidrolisa pati. Enzim tersebut adalah enzim amilase. Khusus enzim amilase banyak digunakan oleh industri yang bergerak dibidang pangan maupun non pangan diantaranya yaitu industri farmasi, industri makanan seperti permen dan coklat, industri gula, tekstil, industri detergen serta sering juga digunakan untuk konversi bahan berpati seperti produksi glukosa dan sirup glukosa.

Melihat prospek yang cerah, dan kondisi perekonomian sekarang yang belum stabil, serta harga barang impor yang sangat mahal, maka diharapkan Indonesia mampu memproduksi enzim untuk memenuhi kebutuhan sendiri (industri). Hal tersebut harus didukung oleh tersedianya galur unggul penghasil enzim.

Indonesia sendiri kaya akan sumber mikrohayati, sehingga untuk mendapatkan mikroorganisme penghasil enzim yang baik dan banyak tidaklah sulit.

Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan (BALITBIO), Cimanggu-Bogor, telah berhasil mengisolasi isolat bakteri, salah satunya bakteri termofil penghasil enzim amilase. Bakteri tersebut diisolasi dari tiga lokasi yaitu Taman Nasional Ujung Kulon, Kawah Dieng dan Tangkuban Perahu. Isolat bakteri termofil paling banyak digunakan karena bersifat lebih tahan panas.

Enzim hasil fermentasi memiliki mutu yang baik dan bagus, jika enzim tersebut dalam keadaan murni. Enzim murni memiliki beberapa keuntungan, diantaranya enzim menjadi lebih stabil karena tidak adanya protein pengganggu dan memiliki aktivitas yang tinggi.

Untuk menghasilkan enzim murni, diperlukan pengetahuan tentang teknologi pemurnian yang murah dan efisien, sehingga dapat diterapkan baik skala lab maupun skala industri. Metode pemurnian yang ada selama ini bermacam-macam, diantaranya yaitu metode presipitasi. Metode presipitasi menggunakan bahan diantaranya garam dan bahan organik. Penggunaan garam dan bahan organik memiliki kelemahan. Penggunaan garam dengan konsentrasi rendah menyebabkan enzim larut dalam garam, sedangkan garam dengan konsentrasi tinggi menyebabkan enzim yang tidak tahan mengalami denaturasi (Winarno, 1986). Penggunaan bahan organik seperti aseton dapat menyebabkan terjadinya denaturasi protein, disamping sifat bahan organik itu sendiri yang mudah terbakar. (Chaplin dan Bucke, 1990).

Untuk itulah dicoba metode lain yaitu pemurnian dengan sistem dua fase menggunakan polimer. Polimer terbanyak digunakan dan dipelajari adalah polietilen glikol, yang digunakan dalam pemisahan dua fase.

Sistem dua fase telah berkembang selama 30 tahun, sehingga pengembangan dan penelitian tentang sistem dua fase terus dipelajari (King, 1992). Sistem dua fase yang terdiri dari dua larutan polimer yang larut air, disebut sistem dua fase cair, seperti polietilen glikol-dekstran atau polimer-garam seperti polietilen glikol-garam fosfat atau garam sulfat. Dilihat dari keuntungan penggunaan polietilen glikol, salah satunya yaitu tidak menyebabkan denaturasi, maka dilakukan penelitian pemisahan dua fase menggunakan polietilen glikol-garam fosfat. Tujuan akhir penelitian ini adalah agar dapat menghasilkan enzim amilase dengan kemurnian tinggi.

B. TUJUAN

Tujuan penelitian ini adalah :

1. Mempelajari pemurnian enzim α -amilase termofilik dengan sistem dua fase pada dengan berbagai perbandingan berat molekul polimer
2. Mempelajari fraksinasi protein dari hasil pemurnian dengan sistem dua fase menggunakan gel filtrasi



II. TINJAUAN PUSTAKA

A. AMILASE

Enzim dapat meningkatkan kecepatan reaksi dengan cara menurunkan energi aktivasi. Energi aktivasi adalah jumlah energi (dalam kalori) yang diperlukan untuk membawa semua molekul pada satu mol senyawa pada suhu tertentu menuju tingkat transisi pada puncak batas energi (Muchtadi, 1992).

Berdasarkan enzim yang dihasilkan oleh mikroba, enzim terdiri dari 2 macam yaitu enzim *ekstraselluler* dan enzim *intraseluler*. Enzim *ekstraselluler* adalah enzim yang dihasilkan di dalam sel, tetapi dikeluarkan ke medium fermentasi karena enzim ini dapat mendegradasi senyawa polimer hingga larut dan dapat diserap melalui dinding sel. Enzim ini cocok diproduksi dalam skala industri, karena dihasilkan dalam jumlah relatif banyak serta tidak terlalu sulit metode ekstraksinya (Whitaker, 1972). Sedangkan enzim *intraseluler* adalah enzim yang dihasilkan di dalam sel yaitu pada membran sitoplasma sehingga enzim ini relatif lebih sulit metode ekstraksinya karena harus menghancurkan sel terlebih dahulu.

Menurut Aunstrup *et al.*, (1979), proses terbentuknya enzim dibagi menjadi dua kelompok yaitu enzim yang bersifat *inducibel* (dihasilkan karena respon terhadap senyawa tertentu) dan "*inducer*" (terdapat pada media, dan dapat meningkatkan hasil degradasi. Menurut Casida (1978), bahwa ada satu enzim yang bersifat konstitutif yaitu enzim yang dihasilkan tanpa pengaruh "*inducer*".

Enzim α -amilase merupakan enzim yang konstitutif (Coleman 1967 di dalam Berkeley *et al.*, 1979)

Enzim amilase merupakan enzim yang dapat memecah atau menghidrolisa pati, glikogen dan turunan polisakarida dengan cara memecah ikatan glikosidik pati. Enzim amilase dibedakan atas tiga grup yaitu α -amilase yang disebut juga endoamilase, β -amilase yang disebut juga eksoamilase, dan glukamilase. Endoamilase memecah ikatan dibagian dalam substrat, eksoamilase menghidrolisa unit paling ujung dari substrat sedangkan glukamilase memecah unit gula non pereduksi dari substrat pati (Kulp didalam Reed 1975).

Sedangkan menurut Atlas (1984), amilase adalah enzim yang dapat mengkatalisis proses hidrolisis ikatan (1,4) glikosida pada senyawa polimer α -D-glikopiranos. Enzim amilase dibagi atas tiga yaitu enzim α -amilase yang mengubah pati menjadi oligosakarida dan maltosa, β -amilase yang mengubah pati menjadi maltosa dan dekstrin dan glukamilase yang mengubah pati menjadi glukosa.

Enzim α -amilase (α -1,4 glucan-4-glucanhydrolase) memecah ikatan α -1,4-glikosida molekul pati secara acak dari bagian tengah atau dalam molekul pati. α -amilase terdiri atas dua yaitu enzim α -amilase yang tahan pada temperatur tinggi (termostabil) digunakan pada proses liquifikasi, dan α -amilase yang bersifat labil (termolabil) digunakan dalam proses sakarifikasi (Norman, 1980, di dalam Birch and Blakeborough, 1981).



B. PRODUKSI DAN CARA KERJA ENZIM

Enzim amilase merupakan enzim ekstraseluler, sehingga cocok untuk diproduksi dalam skala industri. Proses ekstraksi enzim ekstraseluler tidaklah sesulit enzim intraseluler.

Menurut Boing (1982), syarat mikroorganisme yang dapat digunakan dalam memproduksi enzim secara komersial yaitu :

1. Dapat menghasilkan enzim ekstraseluler yang dikehendaki, karena enzim ekstraseluler lebih mudah pemanenannya.
2. Cukup stabil dan mempunyai kemampuan produksi yang tinggi.
3. Tidak membentuk produk fermentasi yang dapat mengganggu pembentukan enzim yang dikehendaki yaitu senyawa toksik dan antibiotik.
4. Pemanenan atau ekstraksi yang dikehendaki dapat dilakukan dengan mudah.

Proses produksi enzim dapat dilakukan pada media padat maupun media cair. Media cair lebih menguntungkan dibandingkan media padat antara lain karena komponen medianya dapat diatur, memberikan kondisi pertumbuhan yang optimal, substrat yang efisien dan resiko kontaminan yang kecil (Blevins dan Davis, 1979).

Produksi enzim pada umumnya menggunakan metode balik yaitu dengan menumbuhkan mikroorganisme penghasil enzim pada media dan kondisi tertentu. Enzim yang dihasilkan dipisahkan dari biomasnya dengan cara tertentu (Whitaker, 1972).



Media pertumbuhan sangat mempengaruhi proses produksi, dan hasil proses produksi itu sendiri. Oleh karena itu formulasi media pertumbuhan dan waktu kultivasi merupakan faktor penentu dalam produksi enzim baik skala lab, rumah tangga (sedang) maupun skala industri (Whitaker, 1972).

Produksi enzim secara *in vitro* dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain adalah seleksi mikroorganisme, komposisi media untuk fermentasi serta faktor lingkungan seperti pH, suhu, agitasi atau aerasi (Whitaker, 1972).

Menurut Meyrath dan Volovsek di dalam Reed (1975), kecepatan produksi enzim α -amilase oleh *Aspergillus oryzae*, tidak dipengaruhi oleh perbedaan sumber karbon dalam media selama tahap pertumbuhan cepat tetapi sumber karbon akan berpengaruh dengan nyata pada tahap produksi.

Pati adalah *inducer* bagi produksi enzim α -amilase dari *Aspergillus spp* dan maltosa sebagai induser bagi produksi enzim α -amilase dari *Bacillus substillis* (Windish dan Mhatre, 1965).

Enzim α -amilase pada umumnya stabil pada kisaran pH 5.5 sampai 8. Namun aktivitas optimumnya secara normal berlangsung pada pH 4.8 sampai 6.5. Besarnya pH medium pertumbuhan dapat mempengaruhi permeabilitas sel mikroorganisme maupun aktivitas enzim. Aktivitas enzim ditentukan dengan cara mengukur hasil degradasi pati yaitu mengukur kadar pati yang larut atau mengukur kadar maltosa yang terbentuk, yang sering juga dinyatakan dengan mengukur viskositas dan jumlah gula pereduksi yang dihasilkan (Winarno, 1983).

Enzim α -amilase memiliki berat molekul sekitar 50000 dan setiap molekulnya mengandung 1 gram atom Ca. Adanya kalsium yang berikatan dengan molekul enzim, membuat enzim α -amilase relatif tahan terhadap suhu, pH, perlakuan dengan urea atau enzim-enzim protease. Kalsium tidak berperan langsung dalam pembentukan kompleks antara enzim dan media, tetapi konformasi yang optimal aktivitas dan stabilitas memerlukan ion kalsium (Whitaker, 1972).

Agar enzim yang dihasilkan tidak mengalami kerusakan terlebih lagi enzim dalam bentuk cair, diperlukan suatu cara guna mempertahankan stabilitas enzim yaitu dengan cara penambahan bahan aditif. Beberapa bahan aditif yang telah diketahui dapat mempertahankan stabilitas enzim diantaranya adalah gula (sukrosa dan laktosa), alkohol polihidrat atau poliol (gliserol, sorbitol), garam-garam (amonium sulfida) dan macam-macam polimer. Pelarut organik sering mempunyai efek stabilisasi pada konsentrasi rendah tapi pada konsentrasi tinggi mempunyai efek denaturasi yang sangat kuat (Muchtadi *et al.*, 1992).

Menurut Muchtadi *et al.* (1992), senyawa-senyawa hidrofilik seperti gliserol, polietilen glikol, sorbitol, polifinil alkohol dan beberapa gula bila ditambahkan ke dalam larutan enzim dapat meningkatkan interaksi hidrofobik antara residu asam amino non-polar, sehingga konformasi molekul protein menjadi lebih kaku yang selanjutnya akan menyebabkan enzim menjadi lebih tahan terhadap panas. Poliol yang sering digunakan sebagai penstabil enzim adalah sorbitol, mannitol, gliserol, polietilen glikol, etilen glikol, xilitol dan eritritol. Fungsi poliol diantaranya adalah untuk mempertahankan kebiasaan dan mereduksi aktivitas air.



C. PEMURNIAN

Kerja enzim sering terganggu karena adanya kontaminan seperti logam berat dan asam nukleat. Agar terhindar dari kontaminan tersebut maka perlu dilakukan pemurnian. Banyak faktor yang mempengaruhi cara pemilahan metode pemurnian terutama bagi industri diantaranya masalah biaya dan waktu produksi (Priest 1984),

Salah satu tujuan pemurnian enzim ialah untuk memperoleh preparat murni protein enzim, sehingga enzim murni tersebut dapat digunakan untuk menentukan komposisi dan deret asam amino (Lehninger, 1993). Sedangkan menurut Priest (1984), pemurnian enzim yang dilakukan oleh industri sampai pada tahapan tertentu bertujuan untuk menghilangkan metabolit beracun dan sel mikro, mempertahankan aktivitas dan stabilitas enzim serta dengan pemurnian, warna dan odor yang diinginkan dapat diperoleh.

Secara umum untuk memurnikan enzim tidak berbeda dengan memurnikan protein. Ada tiga tahap pemurnian yaitu pengendapan protein, pemisahan dengan kolom kromatografi dengan berbagai media dan metode elektroforesis. Secara rinci tahap tersebut dapat diuraikan yaitu ekstraksi, pemisahan enzim (pengendapan), penyaringan, sentrifuse, dialisis, elektroforesis dan pengeringan baku (Muchtadi, 1992).

Tahap awal ekstraksi dan pemurnian adalah fermentasi mikrobial dengan tujuan produksi enzim. Dalam tahap ini perlu diperhatikan, bahwa semua rangkaian aktivitas inokulasi dan inkubasi harus secara aseptik untuk



memperkecil resiko terkontaminasi dari luar (Fardiaz, 1989). Ekstraksi mengacu kepada pembebasan sejumlah enzim dari sel-selnya atau bagian sel. Ekstraksi dapat dilakukan secara mekanik dan fisik dengan penambahan bahan kimia terhadap suatu sel/membran sel. Untuk enzim *intracellular* dan *ekstrasellular*, penting untuk memodifikasi cairan alami dari medium untuk dapat menyempurnakan proses disosiasi tersebut (Patel, 1985).

Menurut Wang *et al.* (1979), proses yang dapat digunakan untuk ekstraksi enzim adalah dengan cara metode pengendapan (*Precipitation*). Presipitasi enzim merupakan suatu metode untuk memekatkan enzim dan sering dilakukan pada tahap awal dari pemurnian enzim. Metode ini dapat digunakan untuk skala yang cukup besar dan tidak terlalu dipengaruhi oleh material pengganggu seperti pada kromatografi. Menurut Wang *et al.* (1979), presipitasi adalah suatu metode menggunakan penambahan reagen atau mengubah kondisi lingkungan sehingga protein meninggalkan larutan dan membentuk partikel yang tidak larut dalam bentuk endapan. Metode pengendapan enzim dapat dilakukan dengan berbagai cara. Diantaranya berkisar dari penambahan garam netral dan alkohol ataupun perubahan pH sampai dengan reaksi kimia spesifik ion logam dan reagen organik.

Salah satu metode presipitasi adalah dengan penambahan garam pada larutan enzim. Penambahan garam disebut juga dengan *salting out*, yang didasarkan pada kelarutan protein. Keuntungan penggunaan garam organik adalah biaya yang relatif murah, kelarutan tinggi, pH larutan tidak terlalu ekstrim, dengan penambahan garam dapat meningkatkan kekuatan ionik larutan, dan tidak



memberi pengaruh yang berarti terhadap enzim serta tidak bersifat toksik (Winarno, 1986). Sedangkan kerugian penggunaan garam ialah dapat menyebabkan penurunan kelarutan protein globular, jika konsentrasi garam tinggi (Winarno, 1986), dan penurunan gaya tolak pada muatan yang sama antar molekul protein yang identik.

Beberapa enzim tidak tahan terhadap presipitasi dengan garam amonium sulfat. Untuk itu dapat digunakan garam lain atau memakai pelarut organik seperti metanol, etanol, propan-2-ol dan aseton. Pengendapan dengan pelarut organik harus dilakukan pada suhu rendah dan waktu sesingkat mungkin. Dan setelah pengendapan harus secepatnya dilakukan pencucian dengan air destilata agar konsentrasi bahan pengendap berkurang sehingga tidak merusak protein enzim. Penambahan pelarut organik dilakukan pada suhu rendah dan secara perlahan-lahan (Schwimmer, 1981). Pelarut organik juga dapat menurunkan konstanta dielektrik dari medium sehingga dapat menurunkan kelarutan protein. Pelarut organik tidak banyak digunakan dalam skala besar, karena biayanya yang mahal, mudah terbakar dan ada kecenderungan terjadi denaturasi yang cepat pada protein terlarut jika suhu meningkat diatas 0°C (Chaplin dan Bucke, 1990).

Selain garam dan pelarut organik, polimer dengan berat molekul yang tinggi, netral dan larut air dapat juga mengendapkan protein plasma. Kekentalan yang tinggi dapat menyebabkan penggunaan polimer sebagai presipitan protein tidak praktis karena garam maupun pelarut organik memiliki resiko terdenaturasinya protein maka dicobakan polimer dengan kekentalan yang rendah.



Salah satu polimer yang memiliki kekentalan yang tidak terlalu tinggi yaitu polietilen glikol (PEG), yang memiliki derajat polimerisasi yang beragam. PEG dengan berat molekul 20000 akan lebih efektif dibandingkan dengan PEG 6000 dan 4000. Protein yang pertama kali diendapkan dengan PEG ialah fibrinogen (Scopes, 1987). Jadi polimer seperti polietilen glikol dapat digunakan sebagai bahan presipitan, karena kekentalan yang rendah dan tidak menyebabkan denaturasi pada protein terutama enzim.

Menurut Muchtadi *et al* (1992), senyawa-senyawa hidrofilik seperti gliserol, polietilen glikol, sorbitol, polifinil alkohol dan beberapa gula bila ditambahkan kedalam larutan enzim dapat meningkatkan interaksi hidrofobik antara residu asam amino non-polar, sehingga konformasi molekul protein menjadi lebih kaku yang selanjutnya akan menyebabkan menjadi lebih tahan terhadap panas. Polior yang sering digunakan sebagai penstabil enzim adalah sorbitol, mannitol, gliserol, polietilen glikol, etilen glikol, xilitol, dan eritritol. Fungsi polior diantaranya ialah untuk mempertahankan kebebasan dan mereduksi aktivitas air.

Metode ekstraksi yang juga sering digunakan dalam pemurnian enzim adalah sentrifugasi. Pemisahan partikel dari cairan merupakan langkah yang penting dalam isolasi enzim. Metode ini mencakup pemisahan cairan kultur, pemisahan kontaminan, pengumpulan endapan dan pemulihan adsorban protein tambahan dari cairan protein yang lain (Wang *et al.*, 1979).

Pada skala lab, alat-alat ultrafiltrasi dan sentrifugasi lebih sering digunakan. Untuk sentrifugasi sebagian besar menggunakan sentrifugasi yang lengkap

dengan sistem pendingin, sehingga mampu mempertahankan suhu pada atau mendekati 0 °C dengan kemampuan putar yang tinggi (Irawadi *et al.*, 1992).

D. PEMURNIAN DENGAN SISTEM DUA FASE

Salah satu metode yang dapat digunakan untuk memisahkan protein adalah dengan dua fase seperti PEG-Dekstran (polimer-polimer) dan PEG-Fosfat (polimer-garam). Metode ini dapat digunakan untuk memekatkan protein, dan memisahkan protein dari pecahan-pecahan sel. Metode ini memiliki proses yang lembut dalam memurnikan protein, sehingga denaturasi dan kehilangan aktivitas biologis protein jarang terjadi (Harris dan Angal, 1989).

Sistem dua fasa telah berkembang selama 30 tahun. Polimer terbanyak digunakan dan dipelajari dalam sistem dua fasa adalah polietilen glikol dengan dekstran atau garam seperti potasium fosfat. Pada kedua sistem tersebut polietilen glikol akan dominan berada di fase atas yaitu fase ringan, sementara dekstran atau garam akan dominan di bawah, yaitu fase yang lebih berat dan padat (King, 1992).

Menurut Kula (1986), sistem dua fase yang terdiri dari dua larutan polimer yang larut air, disebut juga sistem dua fase cair, seperti polietilen glikol-desktran atau polimer-garam seperti polietilen glikol dan larutan garam fosfat atau garam sulfat.

Bila dua polimer dengan jumlah tertentu dilarutkan dalam suatu pelarut, maka larutan awal yang bersifat homogen menjadi terpisah dengan sendirinya, dimana

salah satu polimer akan dominan pada salah satu fase atau kedua polimer berada dalam fase yang sama. Secara umum satu polimer akan mengumpul pada fase yang lebih ringan yaitu fase atas, sementara polimer yang lain akan berada pada fase bawah karena lebih berat dan padat atau dapat juga karena perbedaan dua muatan elektrolit (King, 1992). Polimer yang dapat digunakan untuk membentuk sistem dua fase cair dapat dilihat pada tabel dibawah :

Tabel 1. Polimer pada sistem dua fase cair (Albertsson *et al.*, 1990).

Komponen 1	Komponen 2
Polietilen glikol	Dekstran
Polietilen glikol	Pati Hidroksipropil
Polietilen glikol	Potasium fosfat
Polietilen glikol	Potasium sulfat

Proses pemisahan dua fase ditentukan oleh karakteristik fase itu sendiri seperti koefisien partisi. Koefisien partisi dapat dipengaruhi oleh ion buffer dalam sistem dan karakteristik biomolekul itu sendiri. Faktor lain yang mempengaruhi koefisien partisi adalah pH, kekuatan ion, suhu dan hidrofobisitas (Kula, 1986).

Suhu memberikan pengaruh terhadap diagram fase, partisi dan stabilitas protein (Kula, 1979). Penggunaan polimer hidrofilik dapat meningkatkan stabilitas enzim, sehingga separasi dapat dilakukan pada suhu ruang. Selama ini penambahan pendingin sering digunakan untuk proses pemurnian biokimia. Dengan demikian proses biokimia yang selama ini memerlukan pendingin, dapat

diatasi dengan sistem dua fase menggunakan polimer hidrofilik yang dapat meningkatkan stabilitas enzim dan enzim menjadi lebih tahan terhadap panas (Muchtadi *et al.*, 1992)

Berat molekul dan konsentrasi polimer yang digunakan dapat mempengaruhi koefisien partisi. Jenis polimer yang digunakan menentukan hidrofobisitas fase, sementara konsentrasi polimer menentukan rasio volume fase. Monomer masing-masing polimer dapat menolak atau menarik biomolekul.

Sistem dua fase dapat memisahkan bahan yang diinginkan ke dalam fase atas (ringan) pada suhu yang lebih rendah dan konsentrasi polimer yang rendah. Semakin hidrofilik protein, maka akan terpartisi ke dalam fase bawah (fase yang lebih berat) terutama fase yang mengandung polisakarida serta semakin hidrofobik protein akan terpartisi ke fase yang mengandung polietilen glikol (King, 1992).

Komposisi ion dapat memberikan pengaruh besar terhadap partisi makromolekul bermuatan, karena adanya perbedaan tipe ion dan rasio antara konsentrasi ion. Pengubahan komposisi ion dapat digunakan untuk mengatur koefisien partisi yang diinginkan. Pada protein bermuatan negatif, koefisien partisi yang semakin meningkat dapat dicapai dengan menggunakan ion dengan urutan sebagai berikut $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+$ atau $\text{HPO}_3^{2-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{Cl}^-$ (Albertsson, 1983). Untuk muatan makromolekul yang bermuatan positif, digunakan urutan yang berlawanan. Garam-garam tersebut dapat digunakan untuk meningkatkan partisi diantara dua protein berdasarkan muatannya.

Molekul kecil biasanya memiliki koefisien partisi mendekati satu, misalnya glukosa $k=1$, xylosa $=1,1$. Komponen dengan molekul kecil akan terdistribusi diantara fase, penyebab utamanya adalah perbedaan muatan dan hidrofobisitas antara fase kecil, sehingga koefisien partisi kecil (Anderson dan Hahn-Hagerdal, 1990).

Semakin besar berat molekul, semakin terpartisi pada satu sisi. Dalam banyak hal partisi sangat tergantung pada berat molekul polimer yang digunakan. Secara umum jika berat molekul satu polimer diturunkan, substansi cenderung terpartisi ke fase atas (fase yang lebih ringan). Protein memiliki kecenderungan lebih ke fasa yang kaya polietilenglikol jika berat molekulnya dikurangi (Albertsson, 1983).

Koefisien partisi enzim juga dipengaruhi oleh konsentrasi dan berat molekul polimer. Beberapa percobaan menunjukkan bahwa koefisien partisi dapat ditingkatkan dengan menurunkan berat molekul PEG, sementara peningkatan konsentrasi polietilen glikol akan menurunkan koefisien partisi (Kula, 1986).

E. METODE FILTRASI GEL

Berbagai teknik pemisahan dalam proses pemurnian dapat diklasifikasikan berdasarkan ukuran partikel (filtrasi, mikrofiltrasi), ukuran molekul (ultrafiltrasi, dialisis, kromatografi atau filtrasi gel). Teknik kromatografi banyak digunakan untuk pemisahan dan pemurnian komponen (bioproduk) yang mempunyai nilai

ekonomi yang tinggi seperti enzim, antibodi, hormon dan lain-lain (Mangunwijaya, 1988).

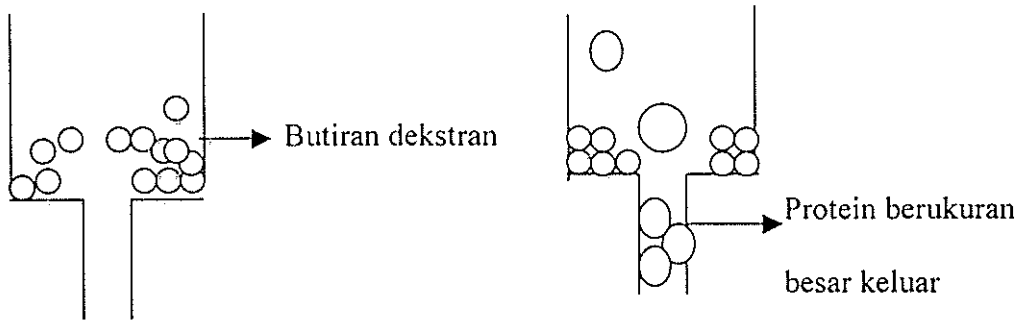
Kromatografi merupakan proses pemisahan yang didasarkan pada distribusi diferensial dari komponen sampel di antara dua fasa. Salah satu fasa (tetap) dan fasa lainnya bergerak diantara celah-celah pada permukaan fasa tetap. Pergerakan fasa mobil mengakibatkan pergerakan diferensial dari komponen sampel.

Kromatografi gel mampu memisahkan fraksi enzim dalam proses pemurnian enzim. Proses pemisahan dengan kromatografi gel tergantung pada kemampuan molekul sampel dalam melewati pori-pori pada fase tetap. Molekul besar yang tidak dapat masuk ke dalam pori-pori gel akan bergerak di dalam kolom lebih cepat sehingga akan terpisah dengan molekul lain yang lebih kecil (Darwis dan Sukara, 1990).

Metode ini merupakan pemisahan menggunakan gel yang dibuat dari bahan dasar dextran, yaitu suatu jaringan tiga dimensi dari molekul-molekul linier polisakarida. Bahan ini dapat mengembang dalam air membentuk struktur tertentu, sehingga dapat memisahkan molekul-molekul berdasar ukurannya. Selain bentuk geometrik, sifat-sifat permukaan juga mempengaruhi kemampuan penyinggannya.

Molekul dengan berat molekul 100 dalton sampai beberapa juta dalton juga dapat dikumpulkan dan dipisahkan dengan metode ini. Gel dapat pula dibuat dari sejenis polistirena dan digunakan untuk memisahkan polimer-polimer (Nur dan Adijuwana, 1987).





Enzim α -amilase yang berasal dari bakteri memiliki berat molekul 96 900 untuk bentuk kristal. Ada dua fraksi yang diperoleh dari filtrasi gel (Shepadex), yaitu satu komponen yang bergerak lebih cepat dengan berat molekul 50 000 dan komponen yang lebih lambat dengan berat molekul 10 000 dalton. Fraksi yang memiliki berat molekul 50 000 adalah monomer α -amilase (Winarno 1995 didalam Stryer, 1975)

III. BAHAN DAN METODE

A. ALAT DAN BAHAN

1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas, erlenmeyer, neraca analitik, *autoclave*, *shaker water bath*, pH meter, corong pemisah (separatory funnel), alat filtrasi gel, pengaduk magnetik dan *Hot Plate*.

2. Bahan

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri termofilik lokal *Bacillus sp* (Damardjati *et al.*, 1997) dengan kode TII₁₂ yang merupakan hasil isolasi Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan (BalitBio), Cimanggu-Bogor.

Bahan-bahan yang digunakan sebagai media peremajaan adalah bakto agar, ekstrak khamir dan akuades. Bahan nutrisi untuk kultivasi yaitu ekstrak khamir, bakto triptone, MgCl₂, KH₂PO₄, CaCl₂, K₂HPO₄, NaCl, (NH₄)₂SO₄ dan amilum sebagai substrat serta akuades sebagai pelarut.

Bahan kimia yang digunakan untuk proses pemurnian dengan sistem dua fase yaitu polietilen glikol (PEG) dengan berat molekul yang berbeda yaitu 600, 3350 dan 8000, dan garam fosfat yang merupakan campuran KH₂PO₄ dan Na₂HPO₄, HCl 0,1 N, Sephadex G-100, buffer Tris-HCl, Bovine Serum



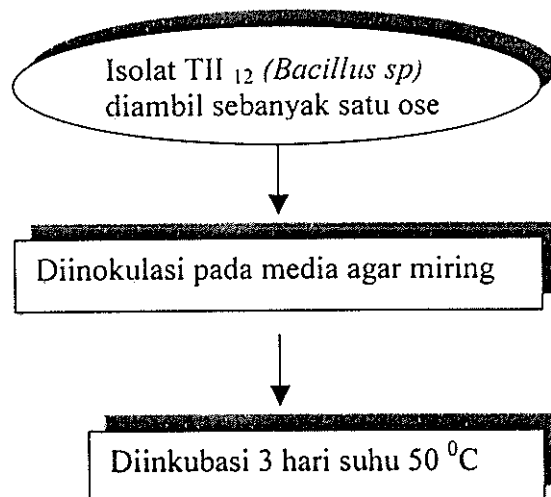
Albumin (BSA), buffer Fosfat, NaOH, NaK-Tartat, CBB G-250, etanol, aseton dan akuades.

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini meliputi beberapa tahapan yaitu produksi enzim, pemisahan dua fase, pengendapan, dan fraksinasi protein dengan cara filtrasi gel. Tahapan proses yang dilakukan yaitu :

1. Penyegaran Isolat

Sebelum mikroorganisme digunakan untuk memproduksi enzim, mikroorganisme tersebut perlu peremajaan. Tahapan peremajaan seperti pada alur dibawah ini :



Gambar 1. Skema Penyegaran Isolat

2. Penyiapan Substrat

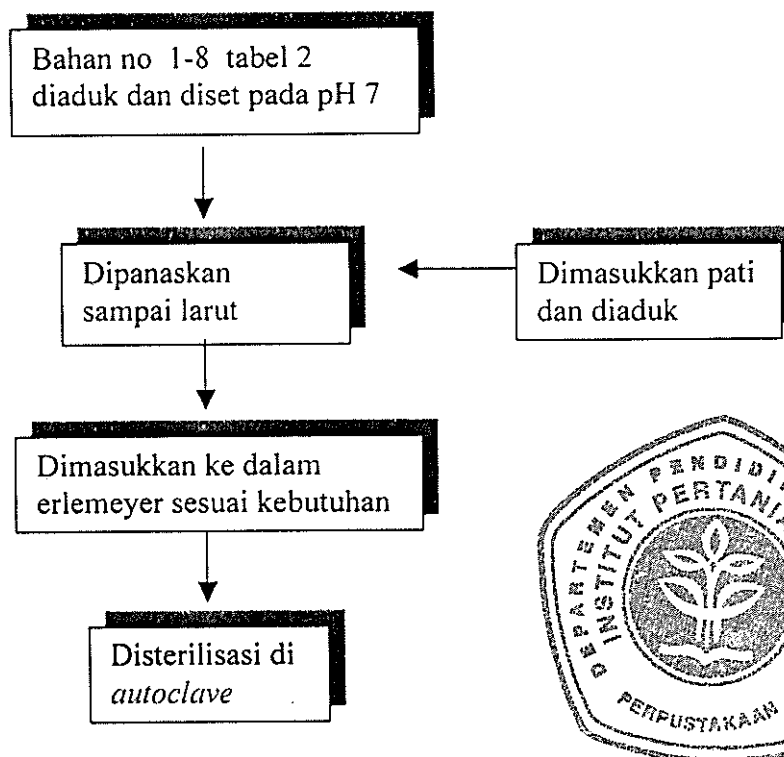
Media yang digunakan untuk propagasi enzim ialah media cair dengan komposisi sebagaimana yang tercantum pada Tabel 2 berikut :

Tabel 2. Komposisi substrat

N0	Bahan	Jumlah (gr/100 ml)
1	Ekstrak khamir	0,5
2	tripton	0,5
3	MgCl ₂	0,2
4	KH ₂ PO ₄	0,2
5	CaCl ₂	0,2
6	K ₂ HPO ₄	0,4
7	NaCl	0,2
8	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5
9	Pati	1,0

Sumber :Gao *et al.*, 1984 yang dimodifikasi

Prosedur :



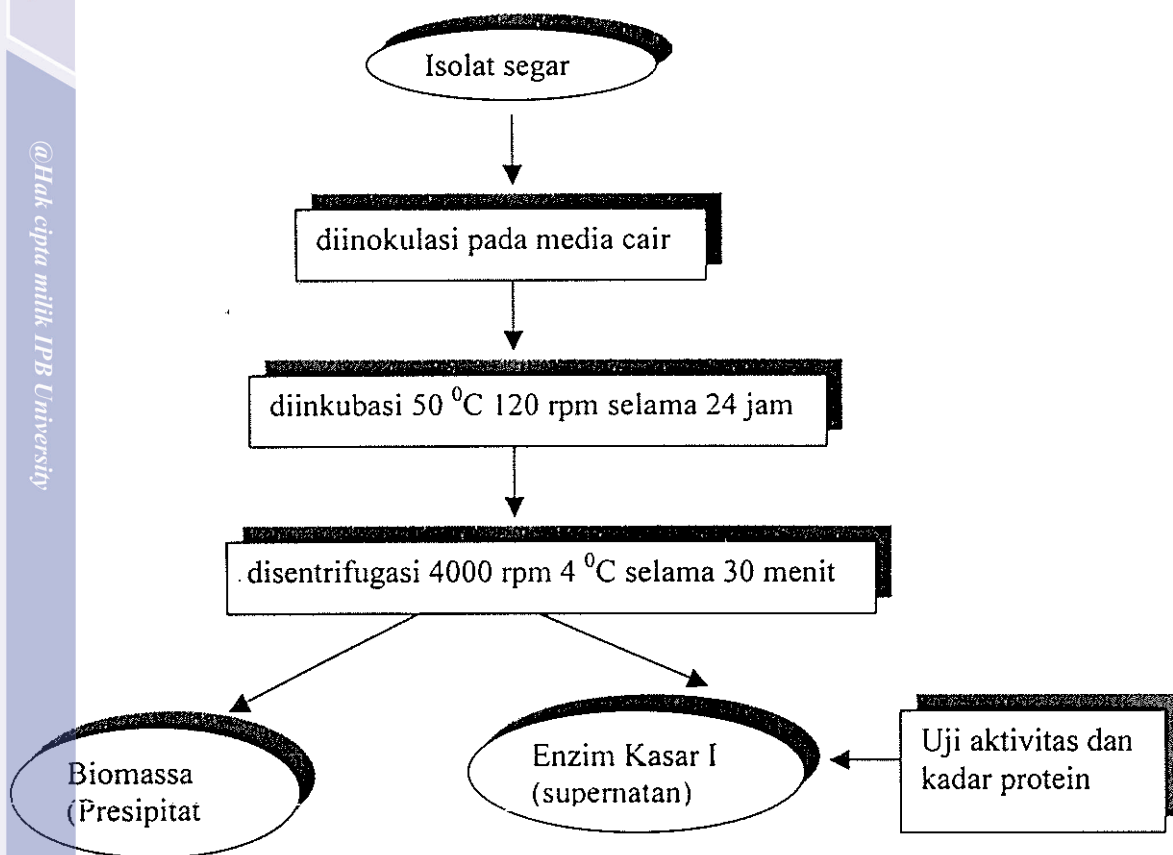
Gambar 2. Skema Pembuatan Media Peremajaan

3. Produksi Enzim

Penyiapan inokulum dilakukan pada kondisi aseptis. Sebanyak satu ose atau lebih kultur unggul yang telah mengalami penyegaran selama tiga hari diinokulasikan ke dalam 250 mililiter media steril dengan pH 7, kemudian diinkubasikan di dalam *Shaker Inkubator* dengan kecepatan 150 rpm, suhu 50 °C selama 24 jam. Setelah 24 jam inokulum tersebut disentrifise selama 30 menit pada suhu 4 °C sehingga diperoleh biomassa (endapan) dan supernatan (enzim kasar I).

Supernatan dan biomassa yang telah dipisahkan kemudian disimpan di dalam ruang yang bersuhu 4 °C agar supernatan (enzim kasar I) tidak mengalami kerusakan. Pengamatan yang dilakukan yaitu pengukuran aktivitas enzim menggunakan metode DNS. Enzim kasar I sebanyak 1 ml dicampurkan dengan 0,9 ml buffer fosfat pH 7, kemudian diinkubasi selama 5 menit, suhu 50 °C. Lalu ditambahkan 2 ml substrat (2 % *soluble starch* dalam buffer fosfat pH 7), diinkubasi selama 30 menit suhu 50 °C, lalu ditambahkan 3 ml DNS dan dimasukkan dalam air mendidih selama 5 menit. Kemudian didinginkan 15 menit dan diukur kadar maltosa yang terbentuk menggunakan spektrofotometer. Hal yang sama dilakukan pada standar dan blanko dan pengukuran kadar protein menggunakan metode Bradford (Prosedur lengkap pada lampiran 1). Gambar alurnya dapat dilihat dibawah ini :

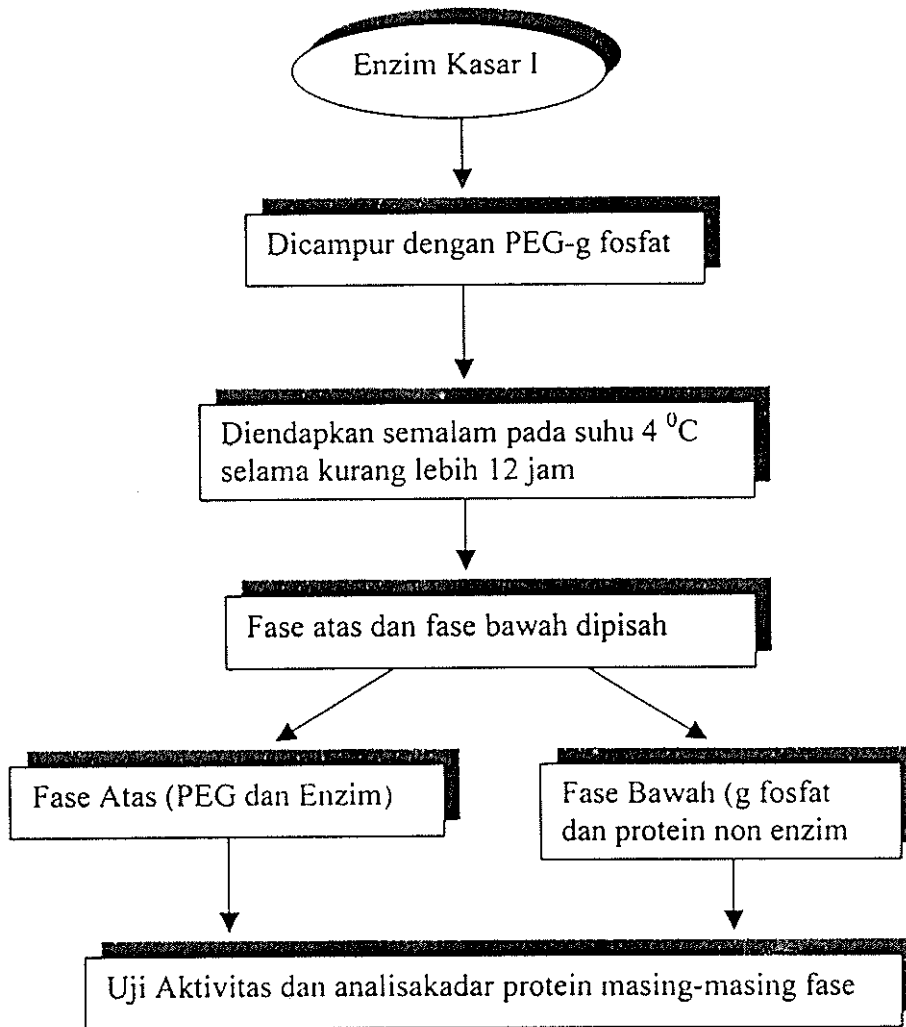




Gambar 3. Skema Proses Produksi Enzim

4. Pemurnian enzim dengan sistem dua fase

Enzim kasar satu (supernatan) dicampur dengan PEG-garam fosfat pada konsentrasi optimal pemurnian dengan dua fase, sehingga terbentuk dua fase. Kemudian campuran tersebut diendapkan semalam pada suhu 4 °C. Setelah diendapkan semalam, fase atas dan fase bawah dipisahkan. Enzim dipisahkan dari masing-masing fase. Pengujian aktivitas enzim dan kadar protein dilakukan terhadap enzim yang telah dipisahkan dari masing-masing fase. Metode pemurnian dengan sistem dua fase dapat dilihat pada Gambar 4.



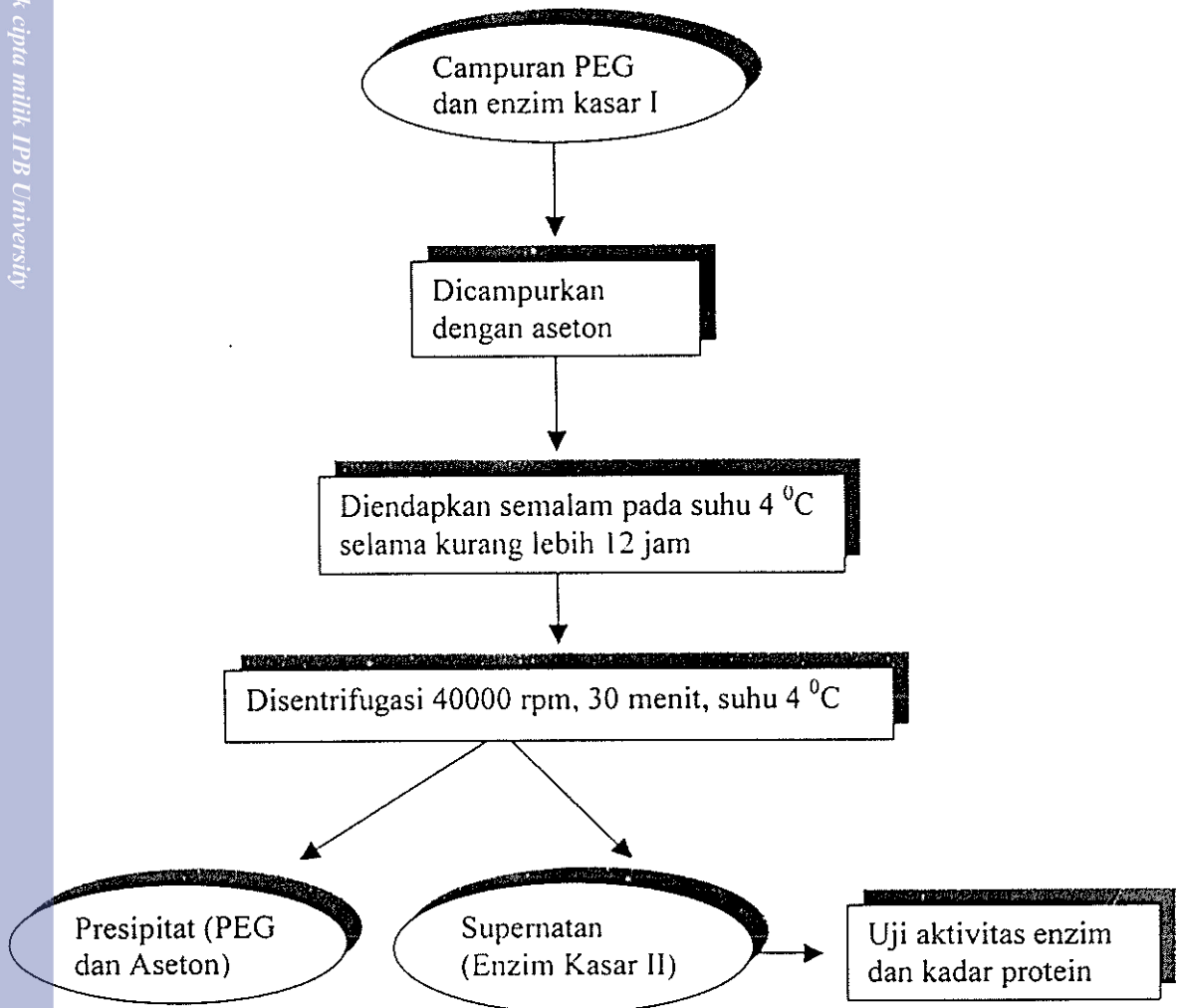
Gambar 4. Skema Pemurnian dengan sistem dua fase

5. Pengendapan

Proses pengendapan dilakukan dengan menggunakan pelarut organik aseton. Perbandingan aseton dan fase atas (campuran PEG-enzim kasar I) adalah 3:2. Proses pengendapan berlangsung semalam pada suhu 4 °C, kemudian dipisahkan dengan sentrifuse. Hasil sentrifuse adalah Enzim kasar

II dan presipitat yang mengandung PEG dan Aseton serta bahan pengotor.

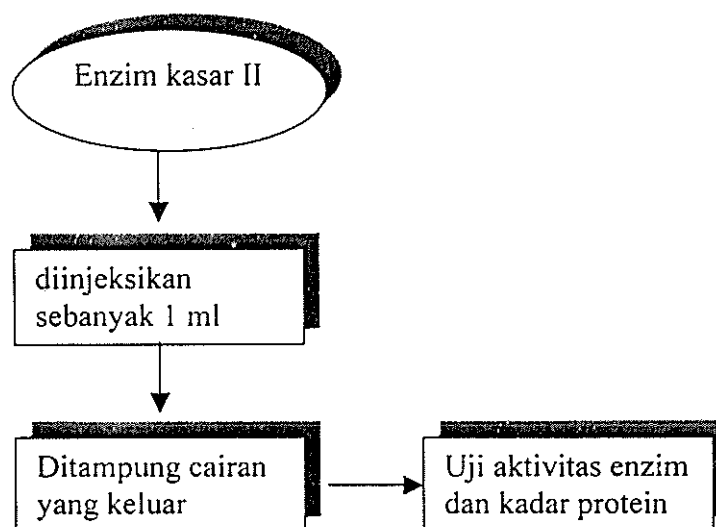
Skemanya dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Skema pengendapan protein

6. Pemurnian

Untuk memurnikan enzim Kasar II yang diperoleh digunakan cara filtrasi gel. Sebelumnya enzim kasar II hasil sentrifuse diberi larutan penyangga yaitu buffer fosfat (lampiran 2), sehingga enzim tidak mengalami kerusakan. Pada filtrasi gel sampel sebanyak satu ml diinjeksikan ke dalam alat filtrasi gel. Pada umumnya setelah 100 menit, akan muncul puncak (*peak*), yang menandakan enzim tersebut telah murni. Pada waktu *peak* tersebut muncul, cairan yang keluar ditampung, kemudian diuji aktivitas dan kadar proteinnya.



Gambar 6. Pemurnian dengan filtrasi gel

C. PERLAKUAN

@Hak cipta milik IPB University

1. Untuk menentukan konsentrasi optimal pemurnian dengan sistem dua fase digunakan PEG dan garam fosfat dengan konsentrasi PEG yaitu 6,7 %, 13,3 %, 20 %, 26 %, dan 41,7% sedangkan garam fosfat dengan konsentrasi 3,5 %, 7,1%, 10,7 %, 21,4 %, 27,3%, dan 54,5 %. Parameter yang digunakan untuk menentukan konsentrasi optimal pemurnian dengan sistem dua fase adalah terbentuknya lapisan dua fase dan volume enzim yang terekstraksi pada fase atas. Enzim kasar I yang ditambahkan sebanyak 20 mililiter.
2. Penentuan volume enzim yang dapat terekstraksi pada fase atas menggunakan konsentrasi PEG- garam fosfat yang telah di dapat. Enzim kasar I yang ditambahkan sebanyak 50 dan 70 ml. (Data analisis dapat dilihat pada lampiran 10).

D. RANCANGAN PERCOBAAN

Untuk menentukan pengaruh volume enzim kasar I yang ditambahkan terhadap volume enzim kasar I yang terekstrak pada fase atas digunakan rancangan acak lengkap dengan rumus sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \quad (i = 1, 2, \dots, k)$$

$$(j = 1, 2, \dots, n_k)$$

Dimana :

Y_{ij} = Variabel yang akan dianalisis

μ = rata-rata umum atau rata-rata sebenarnya

τ_i = efek perlakuan penambahan volume enzim kasar I ke i

E_{ij} = Kekeliruan, berupa efek acak yang berasal dari unit eksperimen ke j karena dikenai perlakuan ke i.

Jika harga F hitung lebih besar dari F tabel dengan α merupakan taraf signifikan, maka hipotesis H_0 akan ditolak. Kesimpulannya bahwa terdapat perbedaan di antara efek i buah perlakuan.

@Hak cipta milik IPB University

IPB University



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang menyalin sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang menyalin dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. PRODUKSI ENZIM

Produksi enzim dilakukan pada skala lab (kecil) yaitu menggunakan erlenmeyer 250 ml (kultivasi) pada kondisi yang sesuai dengan media pertumbuhannya pada suhu 50 °C, pada pH 7. Pada produksi enzim, faktor yang mempengaruhi produksi enzim diantaranya faktor pH, suhu, kondisi media, ketersediaan makanan pada media, dan aerasi.

Aktivitas amilase sebanding dengan jumlah amilase yang diproduksi. Pembentukan amilase dalam fermentasi menunjukkan pola pembentukan produk yang berasosiasi dengan pertumbuhan sel. Hasil uji aktivitas terhadap supernatan menghasilkan kisaran aktivitas enzim yaitu antara 629,1 sampai 906,6 unit/ml. Menurut Widhyastuti (1998), aktivitas enzim amilase TII₁₂ berkisar antara 356.366 sampai 1102.611 Unit/ml.

Rendahnya aktivitas enzim yang dihasilkan pada skala kecil dibandingkan skala besar menggunakan Bioreaktor yang dilakukan oleh Widhyastuti (1998) dapat disebabkan antara lain oleh waktu kultivasi yang singkat. Awal kultivasi merupakan fase adaptasi (fase Lag) atau fase pertumbuhan yang berlangsung singkat, karena adanya proses propagasi terlebih dahulu. Menurut Wang et al (1979), fase lag merupakan periode adaptasi, yang berlangsung segera setelah inokulasi pada media nutrisi. Faktor yang juga dapat mempengaruhi produksi

enzim adalah kultur yang diinokulasikan. Semakin banyak kultur yang diinokulasikan dapat mempercepat fase adaptasi dan propagasi.

Faktor lain yang juga mempengaruhi produksi enzim yaitu faktor makanan pada media, pH media, aerasi dan suhu. Keseimbangan kandungan nitrogen dan karbon dapat mengontrol pH sebagai buffer (Stanbury dan Whitaker, 1984).

Selain pH, suhu pertumbuhan juga mempengaruhi efisiensi konversi substrat (karbon-energi) menjadi masa sel. Pada umumnya yield konversi maksimum terjadi pada suhu lebih rendah dari suhu pada saat kecepatan pertumbuhan maksimum dan kadang terjadi pada suhu yang lebih rendah dari suhu optimum.

Kadar protein yang dihasilkan setelah fermentasi pada isolat TII₁₂ berkisar antara 0.03 mg/ml sampai 0.244 mg/ml. Berdasarkan penelitian Widhyastuti (1998) kandungan protein berkisar antara 0.429 sampai 0.577 mg/ml. Rendahnya kandungan protein dapat disebabkan oleh produksi enzim (kultivasi) yang berlangsung singkat, menyebabkan protein yang terbentuk masih sedikit. Jika prosesnya dilanjutkan memungkinkan terbentuknya protein lain yang terlarut dalam cairan kultivasi. Faktor lain penyebab rendahnya kadar protein yaitu adanya mikroorganisme yang mengkonsumsi protein terlarut sebagai sumber nitrogen karena kandungan nitrogen pada media sudah habis.

Protein terlarut yang terukur merupakan protein yang tidak ikut terdenaturasi dan diduga diantaranya adalah enzim amilase. Penurunan kandungan protein terlarut juga diduga karena adanya protein yang berada di dalam cairan kultivasi menghidrolisis dirinya sendiri seperti pada protease netral yang jika pada waktu inkubasi optimalnya tidak dipanen.



Aktivitas spesifik menunjukkan aktivitas satu jenis enzim tertentu terhadap kandungan protein terlarut secara keseluruhan. Aktivitas spesifik diperoleh dari perbandingan aktivitas enzim dengan kandungan protein terlarut dan dinyatakan dalam satuan unit/mg protein. Aktivitas spesifik yang diperoleh untuk isolat TII₁₂ berada pada kisaran 5375,2 sampai 24313,5 unit/mg protein.

B. PEMURNIAN DENGAN SISTEM DUA FASE

Pemurnian enzim α -amilase dengan sistem dua fase dilakukan pada corong pemisah, sehingga terjadi pemisahan antara PEG dan garam fosfat pada konsentrasi PEG garam fosfat tertentu, karena adanya koefisien partisi. Konsentrasi PEG yang digunakan adalah 6,7 %, 13,3 %, 20 %, 26 % dan 41,7 %. Sedangkan konsentrasi garam fosfat yaitu 3,5 %, 7,1%, 10,7 %,21,4 % dan 54,5 %, dan volume enzim kasar I yang ditambahkan sebanyak 20 ml. Tahap ini bertujuan untuk melihat terbentuknya lapisan dua fase, yaitu fase atas mengandung PEG dan fase bawah mengandung garam fosfat yang dapat dilihat pada Tabel 3.

Pemurnian dengan sistem dua fase dapat dilakukan secara langsung tanpa diendapkan semalam, namun untuk memudahkan pemurnian dengan sistem dua fase yang terbentuk sebaiknya campuran PEG-garam fosfat diendapkan semalam pada suhu 4 °C

Tabel 3. Penentuan konsentrasi optimal pemurnian sistem dua fase PEG-garam fosfat

Konsentrasi PEG (%)	Konsentrasi g-fosfat (%)					
	3,5	7,1	10,7	21,4	27,3	27,3
6,7	1	1	1	1	0	0
13,3	1	2	1	1	0	0
20	1	1	2	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0
41,7	0	0	0	0	0	0

Keterangan :

0 : Tidak terjadi pemisahan dua fase dengan berat molekul yang berbeda

1 : terjadi pemisahan dua fase dengan volume supernatan yang terekstrak di fase atas sedikit (10-15 ml).

2 : terjadi pemisahan dua fase dengan volume supernatan yang terekstrak di fase atas banyak (15-20 ml).

Dari Tabel 3. terlihat, enzim kasar I yang banyak terekstraksi pada fase atas dengan konsentrasi PEG sebesar 13,3 % dan 20 % sedangkan konsentrasi garam fosfat sebesar 7,1 % dan 10,7 %. Dilihat dari segi ekonomis bahwa konsentrasi yang diambil adalah konsentrasi yang terendah, sehingga konsentrasi optimal pemurnian dengan sistem dua fase adalah PEG sebesar 13,3 % dan garam fosfat sebesar 7,1 %. Jadi konsentrasi tersebut merupakan konsentrasi optimal pemurnian dengan sistem dua fase. Sedangkan pada konsentrasi PEG dan konsentrasi garam fosfat selain konsentrasi yang optimal tersebut pemisahan dua fase yang terjadi pada pemurnian ini sangat sedikit bahkan ada yang tidak terjadi pemisahan sama sekali. Hal ini dapat disebabkan oleh tingginya konsentrasi PEG terhadap garam, sehingga PEG yang memiliki kekentalan yang rendah terlarut pada fase bawah (garam fosfat) yang padat dan berat. Pemisahan yang tidak

terjadi diduga juga karena perbedaan muatan elektrolit yang kecil antara PEG dan garam fosfat (albertsson, 1983). Hal ini diperkuat oleh penelitian yang dilakukan oleh Schmidt *et al* (1994), bahwa dengan peningkatan konsentrasi PEG, maka nilai koefisien partisi juga menurun yang disebabkan oleh enzim yang terekstrak di fase atas menurun.

Untuk melihat pengaruh konsentrasi enzim yang ditambahkan pada konsentrasi PEG 13,3 %, dan garam fosfat. sebesar 7,1 digunakan rancangan acak lengkap. Konsentrasi enzim yang ditambahkan sebanyak 50 dan 70 ml. Enzim yang terekstraksi di fase atas dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Penentuan volume optimum pemurnian dengan sistem dua fase

Enzim kasar I yang ditambahkan (ml)	Fase atas (ml) Ulangan			Fase bawah (ml) Ulangan		
	1	2	3	1	2	3
50 ml	94	93,5	92	6	6,5	8
70 ml	95,5	92,5	95	4,5	7,5	5

Keterangan : Konsentrasi PEG 13,3 % dan garam fosfat 7,1 %

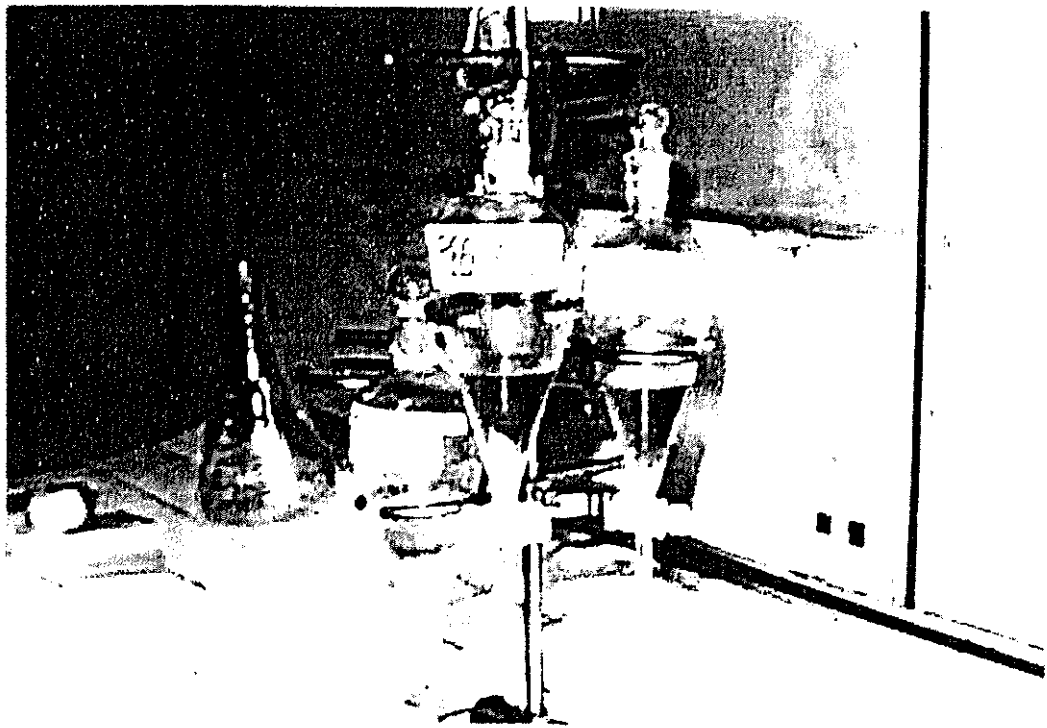
Dari Tabel 4 terlihat, bahwa enzim kasar I yang banyak terekstrak di fase atas adalah pada konsentrasi PEG 13,3 % dan garam fosfat 7,1 % dengan penambahan enzim kasar I sebanyak 70 ml. Dari hasil perhitungan analisis ragam terlihat bahwa penambahan enzim kasar I pada campuran PEG garam fosfat tidak berbeda nyata (Lampiran 10). Sehingga dengan penambahan berapapun enzim kasar I pada konsentrasu PEG dan garam fosfat yang telah didapat menghasilkan enzim yang terekstraksi pda fase atas tidak berbeda nyata. Penambahan enzim kasar I

pada konsentrasi PEG 13,3 % dan garam fosfat 7,1 % tidak boleh melebihi 70 ml.

Jika melebihi 70 ml tidak terjadi pemisahan (Lampiran 10), namun pemurnian dengan volume enzim kasar I kurang dari 70 ml, enzim kasar I akan terpisah..

Namun dilihat dari segi ekonomis, diharapkan dengan bahan yang sedikit dapat menghasilkan hasil yang optimal. Konsentrasi PEG -garam fosfat yang digunakan pada pemurnian dengan sistem dua fase yaitu PEG 13,3 %, garam fosfat 7,1 % dan enzim kasar I sebanyak 70 ml.

Pada pemurnian dengan sistem dua fase didapat bahwa, fase atas mengandung PEG dan enzim kasar I, sedangkan fase bawah mengandung garam fosfat dan kontaminan serta protein non enzim. Hal ini diduga disebabkan oleh sifat enzim yang memiliki kelarutan yang baik terhadap polimer. Terekstraknya enzim kasar I juga dapat disebabkan oleh perbedaan hidrofobisitas. Semakin hidrofobik enzim, maka enzim tersebut akan terpartisi ke fase yang mengandung PEG yang bersifat hidrofilik (King, 1992). Hal ini sama dengan yang dinyatakan oleh Albertsson (1983), bahwa protein cenderung akan terikat ke fase yang kaya Polietilenglikol, jika berat molekulnya dikurangi seperti yang terlihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Pemurnian dengan sistem dua fase

Dari Gambar 6 terlihat pemurnian dengan sistem dua fase menggunakan PEG dengan berat molekul yang berbeda yaitu PEG 600, PEG 3350 dan PEG 8000. Setelah diendapkan semalam pada suhu 4°C fase atas tetap berwujud cair, sedangkan fase bawah menjadi berwujud putih padat. Hal tersebut dikarenakan fase bawah yang merupakan garam fosfat memadat pada suhu dingin (titik beku). Perubahan wujud fase bawah ini memudahkan proses pemisahan dua fase. Setelah dipisahkan proses selanjutnya yaitu pengujian aktivitas enzim dan mengukur kadar protein terhadap enzim yang dipisahkan dari masing-masing fase. Besarnya aktivitas dan kadar protein dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

Tabel 5. Perbandingan aktivitas dan protein total pada fase atas dan fase bawah pada berat molekul PEG yang berbeda

Bahan	Aktivitas enzim (u/ml)		Kadar protein (mg/ml)		Aktivitas Spesifik(u/mg)		KP
	Fase Atas	Fase Bawah	Fase Atas	Fase Bawah	Fase atas	Fase bawah	
Supernatan	655,78	-	0,22	-	5735,2	-	-
PEG 3350	593,15	286,16	0,08	0,434	7414,4	659,3	11,2
PEG 600	632,15	273,66	0,026	0,447	24313,5	612,2	39,7

Keterangan :

KP = Koefisien Partisi

PEG 3350 = PEG dengan berat molekul 3350 begitu juga PEG 600

Konsentrasi PEG yang digunakan 13,3 %

Konsentrasi garam fosfat yang digunakan 7,1 %

Pada Tabel 5. terlihat bahwa aktivitas enzim pada fase atas lebih tinggi dari fase bawah. Enzim kasar I yang terekstraksi di fase atas pada PEG 600 memiliki aktivitas enzim sebesar 632, 15 unit/ml dan aktivitas spesifik sebesar 24313, 5 unit/mg, sedangkan aktivitas enzim fase atas pada PEG 3350 sebesar 593, 15 unit/ml dan aktivitas spesifik sebesar 7141, 4 unit/mg. Aktivitas enzim fase bawah pada PEG 600 sebesar 273 unit/ml dan aktivitas spesifik sebesar 612, 2 unit/mg. Aktivitas enzim fase bawah pada PEG 3350 sebesar 659, 3 unit/mg. Rendahnya aktivitas enzim dan aktivitas spesifik enzim fase bawah dibandingkan fase atas dapat disebabkan oleh banyaknya enzim yang terekstrak di fase atas dibandingkan fase bawah. yang diakibatkan oleh adanya perbedaan hidrofobisitas dan muatan elektrolit (Albertsson, 1983)

Kadar protein terlarut mengalami penurunan setelah pemisahan dua fase. Kadar protein total fase atas pada PEG 3350 sebesar 0,08 mg/ml dan sebesar 0,026 mg/ml pada PEG 600. Sedangkan kadar protein total fase bawah pada PEG 3350 sebesar 0,434 mg/ml dan kadar protein total fase bawah pada PEG 600 sebesar 0,447 mg/ml

Tingginya kadar protein total fase bawah dibandingkan fase atas, karena adanya protein non enzim atau kontaminan lain yang terikat pada fase bawah. Dapat juga disebabkan oleh adanya protein atau enzim amilase yang terekstrak di fase bawah, karena protein atau enzim tersebut memiliki berat molekul yang cukup tinggi. Berat molekul yang cukup tinggi dapat menyebabkan penurunan kekuatan memegang mantel air yang berada disekitar protein, sehingga protein akan mengendap (Winarno, 1986).

Dari Tabel 5 terlihat, pada semua perlakuan, enzim terdistribusi dengan baik pada fase atas. Semakin tinggi aktivitas spesifik enzim fase atas dibandingkan fase bawah, maka koefisien partisi semakin bagus. Koefisien partisi pada PEG 3350 adalah 11,2 sedangkan pada PEG 600 adalah 39,7. Jadi koefisien partisi yang bagus adalah pada PEG 600. Semakin kecil berat molekul PEG, koefisien partisi akan semakin besar. Hal tersebut sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Schmidt *et al.* (1994), bahwa semakin rendah berat molekul PEG, maka koefisien partisi akan semakin besar, yang disebabkan oleh perbedaan pengaruh permukaan hidrofobik antara protein yang berbeda.

Semakin rendah berat molekul PEG, maka koefisien partisi yang dihasilkan akan semakin tinggi. Hal ini diperkuat oleh penelitian yang dilakukan oleh Kula, (1986), bahwa koefisien dipengaruhi oleh berat molekul. Semakin rendah berat molekul, koefisien partisi semakin tinggi, begitu juga sebaliknya. PEG dengan berat molekul kecil juga memiliki kekentalan lebih tinggi dibandingkan dengan PEG dengan berat molekul tinggi. Untuk lebih jelas melihat pengaruh berat molekul PEG terhadap aktivitas enzim dan kadar protein dapat lihat pada Tabel 6 dibawah ini :

Tabel 6. Pengaruh Berat Molekul PEG (PEG 33,3 % dan g-fosfat 13,3 %) terhadap aktivitas enzim dan kadar protein

Bahan	Akt Tot (U/ml)	Prot terlarut (mg/ml)	Akt spesifik (U/mg)	Kemurnian (kali)	Rendemen (%)
Supernatan	771,92	0,112	6892,14	1	100
PEG 8000	599,39	0,073	8210,82	1,19	99
PEG 3350	693,64	0,081	8563,46	1,2	82
PEG 600	820,56	0,086	9541,39	1,4	92

Keterangan:

Konsentrasi PEG = 13,3 %,

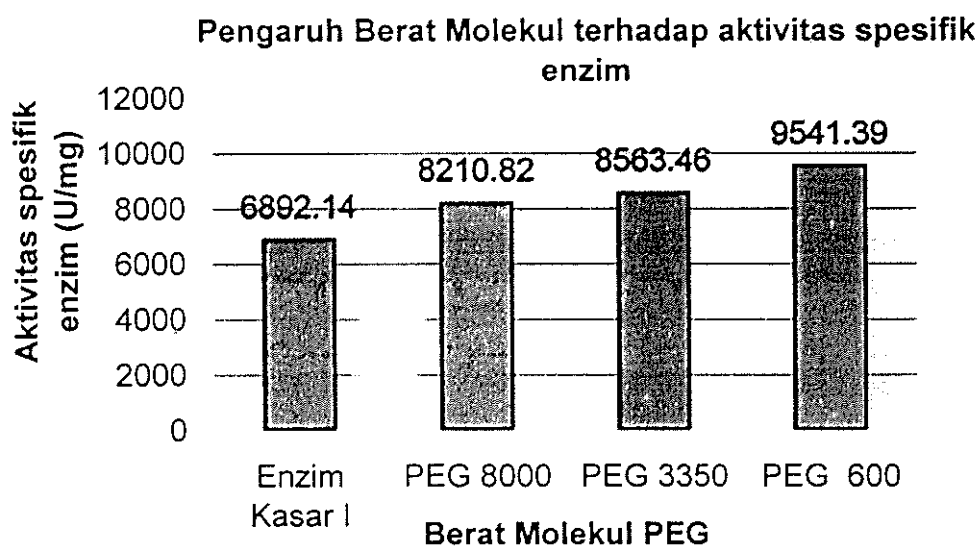
garam fosfat = 7,1 %

enzim kasar I = 70 ml

Dari hasil pengamatan pada Tabel 6. terlihat bahwa pemisahan dua fase menggunakan tiga jenis berat molekul PEG, yaitu PEG 600, PEG 3350, dan PEG 8000, menghasilkan aktivitas enzim dan protein total yang berbeda. Hal ini berpengaruh terhadap aktivitas spesifik dan kemurnian yang dihasilkan. Dari data terlihat PEG dengan berat molekul terkecil yaitu PEG 600 memiliki aktivitas enzim terbesar yaitu 820,56 u/ml. Aktivitas terkecil didapatkan pada pemurnian dengan sistem dua fase yang menggunakan PEG dengan berat molekul terbesar 8000 sebesar 599,39 u/ml.

Dari Tabel 6 juga terlihat bahwa kemurnian enzim meningkat dari 1,0 menjadi 1,4 pada penggunaan PEG 600 dan 1,2 pada PEG 3350 serta 1,19 pada PEG 8000. Kemurnian yang mulai meningkat menandakan protein lain sudah mulai terpisah dari campuran enzim kasar I. Kemurnian yang dihasilkan pada pemurnian dengan sistem dua fase masih rendah, hal ini disebabkan karena

pemurnian ini merupakan tahapan pertama pemurnian, jadi masih perlu tahapan pemurnian lainnya untuk menghasilkan kemurnian tinggi. Walaupun kemurniannya rendah, tetapi rendemen yang dihasilkan dengan sistem dua fase ini cukup tinggi, yaitu berkisar antara 82 sampai 99 %. Untuk lebih jelas melihat pengaruh berat molekul PEG terhadap aktivitas spesifik enzim yang dihasilkan dapat dilihat pada Gambar 7 dibawah ini:



Gambar 7. Pengaruh berat molekul PEG terhadap aktivitas spesifik enzim pada pemurnian dengan sistem dua fase

Pada Gambar 7 terlihat, bahwa aktivitas spesifik enzim yang tertinggi pada pemurnian dengan sistem dua fase adalah penggunaan PEG dengan berat molekul rendah yaitu PEG 600. Tingginya aktivitas spesifik enzim menggunakan PEG dengan berat molekul terkecil disebabkan oleh sifat PEG yaitu PEG dengan berat molekul kecil memiliki kekentalan lebih tinggi dibandingkan PEG dengan berat molekul besar, sehingga diduga interaksi PEG

dengan molekul air lebih kuat, sehingga akan terbentuk kelompok yang dapat mencegah terbukanya rantai polipeptida yang menjadikan enzim lebih stabil (Muchtadi et al., 1992).

Setelah enzim dipisahkan, dilakukan uji aktivitas enzim dan kadar protein total masing-masing fase. Proses pemurnian selanjutnya adalah pengendapan.

C. PENGENDAPAN

Proses pengendapan menggunakan bahan organik aseton. Pengendapan berlangsung semalam pada suhu 4 °C. Hasil pengendapan yaitu enzim kasar II, kemudian hasil pengendapan diuji aktivitas enzimnya dan kadar protein.

Tabel 7. Pengaruh pengendapan dengan sceton terhadap aktivitas enzim dan protein total pada PEG (13,3 %) dan g-fosfat (7,1%)

Bahan	Akt Tot (U/ml)	Prot terlarut (mg/ml)	Akt spesifik (U/mg)	Kemurnian (kali)
Enzim kasar II	771,92	0,112	6892,14	1
PEG 8000	737,71	0,252	2927,42	0,42
PEG 3350	653,35	0,073	8950,00	1,3
PEG 600	465,62	0,049	9502,45	1,4

Dari Tabel 7 terlihat, setelah diendapkan semalam dengan aseton, aktivitas enzim pada PEG 600 dan 3350 mengalami penurunan. PEG 3350 memiliki aktivitas enzim 653,35 U/ml sedangkan PEG 600 memiliki aktivitas enzim yaitu 465,62 U/ml. Penurunan aktivitas pada PEG dengan berat molekul 3350 dan 600

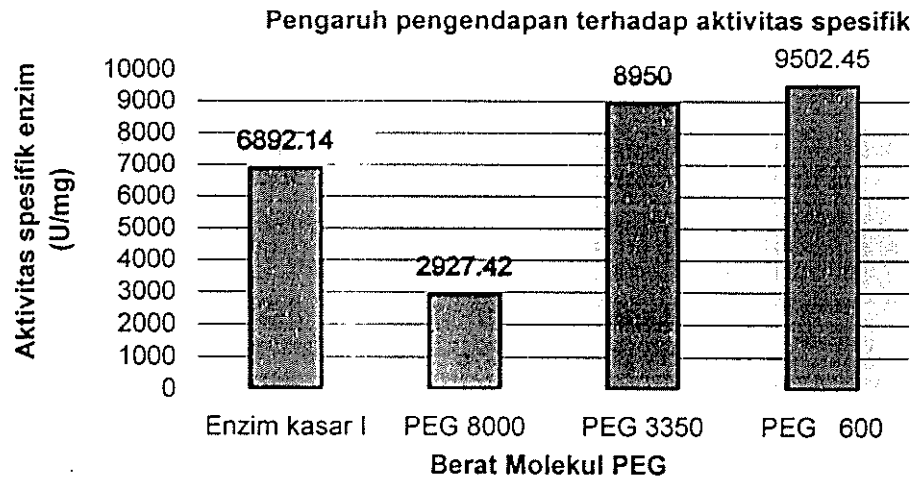
disebabkan oleh terdenaturasinya enzim yaitu terjadinya kerusakan struktur akibat terjadinya pelipatan kembali struktur enzim, gugus hidrofobik akan terlipat keluar, sehingga terjadi perubahan dalam sisi aktif enzim (Winarno, 1995). Penurunan aktivitas enzim juga dapat disebabkan oleh penurunan kekuatan air melarutkan suatu enzim dengan adanya penambahan konsentrasi pelarut organik.

PEG 600 dan PEG 3350 memiliki konsentrasi tinggi, sehingga aseton sebagai pelarut organik, cenderung untuk berinteraksi dengan enzim yang menyebabkan enzim mengalami denaturasi. Sedangkan PEG 8000 yang memiliki konsentrasi rendah, asetonnya cenderung untuk berinteraksi dengan PEG dibandingkan dengan enzim. Aseton yang digunakan pada proses pengendapan enzim menurut Schwimmer (1981), merupakan pelarut organik yang kurang efektif dalam memecah grup prostatik, dibandingkan garam. Selain itu penggunaan aseton harus dilakukan pada suhu rendah (dibawah 0°C). Menurut Manning dan Champbel (1961), pengendapan berlangsung pada ruangan bersuhu -10°C . Penurunan aktivitas enzim maupun protein juga dapat disebabkan oleh komposisi enzim kasar I dengan aseton.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Trinovia (1997), perbandingan optimal aseton terhadap enzim 3:2. Pada penelitian ini penambahan aseton terhadap enzim sama dengan penelitian terdahulu tersebut, sehingga komposisi aseton terhadap enzim berlebih. Hal ini dikarenakan, pada penambahan aseton ke dalam supernatan, didalamnya tidak hanya enzim kasar I, tapi juga ada PEG. Sehingga perbandingan aseton terhadap enzim kasar I melebihi perbandingan 3



banding 2. Banyaknya aseton dalam fase atas (enzim kasar I dan PEG) dapat menyebabkan enzim terdenaturasi. Untuk lebih jelas melihat pengaruh pengendapan terhadap aktivitas spesifik dapat dilihat pada Gambar 8 dibawah ini



Gambar 8. Pengaruh pengendapan dan berat molekul PEG terhadap aktivitas spesifik enzim

Dari Gambar 8 terlihat bahwa aktivitas spesifik enzim pada PEG 600 sebesar 9502,45 U/mg, dan pada PEG 3500 aktivitas spesifik sebesar 8950,00 U/mg sedangkan pada PEG 8000 aktivitas spesifiknya sebesar 2927,42 U/mg. Rendahnya aktivitas spesifik enzim pada PEG 8000 disebabkan oleh adanya zat lain yang terikat pada enzim yaitu aseton dan PEG. Sedangkan meningkatnya aktivitas spesifik enzim pada PEG 600 disebabkan oleh semakin meningkatnya kemurnian enzim

Setelah pengendapan, enzim yang dihasilkan berbentuk padat, sehingga untuk menjaga stabilitasnya ditambahkan buffer sitrat pH7. Dan dilanjutkan proses selanjutnya yaitu filtrasi gel.

D. PEMURNIAN DENGAN FILTRASI GEL

Pemurnian dengan filtrasi gel menggunakan bahan gel dektran yang memiliki sifat tahan terhadap garam dan basa pada konsentrasi tinggi, akan tetapi rusak oleh asam (dibawah pH 2 dan oksidator kuat). Pada filtrasi gel ini molekul akan tersaring berdasarkan ukurannya. Molekul protein besar akan langsung keluar melalui kolom pada awal elusi berlangsung, sedangkan molekul protein dengan ukuran kecil akan terperangkap dalam granula bahan kolom dan terelusi keluar secara bergradien dari ukuran yang lebih besar sampai yang paling kecil, tergantung ukuran porus bahan kolom tersebut.

Enzim hasil pengendapan dilewatkan pada kolom filtrasi gel superdex 6-75 berukuran 116 x 60 cm pada suhu kamar. Eluen yang digunakan adalah buffer tris Cl 0,25 M pH 7. Elusi dilakukan dengan laju alir 1 ml/menit.

Pada filtrasi gel dihasilkan *peak*, yang terlihat pada gambar. *Peak* ini menandakan adanya enzim. *Peak* tertinggi berarti memiliki aktivitas enzim dan protein tinggi. Munculnya *peak* tersebut pada umumnya lebih satu jam setelah diinjeksikan. Awalnya tidak akan muncul *peak*, karena enzim yang berukuran besar yang langsung keluar, sedangkan enzim amilase merupakan enzim dengan berat molekul sekitar 50000 dalton.

Pada filtrasi gel, cairan yang ditampung dan diambil adalah yang memiliki *peak* yang tinggi. Pada filtrasi gel ini ada yang menghasilkan dua *peak*, ada yang tiga *peak*, tergantung enzim dan kontaminan yang terdapat didalamnya (Lampiran 5, 6 dan 7). Hasil filtrasi gel yang memiliki *peak* tertinggi ditampung, kemudian diuji aktivitas enzim dan kadar protein.

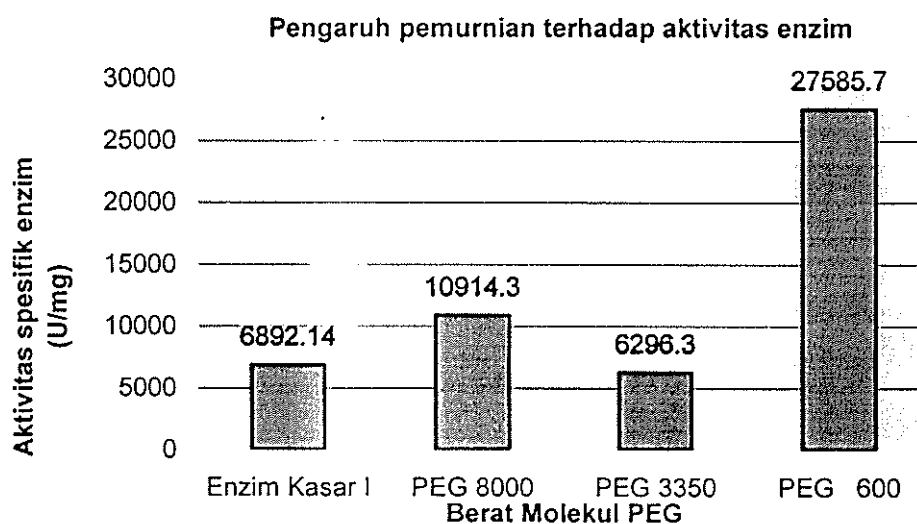
Tabel 8. Aktivitas enzim dan protein total hasil filtrasi gel

Bahan	Akt (U/ml)	Prot tot(mg/ml)	Akt sps(U/mg)	kemurnian(kali)
Enz Kasar I	771,92	0.112	6892,14	1
PEG 8000	229,2	0,021	10914,3	1,6
PEG 3350	188,89	0,030	6296,3	0,91
PEG 600	193,1	0,007	27585,7	4

Keterangan : Enz = Enzim

Dari Tabel 8 terlihat, bahwa aktivitas enzim mengalami penurunan setelah pemurnian dengan filtrasi gel. Pada PEG 8000 aktivitas enzim sebesar 229,2 U/ml, dan pada PEG 3350 aktivitas enzim sebesar 188,89 U/ml. Sedangkan pada PEG 600 aktivitasnya terkecil yaitu 193,1 U/ml. Untuk lebih jelas dapat dilihat pada Gambar 9. Turunnya aktivitas enzim diduga disebabkan pengaruh proses sebelumnya yaitu pengendapan dengan aseton. Setelah diendapkan dengan aseton, aktivitas enzim pada PEG 600 memiliki nilai terkecil, sehingga setelah pemurnian dengan filtrasi gel aktivitasnya juga terkecil. Turunnya aktivitas enzim juga diduga karena semakin murninya enzim. Setelah pemurnian, kadar protein total mengalami penurunan. Hal ini disebabkan oleh kemurnian yang semakin tinggi. Penurunan kadar protein ini juga dialami oleh beberapa peneliti lain yaitu Obi dan Obida (1983). Dalam pemurnian enzim amilase yang dilakukan oleh Obi dan Obida (1883) dari *Actinomycetes*, protein yang tertinggal hanya sekitar 0,6 % dibandingkan kadar protein sebelum melalui beberapa tahapan pemurnian.

Walaupun aktivitas enzim dan kadar protein mengalami penurunan, namun aktivitas spesifik meningkat. Aktivitas spesifik amilase dalam penelitian ini jauh lebih tinggi dari aktivitas amilase termostabil *Bacillus licheniformis* yang dilakukan oleh Inova et al., (1993) yaitu 4,300 u/mg dan oleh Lestari et al., (1999) dari *Bacillus stearothermophilus* yaitu 18155,4 u/mg. Untuk lebih jelas, aktivitas spesifik yang dihasilkan oleh filtrasi gel dapat dilihat pada Gambar 9 dibawah ini.



Gambar 9. Pengaruh pemurnian dan berat molekul PEG terhadap aktivitas spesifik enzim

Kemurnian yang dihasilkan dari filtrasi gel dibandingkan enzim kasar I pada PEG 600 sebesar 4 kali, PEG 3350 sebesar 1,2 kali dan pada PEG 8000 sebesar 1,6 kali.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Pada pemurnian dengan sistem dua fase menggunakan PEG-garam fosfat, konsentrasi optimal pemurnian dengan sistem dua fase adalah 13,3 % Polietilen glikol (PEG), 6,7 % garam-fosfat dan 70 ml supernatan (enzim kasar I). Peningkatan konsentrasi PEG menyebabkan terjadinya penurunan koefisien partisi.

Aktivitas enzim dan Protein total pada fase atas memiliki nilai yang lebih tinggi dibandingkan fase bawah. Semakin tinggi koefisien partisi proses pemisahan semakin bagus. Pada pemurnian dengan sistem dua fase, aktivitas spesifik enzim terbesar dihasilkan oleh PEG dengan berat molekul 600 diikuti oleh PEG 3350 dan 8000. Pemurnian dengan sistem dua fase yang terbaik adalah menggunakan PEG 600.

Setelah pengendapan dengan aseton, aktivitas enzim dan protein mengalami penurunan cukup tajam. Penurunan aktivitas enzim dan kadar protein berpengaruh terhadap aktivitas spesifik dan kemurnian enzim.

Pemurnian dengan filtrasi gel menyebabkan aktivitas enzim dan kandungan kadar protein mengalami penurunan, sedangkan aktivitas spesifik enzim meningkat dan peningkatan aktivitas spesifik, juga meningkatkan kemurnian.

Setelah melewati beberapa tahapan proses, aktivitas spesifik dan kemurnian terbesar dihasilkan pada enzim yang menggunakan PEG 600. Berat molekul PEG yang bagus digunakan pada pemurnian dengan sistem dua fase yaitu PEG dengan berat molekul rendah.

B. SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian untuk menentukan komposisi optimal fase atas (PEG & enzim kasar I) terhadap aseton pada proses pengendapan.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan, penentuan tekno ekonomi pada pemurnian dengan sistem dua fase.
3. Perlu dilakukan penelitian lain untuk mencari proses pemurnian yang murah, mudah dan mutu yang dihasilkan bagus.

DAFTAR PUSTAKA

- Albertsson, P.A. 1983. Interaction Between Biomelecular studied by Phase Partition di dalam Method of Biochemical Analysis Vol 29. David Glick (ed). John Wiley and Sons, New York.
- Andersson, E Johansson, A.C dan Hahn-Hagerdal, B. 1985. α -Amilase Production in Aqueous Two Phase System with *Bacillus Subtilis*. Enzyme Microbial Technology Vol 7 : 333-338
- Andersson, E Johansson, A.C dan Hahn-Hagerdal, B. 1990. Bioconversions in Aqueous Two Phase Systems. Enzyme Microbial Technology Vol 12 : 243-254
- Atlas, R. M. 1984. Microbiology Fundamentals and Application. Macmillan Publishing Company, New York.
- Aunstrup, K. 1978. Enzyme of Industrial interest Traditional Product. Di dalam D. Perlman (ed). Annual Report or Fermentation Process. Academic Press. New York.
- Benfeld,P. 1955. Amylases Alfa and Beta. Didalam Method in Enzymology.Vol:149-158
- Blevin, W.T. and N.D. Davis. 1979. Methods for Laboratory for Mentation. in H.J. Peppler and D. Perlman (eds). Microbial Technology ; Microbial Process Vol 1. Academic Press, New York.
- Boing, J. P. 1982. Enzyme Production. Didalam S.C. Presscot dan C.G. Dunn (eds). Industrial Microbiology. AVI Pub. Co.Inc Wesport, Connecticut.
- Biro Pusat Statistik. 1997. Statistik Industri Besar dan Sedang Indonesia. Klui 31. Statistical Year Book of Indonesia, Jakarta.
- Bradford. 1976. Production, Isolation dan Economic of extracellular enzyme. Di dalam Tuntedja Irawadi. Produksi Enzim ekstraselular (Sellular and xilanase) dari N. Sitophila pada limbah padat kelapa sawit. Tesis Pasca Sarjana, IPB, Bogor.
- Casida, L.E. 1968. Industrial Microbiology. John Willey and Sons, New York.
- Chaplin, M.F. dan Bucke. 1990. Enzyme Technology. Cambridge University Press,, Cambridge.
- Coleman. 1962. Microbial Technology . Di dalam Berkeley, R , dan D.C. Ellwood (eds). 1979. Microbial Polysaccharides and Polysacchorases. Academic Press, New York.
- Damardjati, Djoko S., Untung Murdiyatmo, Nur Richana, Pujoyuwono M, Nur Azizah , Dini Andriani, Pia Lestari dan Dini Kusdiningsih. 1997. Kloning Gen-Gen Amilase



dari Isolat Bakteri Indogenous Untuk Proses Biokonversi Bahan Berpati. Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor.

Fardiaz, S. 1989. Fisiologi Fermentasi. PAU IPB dan LSI IPB, Bogor.

Fogarty, W.M. 1983. Microbial Enzymes and Biotechnology. Applied Science Publisher, London.

Fox, J.L. 1994. Biodeversity Promises Great Prospecting Biotechnology. Appl. Sci. Publishing Co., Amsterdam.

Gao, X.L., Y.Yu, and P. Lingko. 1984. Glukoamylase and α -Amilase Production by Immobilized. Biotech. 6 : 645 – 650.

Harris, E.L. V dan S. Angal. 1988. Protein Purification Method a Practical Approach. Oxford University Press, Oxford.

Harris, E.L.V. 1988. Amino acid analysis by Precoloumn Derivatization Di dalam J.M. Walker (ed). Methods in Molecular Biology Vol 3 : New Protein Techniques. Humana Press. Clifton, New Jersey.

Irawadi, T. dan S. R. Herastuti. 1992. Teknik Pemurnian Selullase. PAU Bioteknologi, IPB, Bogor.

Inova V.N., E.P. Dobрева and E.I. Emanuilova. 1993. Purification and Some Properties of Haimsensitive α -Amilase from Newly Isolated *Bacillus licheniformis*. J. Biotechnology. 28 : 277-289

Kula, M.K. 1997. Aqueous Phase Separation in Bioactive Microbial Product 3. J.D. Stower D.J. Bailey dan D.J.Winstanley (ed). Academic Press. London.

Kulp, K. 1975. Carbohydrases, Di dalam G. Reed (ed). Enzyme in Food Processing. Academic Press, Orlando.

King R.S. 1992. Aqueous Two Phase Partitioning in Biotechnology Di dalam. Soane, D.S. (ed). Polimer Application for Biotechnology. Prentice Hal, New Jersey.

Lay, B.W. dan S. 1992. Mirobiologi. Rajawali Press, Jakarta.

Lehninger. 1990. Dasar-dasar Biokimia. Erlangga, Jakarta.

Mangunwidjaja, D dan A. Suryani. 1994. Teknologi Bioproses. Penebar Swadaya, Jakarta.

Meyrath, J and G. Volovsek. 1975. Production of Microbial enzymes. Di dalam Reed, G. (eds). Enzyme in Food Processing. Academic Press, New York.

- Muchtadi, D.,N. Sri Palupi dan Made Astrawan. 1992. Enzim dalam Industri Pangan. Depdikbud PAU Pangan dan Gizi IPB, Bogor.
- Nur, A. dan Adijuana H. 1987. Teknik separasi dlm Analisis Pangan. PAU IPB, Bogor.
- Norman. 1979. New Development in Starch Syrup Technology. Di dalam Birch, G.G. dan N. Blakeborough (eds). 1981. Enzyme in Food Processing, Applie Science Publiser Ltd, London.
- Patel, P.R. Enzyme Isolation and Purification Di dalam Cheremisinoff, P.N. dan R.P. Ouelktte. 1985. Biotechnology. Application and Resed Technomic Publishing Co., Inc., Loncoster, Basel.
- Priest, F.G. 1989. Aspects of Microbiology 9 : Extracellular enzymes. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Schwimmer, S. 1981. Source Book of Enzymology the AVI Publishing Co., Inc., Westport, USA.
- Scopes, R.K. 1987. Protein Purification : Principles and Practice. Springer-verlog, New Jersey.
- Schmidt. A.S, Ventom A. dan Asenjo J, A. 1994. Partitioning and Purification of α -amylase in Aqueous Two-Phase systems. Enzyme Microb Technol, vol 16 : 131-142.
- Sudjana, M.A. 1982. Disain dan analisa Eksperimen. Tarsita, Bandung
- Stanbury, P.F dan A. Whitaker. 1984. Principles of Fermentation Technology. Pergaman Press, Oxford.
- Trinovia, D. 1997. Enzim Amilase dari beberapa Strain Bakteri Indigenous. Skripsi. Jurusan Kimia FMIPA, Bogor.
- Wang, D.I. C, C.L. Cooney, A.L. Demain, P. Dunhill, A.E. Humphrey and M.D. Lily. 1979. Fermentation and Enzyme Technology. John Wiley and Son, New York.
- Windish, W.W dan N. S. Mhatre. 1965. Microbial Amylase. Appl. Microbial . 7 : 273.
- Winarno, F.G. 1983. Enzim Pangan. Gramedia, Jakarta.
- Whitaker, J. R. 1872. Principle of Enzymology for the Food Science. Marcel Dekker Inc., New York.
- Widhyastuti. 1998. Produksi dan Identifikassi Enzim Amilase dari Bakteri Termofilik Lokal. Skripsi FATETA, IPB, Bogor.



LAMARAN

@Hak cipta milik IPB University

IPB University



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Lampiran 1. Prosedur analisis enzim

a. Pembuatan Larutan Bradford (Lowry, 1951)

Larutan Bradford dibuat dengan cara melarutkan 100 mg Coomasie “Brilliant Blue G-250 dalam 50 ml etanol 95 % dan 100 ml asam fosfat 85 %, kemudian campuran tersebut diencerkan dengan akuades hingga tepat 1000 ml.

b. Pengukuran kadar protein

Supernatan sebanyak 500 mikroliter (0,5 ml) ditambahkan ke dalam 3 ml larutan Bradford kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi. Divortex agar larutan didalam tabung reaksi tersebut tercampur merata, lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit sampai 1 jam. Diukur adsorbansi sampel dalam tabung pada panjang gelombang 595 nm. Standar yang digunakan adalah Bovin Serum Albumin (BSA) dengan konsentrasi 100, 200, 300, 400 dan 500 ppm. Blanko yang digunakan adalah akuades.

c. Prosedur pembuatan larutan DNS (Bernfeld, 1955)

Sebanyak 5 gr DNS dilarutkan dalam 100 ml NaOH 2 N sambil diaduk, kemudian ditambahkan 250 ml akuades sambil terus diaduk hingga DNS larut. Kemudian ditambahkan 150 gr Na K-Tartat, diaduk, lalu dicampur dengan akuades hingga 250 ml.

d. Pengukuran aktivitas Enzim

Aktivitas enzim diukur dengan menggunakan metode DNS. Sebanyak 0,1 ml supernatan dan 0,9 ml buffer fosfat sitrat pH 7 dimasukkan kedalam tabung reaksi. Kemudian tabung tersebut diinkubasi pada suhu 50 ° C selama 5 menit. Setelah itu ditambahkan 2 ml substrat (2% soluble starch dalam BFS pH 7). Lalu diinkubasi pada suhu 50 ° C selama 30 menit. Selanjutnya ditambahkan 2 ml DNS dan dimasukkan dalam air mendidih selama 5 menit. Kemudian didinginkan selama 15 menit. Diukur adsorbansi sampel yang telah didinginkan pada panjang gelombang 550 nm. Standar yang digunakan adalah larutan maltosa dengan konsentrasi 1000 ppm, 2000 ppm, 3000 ppm, 4000 ppm, 5000 ppm, 6000 ppm, 7000 ppm, 8000 ppm, 9000 ppm, 16000 ppm. Blanko yang digunakan adalah akuades.



Lampiran 2. Prosedur dan analisa kuantitatif

1. Pembuatan Larutan BFS

Campurkan 8,83 ml Asam Sitrat 0,1 M dengan 41,18 ml Na_2HPO_4 0,2 M, kemudian diukur pH sampai pH 7 dan ditepatkan sebanyak 100 ml.

Cara pembuatan Asam Sitrat 0,1 M yaitu Asam sitrat dengan berat molekul $210,14 \times (0,1 \text{ M}) = 21,014 \text{ gr/ltr}$. Sedangkan Na_2HPO_4 dengan berat molekul $177,49 \times (0,2 \text{ M}) = 35,598 \text{ gr/ltr}$

2. Perhitungan aktivitas enzim

$$\text{Aktivitas enzim (U/ml)} = \frac{\text{ppm} \times 1000}{360,32} \times \frac{1}{30} \frac{\text{unit}}{\text{ml}}$$

3. Pengukuran Aktivitas Spesifik

$$\text{Aktivitas spesifik (U/mg)} = \frac{\text{Aktivitas enzim U/ml}}{\text{Protein Total mg/ml}}$$

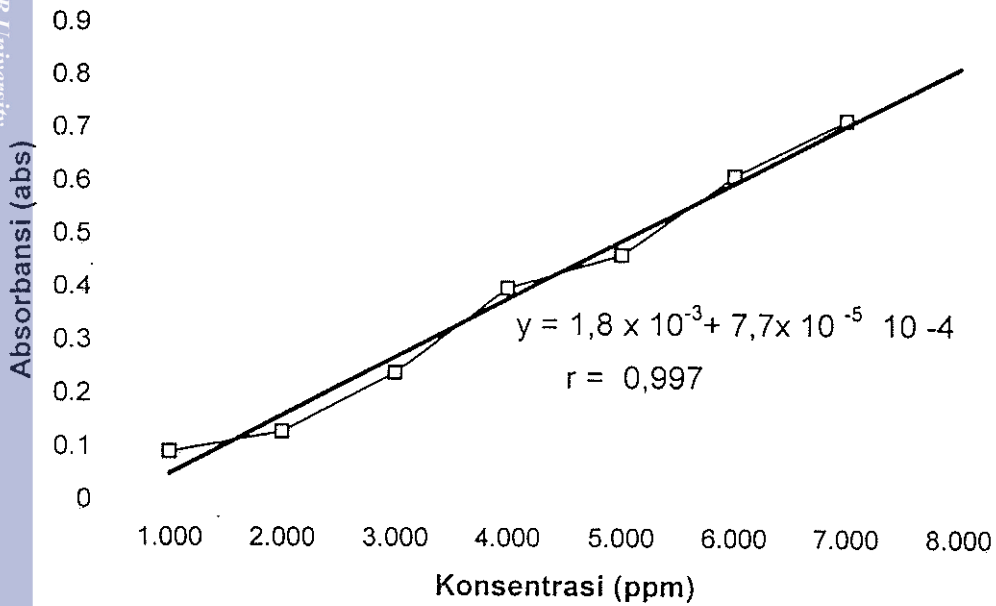
4. % Recovery merupakan perbandingan jumlah total aktivitas yang di dapat pada tiap tahap fraksinasi dengan aktivitas total awal.

5. Total Unit

$$\text{Total Unit (U)} = \text{Volume (ml)} \times \text{Aktivitas enzim (U/ml)}$$

Lampiran 3. Kurva Standar Aktivitas Enzim

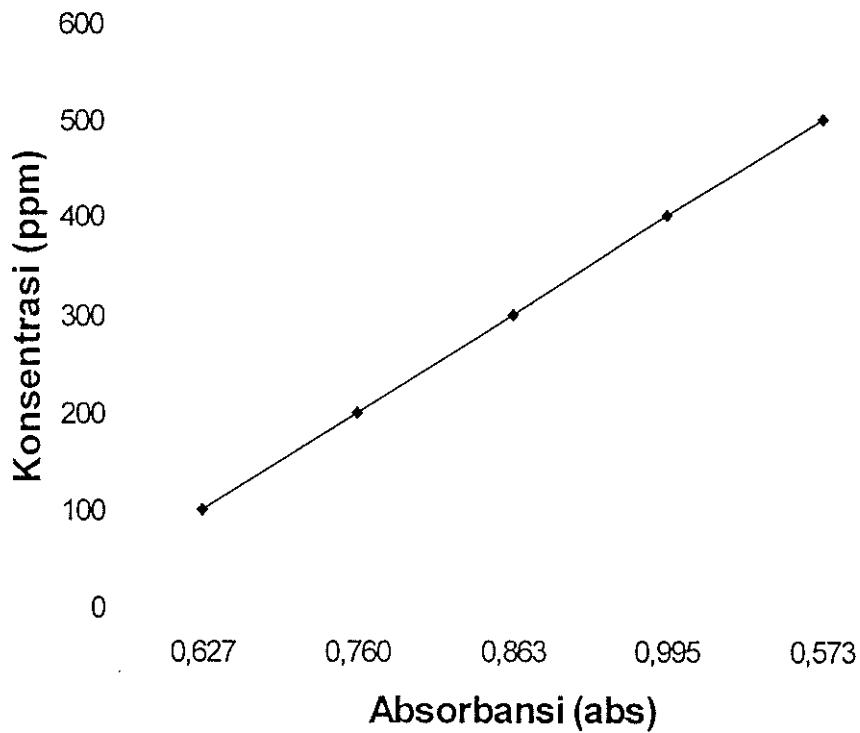
KURVA MALTOSA STANDAR AKTIVITAS ENZIM



Konsentrasi (ppm)	Absorbansi (abs)
1000	0,091
2000	0,129
3000	0,239
5000	0,398
6000	0,461
8000	0,611

Lampiran 4. Kurva Standar Protein (BSA)

KURVA PROTEIN STANDAR (BSA)



Konsentrasi (ppm)	Absorbansi (abs)
100	0,627
200	0,760
300	0,863
400	0,995
500	0,573

Lampiran 5. Grafik hasil filtrasi gel pada pemurnian dua fase dengan PEG 600

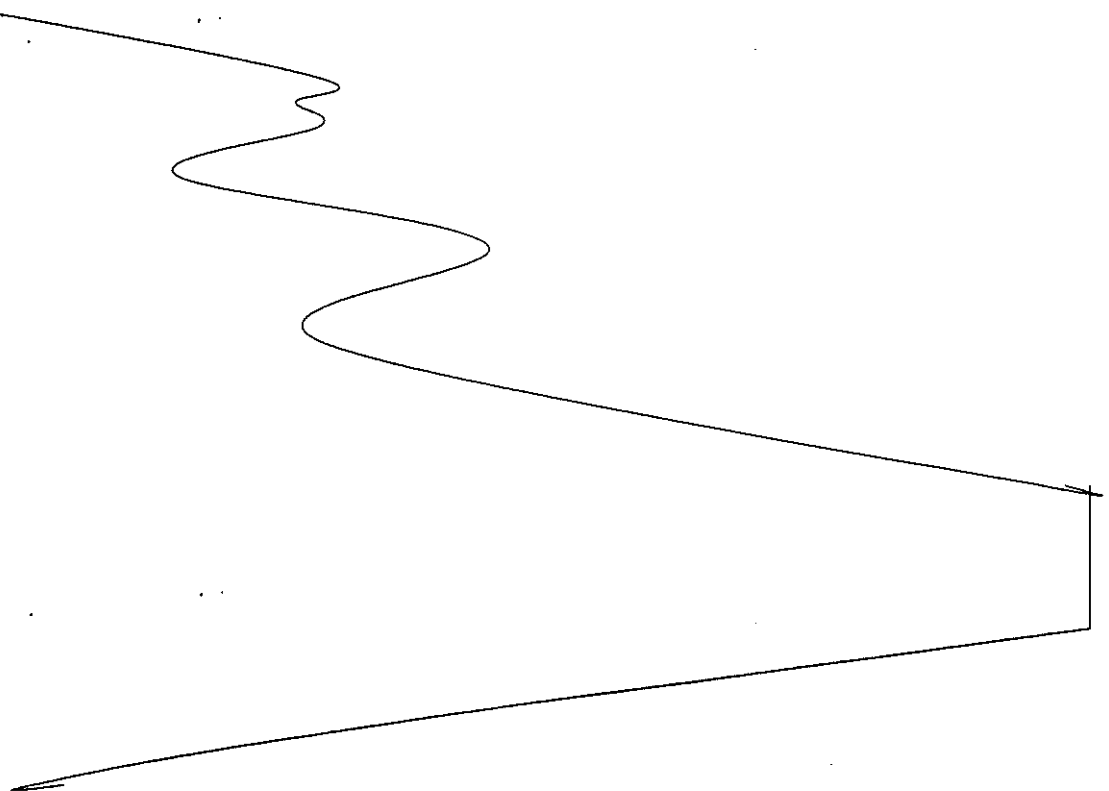
Method : Amilase-yul Tag : 1 CH
 CH. 1 C.S 1.25 ATT 70FFS 0 00/25/00 06:03

@Hak cipta milik IPB University

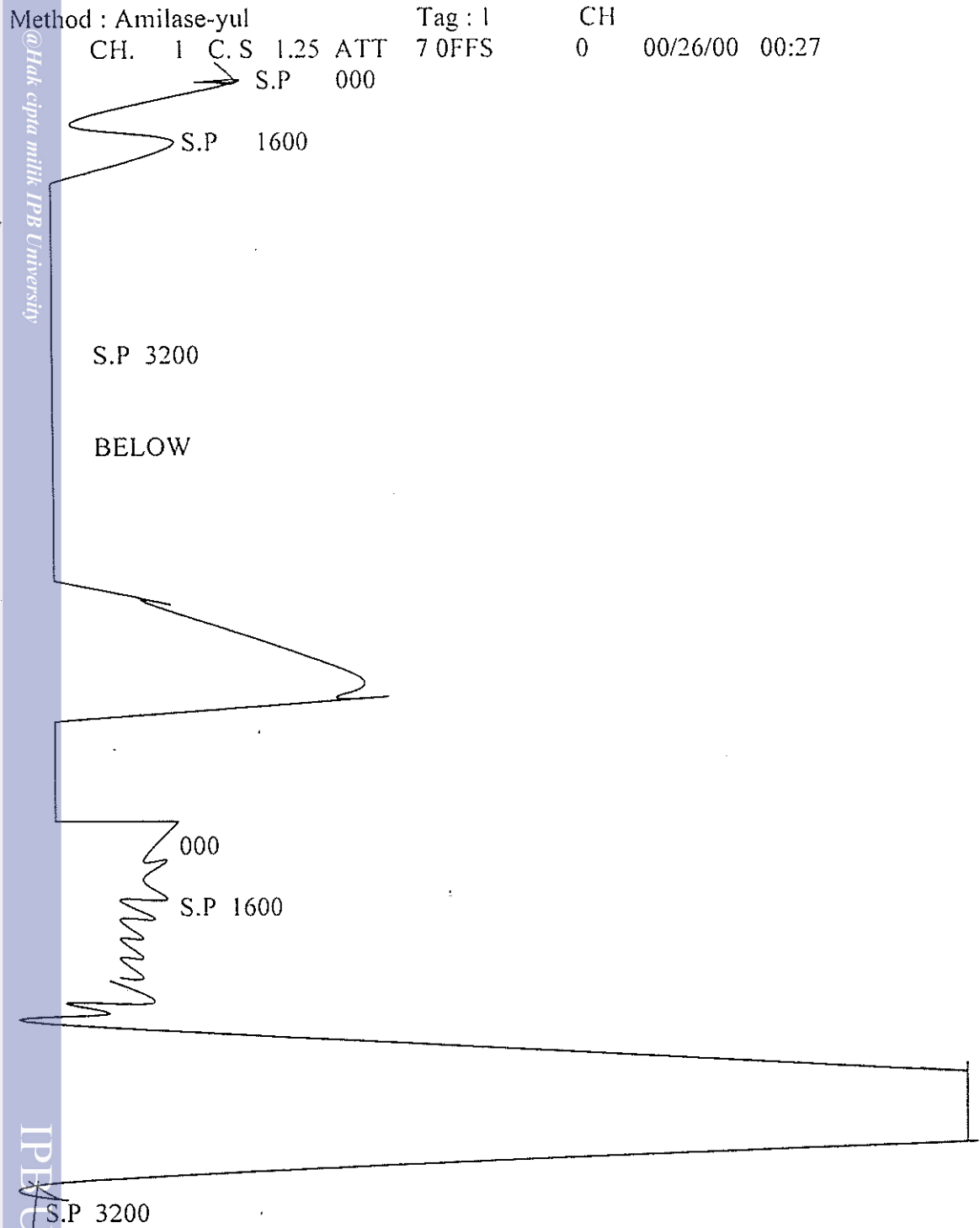
S.P 000

S.P 1600

S.P 3200

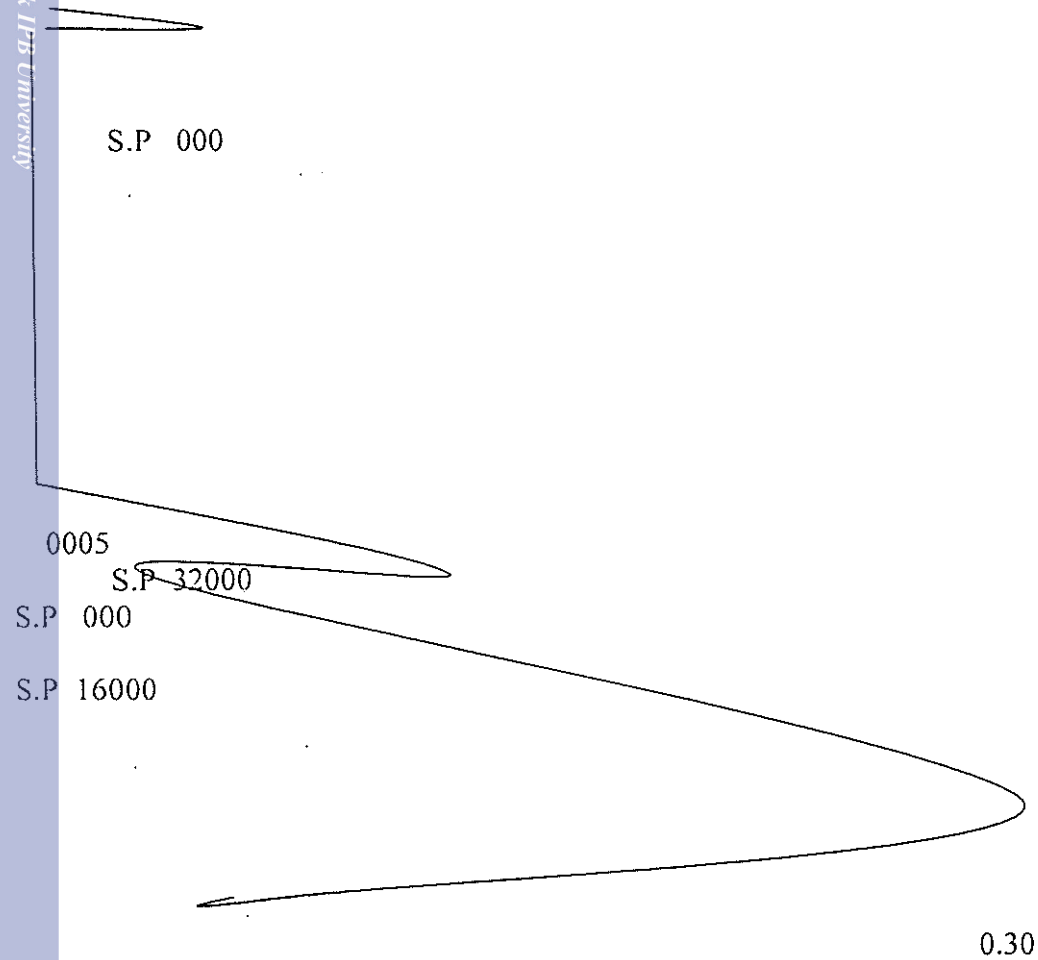


Lampiran 6. Grafik hasil filtrasi gel pada pemurnian dua fase dengan PEG 3350



Lampiran 7. Grafik hasil filtrasi gel pada pemurnian dua fase dengan PEG 8000

Method : Amilase-yul Tag : 1 CH
CH. 1 C.S 10 ATT 60FFS 0 00/5/00 03:16



Lampiran 8. Hasil Perhitungan filtrasi gel

D 250 00/26/99 10 : 30
 METHOD : Amilase Yul TAG: 6 CH : 1
 FILE : 0 CALE METHOD : AREA TADLE 0 CONC: AREA

NO	RT	AREA	CONC	DC
6	0,56	237011	1,130	!!!
7	0,65	120304	0,010	!!!
8	0,00	252546	1,200	!!!
9	0,00	150007	0,761	!!!
10	0,05	155075	0,746	!!!
11	0,02	130602	0,625	!!!
12	1,10	151216	0,724	!!!
13	1,10	137004	0,650	!!!
14	1,25	147002	0,700	!!!
15	1,33	147367	0,705	!!!
16	1,41	134054	0,641	!!!
17	1,40	143250	0,605	!!!
18	1,56	110003	0,574	!!!
19	1,64	120601	0,616	!!!
20	1,71	127610	0,611	!!!
21	1,70	147145	0,704	!!!
22	1,06	134276	0,642	!!!
23	1,04	142260	0,601	!!!
24	2,02	100326	0,400	!!!
25	2,00	110050	0,560	!!!
26	2,16	127725	0,611	!!!
27	2,24	116002	0,550	!!!
28	2,32	124600	0,507	!!!
29	2,30	104100	0,400	!!!
30	2,47	120304	0,610	!!!
31	2,55	100637	0,402	!!!
32	2,62	117256	0,561	!!!
33	2,70	116270	0,556	!!!
34	2,70	105345	0,504	!!!
35	2,04	120020	0,574	!!!
37	3,00	107545	0,515	!!!
39	3,16	105601	0,505	!!!
41	3,30	101252	0,404	!!!
620	52,06	103445	0,405	!!!
626	52,51	140100	0,670	!!!
627	52,50	121606	0,502	!!!
629	52,75	120404	0,620	!!!
630	52,03	120404	0,620	!!!
631	52,00	135013	0,650	!!!
632	52,06	151002	0,727	!!!
633	53,04	160604	0,760	!!!
634	53,12	121007	0,570	!!!
635	53,20	160072	0,013	!!!
636	53,20	171750	0,022	!!!
637	53,34	177576	0,050	!!!
638	53,42	102702	0,022	!!!
639	53,50	102550	0,060	!!!
640	53,50	155071	0,742	!!!
641	53,66	217200	1,040	!!!
642	53,74	215771	1,032	!!!
643	53,00	210713	1,046	!!!
644	53,051	232630	1,113	!!!
645	54,03	243334	1,164	!!!
646	54,11	204540	1,003	!!!
647	54,10	257654	1,233	!!!
648	54,27	257652	1,233	!!!
649	54,35	257612	1,233	!!!
650	54,43	273616	1,300	!!!
651	54,46	207011	1,373	!!!
652	54,46	202736	1,306	!!!



Lampiran 9. Lanjutan hasil perhitungan filtrasi gel

630	52,03	120404	0,620	!!!
631	52,00	135013	0,650	!!!
632	52,06	151002	0,727	!!!
633	53,04	121004	0,760	!!!
634	53,12	121007	0,570	!!!
635	53,20	160072	0,013	!!!
636	53,20	171750	0,022	!!!
637	53,34	177576	0,050	!!!
638	53,42	102702	0,022	!!!
639	53,50	102550	0,060	!!!
640	53,50	155071	0,742	!!!
641	53,66	217200	1,040	!!!
642	53,74	215771	1,032	!!!
643	53,02	210713	1,046	!!!
644	53,00	232630	1,113	!!!
645	53,05	243334	1,164	!!!
646	54,05	204540	1,003	!!!
647	54,11	257654	1,233	!!!
648	54,10	257652	1,233	!!!
649	54,27	257612	1,233	!!!
650	54,35	273616	1,300	!!!
651	54,43	207011	1,373	!!!
652	54,40	202736	1,300	!!!
653	54,56	313465	1,500	!!!
654	54,64	230262	1,140	!!!
655	54,72	314576	1,505	!!!
656	54,00	331264	1,505	!!!
657	54,00	347540	1,663	!!!
658	54,04	351764	1,603	!!!
659	55,02	375134	1,705	!!!
660	55,10	206161	1,360	!!!
661	55,10	376204	1,000	!!!
662	55,26	376076	1,003	!!!
663	55,34	370102	1,000	!!!
664	55,42	362320	1,734	!!!
665	55,47	367224	1,757	!!!
666	55,55	350070	1,713	!!!
667	55,63	271061	1,301	!!!
668	55,71	360100	1,723	!!!
669	55,70	363040	1,741	!!!
670	55,07	340120	1,666	!!!
671	55,05	430300	1,667	!!!
672	56,00	330064	1,503	!!!
673	55,00	326204	1,561	!!!
674	55,16	245464	1,174	!!!
675	55,24	310037	1,531	!!!
676	55,32	200005	1,435	!!!
677	55,40	200744	1,420	!!!
678	55,45	277115	1,326	!!!
679	55,54	267004	1,202	!!!
600	55,62	200120	0,050	!!!
601	55,70	250210	1,240	!!!
602	55,70	236553	1,132	!!!
603	55,06	230652	1,104	!!!
604	56,01	207705	0,004	!!!
605	56,09	106440	0,040	!!!
606	57,07	100000	0,000	!!!
607	57,15	170506	0,055	!!!
608	57,23	123301	0,500	!!!
609	57,31	154004	0,741	!!!
600	57,30	130060	0,627	!!!
601	57,44	117052	0,564	!!!
602	57,52	111510561	0,534	!!!
603	57,60	101104174	0,404	!!!
TOTAL		20000513	100,000	
PEAK REJ :		100000		

@Hak cipta milik IPB University

IPB University



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

lampiran 10. Hasil Perhitungan rancangan acak lengkap

Enzim kasar I yang ditambahkan	50 ml	70 ml
Enzim kasar I fase atas	94 93,5 92	95,5 92,5 95
Total	279,5	283
Enzim kasar I fase bawah	6 6,5 8	4,5 7,5 5

Catatan : Penambahan enzim kasar I melebihi 70 ml, menyebabkan enzim tidak terekstrak di fase atas (Tidak terbentuk lapisan atas dan bawah)

Daftar Analisis Hubungan berat molekul PEG dan tahapan proses terhadap aktivitas spesifik

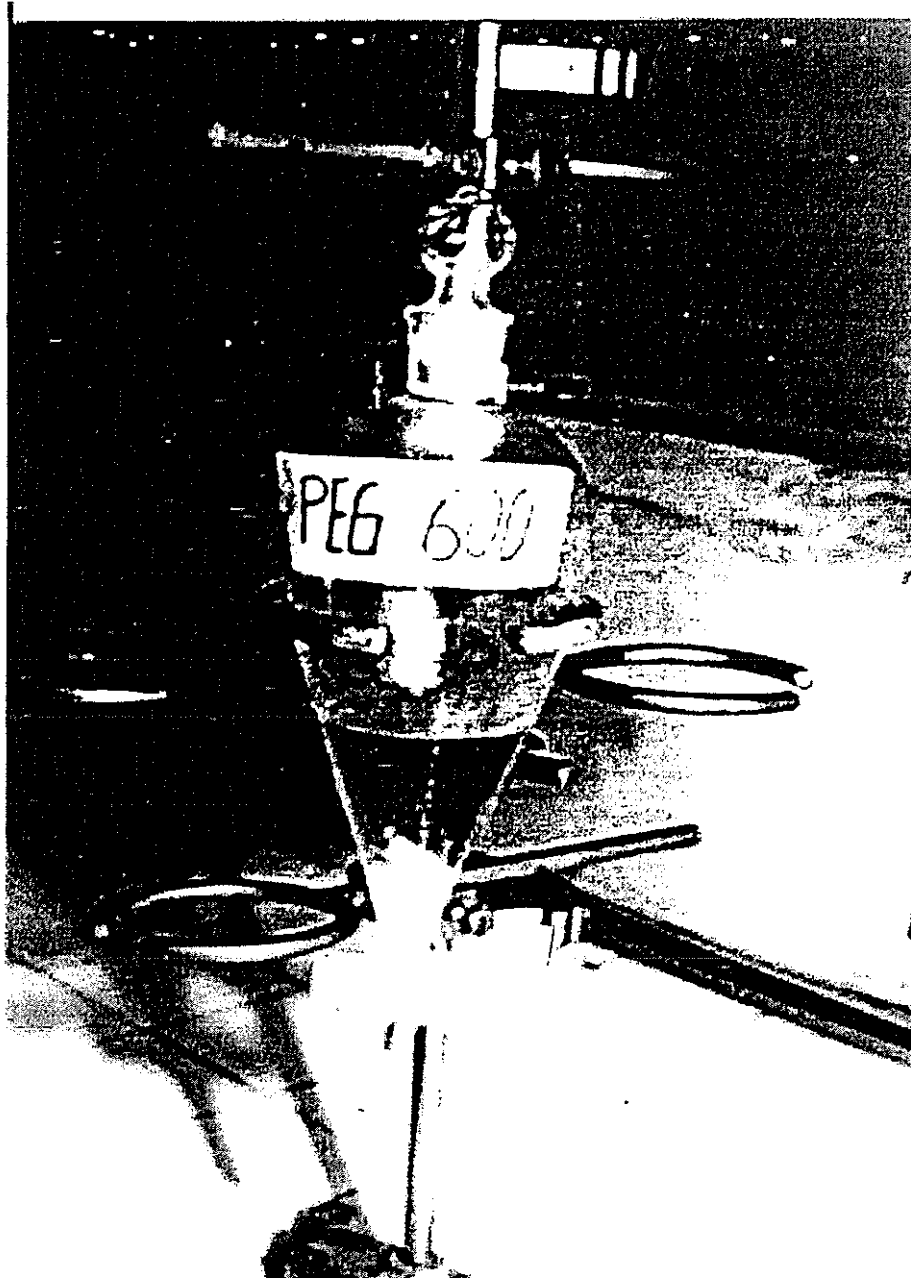
Sumber keragaman	Derajat Bebas (DB)	JK	KT	F hitung	F Tabel	
					5 %	10%
Perlakuan	1	2,0416	2,0416	1,11	7,71	4,54
Galat	4	7,33	1,8325	-		
Total	5	9,375	-	-		

Karena H_0 diterima, berarti tidak berbeda nyata

Kesimpulan : Ternyata penambahan enzim kasar I terhadap fase atas pada konsentrasi PEG 13,3 % dan garam fosfat 7,1 % tidak berpengaruh terhadap volume enzim kasar I yang terikat di fase atas (enzim kasar I yang ditambahkan ≤ 70 ml) akan terekstrak semua pada fase atas.

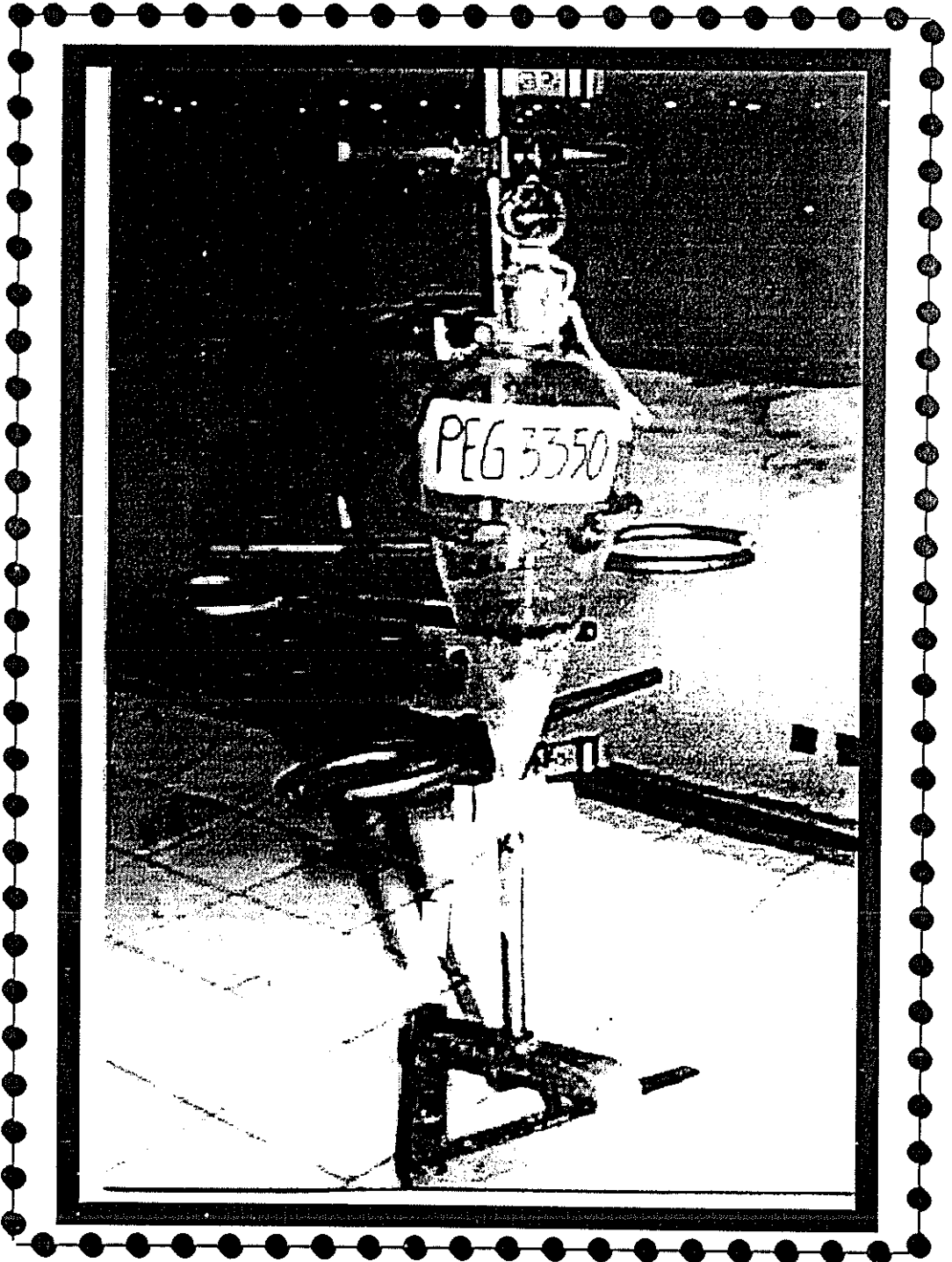
Lampiran 11. Gambar Pemisahan 2 fase pada PEG 600

@Hak cipta milik IPB University



IPB University

Lampiran 12. Gambar Pemisahan 2 fase pada PEG 3350



@Hak cipta milik IPB University

IPB University

Lampiran 13. Gambar Pemisahan 2 fase pada PEG 8000

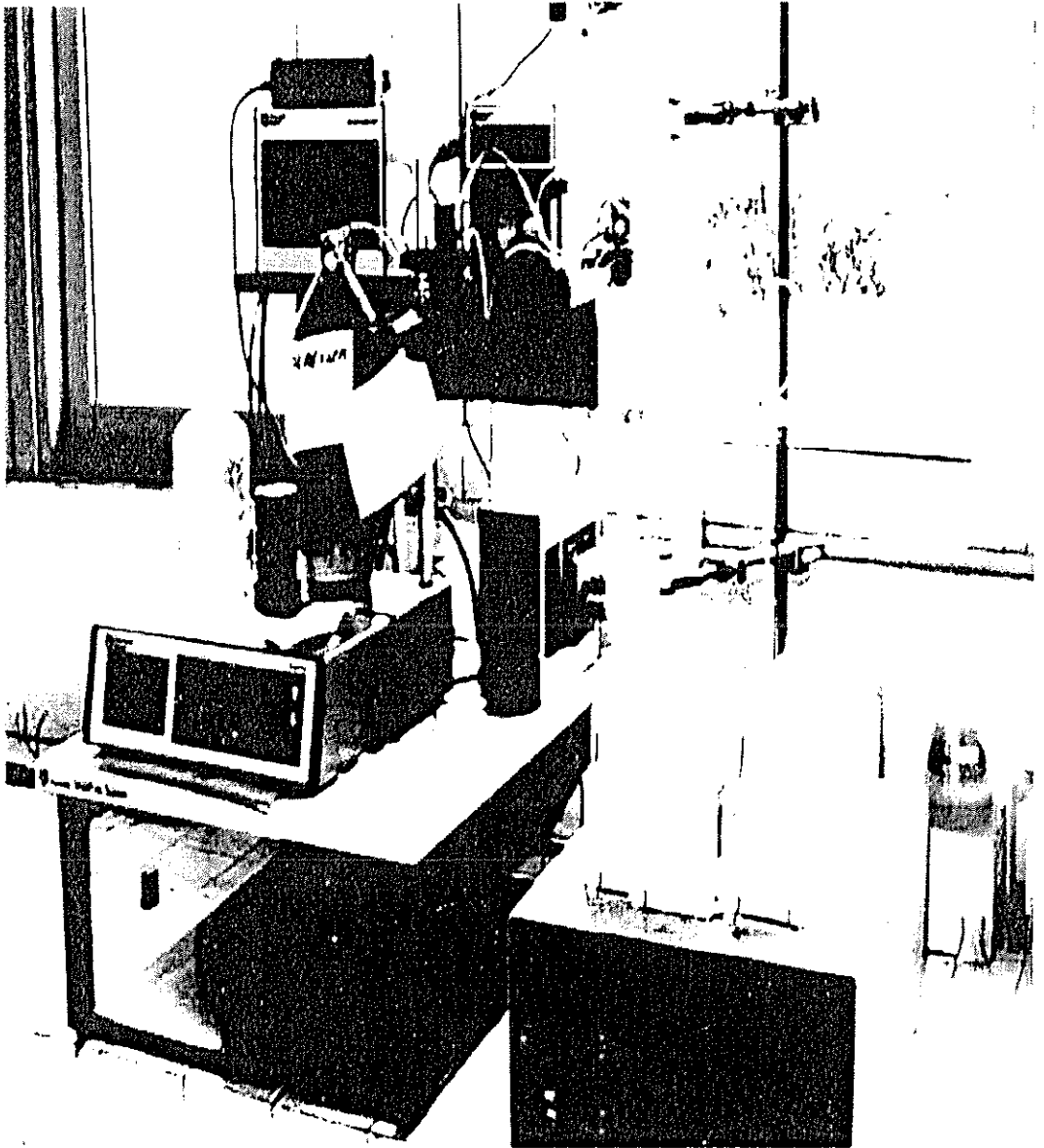


@Hak cipta milik IPB University

IPB University



lampiran 14. Alat Filtrasi Gel



@Hak cipta milik IPB University

IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang menyalin dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Lampiran 15. Rekapitulasi Data

Aktivitas enzim dan kadar protein pada pemurnian dengan sistem dua fase menggunakan PEG-g fosfat pada berat molekul PEG yang berbeda

Bahan	Aktivitas enzim (u/ml)	Kadar protein (mg/ml)
Enzim kasar II	771,92	0,112
PEG 8000	599,39	0,073
PEG 3350	693,64	0,081
PEG 600	820,56	0,086

Aktivitas enzim dan kadar protein setelah pengendapan dengan aseton

Bahan	Aktivitas enzim (u/ml)	Kadar protein (mg/ml)
Enzim kasar II	771,92	0,112
PEG 8000	737,71	0,252
PEG 3350	653,35	0,073
PEG 600	465,62	0,049

Aktivitas enzim dan kadar protein setelah pemurnian dengan filtrasi gel

Bahan	Aktivitas enzim (u/ml)	Kadar protein (mg/ml)
Enz Kasar I	771,92	0.112
PEG 8000	229,2	0,021
PEG 3350	188,89	0,030
PEG 600	193,1	0,007

Lampiran 16. Rekapitulasi Perhitungan

PEG 10 % (ml)	Garam Fosfat 10 % (ml)	Enzim kasar I	Terbentuk 2 fase
10	5	20	X
20	10	20	X
30	15	20	X
40	20	20	X
50	30	20	X

PEG 10 % (ml)	Garam Fosfat 20 % (ml)	Enzim kasar I	Terbentuk 2 fase
10	5	20	X
20	10	20	X
30	15	20	X
40	20	20	X
50	30	20	X

PEG 20 % (ml)	Garam Fosfat 30 % (ml)	Enzim kasar I	Terbentuk 2 fase
10	5	20	X
20	10	20	X
30	15	20	X
40	20	20	X
50	30	20	X

PEG 40 % (ml)	Garam Fosfat 50 % (ml)	Enzim kasar I	Terbentuk 2 fase
10	5	20	X
20	10	20	X
30	15	20	X
40	20	20	X
50	30	20	X

PEG 50 % (ml)	Garam Fosfat 40 % (ml)	Enzim kasar I	Terbentuk 2 fase
10	5	20	V
20	10	20	V
30	15	20	V
40	20	20	V
50	30	20	v

Keterangan : x = tidak terbentuk dua fase dan v = terbentuk dua fase /dua lapisan
Perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 17

Lampiran 17. Perhitungan data

Pembuatan PEG dan garam fosfat serta perhitungannya

contoh : Pembuatan larutan PEG

Dilarutkan PEG sebanyak 50 gram dalam 100 ml akuades. Kemudian diambil larutan PEG tersebut sebanyak 20 ml, sehingga didapat konsentrasi PEG

$$\text{PEG} = \frac{20 \text{ ml}}{150 \text{ ml}} \times 100 \% = 13,3 \%$$

contoh : Pembuatan larutan garam fosfat

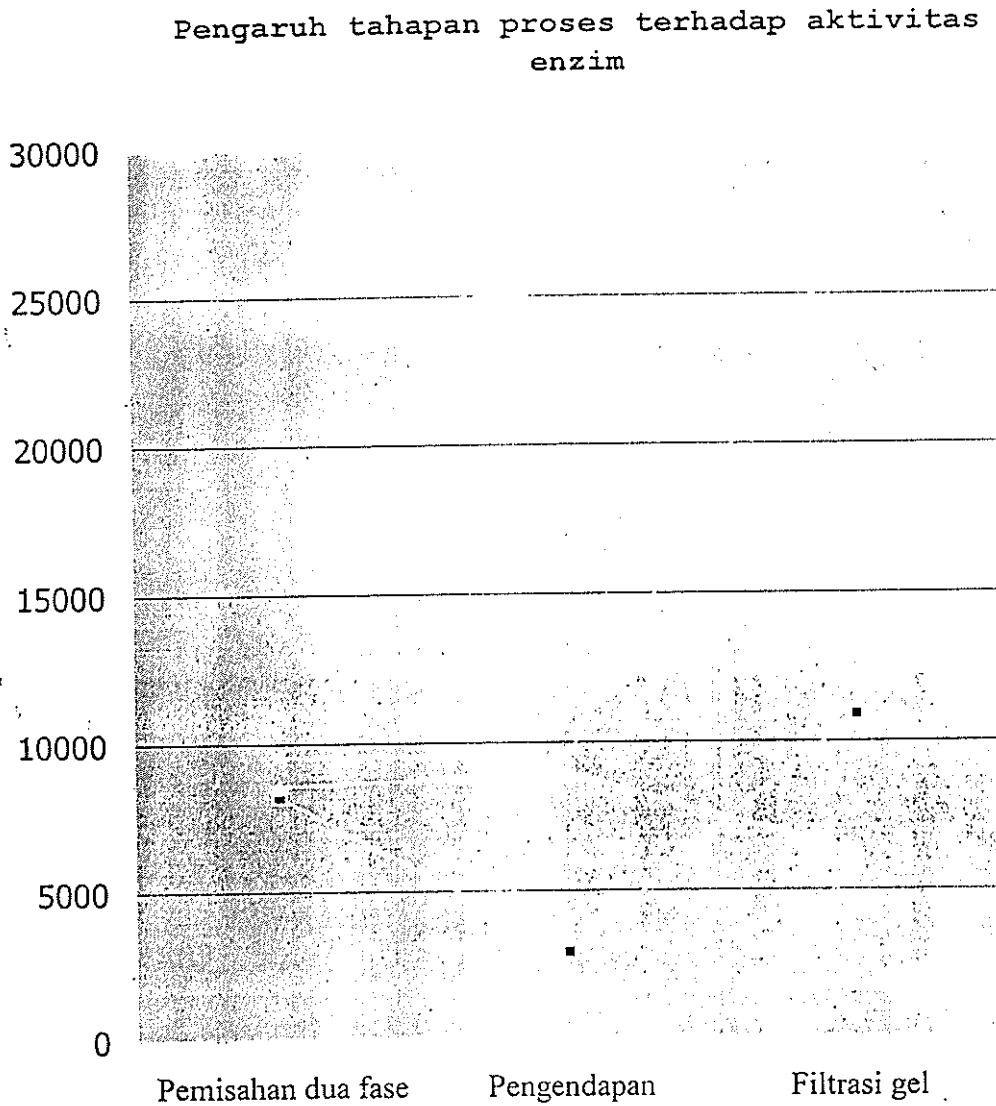
dilarutkan garam fosfat (NaH_2PO_4 & K_2HPO_4). Senyawa NaH_2PO_4 20 gram dan K_2HPO_4 20 gram dicampur, kemudian dilarutkan dalam 100 ml akuades. Kemudian larutan garam fosfat tersebut diambil sebanyak 10 ml sehingga didapat konsentrasi garam fosfat sebagai berikut :

$$\text{garam fosfat} = \frac{10 \text{ ml}}{140 \text{ ml}} \times 100 \% = 7,1 \%$$

ampiran 18. Pengaruh Tahapan proses terhadap aktivitas enzim

@Hak cipta milik IPB University

Aktivitas spesifik Enzim (U/mg)



Tahapan proses

■ PEG 8000 PEG 3350 PEG 600