J. Sains MIPA, Agustus 2009, Vol. 15, No. 2, Hal.: 111 - 118
ISSN 1978-1873

PENGARUH PENAMBAHAN SORBITOL TERHADAP STABILITAS TERMAL ENZIM α-AMILASE DARI *Rhizopus oryzae*

Yandri A.S.* dan Pretty Wulandari

Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Lampung, Bandar Lampung 35145
*E-mail: yandrias@unila.ac.id

Diterima 2 Agustus 2009, disetujui untuk diterbitkan 27 Agustus 2009

ABSTRACT

This research aims to study the effect of sorbitol addition toward the thermal stability of α-amilase obtained from *Rhizopus oryzae*. The result showed that the purified enzyme has optimum pH and temperature of 5.5 and 55 °C, respectively. The purification process raised the enzyme specific activity from 22.096 u/mg for the raw extract to 829.46 u/mg for enzyme after being column chromatography, with the purity grade increased of 38 times. The enzyme thermal stability after addition of 0.5 M sorbitol showed by the values of $t_{1/2}$ = 37.66 min., ΔG_i = 102.66 kJmol^{-1}; sorbitol 1 M, $t_{1/2}$ = 48.80 min., ΔG_i = 103.37 kJmol^{-1}; and sorbitol 1.5 M, $t_{1/2}$ = 39.83 min., ΔG_i = 102.82 kJmol^{-1}. The enzyme after the sorbitol addition 0.5 M; 1 M; and 1.5 M has residual activity of 12.98%; 20.45%; and 14.70% after being stored for 100 minutes and temperature of 55 °C. The addition of sorbitol did not change the optimum temperature of the enzyme, but the enzyme activity at higher temperature showed a better activity than that without addition. The increase of half life and ΔG_i indicated that the enzyme with addition of polyol was more stable than the purified enzyme.

Keywords: *α-amilase, sorbitol effect, Rhizopus oryzae*

1. PENDAHULUAN

Penggunaan enzim dalam proses industri, umumnya menggunakan suhu yang tinggi. Hal ini bertujuan untuk meningkatkan laju reaksi dan juga untuk mengurangi terjadinya kontaminasi mikroba[1]. Namun, kondisi ini sangat bertentangan dengan sifat enzim yang tidak stabil pada suhu tinggi dan pH yang ekstrim[2]. Oleh sebab itu, untuk penggunaan pada proses industri diperlukan enzim yang bersifat termostabil, yaitu enzim yang bekerja secara optimum pada rentang suhu antara 60° – 125 °C, dan bekerja pada rentang pH yang lebar[3].

Beberapa cara yang dapat digunakan untuk meningkatkan stabilitas enzim adalah penggunaan zat aditif, modifikasi kimia, amobilisasi dan penggunaan rekayasa protein[4]. Penggunaan zat aditif merupakan cara yang paling sederhana yang dapat dipilih untuk meningkatkan stabilitas enzim. Bustos *et al.*[5] melakukan penelitian tentang peningkatan stabilitas termal enzim tripsin dengan penambahan gliserol, xilitol, sorbitol, maltodekstrin dan sukrosa. Peningkatan stabilitas enzim ditandai dengan peningkatan waktu paruh. Peningkatan waktu paruh tertinggi terjadi pada penambahan sorbitol, kemudian diikuti dengan xilitol, gliserol, sukrosa dan maltodekstrin. Sedangkan menurut penelitian yang dilakukan oleh Singh and Singh[6], pengaruh penambahan poliol terhadap lisozim (pH 2,0 dan 7,0), pada suhu 60 °C selama 24 jam, terjadi peningkatan ΔH dan aktivitas spesifik enzim setelah penambahan sukrosa, kemudian diikuti dengan manitol, laktosa, gliserol dan propilen glikol.

Rhizopus oryzae merupakan salah satu mikroorganisme mesofilik yang memiliki kemampuan untuk memproduksi enzim α-amilase, dan merupakan penghasil enzim α-amilase terbesar dibandingkan dengan jenis *Rhizopus* yang lain. Enzim α-amilase yang dihasilkan *Rhizopus oryzae* bersifat ekstraseluler dan memiliki kelebihan dibandingkan dengan enzim yang dihasilkan secara intraseluler. Salah satunya, enzim ini dapat diperoleh dalam keadaan murni pada biakan cair dengan cara pemisahan dan pemurnian yang tidak begitu rumit [7].

Enzim α-amilase (EC 3.2.1.1) mengkatalisis pemutusan ikatan α-D-(1,4)-glikosidik pada pati, glikogen dan oligosakarida. Enzim ini banyak digunakan pada proses-proses industri baik pada industri pangan maupun non pangan. Pada industri pangan salah satunya digunakan dalam memproduksi sirup gula cair, sedangkan di industri non pangan enzim ini banyak dipakai pada industri tekstil, terutama pada proses

© 2009 FMIPA Universitas Lampung

desizing yaitu proses penghilangan pati sebagai pelapis tekstil. Menurut Illanes[4] kestabilan sebagian besar enzim khususnya α-amilase terhadap suhu sangat rendah, sehingga diperlukan suatu metode untuk meningkatkan kestabilan enzim.

Pada penelitian ini, peningkatan stabilitas termal enzim α-amilase yang diisolasi dari *Rhizopus oryzae,* dilakukan dengan penambahan zat aditif yaitu sorbitol . Pemilihan sorbitol didasarkan pada beberapa kelebihan antara lain, dapat mempertahankan konformasi enzim, mengurangi kemungkinan oksidasi gugus tiol pada enzim, menjaga stabilitas interaksi non kovalen, termasuk interaksi hidrofobik dalam molekul enzim, meningkatkan stabilitas dan daya awet enzim, dan yang terpenting adalah menjaga keutuhan struktur enzim terhadap degradasi oleh suhu[8]. Dengan demikian, diharapkan dengan penggunaan poliol sebagai zat aditif dapat meningkatkan kestabilan enzim α-amilase dan juga diharapkan aplikasi enzim α-amilase pada proses-proses industri akan semakin berkembang.

2. METODE PENELITIAN

2.1. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah medium PDA (*Potato Dextrose Agar*), pepton, pati, maltosa, pereaksi Iodin, amonium sulfat, buffer sitrat, BSA (*Bovine Serum Albumin*), Na_2CO_3, NH_4NO_3, $CaCl_2$, KH_2PO_4, $Ba(OH)_2$, kapas, kasa, Na(K)tartarat, reagen Folin-Ciocelteau, sephadex G-100, aquades, gliserol, dan sorbitol.

Mikroorganisme yang digunakan pada penelitian ini adalah jenis kapang, yaitu *Rhizopus oryzae* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi dan Teknologi Fermentasi ITB.

2.2. Prosedur Penelitian

2.2.1. Isolasi dan pemurnian enzim

Isolasi enzim α-amilase dilakukan dengan memisahkan larutan enzim dari komponen seluler lainnya, menggunakan sentrifugasi pada 5000 rpm selama 20 menit dengan suhu 4°C. Filtrat yang diperoleh disebut ekstrak kasar enzim. Pemurnian enzim α-amilase dilakukan melalui beberapa tahap yaitu: fraksinasi ekstrak kasar enzim dengan amonium sulfat dengan berbagai tingkat kejenuhan, kromatografi kolom filtrasi gel Sephadex G-100.

2.2.2. Uji Aktivitas α-amilase dengan metode iodin

Uji aktivitas α-amilase tiap tahap pemurnian dilakukan dengan pereaksi iodin[9]. Yaitu sebanyak 250 µL enzim ditambahkan 250 µL larutan pati 0,1 %, dan diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 250 µL HCl 1 N dan kemudian ditambahkan 250 µL pereaksi iodin dan 4 mL aquades kedalam tabung reaksi. Absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm. Kontrol dibuat dengan cara yang sama tetapi tanpa menggunakan enzim.

2.2.3. Penentuan kadar protein dengan menggunakan Metode Lowry [10]

Kadar protein enzim ditentukan dengan metode Lowry . Sebanyak 0,1 mL larutan enzim ditambah 0,9 mL air dan 5 mL pereaksi, dikocok dan didiamkan pada suhu kamar (25 °C) selama 10 menit. Setelah itu ditambahakan 0,5 mL pereaksi D, dikocok dan didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit. Serapan diukur pada panjang gelombang 750 nm. Konsentrasi protein ditentukan dengan menggunakan kurva standar *Bovine Serum Albumin* (BSA).

2.3. Karakterisasi Enzim Sebelum dan Setelah Penambahan Poliol

2.3.1. Penentuan pH optimum enzim sebelum penambahan poliol

Untuk mengetahui pH optimum enzim hasil isolasi dilakukan variasi pH antara 4; 4,5; 5; 5,5; 6; dan 7.

2.3.2. Penentuan suhu optimum enzim sebelum penambahan poliol

Penentuan suhu optimum enzim hasil isolasi, dilakukan dengan variasi suhu antara 50, 55, 60, 65 dan 70°C.

2.3.3. Penentuan pH optimum enzim setelah penambahan poliol

Larutan poliol ditambahkan pada enzim hasil pemurnian hingga konsentrasi 0,5; 1; dan 1,5 M dengan perbandingan 1 : 1, (enzim : poliol). Selanjutnya enzim dikondisikan pada variai pH 4; 4,5; 5, 5,5; 6,

© 2009 FMIPA Universitas Lampung

6,5; dan 7. Kemudian dilakukan pengukuran aktivitas unit enzim dengan metode iodin. Sebagai kontrol, enzim tanpa penambahan poliol diinkubasi pada variasi pH yang sama. Dengan percobaan ini dapat diketahui pula stabilitas enzim dengan penambahan poliol terhadap pengaruh pH.

2.3.4. Penentuan suhu optimum enzim petelah penambahan poliol

Larutan poliol ditambahkan pada enzim hasil pemurnian hingga konsentrasi 0,5; 1; dan 1,5 M dengan perbandingan 1 : 1, (enzim : poliol). Selanjutnya sebanyak 250 μL campuran enzim-poliol ditambahkan 250 µL larutan pati 0,1 % yang dilarutkan dalam buffer pH optimum enzim-poliol, kemudian di inkubasi selama 10 menit pada suhu 50,55,60, 65, dan 70 ^{o}C dalam *waterbat*h. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 250 µL HCl 1 N dan ditambahkan 250 µL pereaksi iodin dan 4 mL aquades. Sebagai kontrol, enzim tanpa penambahan poliol diinkubasi pada suhu dan waktu yang sama.

2.3.5. Pengaruh poliol terhadap stabilitas termal enzim α-amilase

Campuran enzim-poliol dengan konsentrasi 0,5; 1; dan 1,5 M diinkubasi pada suhu optimumnya selama 0, 20, 40, 60, 80, dan 100 menit. Kemudian dilakukan pengukuran aktivitas unit dengan metode Iodin. Sebagai kontrol, enzim tanpa penambahan poliol diinkubasi pada suhu dan waktu yang sama. Enzim kontrol ini digunakan untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh penambahan poliol terhadap aktivitas sisa enzim.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Isolasi dan Pemurnian Enzim

3.1.1. Isolasi enzim

Isolasi enzim α-amilase dari *Rhizopus oryzae* dilakukan dengan memisahkan ekstrak kasar enzim dari komponen seluler lainnya dengan sentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 5000 rpm pada suhu 4°C. Ekstrak kasar enzim yang diperoleh memiliki aktivitas unit sebesar 5,281 u/mL dan aktivitas spesifik 22,096u/mg.

3.1.2. Pemurnian Enzim α-Amilase

Proses pemurnian enzim dilakukan melalui dua tahap, yaitu fraksinasi dan kromatografi kolom filtrasi gel.

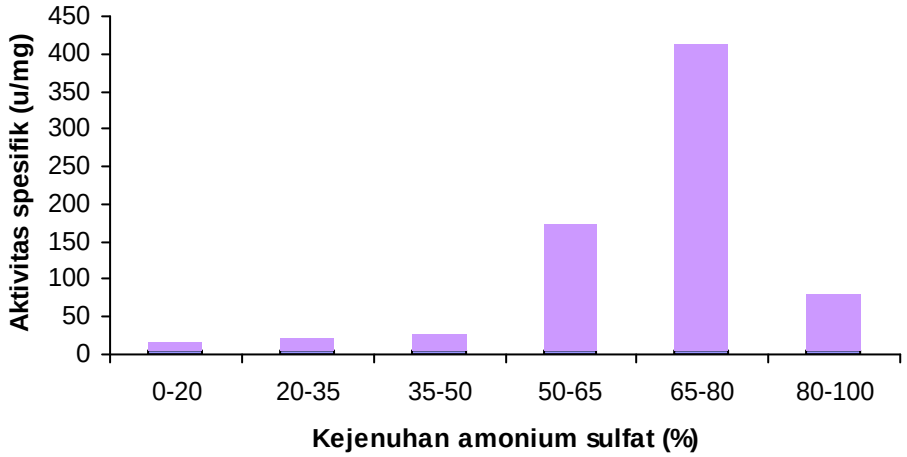
a. Fraksinasi dengan amonium sulfat

Pada tahap ini, proses pemurnian dilakukan dengan cara menambahkan garam amonium sulfat ke dalam ekstrak kasar enzim dengan enam tingkat kejenuhan. Kemudian endapan enzim yang dihasilkan dilarutkan dengan buffer sitrat pH 5,5. Gambar 1 menunjukkan hubungan antara fraksi enzim pada berbagai tingkat kejenuhan amonium sulfat dengan aktivitas spesifik enzim.

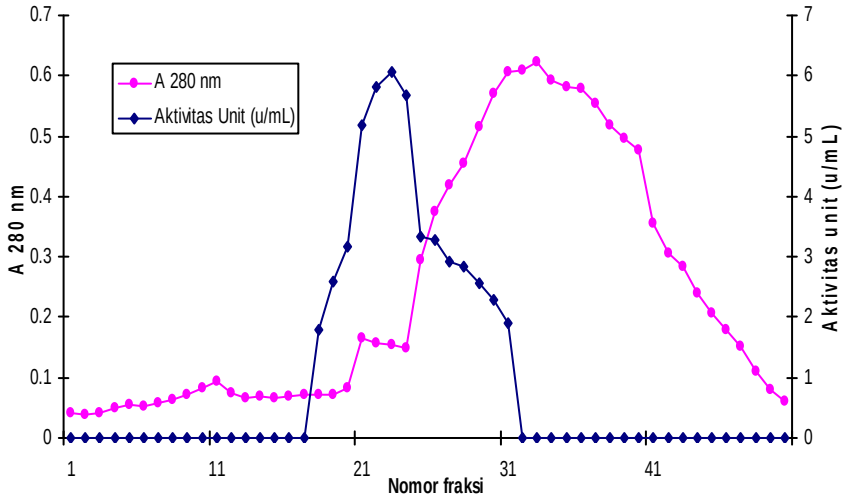
Gambar 1 menunjukkan bahwa aktivitas spesifik tertinggi enzim α-amilase ditunjukkan pada fraksi 65-80 % sebesar 349,82 u/mg. Sedangkan aktivitas spesifik enzim pada fraksi 50-65% menunjukkan angka yang cukup besar yaitu 155,836 u/mg, dan fraksi 80-100% dengan aktivitas spesifik sebesar 59,86u/mg. Sehingga untuk proses selanjutnya fraksinasi hanya di bagi menjadi dua tahap yaitu 0-40% dan 40-85%. Hal ini disebabkan bila hanya fraksi 65-80% yang digunakan pada tahap berikutnya, dikhawatirkan banyak enzim yang hilang, yang akan berakibat pada penurunan perolehan enzim. Fraksi 0-40% tidak digunakan pada proses pemurnian selanjutnya, karena pada fraksi ini enzim α-amilase yang mengendap sangat sedikit sekali. Oleh karena itu fraksi 40-85% yang digunakan pada tahap pemurnian selanjutnya.

b. Kromatografi kolom filtrasi gel

Kromatografi kolom filtrasi gel yang digunakan pada penelitian ini menggunakan fasa diam sepadhex G-100, dengan *range* pemisahan antara 40-150 kDa[11]. Selanjutnya, enzim yang telah dimasukkan ke dalam kolom dielusi menggunakan buffer sitrat 0,1 M pH 5,5. Volum enzim yang dimasukkan sebanyak 5 mL, dan volum enzim yang ditampung sebanyak 4 mL per fraksi. Pola protein (A_{280} nm) dan aktivitas enzim α-amilase hasil kromatografi kolom filtrasi gel dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 1. Hubungan antara kejenuhan amonium sulfat dengan aktivitas spesifik enzim α-amilase



Gambar 2. Kromatogram enzim α-amilase pada kromatografi kolom filtrasi gel.

Gambar 2 menunjukkan beberapa puncak protein, namun aktivitas terbaik ditunjukkan pada fraksi 21, 22, 23, dan 24, dengan aktivitas spesifik sebesar 829,46 u/mg dan kadar protein 0,013 mg/mL. Skema pemurnian enzim α-amilase dari *R. oryzae* dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pemurnian enzim α-amilase dari *R. oryzae*

Tahap	Vol. (mL)	Aktivitas total (u)	Kadar protein (mg/mL)	Protein total (mg)	Aktivitas spesifik (u/mg)	Kemurnian (kali)	Perolehan (%)
Ekstrak kasar	200	1056,2	0,239	47,8	22,096	1	100
Fraksinasi amonium sulfat (40-85%)	11	395,769	0,128	1,408	281,09	13	37
Kromatografi Kolom	10	107,83	0,013	0,13	829,46	38	10,2

© 2009 FMIPA Universitas Lampung

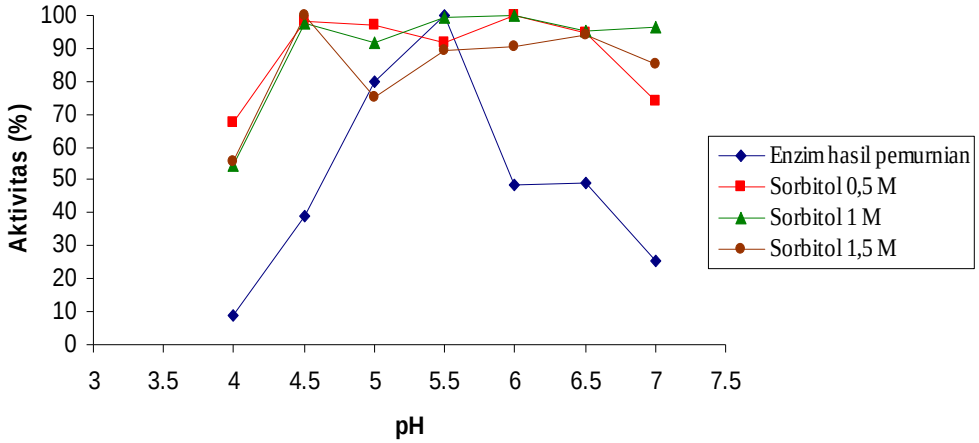
Berdasarkan Tabel 1 dapat dilihat bahwa pemurnian enzim α-amilase menggunakan garam amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 40-85%, menghasilkan aktivitas spesifik sebesar 281,09 u/mg, meningkat 13 kali dibandingkan ekstrak kasar enzim, dengan perolehan 37%.

Pemurnian lebih lanjut menggunakan kromatografi kolom filtrasi gel Sephadex G-100, menghasilkan aktivitas spesifik enzim sebesar 829,46 u/mg dengan tingkat kemurnian 38 kali dibandingkan ekstrak kasar enzim dengan perolehan 10,2%. Perolehan (%) enzim yang semakin kecil selama proses pemurnian disebabkan oleh tidak semua enzim terendapkan pada saat fraksinasi dan karena enzim kehilangan aktivitasnya selama proses kromatografi kolom.

3.2. Karakterisasi Enzim Sebelum dan Setelah Penambahan Poliol

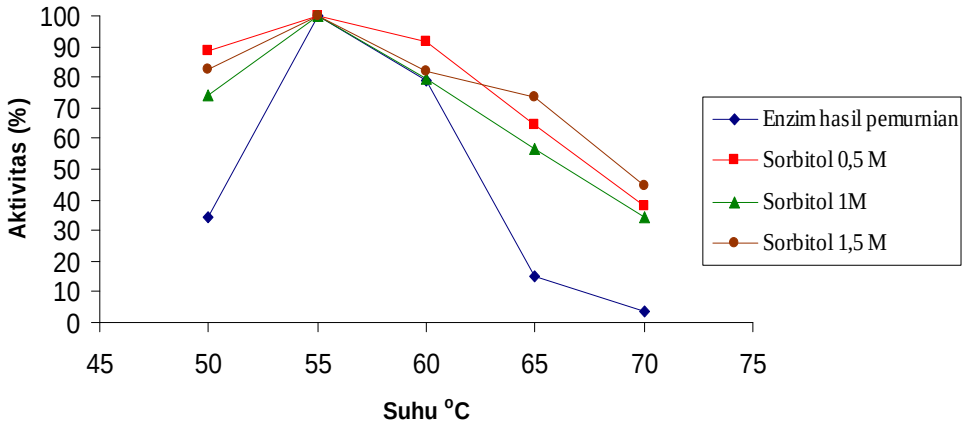
3.2.1. Penentuan pH optimum enzim sebelum dan setelah penambahan poliol

Percobaan ini dilakukan untuk mengetahui stabilitas enzim α-amilase setelah penambahan poliol terhadap pengaruh pH, dan juga untuk melihat apakah terjadi pergeseran pH optimum. Aktivitas (%) enzim hasil pemurnian dan enzim setelah penambahan sorbitol dalam tiga variasi konsentrasi pada berbagai pH dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. pH optimum enzim hasil pemurnian dan enzim setelah penambahan sorbitol (0,5 M; 1 M; 1,5M) pada suhu 55 °C.

Gambar 3 menunjukkan terjadi pergeseran pH optimum enzim setelah penambahan sorbitol. pH optimum enzim hasil pemurnian adalah 5,5, sedangkan pada penambahan sorbitol 0,5 dan 1 M terjadi pergeseran pH menjadi 6, dan pada penambahan sorbitol 1,5 M juga terjadi pergeseran pH optimum menjadi 4,5.



Gambar 4. Suhu optimum enzim hasil pemurnian dan enzim setelah penambahan sorbitol (0,5 M; 1 M; 1,5 M)

© 2009 FMIPA Universitas Lampung

Gambar 3 juga menunjukkan terjadi peningkatan stabilitas enzim α-amilase setelah penambahan sorbitol terhadap pH. Semua enzim setelah penambahan sorbitol meningkat stabilitasnya terhadap pH dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Dari Gambar dapat dilihat bahwa enzim setelah penambahan sorbitol stabil terhada pH antara 4,5 – 7. Sedangkan enzim hasil pemurnian hanya stabil antara pH 5 – 5,5.

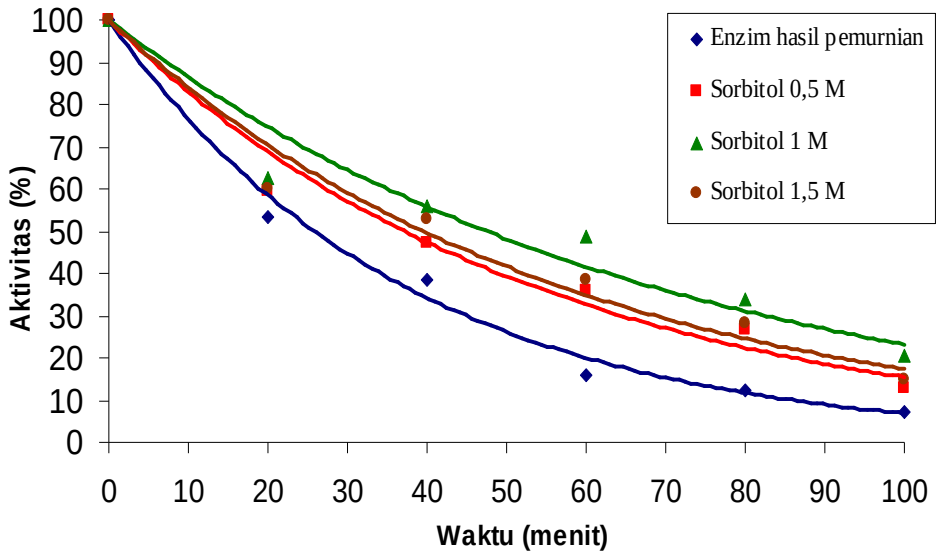
3.2.2. Penentuan suhu optimum enzim sebelum dan setelah penambahan poliol

Aktivitas (%) enzim α-amilase setelah penambahan poliol dan enzim α-amilase sebelum penambahan poliol pada berbagai suhu dapat dilihat pada Gambar 4.

Dari Gambar 4 di atas dapat diketahui bahwa suhu optimum enzim setelah penambahan sorbitol sama dengan suhu optimum enzim hasil pemurnian, yaitu 55 °C. Walaupun suhu optimum enzim setelah penambahan sorbitol tidak mengalami kenaikkan dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian, akan tetapi terjadi peningkatan stabilitas enzim setelah penambahan sorbitol terutama pada suhu 65 – 70 °C. Pada suhu 65 °C, aktivitas enzim (%) dengan penambahan sorbitol (0,5 M;1 M; dan 1,5 M) adalah 64,65%; 56,66%; dan 73,30%. Pada suhu 70 °C aktivitas enzim (%) dengan penambahan sorbitol (0,5 M; 1 M; dan 1,5 M) berturut – turut adalah 38,16%; 34,60%; dan 44,40%. Sedangkan enzim hasil pemurnian hanya memiliki aktivitas enzim sebesar 3,43%.

3.2.3. Stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan enzim setelah penambahan poliol

Aktivitas sisa (*residual activity*), enzim hasil pemurnian dan enzim setelah penambahan sorbitol dan gliserol ditentukan dengan cara mengikubasi tiap – tiap enzim pada suhu 55 °C selama 100 menit. Pada interval waktu tertentu tiap – tiap enzim ditentukan aktivitasnya. Gambar 5 menunjukkan Grafik uji stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan enzim setelah penambahan sorbitol.



Gambar 5. Stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan enzim setelah penambahan sorbitol (0,5 M; 1 M dan 1,5 M) pada suhu 55 °C

Gambar 5 menunjukkan enzim hasil pemurnian memiliki aktivitas sisa yang lebih rendah, yaitu 4,58 %, bila dibandingkan enzim setelah penambahan sorbitol (0,5 M; 1 M; dan 1,5 M) memiliki aktivitas sisa berturut-turut 12,98%; 20,45% dan 14,7%. Terlihat bahwa enzim setelah penambahan sorbitol mempunyai stabilitas termal yang lebih tinggi dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Peningkatan stabilitas termal tertinggi dicapai pada enzim setelah penambahan sorbitol 1 M.

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa penambahan sorbitol pada enzim hasil pemurnian memberikan pengaruh yang cukup baik terhadap stabilitas enzim. Peningkatan stabilitas enzim oleh poliol terjadi karena adanya perubahan pada lingkungan enzim, yang menyebabkan konformasi struktur enzim menjadi lebih *rigid* karena intensitas interaksi hidrofobik antara gugus nonpolar yang meningkat. Interaksi hidrofobik merupakan faktor yang sangat penting dalam stabilitas struktur protein,

© 2009 FMIPA Universitas Lampung

karena dapat menyebabkan enzim mengalami *folding* sehingga menjadi lebih stabil dibandingkan dengan struktur *unfolding*[12].

3.2.4. Perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan konstanta laju inaktivasi termal (k_i) enzim hasil pemurnian dan enzim setelah penambahan poliol

Perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i), waktu paruh ($t_{1/2}$) dan nilai konstanta laju inaktivasi termal (k_i) [13] enzim hasil pemurnian dan enzim dengan penambahan poliol (sorbitol dan gliserol) dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Nilai k_i, ΔG_i dan $t_{1/2}$ enzim hasil pemurnian dan enzim setelah penambahan poliol

Enzim	k_i (menit^{-1})	$t_{1/2}$ (menit)	ΔG_i (kJ/mol)
Hasil pemurnian	0,0262	26,45	101,70
Sorbitol 0,5 M	0,0184	37,66	102,66
Sorbitol 1 M	0,0142	48,80	103,37
Sorbitol 1,5 M	0,0174	39,83	102,82

Dari Tabel 2 terlihat bahwa terjadi peningkatan nilai ΔG_i pada semua enzim dengan penambahan poliol, walaupun peningkatan yang terjadi tidak terlalu signifikan. Peningkatan nilai ΔG_i pada enzim setelah penambahan poliol mengindikasikan bahwa konformasi struktur enzim menjadi lebih *folding* dari semula,yang menjadikan struktur enzim lebih kaku dan kurang fleksibel sehingga energi yang diperlukan untuk mendenaturasi enzim tersebut semakin tinggi. Kenaikan ΔG_i yang tidak terlalu besar ini juga dilaporkan oleh Yandri[14] yang menyatakan terjadi peningkatan ΔG_i enzim α-amilase dari *B. subtilis*, yaitu enzim hasil pemurnian (102,3 kJ/mol) dan enzim hasil modifikasi kimia (CC-PEG 67% : 104,7 kJ/mol dan NPC-PEG 89% : 106,3 kJ/mol).

Penambahan poliol juga dapat meningkatkan waktu paruh enzim, walaupun peningkatan yang terjadi tidak terlalu besar. Menurut Stahl[15] stabilitas termal enzim adalah dengan menentukan waktu paruh enzim tersebut. Pada percobaan yang telah dilakukan waktu paruh tertinggi dicapai oleh enzim dengan penambahan sorbitol 1 M, yaitu 48,80 menit dan gliserol 1,5 M sebesar 38,72 menit.

Nilai konstanta laju inaktivasi termal (k_i) pada masing – masing enzim setelah penambahan poliol dapat dilihat pada Tabel 2. Dari Tabel dapat dilihat terjadi penurunan nilai ki pada masing – masing enzim setelah penambahan poliol. Hal ini berarti bahwa, terjadi penurunan laju denaturasi enzim dengan penambahan poliol dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Penurunan nilai k_i diperkirakan karena kondisi enzim yang kurang fleksibel dalam larutan air, yang menjadikan ketidakterlipatan (*unfolding*) protein menjadi berkurang, sehingga meningkatkan kestabilan enzim.

4. KESIMPULAN DAN SARAN

4.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa: (a) Enzim α-amilase dari *Rhizopus oryzae* hasil pemurnian memiliki pH optimum 5,5 dan suhu optimum 55 ^oC. Aktivitas spesifik enzim hasil pemurnian sebesar 829,46 u/mg, meningkat 38 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar yang memiliki aktivitas spesifik sebesar 22,096 u/mg. Stabilitas termal enzim hasil pemurnian pada suhu penyimpanan 55 ^oC selama 100 menit menunjukkan enzim hasil pemurnian memiliki aktivitas sisa 4,58%, $t_{1/2}$ = 26,45 menit, ki = 0,0262 menit $^{-1}$, dan ΔG_i = 101,70 kJmol^{-1} ; (b) Penambahan sorbitol pada enzim hasil pemurnian menyebabkan terjadinya pergeseran nilai pH optimum menjadi 6 (sorbitol 0,5 dan 1 M) dan 4,5 (sorbitol 1,5 M). Serta suhu optimumnya 55 ^oC. Uji stabilitas termal pada suhu penyimpanan 55 ^oC selama 100 menit menunjukkan enzim dengan penambahan sorbitol; 0,5 M memiliki aktivitas sisa sebesar 12,98%, $t_{1/2}$ = 37,66 menit, k_i = 0,0184 menit $^{-1}$, dan ΔG_i =102,66 kJmol^{-1}; sorbitol 1 M memiliki aktivitas sisa sebesar 20,45%, $t_{1/2}$ = 48,80 menit, k_i = 0,0142 menit^{-1}, dan ΔG_i = 103,37 kJmol^{-1}; dan sorbitol 1,5 M memiliki aktivitas sisa sebesar 14,7%, $t_{1/2}$ = 39,83 menit, k_i = 0,0174 menit^{-1}, dan ΔG_i = 102,82 kJmol^{-1}; (c) Penambahan poliol dapat meningkatkan stabilitas termal enzim serta stabilitas enzim terhadap pH.

4.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh pada penelitian ini, untuk penelitian selanjutnya disarankan untuk menggunakan senyawa poliol selain sorbitol dan menggunakan metode peningkatan stabilitas yang lain, misalnya dengan modifikasi

DAFTAR PUSTAKA

1. Ahern, T.J., dan Klibanov, A.M. 1987. *Why Do Enzyme Irreversibly Inacctive At High Temperature*. Biotec. I. Microbial Genetic Engineering and Enzyme Technology. Gustav Fischer. Stuttgart. New York. P. 131-136.

2. Goddette, D.W., Terri, C., FBeth, .L., Maria, L., Jonathan, R.M., Christian, P., Robert, B.R., Shiow, S.Y. and Wilson, C.R. 1993. Strategy and Implementation of a System of Protein Engineering. *J. Biotechol.* , **28:**. 41-54.

3. Vielle, C., and Zeikus., J. G. 1996. Thermozymes : Identifying Molecular Determina of Protein Structural and Fuctional Stability. *Tibtech*., **14**(6): 183-189.

4. Illanes, A. 1999. Stability of Biocatalysts. Review Article. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*. **2** (1):

5. Bustos, R.O., Romo, C.R. and Healy, M.G. 1999. Stabilisatioan of Trypsin-Like Enzymes from Antarctic Krill : Effect of Polyols, Polysaccharida and Proteins. *J. Chem. Technol. Biotechnol.,* **65**: 193-199.

6. Singh, S. and Singh, J. 2003. Effect of Polyols on the Conformational Stability and Biological Activity of a Model Protein Lysozyme. *AAPS PharmSciTech.* 4 (3).

7. Smith, J.E. 1990. *Prinsip Bioteknologi*. Diterjemahkan oleh Sumo, U.F., Sumantri, B. dan Subono. PT. Gramedia. Jakarta.

8. Suhartono, M.T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi.* Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor. Bogor.

9. Fuwa, H. 1954. A New Method For Microdetermination of Amylase Activity by The Use of Amylose As The Substrate. *J. Biochem. Tokyo*. **41**: 583-603.

10. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein Mesurement With The Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 193-265.

11. Deutscher, M.P. 1990. *Methods in Enzymology : Guide to Protein Purification*. Acamic Press, inc. California.

12. Lemos, S.L.J., P.S Bon[2], M, de fatima, and N. P, Junior. 2000. Thermal Stability of Xylanases Produced By Aspergillus awamori. *Brazilian Journal of Microbiology.* 31. 206-211.

13. Kazan, D., Ertan, H., and Erarslan, A. 1996. Stabilization of Penicillin G Acylase Against pH by Chemical Cross-Linking. *J ProcesBiochemistry*. 33(2):135-140.

14. Yandri, A.S. 2004. *Karakterisasi dan Modifikasi Kimia α-Amilase dari Bakteri Isolat Lokal Bacillus subtilis ITBCCB148*. [Disertasi]. ITB. Bandung.

15. Stahl, S. (1999), Thermophilic Microorganisms: The Biological Background for Thermophily and Thermoresistance of Enzymes in *Thermostability of Enzymes* (Gupta, M.N. editor), Springer Verlag, New Delhi, 59-60.

© 2009 FMIPA Universitas Lampung