

Purifikasi dan Karakterisasi α -amilase Termotabil dari *Bacillus stearothermophilus* TII-12

Puji Lestari^{1*}, Nur Richana², Abdul A. Darwis³, Khaswar Syamsu³, dan Untung Murdiyatmo⁴

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: lestari_71@yahoo.com

²Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian Jl. Tentara Pelajar No. 12, Cimanggung, Bogor
Telp. (0251) 8321762; Faks. (0251) 8350920

³Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680

⁴PTP Nusantara XI, Jl. Merak No. 1, Surabaya 60175
Telp. (031) 3524596; Faks. (031) 352992, 3532525

Diajukan: 20 September 2010; Diterima: 24 Februari 2011

ABSTRACT

Purification and Characterization of Thermostable α -amylase from *Bacillus stearothermophilus* TII-12. Puji Lestari, Nur Richana, Abdul A. Darwis, Khaswar Syamsu, and Untung Murdiyatmo. Thermostable α -amylase is a potential enzyme employed in the starch processing and widely used in food industries, but this enzyme is still imported. The local enzyme production would be more economical and useful for its broad applications. Here we report α -amylase from indigenous bacteria TII-12 which was purified and characterized, as well as analyzed its hydrolysis product on cassava starch. The enzyme of *Bacillus stearothermophilus* TII-12 partially purified by ultrafiltration, acetone precipitation and gel filtration (Sephadex G-100) showed the reduced total activity, total protein and yield, but increased the specific activity. The enzyme had a K_m of 1,06 mg/ml and V_{max} of 1,21 mol/min, with optimal activity at pH 7 and 90°C. An apparent molecular mass was of 192.932,8 Dalton, as estimated by Native-Polyacrylamide Agarose Gel electrophoresis. Its activity was inhibited by the divalent cation chelator such as EDTA and $CuSO_4$ but activated by calcium ion. Hydrolysis products of this enzyme on cassava starch were glucose, dextrin, maltose and oligosaccharides. After 24 hours of hydrolysis, the concentration of glucose and maltose reached 51.970 and 10.090 ppm, respectively. The thermostable α -amylase of TII-12 is an endo- α -amylase and prospective to be applied on starch liquefaction with high temperature process.

Keywords: *Bacillus stearothermophilus*, characterization, purification, thermostable α -amylase.

ABSTRAK

Purifikasi dan Karakterisasi α -amilase Termotabil dari *Bacillus stearothermophilus* TII-12. Puji Lestari, Nur Richana, Abdul A. Darwis, Khaswar Syamsu, dan Untung Murdiyatmo. α -amilase termotabil merupakan enzim potensial yang banyak digunakan dalam pengolahan pati dan industri makanan, namun demikian enzim ini masih impor. Produksi enzim lokal akan menjadikan lebih ekonomis dan bermanfaat untuk aplikasinya secara lebih luas.

Studi ini melaporkan pemurnian, karakterisasi, dan analisis produk hidrolisis α -amilase dari bakteri TII-12 pada pati ubi kayu. Enzim dari *Bacillus stearothermophilus* TII-12 yang dimurnikan secara parsial dengan ultrafiltrasi, pengendapan aseton, dan gel filtrasi (Sephadex G-100) menunjukkan penurunan aktivitas total, protein total, dan rendemen, tetapi aktivitas spesifik meningkat. Enzim ini mempunyai K_m sebesar 1,06 mg/ml dan V_{max} adalah 1,21 mol/menit, dengan aktivitas optimal pada pH 7,0 dan 90°C. Berdasarkan estimasi menggunakan *native-polyacrylamide agarose gel electrophoresis*, masa molekul α -amilase dari bakteri TII-12 sekitar 192.932,8 Dalton. Aktivitas enzim ini dihambat oleh kelat kation divalen seperti EDTA dan $CuSO_4$, tetapi meningkat aktivitasnya oleh ion kalsium. Produk hidrolisis enzim ini pada pati ubi kayu meliputi glukosa, dekstrin, maltosa, dan oligosakarida. Setelah 24 jam hidrolisis konsentrasi glukosa dan maltosa mencapai 51.970 dan 10.090 ppm. α -amilase termotabil dari TII-12 merupakan endo- α -amilase dan prospektif untuk diterapkan pada proses likuifikasi pati yang memerlukan suhu tinggi.

Kata kunci: *Bacillus stearothermophilus*, karakterisasi, pemurnian, α -amilase termotabil.

PENDAHULUAN

α -amilase (E.C.3.2.1.1) mampu menghidrolisis pati dan glikogen melalui pemotongan internal ikatan α -1,4-glikosida secara acak, menghasilkan oligosakarida seperti maltosa, glukosa, dan α -dekstrin. Enzim yang mempunyai peranan penting pada penggunaan polisakarida ini banyak dikandung berbagai bakteri, fungi, tanaman, dan hewan. α -amilase merupakan enzim yang penting dan dimanfaatkan secara luas dalam dunia industri seperti industri pangan, fermentasi, tekstil, kertas, obat-obatan, dan gula (Gupta *et al.*, 2003). Pemanfaatan enzim ini pada skala industri lebih dititikberatkan pada peningkatan produksi dan efisiensi prosesnya.

α -amilase termotabil dipandang lebih penting dalam aplikasinya dibidang industri dibandingkan jenis α -amilase yang tidak tahan suhu tinggi. Termosta-

bilitas α -amilase biasanya disesuaikan dengan pemanfaatannya, sebagai contoh α -amilase termolabil dapat digunakan pada proses sakarifikasi pati, sedangkan α -amilase termotabil lebih sesuai digunakan dalam likuifikasi pati (Richardson *et al.*, 2002). Saat ini telah dikembangkan metode enzimatis memanfaatkan α -amilase yang dikombinasikan dengan β -amilase dan isoamilase dan/pululanase dalam pembuatan sirup maltosa dan tepung beras protein tinggi secara simultan. Meskipun potensi penggunaan α -amilase cukup besar, namun saat ini enzim ini masih harus diimpor dengan harga cukup mahal. Untuk memproduksi sendiri masih menghadapi beberapa kendala, antara lain tidak tersedianya galur mikroba unggul penghasil amilase dan kurangnya pengetahuan tentang teknologi produksi dan purifikasi enzim.

Berbagai mikroba yang mampu menghasilkan α -amilase berhasil diisolasi dan dimurnikan, seperti *Bacillus stearothermophilus* (Srivastava, 1984), *Streptococcus bovis* JB1 dan *Lactobacillus plantarum* (Giraud *et al.*, 1994). Pemurnian dan karakterisasi α -amilase dari beberapa mikroba jenis *Bacillus* sp. (Mamo dan Gessesse, 1999) ataupun *Bacillus subtilis* (Das *et al.*, 2004) juga telah dilakukan. Penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa α -amilase *B. stearothermophilus* telah diuji sifat termostabilitasnya (Vihinent dan Mantsala, 1989), dan dikarakterisasi enzim ekstra dan intraselulernya (Chakraborty *et al.*, 2000; Srivastava, 1984). Isolat bakteri termofil penghasil α -amilase juga berhasil diisolasi (Damardjati *et al.*, 1997), yaitu isolat TII-12. Dalam tulisan ini akan dikemukakan pemurnian dan karakterisasi α -amilase dari *B. stearothermophilus* TII-12, bakteri indigenous Indonesia yang diisolasi dari kawah Pegunungan Dieng.

BAHAN DAN METODE

Pemurnian α -amilase

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia dan Enzimatis, Balitbio, Bogor dan Pabrik Alkohol dan Spiritus, PTPN XI Jatiroto sejak 1997 sampai 1999. *B. stearothermophilus* TII-12 ditumbuhkan dalam media amilum termodifikasi dari Gao *et al.* (1984). Fermentasi dilakukan dalam fermentor 5 liter dengan 0,0075% anti buih silikon, suhu 50°C, pH 6,5, agitasi 300 rpm, aerasi 1,5 vvm selama 24 jam. Pemisahan supernatan dilakukan dengan menggunakan membran mikrofiltrasi kemudian diendapkan dengan aseton dingin (-20°C) semalam pada suhu 4°C. Tahap pemurnian selanjutnya adalah dengan filtrasi gel Sephadex G-100 untuk memisahkan fraksi aktif dari enzim kasar. Pengukuran protein terlarut dengan metode Bradford (Kruger, 1991) dan aktivitas α -amilase ditentukan de-

ngan metode 3,5-dinitrosalicylic acid (Mamo dan Gessesse, 1997). Satu unit aktivitas α -amilase dinyatakan sebagai satu mikromol α/β maltosa yang terbentuk per menit pada suhu dan pH aktivitasnya.

Karakterisasi Fisiko-Kimia Enzim

Enzim hasil pemurnian parsial dengan aseton digunakan dalam uji karakterisasi enzim. Pengaruh variasi pH dan suhu terhadap aktivitas dan stabilitas α -amilase dilakukan dengan uji hidrolisis terhadap *soluble starch* dengan metode dari Ivanova *et al.* (1993). Pengaruh ion kalsium terhadap stabilitas termal α -amilase diuji pada beberapa konsentrasi CaCl_2 yang diinkubasi pada suhu 90°C. Beberapa macam ion logam juga diujikan terhadap aktivitas enzim. Tingkat inhibisi dan aktivasi ditentukan dari perbandingan aktivitas ada inhibitor/aktivator dengan aktivitas tanpa inhibitor/aktivator.

Konstanta Kinetika Enzim

Nilai K_m dan V_{maks} α -amilase ditentukan dengan melakukan uji hidrolisis enzim dalam *soluble starch* pada konsentrasi 0,25-1% dengan suhu inkubasi 90°C. Gula reduksi diukur, kemudian konstanta K_m dan V_{maks} ditentukan dengan metode Lineweaver-Burk.

Visualisasi Enzim

Hasil pemurnian parsial dengan aseton dimigrasikan pada *Native Polyacrylamide Agarose Gel Electrophoresis* (N-PAGE) pada gel separasi 8% dan stacking 4% sesuai prosedur di Biorad Elektroforesis. Gel hasil elektroforesis direndam dalam *coomasie brilliant blue* R-250 (0,005% *coomasie brilliant blue* dalam etanol 10% dan asam asetat glacial 5%) (Bollag dan Edelstein, 1991) dengan protein standar *bovine serum albumin*. Untuk mengetahui aktivitas α -amilase setelah elektroforesis dengan N-PAGE, gel direndam dalam 1% *soluble starch* yang dilarutkan dalam Tris-HCl pH 6,8 dan diinkubasi pada suhu 50°C. Pita α -amilase divisualisasikan dengan merendam gel dalam larutan iodine (I_2/KI) (Kim *et al.*, 1995).

Hidrolisis Enzim pada Pati

Suspensi pati ubi kayu sebanyak 2% diatur pH-nya pada 6,0-6,5 dengan CaCO_3 , kemudian dipanaskan sampai tergelatinisasi. Hasil likuifikasi pati dianalisis melalui *Thin Layer Chromatography* (TLC) pada gel silika dengan menggunakan fase *mobile* butanol-etanol-air (5 : 3 : 2). Analisis dengan *high performance liquid chromatography* (HPLC) dilakukan pada kondisi pelarut fase *mobile* adalah bufer fosfat dan metanol (50 : 50), laju aliran 1 ml/min, suhu kolom pada su-

hu ruang dengan detektor *fluorescence* (Holt *et al.*, 1988).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemurnian Enzim

Isolat TII-12 mampu menghidrolisis pati menjadi polimer yang lebih kecil yang ditunjukkan oleh zona bening di sekeliling koloni (Gambar 1A). Di sisi lain, proses pemurnian menyebabkan penurunan aktivitas enzim dan protein total (Tabel 1). Berdasarkan penentuan aktivitas dan konsentrasi protein diperoleh aktivitas spesifik pada pemurnian dengan membran ultrafiltrasi, pengendapan aseton, dan Sephadex G-100 berturut-turut 6.686,6; 18.155,4; dan 28.825,5 U/m (Tabel 1).

Penurunan aktivitas enzim pada tahap pemurnian disebabkan karena sebagian protein terdenaturasi oleh pengaruh perlakuan selama pemurnian. Pada tahap ultrafiltrasi telah dipisahkan protein dengan bobot molekul lebih dari 30.000 Dalton. Proses pengendapan dengan aseton memisahkan protein yang mengendap dari yang tidak terendapkan akibat perbedaan kelarutan, yang berakibat pada penurunan rendemen α -amilase TII-12. Terlihat bahwa pengendapan dengan pelarut organik seperti aseton menunjukkan penurunan aktivitas enzim karena pengaruh adanya reduksi aktivitas air. Kekuatan pelarutan air untuk suatu muatan dan molekul enzim hidrofilik akan berkurang dengan meningkatnya konsentrasi pelarut organik. Jadi pemurnian enzim mampu meningkatkan kemurnian

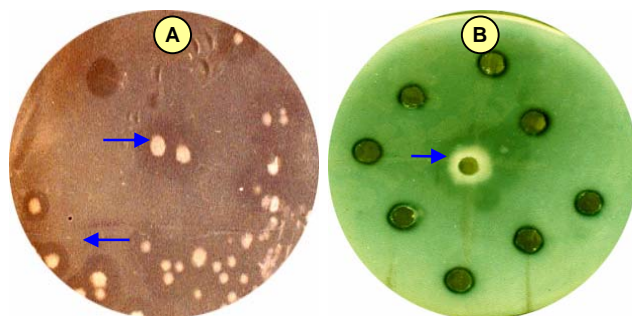
enzim beberapa kali lipat, baik menggunakan metode ultrafiltrasi maupun dialisis (Suzuki *et al.*, 2006).

Fraksi aktif hasil pemurnian dengan filtrasi gel Sephadex G-100 berdasarkan uji kualitatif dengan metode difusi radial menghasilkan zona bening di sekitar spot enzim kasar (Gambar 1B) yang menunjukkan kemampuan menghidrolisis pati. Di sini terbukti bahwa kemurnian enzim hasil pemurnian dengan Sephadex G-100 meningkat 10,1 kali lebih tinggi dibandingkan dengan enzim kasar dalam supernatan. Hasil ini melebihi hasil studi Hmidet *et al.* (2008) yang hanya meningkat 3 kali dengan aktivitas spesifik sekitar 16%. Dengan demikian meskipun aktivitas total α -amilase menurun pada tiap tahap pemurnian, namun aktivitas spesifik meningkat yang berarti kemurnian enzim juga meningkat. Hasil pemurnian menggunakan filtrasi gel Sephadex dalam studi ini ternyata memberikan tingkat kemurnian lebih tinggi dibandingkan dengan CM Sepharose CL-6B yang hanya meningkatkan kemurnian 3,7 kali dari enzim di supernatan (Ivanova *et al.*, 1993), tetapi 20,4 kali untuk DEAE-Sephacel dan Sephacyl 5-100R (Shih dan Labbe, 1995). Jadi dalam pemurnian enzim, meskipun kemurnian enzim meningkat tetapi biasanya diikuti dengan menurunnya rendemen, untuk itu perlu dicari kondisi terbaik agar rendemen α -amilase tetap tinggi selama tahap pemurnian.

Karakterisasi Fisiko-Kimia Enzim

pH dan suhu optimum

PH optimum α -amilase TII-12 adalah pH 7 (Gambar 2A). PH optimum α -amilase TII-12 terlihat masih



Gambar 1. Uji hidrolisis pati oleh α -amilase TII-12. A = isolat TII-12 dengan zona bening di sekeliling koloni (tanda panah), B = hasil uji difusi radial α -amilase dengan substrat pati ditandai dengan zone bening sebagai hasil hidrolisis enzim (tanda panah).

Tabel 1. Tahapan pemurnian α -amilase TII-12.

| Tahap | Volume (ml) | Aktivitas total (U) | Protein total (mg) | Aktivitas spesifik (U/mg) | Kemurnian (kali) | Rendemen (%) |
|----------------|-------------|---------------------|--------------------|---------------------------|------------------|--------------|
| Supernatan | 2.000 | 2.062.120 | 702,00 | 2.864,0 | 1,0 | 100 |
| Ultrafiltrasi | 200 | 1.194.768 | 178,70 | 6.686,6 | 2,3 | 58 |
| Aseton | 100 | 405.048 | 22,80 | 18.155,4 | 6,3 | 20 |
| Sephadex G-100 | 75 | 42.292 | 1,43 | 28.825,5 | 10,1 | 2 |

berada pada kisaran suhu optimum dari sebagian besar α -amilase. PH optimum α -amilase TII-12 ini konsisten dengan hasil sebelumnya, yaitu 6,0-6,5 untuk α -amilase *B. licheniformis* 44MB82-A (Ivanova *et al.*, 1993) dan *B. licheniformis* NRRL B14368 (Bose dan Das, 1996). Sedangkan α -amilase *B. licheniformis* IFO12196 mempunyai aktivitas maksimum pada pH 9 tetapi aktivitas total menurun pada pH 10 (Lee *et al.*, 2006). Suhu optimum α -amilase termotabil TII-12 ialah 90°C (Gambar 2B), yang menunjukkan pada kisaran suhu optimum α -amilase termotabil. Hasil ini selaras dengan amilase dari *Bacillus* lain (Vihinent dan Mantsala, 1989), terutama amilase *B. Stearothermophilus* strain lain yang juga masih memiliki 90% aktivitas katalitik pada suhu 100°C (Chakraborty *et al.*, 2000).

Stabilitas pH dan suhu

α -amilase TII-12 masih stabil pada pH 4-8 (Gambar 2C). α -amilase TII-12 stabil pada pH 7 suhu 27°C selama 24 jam dengan aktivitas sisa 92,1% sedangkan pada 6 jam inkubasi menghasilkan aktivitas sisa 98%. α -amilase TII-12 masih stabil pada kisaran suhu 40-60 dan 80-100°C (Gambar 2D). Sebaliknya α -amilase TII-12 menunjukkan kesensitifan terhadap suhu 70°C karena menghasilkan aktivitas sisa lebih kecil dari 70% dan masih tersisa sekitar 92% pada suhu 100°C selama 15 menit inkubasi. Enzim dari TII-12 ini merupakan α -amilase termotabil seperti yang dihasilkan *Bacillus* lain (Chakraborty *et al.*, 2000), tetapi amilase TII-12 ini mempunyai kelebihan karena ternyata lebih tahan terhadap suhu tinggi dibandingkan dengan α -amilase GM 8901 hasil penelitian Kim *et al.* (1995).

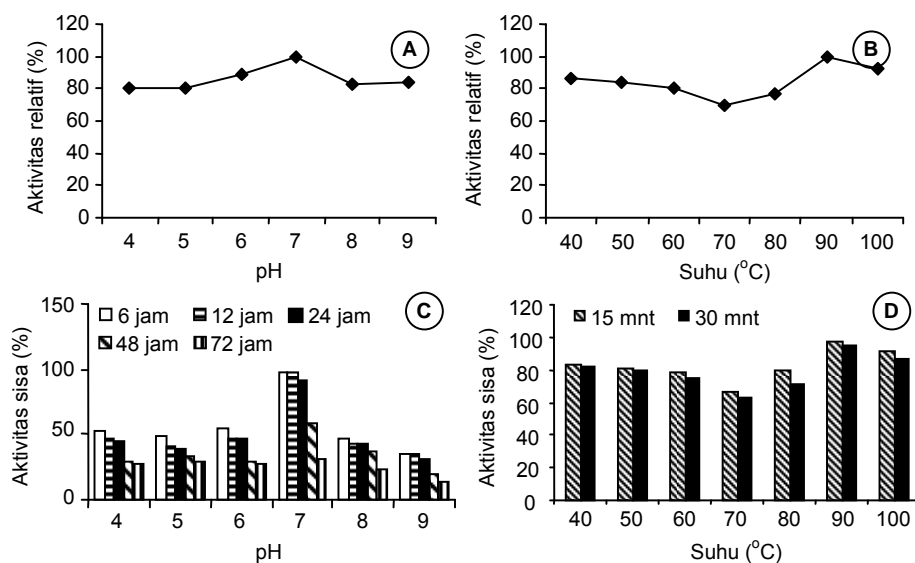
Pengaruh Inhibitor dan Aktivator

α -amilase TII-12 tidak dihambat oleh ion Na^+ , $(\text{NH}_4)^{2+}$, K^+ dan Mg^{2+} , hal ini didukung oleh hasil studi Ivanova *et al.* (1993). Namun demikian enzim ini sensitif terhadap EDTA dan CuSO_4 karena menyebabkan denaturasi protein α -amilase TII-12 (Tabel 2), tetapi sebaliknya EDTA dan Cu^{2+} tidak berpengaruh pada aktivitas Amyl dari *Bacillus* sp strain GM 8901 (Kim *et al.*, 1995). Pada konsentrasi rendah (1 mM) ion logam Co^{2+} dan Mn^{2+} tidak menghambat aktivitas enzim tetapi pada konsentrasi tinggi (5 mM) bertindak sebagai inhibitor α -amilase TII-12. Hasil ini sesuai dengan hasil sebelumnya (Hagihara *et al.*, 2001), di mana hal tersebut dikarenakan adanya pengaruh kelebihan aktivator. Senyawa aktivator meningkatkan kecepatan reaksi katalitik enzim sampai jumlah tertentu. Apabila aktivator terlalu besar menyebabkan terjadinya persaingan antara aktivator bebas dan kompleks aktivator substrat terhadap enzim.

Ion Ca^{2+} bertindak sebagai aktivator α -amilase TII-12 dengan konsentrasi optimum 5 mM (Gambar 3) dan mampu mempertahankan aktivitas sisa α -amilase TII-12 sampai 97,1% pada suhu 90°C setelah 1 jam. Tanpa CaCl_2 , aktivitas α -amilase hanya sebesar 71% setelah 15 menit inkubasi. Jadi α -amilase termotabil dari bakteri memerlukan ion kalsium (Machius *et al.*, 1998) sebagai pelindung suhu tinggi.

Sifat Kinetik dan Bobot Molekul Enzim

Nilai V_{maks} dan K_m α -amilase TII-12 masing-masing adalah 1,21 mol/menit dan 1,06 mg/ml. Nilai K_m α -amilase TII-12 lebih kecil dibandingkan dengan



Gambar 2. Pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas (A dan B) dan stabilitas (C dan D) α -amilase dari *B. stearothermophilus* TII-12.

α -amilase *B. acidocaldarius* A2 yang memiliki Km 1,6 mg/ml (Kanno, 1986). Hal ini menunjukkan bahwa α -amilase TII-12 untuk mencapai kecepatan maksimum memerlukan konsentrasi substrat lebih tinggi daripada α -amilase *B. licheniformis* BLM 1777.

Dalam penelitian ini, karakterisasi protein berdasarkan bobot molekul enzim hasil pemurnian parsial dengan ultrafiltrasi dan aseton juga dilakukan pada Native-PAGE (Gambar 4). Pita protein yang menunjukkan zona bening ialah pita protein α -amilase TII-12

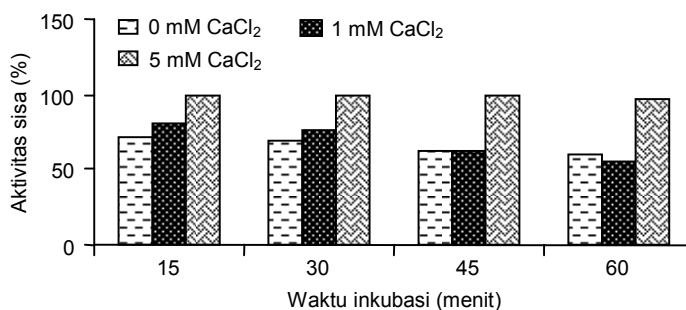
yang mampu menghidrolisis pati. Berdasarkan pengamatan tersebut diketahui bahwa α -amilase adalah pita protein pertama yang berzona bening dengan perkiraan bobot molekul 192.932,8 Dalton.

Analisis Produk Hidrolisis Enzim

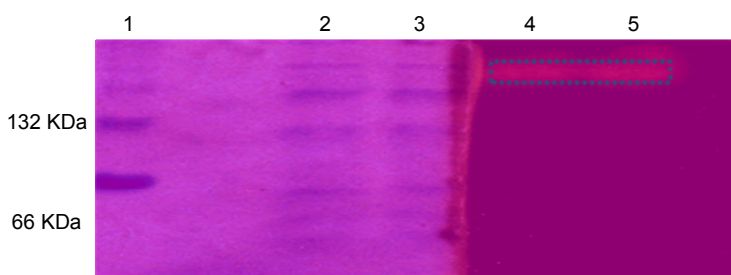
Hidrolisis enzimatis oleh α -amilase TII-12 antara 0,5 sampai 1 jam menghasilkan dekstrin, malto-oligosakarida yang lebih pendek dan setelah 2 jam hidrolisis maltosa mulai terbentuk (Gambar 5). Setelah 24

Tabel 2. Pengaruh ion logam terhadap aktivitas α -amilase TII-12.

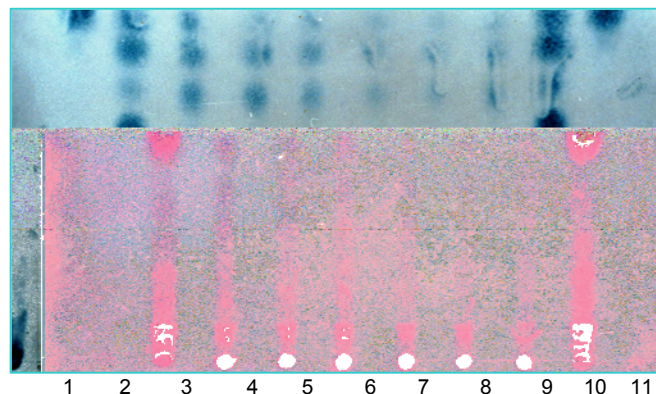
| Ion logam | Konsentrasi (mM) | Aktivitas relatif (%) |
|---|------------------|-----------------------|
| EDTA | 1 | 43,8 |
| | 5 | 33,5 |
| NaCl | 1 | 107,7 |
| | 5 | 141,2 |
| CuSO ₄ | 1 | 77,3 |
| | 5 | 81,4 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1 | 126,9 |
| | 5 | 138,6 |
| MgSO ₄ | 1 | 131,2 |
| | 5 | 155,2 |
| KNO ₃ | 1 | 110,2 |
| | 5 | 114,0 |
| CoSO ₄ | 1 | 109,5 |
| | 5 | 85,4 |
| MnSO ₄ | 1 | 125,1 |
| | 5 | 78,3 |



Gambar 3. Pengaruh ion kalsium terhadap termostabilitas α -amilase dari *B. Stearothermophilus* TII-12.



Gambar 4. Analisis zimogram dengan Native-PAGE dari α -amilase *B. Stearothermophilus*. Sumur 1 = *marker bovine serum albumine* (66 dan 132 KDa); 2 dan 3 = enzim kasar α -amilase hasil ultrafiltrasi yang diendapkan dengan aseton; 4 dan 5 = α -amilase dengan zona bening yang menunjukkan hidrolisis pati dengan perkiraan bobot molekul 192.932 Da (kotak).



Gambar 5. Pola kromatogram TLC produk hidrolisis α -amilase *Bacillus stearothermophilus* TII-12. No. 1 dan 10: standar glukosa dan maltosa, 2 dan 9: α -amilase standar dari *B. Licheniformis*, 3: hidrolisis pati 0 jam, 4: hidrolisis pati 0,5 jam, 5: hidrolisis pati 1 jam, 6: hidrolisis pati 1.5 jam, 7: hidrolisis pati 2 jam, 8: hidrolisis pati 24 jam.

Tabel 3. Hasil analisis produk akhir hidrolisis pati ubi kayu oleh α -amilase dari *Bacillus stearothermophilus* TII-12 dengan HPLC.

| Pertakuan | Glukosa (ppm) | Maltosa (ppm) |
|---------------------------|---------------|---------------|
| Standar α -amilase | 81.050 | 11.040 |
| Hidrolisis 1 jam | 27.530 | 4.870 |
| Hidrolisis 24 jam | 51.970 | 10.090 |

jam hidrolisis, dekstrin, maltotriosa, maltosa, dan glukosa terbentuk, sedangkan malto-oligosakarida lainnya mulai mengecil konsentrasinya. Hasil hidrolisis enzim ini tidak berbeda jauh dengan hasil Ratanakhanokchai *et al.* (1992) yang meliputi glukosa, maltosa, dan malto-oligosakarida, sedangkan hasil dari Ivanova *et al.* (1993) adalah maltotriosa, maltosa, dan glukosa melalui aksi α -amilase dari *B. licheniformis* 44MB82-A. Di lain pihak produk utama α -amilase *Clostridium perfringens* tipe A adalah maltosa, maltotriosa dan maltotetrosa, dan glukosa yang terbentuk setelah 24 jam hidrolisis (Shih dan Labbe, 1995). Hasil hidrolisis yang beragam tersebut menunjukkan bahwa pola pemecahan enzim α -amilase terjadi secara acak, sehingga α -amilase *B. stearothermophilus* TII-12 adalah termasuk endoenzim, selaras dengan pernyataan Kim *et al.* (1995). Sesuai jenis α -amilase TII-12 yang termostabil, maka enzim ini perlu dicobakan untuk tahap likuifikasi pati yang memerlukan suhu tinggi dalam prosesnya.

Hidrolisis pati oleh α -amilase TII-12 selama 1 jam menghasilkan glukosa lebih rendah (37.530 ppm) dibandingkan hidrolisis selama 24 jam (51.970 ppm) (Tabel 3). Kecenderungan yang sama ditunjukkan oleh maltosa pada hidrolisis 1 jam dan 24 jam. Hal ini membuktikan bahwa produk akhir hidrolisis α -amilase TII-12 terhadap pati ubi kayu ialah glukosa dan

maltosa dan sebagian maltosa masih merupakan produk intermediat sebelum akhirnya menjadi glukosa terutama setelah 24 jam hidrolisis (Kim *et al.*, 1995). Meskipun aktivitas α -amilase TII-12 lebih rendah daripada enzim standar dari *B. licheniformis*, tetapi enzim ini sangat potensial karena aktivitas α -amilase TII-12 ini termasuk tinggi dan spesifik (termostabil). Mengingat enzim ini sampai sekarang masih impor dan harganya cukup mahal, maka dengan adanya α -amilase TII-12 akan sangat bermanfaat terutama dari segi ekonomis dalam proses pembuatan sirup glukosa ataupun industri lain yang digunakan secara luas di Indonesia. Selain itu, hal tersebut sekaligus mampu mengoptimalkan pemanfaatan pati ubi kayu di Indonesia yang diproduksi secara melimpah. Untuk itu perlu dikembangkan dan ditingkatkan produktivitas α -amilase TII-12 ini baik secara bioproses maupun rekayasa genetik.

KESIMPULAN

Proses pemurnian menyebabkan penurunan aktivitas dan protein total tetapi meningkatkan aktivitas spesifik α -amilase TII-12. PH dan suhu optimum α -amilase TII-12 adalah pH 7 dan 90°C. EDTA dan Cu^{2+} merupakan inhibitor tetapi ion kalsium bertindak sebagai aktivator α -amilase TII-12. Nilai V_{maks} dan K_m α -amilase TII-12 masing-masing adalah 1,21 mol/menit

dan 1,06 mg/ml. Hasil hidrolisis α -amilase TII-12 terhadap pati ubi kayu ialah glukosa dan maltosa dan sebagian maltosa masih merupakan produk intermediet sebelum akhirnya menjadi glukosa.

DAFTAR PUSTAKA

- Bollag, D.M. and S.J. Edelman. 1991. Protein Methods. John Wiley and Sons. New York. p. 143-160.
- Bose, K. and D. Das. 1996. Thermostable α -amylase production using *Bacillus licheniformis* NRRL B14368. Indian J. Exp. Biol. 34:1279-1282.
- Chakraborty, K., B.K. Bhattacharyya, and S.K. Sen. 2000. Purification and characterization of a thermostable α -amylase from *Bacillus stearothermophilus*. Folia Microbiol. 45:207-210.
- Das, K., R. Doley, and A.K. Mukerjee. 2004. Purification and biochemical characterization of a thermostable, alkalophilic, extracellular α -amylase from *Bacillus subtilis* DM-03 strain isolated from the traditional fermented food in India. Biotechnol. Appl. Biochem. 40:291-298.
- Damardjati, D.S., U. Murdiyatmo, N. Richana, Pujoyuwono, N. Azizah, D. Andriani, P. Lestina, dan D. Kusdiningsih. 1997. Kloning gen-gen amilase dari isolat bakteri indigenous untuk proses biokonversi bahan berpati. Laporan Hasil Penelitian. Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan. Bogor. hlm. 70.
- Gao, X.L., Y. Yu, and P. Linko. 1984. Glucoamylase and α -amylase production by immobilized. Biotech. 6:645-650.
- Giraud, E., A. Champailier, and M. Rainbault. 1994. Degradation of raw starch by wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. Appl. Environ. Microbiol. 60:4319-4323.
- Gupta, R., P. Gigras, H. Mohapatra, V.K. Goswami, and B. Chauhan. 2003. Microbial α -amylases: A biotechnological perspective. Proc. Biochem. 38:1599-1616.
- Hagihara, H., K. Igarashi, Y. Hayashi, K. Endo, K. Ikawa-Kitayama, and K. Ozaki. 2001. Novel α -amilase that is highly resistant to chelating reagents and chemical oxidants from the alkaliphilic *Bacillus* isolate KSM-K38. Appl. Environ. Microbiol. 67:1744-1750.
- Hmidet, N., A. Bayoudh, J.G. Berrin, S. Kanoun, N. Juge, and M. Nasri. 2008. Purification and biochemical characterization of a novel α -amylase from *Bacillus licheniformis* NH1. Cloning, nucleotide sequence and expression of *amyN* gene in *Escherichia coli*. Proc. Biochem. 43:499-510.
- Holt, D.L., R.L. Wehling, and M.G. Zeece. 1988. Determination of native folates in milk and other dairy products by high performance liquid chromatography. J. Chromatography 449:271-279.
- Ivanova, V.N., E.P. Dobreva, and E.I. Emanuilova. 1993. Purification and characterization of a thermostable α -amylase from *Bacillus licheniformis*. J. Biotechnol. 28:277-289.
- Kanno, M. 1986. A *Bacillus acidocaldarius* α -amylase that is highly stable to heat under acidic condition. Agric. Biol. Chem. 50:2633-2635.
- Kim, T.V., B.G. Gu, J.Y. Jeong, S.M. Byun, and Y.C. Shin. 1995. Purification and characterization of maltotetraose-forming alkaline α -amylase from an alkalophilic *Bacillus* strain GM 8901. Appl. Environ. Microbiol. 61:3105-3112.
- Kruger, N.J. 1991. The Bradford Method for Protein Quantitation. In J.M. Walker (ed.) The Protein Protocols Handbook. Humana Press, New Jersey. p. 49-55.
- Lee, S., H. Oneda, M. Minoda, A. Tanaka, and K. Inouye. 2006. Comparison of starch hydrolysis activity and thermal stability of two *Bacillus licheniformis* α -amylases and insights into engineering α -amylase variants active under acidic conditions. J. Biochem. 139:997-1005.
- Machius, M., N. Declerck, R. Huber, and G. Wiegand. 1998. Activation of *Bacillus licheniformis* α -amylase through a disorder order transition of the substrate-binding site mediated by calcium-sodium-calcium metal triad. Structure 6:281-292.
- Mamo, G. and A. Gessesse. 1997. Thermostable amylase production by immobilized thermophilic *Bacillus* sp. Biotechnol. Tech. 11:447-450.
- Mamo, G. and A. Gessesse. 1999. Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable α -amylases from a thermophilic *Bacillus*. Enz. Microb. Technol. 25:433-438.
- Ratanakhanokchai, K., J. Kaneko, Y. Kamio, and K. Izaki. 1992. Purification and properties of maltotetraose and maltotriose-producing amylase from *Chloroflexus auranticus*. Appl. Environ. Microbiol. 58:2490-2494.
- Richardson, T.H., X. Tan, G. Frey, W. Callen, M. Cabell, D.L.J. Macomber, J.M. Short, D.E. Robertson, and C. Miller. 2002. A novel, high performance enzyme for starch liquefaction: discovery and optimization of a low pH, thermostable α -amylase. J. Biol. Chem. 277:26501-26507.
- Shih, N.J. and R.G. Labbe. 1995. Purification and characterization of an extracellular α -amylase from *Clostridium perfringens* type A. Appl. Environ. Microbiol. 61:1776-1779.
- Srivastava, R.A.K. 1984. Studies on extracellular and intracellular purified amylases from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus*. Enz. Microb. Technol. 6:422-426.
- Suzuki, Y., T. Nagayama, H. Nakano, and K. Oishi. 2006. Purification and characterization of a maltotriogenic α -amylase I and a maltogenic α -amylase II capable of cleaving α -1,6-bonds in amylopectin. Starch 39:211-214.
- Vihinent, M. and P. Mantsala. 1989. Microbial amylolytic enzymes. Critical Rev. Biochem. Molec. Biol. 24:329-418.