

**PEMURNIAN ENZIM AMILASE KASAR DARI BAKTERI AMILOLITIK
ENDOGENOUS BEKATUL SECARA PARSIAL MENGGUNAKAN
AMMONIUM SULFAT**

SKRIPSI

**Oleh:
Mayasari
NIM. 10630076**



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2016**

**PEMURNIAN ENZIM AMILASE KASAR DARI BAKTERI AMILOLITIK
ENDOGENOUS BEKATUL SECARA PARSIAL MENGGUNAKAN
AMMONIUM SULFAT**

SKRIPSI

**Oleh:
MAYASARI
NIM. 10630076**

**Diajukan Kepada:
Fakultas Sains Dan Teknologi
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan Dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2016**

**PEMURNIAN ENZIM AMILASE KASAR DARI BAKTERI AMILOLITIK
ENDOGENOUS BEKATUL SECARA PARSIAL MENGGUNAKAN
AMMONIUM SULFAT**

SKRIPSI

Oleh:
MAYASARI
NIM. 10630076

**Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:
Tanggal: 11 Januari 2016**

Pembimbing I

Pembimbing II

Akyunul Jannah, S.Si., M.P
NIP. 19750410 200501 2 009

Begum Fauziah, S.Si., M.Farm
NIP. 19790620 200604 2 002

**Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia**

Elok Kamilah Hayati, M. Si
NIP. 19790620 200604 2 002

**PEMURNIAN ENZIM AMILASE KASAR DARI BAKTERI AMILOLITIK
ENDOGENOUS BEKATUL SECARA PARSIAL MENGGUNAKAN
AMMONIUM SULFAT**

SKRIPSI

Oleh:
MAYASARI
NIM. 10630076

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 11 Januari 2016**

**Penguji Utama : Diana Candra Dewi, M.Si (.....)
NIP. 19770720 200312 2 001**

**Ketua Penguji : Anik Maunatin, S.T., M.P (.....)
NIPT. 20140201 2 412**

**Sekretaris Penguji : Akyunul Jannah, S.Si., M.P (.....)
NIP. 19750410 200501 2 009**

**Anggota Penguji : Begum Fauziyah, S.Si, M.Farm (.....)
NIP. 19830628 200912 2 004**

**Mengesahkan,
Ketua Jurusan Kimia**

Elok Kamilah Hayati, M. Si
NIP. 19790620 200604 2 002

**SURAT PERNYATAAN
ORISINALITAS PENELITIAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Mayasari

NIM : 10630076

Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/Kimia

Judul Penelitian : “Pemurnian Enzim Amilase Kasar Dari Bakteri Amilolitik
Endogenous Bekatul Secara Parsial Menggunakan
Ammonium Sulfat”

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa hasil penelitian saya ini tidak terdapat unsur-unsur penjiplakan karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata hasil penelitian ini terbukti terdapat unsur-unsur jiplakan, maka saya bersedia untuk mempertanggung jawabkan, serta diproses sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 11 Januari 2016
Yang Membuat Pernyataan,

Mayasari
10630076

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr.Wb

Puji syukur penulis ucapkan kehadirat Allah SWT. karena atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi ini dengan judul **“Pemurnian Enzim Amilase Kasar dari Bakteri Amilolitik Endogenous Bekatul Secara Parsial Menggunakan Ammonium Sulfat”**. Shalawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW. yang telah memberi bimbingan ke jalan yang diridhoi Allah Swt.

Seiring dengan terselesaikannya penyusunan skripsi ini, Penulis menyadari bahwa baik dalam perjalanan studi maupun penyelesaian skripsi ini banyak memperoleh bimbingan dan motivasi dari berbagai pihak. Oleh karena itu, dengan penuh rasa hormat penulis mengucapkan terimakasih kepada :

1. Bapak dan Ibu, Adik, paman dan bibi, saudara penulis yang telah memberikan do'a, kasih sayang dan motivasi yang sangat berharga, hingga proses penulisan skripsi ini terselesaikan.
2. Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang, Bapak Prof. H. Mudjia Raharjo, M.Si.
3. Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang, Ibu Dr. Drh. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si.
4. Ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang, Ibu Elok Kamilah Hayati.
5. Para dosen pembimbing, Ibu Akyunul Jannah, S.Si, M.P dan Ibu Anik maunatin, S.T, M.P yang telah meluangkan waktu dengan sabar dan telaten, memberikan masukan dan arahan untuk membimbing penulis serta Ibu

Begum Fauziyah, S.Si, M. Farm yang telah memberikan saran dan mengarahkan penulis dalam mengintegrasikan sains dengan al-Qur'an.

6. Ibu Diana Candra Dewi, M.Si selaku dosen penguji tugas akhir yang telah memberikan banyak saran.
7. Ibu Rahmawati Ningsih, M.Si selaku dosen wali yang telah memberikan bimbingan dan dukungan yang membangun.
8. Seluruh Bapak/Ibu dosen jurusan Kimia yang telah mendidik dan memberikan banyak pengetahuan.
9. Karyawan Laboratorium dan Administrasi Jurusan Kimia dan Laboran Laboratorium Genetika Jurusan Biologi.
10. Seluruh kawan seangkatan Kimia 2010 yang saling memberikan semangat dalam menyelesaikan tugas akhir ini. Serta pihak-pihak yang telah membantu penulis yang tidak mungkin disebutkan satu per satu.

Semoga dengan tersusunnya skripsi ini dapat memberikan manfaat dan menambah khasanah ilmu pengetahuan bagi kita semua.

Malang, 11 Januari 2016
Penulis

DAFTAR ISI

SURAT PERNYATAAN	i
LEMBAR PERSETUJUAN	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
LEMBAR ORSINELITAS	iv
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan	6
1.4 Batasan Masalah	6
1.5 Manfaat	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Pati	7
2.1.1. Amilosa	8
2.1.2. Amilopektin	9
2.2 Enzim Amilase.....	10
2.3 Pertumbuhan Mikroorganisme Amilolitik	13
2.4.1 Bakteri Amilolitik	13
2.4.2 Media Pertumbuhan Bakteri Amilolitik.....	13
2.4 Kurva Pertumbuhan	15
2.5 Penentuan Aktivitas Enzim Amilase Dengan Metode DNS.....	16
2.6 Pemurnian Enzim.....	18
2.7 Pemurnian dengan Ammonium sulfat	19
2.8 Dialisis	21
2.9 Analisis Protein Menggunakan Metode Biuret.....	22
2.10 Spektrofotometer UV-Vis	23
2.11 Hasil Penelitian dalam Perspektif Islam	24
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	28
3.2 Alat dan Bahan	28
3.2.1 Alat Penelitian.....	28
3.2.2 Bahan Penelitian	28
3.3 Rancangan Penelitian.....	29
3.4 Tahapan Penelitian.....	29
3.5 Pelaksanaan Penelitian.....	30
3.5.1 Pembuatan Media Selektif Bakteri Amilolitik.....	30
3.5.2 Peremajaan Isolat Bakteri Amilolitik.....	30
3.5.3 Uji Bakteri Penghasil Amilase Secara Kualitatif.....	31
3.5.4 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri amilolitik	31

3.5.6	Produksi Enzim Amilase.....	32
3.5.7	Analisis Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Amilase dengan Metode DNS.....	32
3.5.7.1.	Pembuatan Kurva Standar Glukosa	32
3.5.7.2.	Uji Aktivitas Enzim Amilase	32
3.5.8	Pemurnian Ekstrak Kasar Enzim Amilase	33
3.5.8.1.	Pengendapan 20–40%	33
3.5.8.2.	Pengendapan 40–60%	34
3.5.8.3.	Pengendapan 60–80%	35
3.5.8.4.	Dialisis	35
3.5.9	Pengukuran Aktivitas Enzim Amilase	36
3.5.10	Pengukuran Kadar Protein Enzim Amilase Dengan Metode Biuret..	36
3.5.10.1.	Pembuatan Kurva Standar BSA.....	36
3.5.10.2.	Penentuan kadar Protein dalam Enzim Amilase	36
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		
4.1	Media Pertumbuhan Dan Peremajaan Bakteri Amilolitik	37
4.2	Uji Bakteri Penghasil Amilase secara Kualitatif.....	39
4.3	Kurva Pertumbuhan Bakteri Amilolitik.....	41
4.4	Produksi Ekstrak Kasar Enzim Amilase	43
4.5	Pengaruh Variasi Konsentrasi Amonium Sulfat	44
4.4.1.	Pengendapan Amonium Sulfat	44
4.4.2.	Dialisis	46
4.5	Penentuan Aktivitas Enzim Amilase Menggunakan Metode DNS	50
4.6	Penentuan Kadar Protein dan Ativitas Spesifik Enzim Amilase dengan Metode Biuret	53
4.7	Hasil Penelitian dalam Perspektif Islam	55
 BAB V KESIMPULAN		
5.1	Kesimpulan	58
5.2	Saran	58
 DAFTAR PUSTAKA		59
LAMPIRAN.....		64

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Karakterisasi Amilosa dan Amilopektin	8
Tabel 2.2	Warna Amilosa Yang Terbentuk Oleh Reaksi Iodium Dengan Berbagai Panjang Rantai	9
Tabel 4.1	Hasil Pemurnian Dengan Amonium Sulfat	46
Tabel 4.2	Nilai Aktivitas Dan Kenaikan Amilase Hasil Pemurnian	47
Tabel 4.3	Rata-Rata Aktivitas Spesifik Amilase Dengan Fraksi Amonium Sulfat 40–60%	55
Tabel L.3.1	Menentukan Kurva Pertumbuhan Bakteri Amilolitik BK 4	75
Tabel L.4.1	Kurva Standar Glukosa λ 540 nm	76
Tabel L.4.2	Penentuan Kadar Glukosa Optimum	77
Tabel L.6.1	Nilai Absorbansi Ekstrak Kasar Amilase	78
Tabel L.6.2	Nilai Konsentrasi Gula Reduksi Dan Aktivitas Ekstrak Kasar ...	79
Tabel L.7.1	Nilai Absorbansi Enzim Amilase	79
Tabel L.7.2	Kadar Gula Reduksi Enzim Amilase	80
Tabel L.7.3	Nilai Aktivitas Enzim Amilase	80
Tabel L.8.1.1	Pengaruh Fraksi Ammonium Sulfat Terhadap Absorbansi Gula Reduksi	80
Tabel L.8.1.2	Aktivitas Amilase pada Variasi Fraksi Ammonium Sulfat	81
Tabel L.8.1.3	Kenaikan Aktivitas Amilase Pada Berbagai Fraksi Pengendapan	81
Tabel L.9.2	Data Absorbansi Larutan BSA pada λ 550 nm	83
Tabel L.10.1	Data Absorbansi dan Kadar Protein Pada Fraksi dengan Aktivitas Tertinggi (F2)	84
Tabel L.4. 1	Amonium Sulfat (gram) yang ditambahkan pada setiap linear enzim	85

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Struktur Amilosa	8
Gambar 2.2	Struktur Pati-iodin	9
Gambar 2.3	Struktur amilopektin Pati	9
Gambar 2.4	Kurva Pertumbuhan bakteri.....	15
Gambar 2.5	Reaksi DNS dengan Gula.....	17
Gambar 2.6	Mekanisme <i>salting in</i> dan <i>salting out</i>	20
Gambar 2.7	Kantong Selofan	21
Gambar 4.1	Penambahan iodin pada media	39
Gambar 4.2	Mekanisme Kerja Enzim Amilase.....	40
Gambar 4.3	Kurva Pertumbuhan Bakteri Isolat BK 4 dan Kadar Glukosa.....	41
Gambar 4.4	Grafik Aktivitas Amilase pada Berbagai Fraksi Pengendapan Amonium Sulfat Hasil Dialisis	49
Gambar 4.5	Reaksi Glukosa dengan Pereaksi asam 3,5-dinitrosalisilat	52
Gambar 4.6	Reaksi dugaan antara protein dan reagen biuret.....	53
Gambar L.3.1	Gravik Kurva Pertumbuhan Bakteri Amilolitik BK 4	75
Gambar L.4.1	Grafik Kurva Standar Glukosa	76
Gambar L.5.1	Grafik penentuan Kadar Glukosa Optimum	77
Gambar L.9.2	Grafik Kurva Standar Larutan BSA	83

ABSTRAK

Mayasari. 2016. Pemurnian Enzim Amilase Kasar dari Bakteri Amilolitik Endogenous Bekatul secara Parsial Menggunakan Ammonium Sulfat. Skripsi. Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing: (I) Akyunul Jannah, S.Si., M.P., (II) Anik Maunatin, S.T., M.P., and (III) Begum Fauziah, S.Si., M.Farm.

Kata Kunci: Enzim amilase, Bakteri Amilolitik, Pemurnian Enzim

Bakteri amilolitik adalah bakteri yang memproduksi enzim amilase yang mampu memecah pati menjadi glukosa. Bekatul yang kaya akan amilosa, kemungkinan bahwa bakteri amilolitik mampu hidup dalam lingkungan yang kaya akan amilosa. Pengendapan merupakan proses awal dalam pemurnian enzim, bertujuan untuk memisahkan protein enzim dari protein-protein lainnya. Penelitian ini bertujuan untuk memurnikan enzim amilase kasar dari bakteri amilolitik endogenous bekatul secara parsial menggunakan amonium sulfat. Penelitian ini diawali dengan pemurnian ekstrak kasar enzim amilase secara fraksinasi (20–40% (F1), 40–60% (F2), dan 60–80% (F3)) menggunakan ammonium sulfat dan dialisis dengan kantong selofan. Hasil fraksinasi dengan amonium sulfat aktivitas tertinggi kemudian ditentukan aktivitas spesifiknya. Hasil penelitian menunjukkan hasil pemurnian dengan fraksinasi amonium sulfat menghasilkan (Paralelisme) aktivitas berturut-turut $6,24 \times 10^{-2}$ U/mL, $7,03 \times 10^{-2}$ U/mL, dan $5,97 \times 10^{-2}$ U/mL. Aktivitas spesifik amilase dari fraksinasi tertinggi (F2) sebesar $3,71 \times 10^{-5}$ U/mL.

ABSTRACT

Mayasari. 2016. Purification of Crude Amylase Enzyme from Amylolytic Bacteria Endogenous to Bran Partially with Ammonium Sulfate. Undergraduate Thesis. Chemistry Major, Faculty of Science and Technology, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Advisors: (I) Akyunul Jannah, S.Si., M.P., (II) Anik Maunatin, S.T., M.P., and (III) Begum Fauziah, S.Si., M.Farm.

Key Words: Amylase Enzyme, Amylolytic Bacteria, Purification Enzyme

Amylolytic bacteria are bacteria that produce amylase enzymes capable of breaking down starch into glucose. Bran which is rich in amylose content, amylolytic bacteria are able to live in an environment which is rich in amylose. Precipitation is the first process in the purification of the enzyme, aiming to separate the protein of the enzyme from other proteins. This study aimed to purify the amylase enzyme from bacteria coarse bran partially endogenous amylolytic using ammonium sulfate. This study begins with the purification of crude extract of enzyme amylase in fractionation (20–40 % (F1), 40–60 % (F2), and 60–80 % (F3)) using ammonium sulfate and dialysis with cellophane bag. The results fractionation with ammonium sulfate, the highest activity is then determined specific activity. The results showed that the purification with ammonium sulfate fractionation produced successive activities of 6.24×10^{-2} U/mL, 7.03×10^{-2} U/mL, and 5.97×10^{-2} U/mL. The amylase specific activity of the highest fractionation was (F2) of 3.71×10^{-5} U/mL.

ملخص البحث

ماياساري، 2016. تنقية على إنزيم أميليز الخشن من بكتيري محلل النشا الداخلية المنشأ النخالة جزئياً مع أمونيوم كبريتات. بحث جامعي. قسم الكيمياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، بجامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرفة الأولى: أعين اللجنة الماجستير، المشرفة الثانية: أنيك موناتين الماجستير، المشرفة الثالثة: بيغوم فوزية الماجستير.

الكلمات الرئيسية: إنزيم أميليز، بكتيري محلل النشا، تنقية إنزيم

بكتيري محلل النشا هي بكتيري التي نتج للإنزيم أميليز قادرة على تحطيم النشا إلى جلوكوز. ذلك النخالة الغنية المحتوى الأميلوز، بكتيري محلل النشا تستطيع أن تعيش في البيئة الغنية الأميلوز. الأمطار هو العملية الأولى في تنقية للإنزيم، والتي تهدف إلى فصل بروتين إنزيم من البروتينات الأخرى. هذا البحث يهدف إلى الحصول على إنزيم أميليز من مصدر الكائن من خلال تنقية الأولية للإنزيم. بتنقية مقتطف الخشن إنزيم أميليز تدرجياً (% 4-20 (F1) % 4-6 (F2) و % 6-8 (F3)). باستخدام أمونيوم كبريتات وتحليل بكيس السيلوفان. أظهرت تجزئة مع أمونيوم كبريتات الأعلى على النشاط المعين. أظهرت نتائج البحث أن نتائج تنقية مع تجزئة أمونيوم كبريتات إنتاج النشاط على التوالي وهي $6,24 \times 10^{-2}$ مل / U، $7,03 \times 10^{-2}$ مل / U، $5,97 \times 10^{-2}$ مل / U. النشاط المعين على أميليز من التجزئة الأعلى. $3,71 \times 10^{-5}$ مل / U.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara yang beriklim tropis dan memiliki beraneka ragam tumbuhan. Salah satu keanekaragaman tumbuhan yang terdapat di Indonesia adalah tanaman padi (*Oryza sativa L.*). Alam semesta beserta isinya yang dianugerahkan kepada manusia merupakan ciptaan Allah Swt yang menunjukkan kekuasaan dan kebesaran-Nya. Islam mengajarkan kita untuk senantiasa memanfaatkan ciptaan Allah dengan cara yang benar. Tumbuhan maupun hewan yang beraneka ragam dapat dimanfaatkan dalam banyak hal sebagai salah satu wujud rasa syukur kita kepada Allah, Firman Allah Swt dalam surat as Sajadah ayat 27:

أَوَلَمْ يَرَوْا أَنَّا نَسُوقُ الْمَاءَ إِلَى الْأَرْضِ الْجُرُزِ فَنُخْرِجُ بِهِ زَرْعًا تَأْكُلُ مِنْهُ

أَنْعَمُهُمْ وَانْفُسُهُمْ أَفَلَا يُبْصِرُونَ

Artinya:”Dan apakah mereka tidak memperhatikan, bahwasanya kami menghalau (awan yang mengandung) air ke bumi yang tandus, lalu kami tumbuhkan dengan air hujan itu tanaman yang daripadanya makan hewan ternak mereka dan mereka sendiri. Maka apakah mereka tidak memperhatikan?(QS. as Sajadah:27)

Kalimat “ زَرْعًا تَأْكُلُ مِنْهُ أَنْعَمُهُمْ وَانْفُسُهُمْ “ menjelaskan arti tanaman untuk hewan ternak dan manusia. Tanaman tersebut diintegrasikan pada hasil pertanian, dimana padi yang dimanfaatkan sebagai makanan pokok manusia, sedangkan limbahnya seperti jerami dan bekatul dimanfaatkan sebagai pakan ternak. Ayat ini juga

menjelaskan bahwa hasil dari keduanya (hasil pertanian dan limbahnya) dapat dimanfaatkan sebagai makanan (Tafsir Al-Qurthubi, 2009).

Bekatul merupakan kulit paling luar dari beras dan kulit paling dalam dari sekam. Bekatul pada proses penyosohan kedua. Proses penyosohan merupakan proses penghilangan dedak dan bekatul dari bagian endosperma beras (Ardiansyah, 2013). Bekatul mengandung karbohidrat 36% (selulosa 8,7-11,4 % dan hemiselulosa 9,6-12,8%), amilosa 32,8%, lemak 14,9 %, protein 2,1 %, dan air 3,6 % (Ardiansyah, 2010). Kandungan bekatul yang kaya akan amilosa memberikan kemungkinan bahwa bakteri amilolitik mampu hidup dalam keadaan lingkungan yang kaya akan amilosa (Ardiansyah, 2010).

Bakteri amilolitik adalah jenis bakteri yang memproduksi enzim amilase yang mampu memecah pati. Amilase merupakan enzim yang bekerja menghidrolisis pati yang dapat dihasilkan oleh bakteri, fungi, tumbuhan dan hewan. Amilase yang dihasilkan oleh bakteri banyak dimanfaatkan dalam industri, terutama industri makanan, minuman, tekstil, farmasi, dan detergen. Hal ini karena umumnya amilase asal bakteri mempunyai aktivitas yang tinggi dan bersifat termostabil dibandingkan yang berasal dari fungi dan hewan (Corderio *et al.*, 2002). Genus bakteri yang termasuk kelompok bakteri amilolitik diantaranya *Bacillus*, *Clostridium*, *Bacteriodes*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Thermus* dan *Actinomycetes* (Reddy *et al.*, 2003).

Amilase merupakan kelompok enzim yang menghidrolisis pati dan glikogen. Dikenal tiga jenis enzim amilolitik yaitu α -amilase, β -amilase, dan glukoamilase. Enzim α -amilase adalah enzim yang menghidrolisis ikatan 1,4-glikosidik dari pati dan maltodekstrin secara acak dari bagian dalam molekul polisakarida menghasilkan

maltosa dan beberapa oligosakarida rantai pendek (Ballschmiter *et al.*, 2006). Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan dari penelitian sebelumnya tentang isolasi bakteri amilolitik dari bekatul untuk memproduksi enzim amilase kasar.

Pentingnya untuk mendapatkan amilase murni hasil isolasi dari penelitian sebelumnya dikarenakan ekstrak murni lebih mempunyai bahan aktif atau komponen kimia yang jauh lebih tinggi dibandingkan ekstrak kasar, sebagai contoh kandungan senyawa aktif dalam ekstrak kasar 20%, setelah dimurnikan senyawa aktif akan meningkat menjadi 60% (Wijesekera, 1991). Ekstra kasar artinya ekstrak yang mengandung semua bahan yang tersari dengan menggunakan pelarut organik, sedangkan ekstrak murni adalah ekstrak kasar yang telah dimurnikan dari senyawa-senyawa *inert* melalui proses penghilangan lemak, penyaringan menggunakan resin atau absorben (Wijesekera, 1991).

Ada beberapa metode pemurnian ekstrak kasar, antara lain dengan fraksinasi garam atau pelarut organik, sentrifugasi, dialisis, dan pemisahan dengan kromatografi kolom (Scopes, 1987). Pada penelitian ini ekstrak kasar dimurnikan dengan menggunakan fraksinasi garam, garam organik yang efektif digunakan adalah ammonium sulfat. Kerugiannya ialah konsentrasi garam yang tertinggal dalam produk tinggi dan kurang efisien dalam menghilangkan pencemar. Keuntungan yang paling penting dari fraksinasi ammonium sulfat dibanding teknik lain adalah mempunyai kestabilan yang tinggi pada protein yang diendapkan dan dapat menghambat aktivitas amilase (Scopes, 1987).

Pemurnian dapat meningkatkan aktivitas suatu enzim. Hal ini dapat dibuktikan dari penelitian-penelitian sebelumnya yang telah dilakukan, seperti

menurut Mutia (2013), karakterisasi amonium sulfat dari akar rimpang alang-alang, diperoleh data aktivitas amilase tertinggi pada tingkat kejenuhan 20–40% (b/v) ammonium sulfat, dan aktifitas enzim tertinggi sebesar 0,0062 U/mg. Hasil yang diperoleh berbeda dengan penelitian sebelumnya yaitu tingkat kejenuhan 60–80% (b/v) ammonium sulfat dari rimpang temulawak oleh Rinawati *et al.*, (2009). Raharjo *et al.*, (2010) melakukan pemurnian enzim α -amilase termostabil diperoleh data aktivitas enzim α -amilase hasil fraksinasi ammonium sulfat tertinggi pada konsentrasi 40–60% (b/v). Sebayang (2005) melakukan isolat ekstrak kasar enzim α -amilase dapat diproduksi dari kapang *Aspergillus niger* setelah dilakukan pemurnian dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% aktivitas spesifik enzim amilase meningkat menjadi 0,0850 U/mg protein.

Proses pemurnian berikutnya adalah dialisis bertujuan untuk memisahkan partikel kecil dari partikel besar dengan menggunakan membran berdasarkan pada prinsip difusi. Dialisis merupakan metode yang paling dikenal untuk menghilangkan molekul pengganggu, seperti garam atau ion-ion lain yang berukuran kecil. Protein enzim yang dihasilkan dari proses dialisis merupakan protein enzim yang terbebas dari ammonium sulfat. Hal ini dapat dibuktikan dari penelitian-penelitian yang telah dilakukan, seperti menurut Atmaja *et al.*, (2013), identifikasi bebasnya ammonium sulfat dilakukan dengan menambahkan larutan BaCl_2 ke dalam buffer yang digunakan. Proses ini dihentikan sampai tidak terbentuk endapan putih pada saat penambahan BaCl_2 . Agustin dan Lia (2012), purifikasi dan karakterisasi protease dari bakteri hasil isolasi dari Tahu menunjukkan bahwa tingkat kemurnian enzim mengalami peningkatan setelah pengendapan dan dialisis secara berturut-turut yaitu

1.91 kali dan 12.96 kali dibandingkan nilai aktivitas spesifik enzim kasar. Menurut Sarjono *et al.*, (2013), Enzim selulase yang dihasilkan dari proses dialisis merupakan enzim selulase yang terbebas dari amonium sulfat. Pada enzim fraksi 2, aktivitas spesifik enzim meningkat 3,5 kali dari aktivitas spesifik ekstrak kasar enzimnya. Mutia *et al.*, (2013) didialisis akar rimpang alang-alang dengan buffer fosfat 0,05 M pH 6,0 selama 18 jam pada suhu 4 °C. Enzim yang diperoleh pada tahap ini adalah enzim semi murni.

Berdasarkan penjelasan-penjelasan sebelumnya, maka perlu dilakukan penelitian untuk memurnikan ekstrak kasar enzim amilase menggunakan metode pengendapan ammonium sulfat yang didasarkan pada fraksi kejenuhan yang mempunyai aktivitas enzim tertinggi pada penelitian-penelitian sebelumnya. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan memberikan alternatif lain dalam memanfaatkan bekatul dengan mengkonversikan kandungan amilosa di dalamnya menjadi glukosa menggunakan bantuan enzim amilase. Selain itu, glukosa juga dapat dimanfaatkan sebagai bahan dari beberapa produk misalnya obat-obatan, beberapa produk pangan lainnya. Keterkaitan enzim dalam proses hidrolisisnya, merupakan bentuk pemanfaatan lain dari produk yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Beberapa gambaran mengenai kebutuhan glukosa tersebut di atas, memberikan peluang untuk dapat meningkatkan jumlah produksi glukosa, dengan pemanfaatan bekatul dan enzim amilase yang diproduksi pula di dalamnya yang secara ekonomis, sehingga dapat meningkatkan perekonomian negara.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan suatu permasalahan yakni bagaimana pengaruh konsentrasi ammonium sulfat terhadap aktivitas enzim amilase hasil pemurnian parsial dan berapakah aktivitas spesifik enzim amilase dari fraksi pengendapan tertinggi?

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui pengaruh konsentrasi ammonium sulfat terhadap aktivitas enzim amilase hasil pemurnian parsial dan untuk mengetahui aktivitas spesifik enzim amilase dari fraksi pengendapan tertinggi!

1.4 Batasan penelitian

Batasan masalah pada penelitian ini adalah isolat yang digunakan merupakan isolat bakteri amolitik dari bekatul dengan kondisi optimum dari penelitian sebelumnya, dan variasi konsentrasi ammonium sulfat yang digunakan adalah mulai dari konsentrasi 20–80 % dengan interval 20%.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah memberikan informasi mengenai pemanfaatan bekatul dengan mengkonversikan kandungan amilosa di dalamnya menjadi glukosa menggunakan bantuan enzim amilase, sehingga bekatul dapat dijadikan salah satu bahan alternatif untuk memproduksi glukosa.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pati

Pati merupakan homopolimer glukosa yang dihubungkan oleh ikatan glikosidik. Dalam bentuk aslinya pati merupakan butiran-butiran kecil yang sering disebut granula. Sebaran dan ukuran granula sangat menentukan karakteristik fisik pati serta aplikasinya dalam produk pangan (Villamajor dan Jurkema, 1996). Pati tersusun dari 2 makromolekul polisakarida, yaitu amilosa dan amilopektin, yang keduanya tersimpan dalam bentuk butiran yang disebut granula pati. Amilosa tersusun dari molekul-molekul glukosa yang terikat glikosidik α -1,4 yang membentuk struktur linier, sedangkan amilopektin disamping disusun oleh struktur utama linear juga memiliki struktur bercabang-cabang, dimana titik percabangannya diikat dengan ikatan glikosidik β -1,6 (suprapti, 2003).

Amilopektin dan amilosa dapat dipisahkan dengan cara melarutkannya kedalam air panas dibawah suhu gelatinisasi pati. Fraksi terlarut air panas adalah amilosa dan fraksi yang tidak terlarut adalah amilopektin (Muchtadi *et al*, 1988 dalam Rochmawatin, 2010). Rasio antara amilosa dan amilopektin berbeda antar pati, tetapi untuk pati yang normal terdiri dari 25% amilosa dan 75% amilopektin (Elliasson and Gudmudsson, 1996 dalam Rochmawatin, 2010). Semakin banyak kandungan amilopektin maka pati tersebut akan mudah larut dalam air. Dengan demikian akan mudah untuk memutus polisakarida tersebut menjadi glukosa (Bailey, 1986).

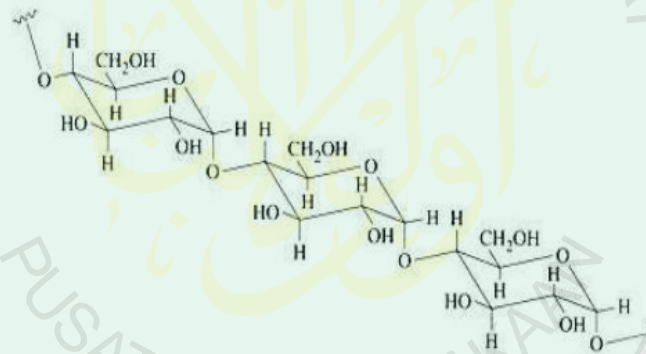
Tabel 2.1 Karakteristik Amilosa dan Amilopektin

Karakteristik	Amilosa	Amilopektin
Bentuk	Utamanya linier	Bercabang
Ikatan	α -1,4 (beberapa α -1,6)	α -1,4 dan α -1,6
Berat Molekul	Khususnya < 0,5 juta	50-500 juta
Pelapisan	Kuat	Lemah
Formasi Gel	Kaku	Tidak membentuk gel sampai lunak
Warna dengan Iodin	Biru	Coklat kemera-merahan

Sumber : Thomas, 1999

2.1.1. Amilosa

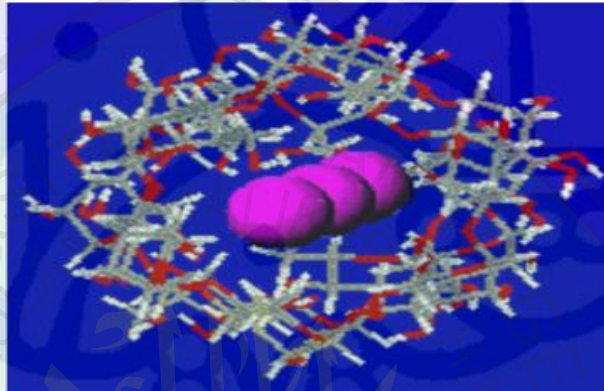
Amilosa adalah polisakarida berantai lurus (tidak bercabang) dan larut dalam air, dengan berat molekul berkisar 10.000 – 50.000. Amilosa ini disusun oleh ikatan 1,4 alpha glikosida melalui atom C-1 dan C-4. Amilosa merupakan bagian terdepan dari rantai amilum (Aiyer, 2005) :



Gambar 2.1 Struktur Amilosa

Setiap putaran heliks terdiri dari enam monomer glukosa dan mengikat satu molekul iodium, sehingga semakin panjang rantai maka akan semakin terbentuk biru (Winarno, 1989). Struktur amilosa yang berbentuk spiral juga bertindak sebagai basa mampu menarik elektron dalam suatu reaksi. Bagian dalam struktur yang spiral adalah suatu ukuran yang mempunyai polaritas untuk menerima molekul iodin. Sehingga kompleks amilum-iod dengan warna biru kehitaman berkurang/hilang. Warna biru/ungu merupakan warna dari kompleks

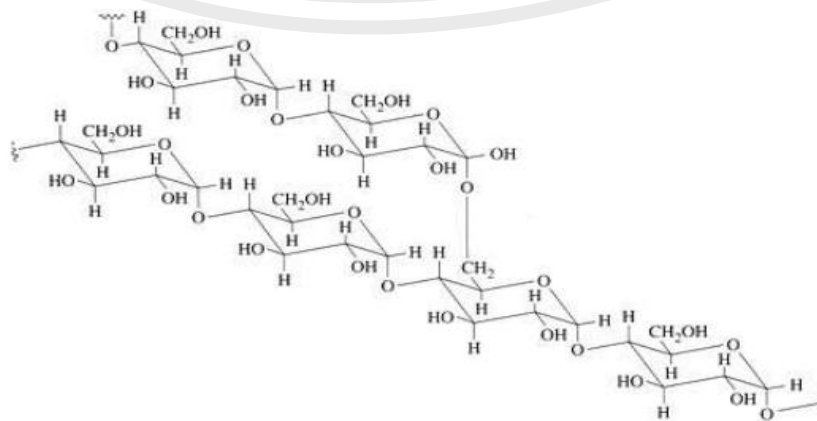
pati-iodin akan saling berinteraksi, iodin tersebut terperangkap dalam struktur pati (gambar 2.2). Keberadaan amilase akan mendegradasi pati menjadi glukosa, sehingga warna biru/ungu yang terbentuk akan semakin hilang (muncul daerah terang). Aktivitas amilase dapat diperiksa dengan hilangnya warna biru/ungu pada medium pertumbuhan setelah penambahan iodin (Fessenden, 1986):



Gambar 2.2 Struktur pati-iodin

2.1.2. Amilopektin

Amilopektin merupakan rantai cabang yang tersusun atas unit glukosa dengan ikatan α (1,4)-D dan α (1,6)-D glukosa. Titik percabangan ini terdiri dari beratus-ratus cabang dan berat molekul diperkirakan sekitar satu juta. Amilopektin juga dapat membentuk kompleks dengan iodin, walaupun tidak sereaktif amilosa (Benion, 1989).



Gambar 2.3 Struktur Amilopektin Pati (Wage, 1995)

2.2 Enzim Amilase

Enzim merupakan protein yang dapat bergabung dengan suatu substrat spesifik untuk mengkatalis reaksi biokimia dari substrat tersebut, disebabkan molekul enzim memiliki spesifitas yang tinggi terhadap substratnya. (Maier *et al.*, 2000). Ukuran molekul enzim jauh lebih besar dari ukuran substratnya karena enzim terdiri dari ratusan bahkan lebih dari seribu asam amino (Shahib, 1992).

Menurut Jenni (2003), enzim merupakan larutan koloid atau katalis organik yang dihasilkan organisme. Enzim meningkatkan kecepatan reaksi dan sangat spesifik untuk reaksi yang dikatalisnya, artinya setiap jenis enzim hanya dapat bekerja pada satu macam senyawa atau reaksi kimia. Hal ini disebabkan perbedaan struktur kimia tiap enzim bersifat tetap. Salah satu diantaranya adalah enzim amilase (Muchtadi *et al.*, 1992).

Ikatan enzim dengan substrat biasa terjadi di sekitar *active site*, selain itu enzim memiliki sisi regulator yang berfungsi sebagai pengatur untuk meningkatkan ataupun menurunkan aktivitas kerja enzim. Sisi regulator ini akan mengikat molekul kecil atau substrat secara langsung ataupun tidak langsung yang berfungsi untuk enzim-substrat yang bersifat sementara dan akan kembali membentuk enzim bebas dan produk (Lehninger, 1997).

Menurut Palmer (1985), reaksi antara enzim dengan substrat dapat terjadi menurut dua hipotesis berikut:

a. Hipotesis *Lock and Key*

Spesifitas enzim termasuk adanya struktur komplementer antara enzim dengan substrat mempunyai kesesuaian bentuk ruang dengan enzim pada struktur sisi aktif enzim

b. Hipotesis *induce-Fit*

Substrat mempunyai kesesuaian ruang dengan sisi aktif pada kompleks enzim-substrat, tetapi dalam proses pengikatan substrat enzim mengalami perubahan konformasi sehingga strukturnya sesuai dengan substrat. Proses ini disebut sebagai proses induksi.

Amilase merupakan salah satu enzim yang mampu mengkatalisis proses hidrolisis ikatan (α -1,4) glikosida pada senyawa polimer karbohidrat dengan rumus umum $(C_6H_{10}O_5)_n$. Amilase dapat dihasilkan oleh bakteri, fungi, tumbuhan dan hewan yang dapat digunakan untuk mengkonversi bahan-bahan berpati menjadi monomer yang lebih sederhana dalam bentuk glukosa, dekstrosa, fruktosa atau maltosa. Hal ini karena umumnya amilase asal bakteri mempunyai aktivitas yang tinggi dan bersifat lebih stabil dibandingkan yang berasal dari tumbuhan dan hewan (Whittaker, 1994).

Amilase dapat memecah ikatan pada amilum hingga terbentuk maltosa. Ada tiga macam enzim amilase, yaitu α amilase, β amilase dan γ amilase (Poedjiadi, 2006).

a. **α -amilase (1,4- α -D-glukan-glukanohidrolase)**

α -amilase merupakan enzim ekstraseluler yang menghidrolisis ikatan 1,4- α -glikosida secara acak terutama pada rantai yang panjang sehingga menghasilkan maltotriosa dan maltosa. Karena sifatnya yang dapat memutuskan ikatan glikosida secara acak, enzim ini bekerja lebih cepat dibanding amilase lainnya terutama β -amilase (palmer, 1985).

α -amilase dibentuk oleh berbagai bakteri dan fungi. α -amilase yang tidak stabil akan tidak efektif memecah substrat karena aktivitasnya menurun (Rosmimik *et al.*, 2011). Pada umumnya α -amilase diproduksi oleh mikroorganisme aerob yang membutuhkan oksigen untuk pertumbuhannya. Beberapa mikroorganisme anaerob mampu memproduksi enzim α -amilase seperti *Clostridium thermosulfuregenes* dan *B. stearpthermophilus* (Brock, 1986).

b. β -amilase (1,4- α -D-glukan maltohidrolase)

β -amilase merupakan eksoenzim yang memotong amilum menjadi gugus-gugus maltosa. Enzim β -amilase memecah ikatan glukosida α -1,4 pada pati dan glikogen yang terjadi secara bertahap dari arah luar atau ujung rantai gula yang bukan pereduksi, karena pemotongannya dari arah luar maka enzim ini disebut eksoamilase (Winarno, 1986).

c. γ -amilase (Glukoamilase)

Glukoamilase memecah pati dari luar dengan mengeluarkan unit-unit glukosa ujung bukan pereduksi polimer pati. Hasil reaksinya hanya glukosa, sehingga dapat dibedakan dengan α dan β amilase.

Berdasarkan arahnya memutus ikatan glikosida dari amilum, maka enzim amilase dapat dikategorikan menjadi 2 kelompok (Reddy *et al.*, 2003) yaitu endoamilase melakukan hidrolisis secara acak dari bagian depan molekul amilum sehingga menghasilkan molekul oligosakarida dalam bentuk rantai lurus maupun bercabang dengan panjang rantai yang bervariasi sedangkan aktoamilase melakukan hidrolisis dari ujung non reduksi dengan produk akhir molekul yang pendek.

2.3 Pertumbuhan Mikroorganisme Amilolitik

2.3.1. Bakteri Amilolitik

Bakteri amilolitik adalah jenis bakteri yang memproduksi enzim amilase dan mampu memecah pati. Genus bakteri yang termasuk kelompok bakteri amilolitik yang cukup dikenal luas ialah *Bacillus*, *Clostridium*, *Bacteriodes*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Thermus* dan *Actinomyces* (Reddy *et al.*, 2003). Pada tahap awal untuk mendapatkan mikroba yang berpotensi sebagai penghasil enzim ialah dengan mengisolasi dan seleksi mikroba tersebut dari habitat alaminya. Mikroba yang diperoleh dari hasil isolasi harus memiliki kemampuan untuk melangsungkan reaksi atau menghasilkan produk yang diinginkan (Handayani *et al.*, 2002).

Menurut Poernomo (2003), pemilihan bakteri sebagai sumber enzim mempunyai beberapa keuntungan bila dibandingkan enzim yang diisolasi dari tanaman, hewan, maupun fungi sebab sel bakteri relatif lebih mudah ditumbuhkan, kecepatan tumbuh relatif lebih cepat, skala produksi sel lebih mudah ditingkatkan bila dikehendaki, produksi yang lebih besar, biaya produksi relatif rendah, kondisi selama produksi tidak tergantung oleh adanya pergantian musim, dan waktu yang dibutuhkan dalam proses produksi lebih pendek (Yuliar, 2008).

2.3.2. Media Pertumbuhan Bakteri Amilolitik

Pertumbuhan dan perkembangan mikroba memerlukan adanya substrat yang disebut media. Media sebelum dipergunakan harus dalam keadaan steril (tidak ditumbuhi mikroba lain). Media pertumbuhan harus mengandung semua

unsur hara yang diperlukan oleh mikroba, selain itu media harus mempunyai pH yang sesuai dengan kebutuhan mikroba yang hendak dibiakkan.

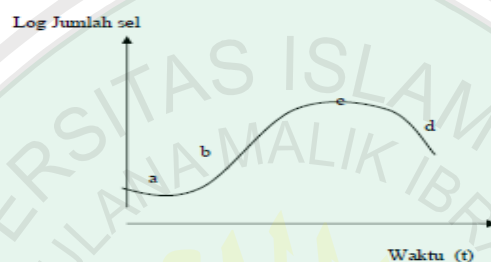
Bakteri yang diinokulasikan ke dalam suatu medium yang sesuai dan pada keadaan optimum bagi pertumbuhannya, maka terjadi kenaikan yang amat tinggi dalam waktu yang relatif pendek. Populasinya dapat mencapai 10 sampai 15 milyar sel per mililiter dalam waktu 24 jam. Pembelahan sel seperti ini disebut pembelahan sel aseksual (Pelszar, *et al.*, 2005).

Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroba yaitu media pertumbuhan yang digunakan, suhu, pH, dan aerasi. Media tumbuh yang biasa digunakan terdiri atas: (1) media sintetik; dan (2) media kompleks. Media sintetik merupakan media sederhana yang seluruh komponennya telah diketahui yang hanya mengandung sumber karbon organik (misalnya selulosa), sumber nitrogen inorganik (NH_4^+ atau NO_3^-), dan beberapa garam mineral lainnya.

Media pertumbuhan bakteri amilolitik umumnya menggunakan *Soluble Strach* dan mengandung beberapa nutrisi untuk pertumbuhannya antara lain MgSO_4 , NaCl, Pepton dan *yeast extract*. Karbon merupakan unsur penting yang diperlukan oleh bakteri autotrof maupun heterotrof. Nitrogen sebagai sumber protein dan asam nukleat untuk membentuk struktur fungsional sebagai enzim dalam metabolisme sel. Unsur-unsur logam diperlukan untuk mengatur penyerapan hara, pengaturan aktivitas enzim, transportasi elektron selama bioksidasi. Ion-ion ini diperlukan dalam jumlah sedikit yang biasanya berasal dari garam-garam. Begitu pula dengan air yang diperlukan oleh semua mikroorganisme sebagai transportasi bahan terlarut zat terlarut berupa ion-ion hara yang melintasi dan mencapai jaringan dan organ.

2.4 Kurva Pertumbuhan

Pertumbuhan dapat didefinisikan sebagai pertumbuhan jumlah atau volume serta ukuran sel. Pada organisme prokariot seperti bakteri, pertumbuhan merupakan penambahan volume dan ukuran sel dan juga sebagai penambahan jumlah sel. Pertumbuhan sel bakteri biasanya mengikuti suatu pola pertumbuhan tertentu berupa kurva pertumbuhan sigmoid (Brock & Madigan, 1986).



Gambar 2.4 kurva pertumbuhan bakteri, menunjukkan empat fase pertumbuhan: a=fase lag; b=fase eksponensial; c=fase stasioner dan d=fase kematian populasi (sumber: Brock & Madigan, 1991).

Perubahan kemiringan pada kurva tersebut menunjukkan transisi dari satu fase perkembangan ke fase lainnya. Nilai logaritmik jumlah sel biasanya lebih sering dipetakan daripada nilai aritmatik. Logaritma dengan dasar 2 sering digunakan, karena setiap unit pada ordinat menampilkan suatu kelipatan-dua dari populasi. Fase-fase tersebut mencerminkan keadaan bakteri dalam kultur pada waktu tertentu. Di antara setiap fase terdapat suatu periode peralihan dimana waktu dapat berlalu sebelum semua sel memasuki fase yang baru (Brock & Madigan, 1986)

Empat fasa dalam kurva tersebut, yaitu fasa lag, log, stasioner dan kematian. Pada fasa lag, jumlah perubahan sel sangat sedikit, sel tidak aktif karena populasi mikroba sedang mengalami aktivitas metabolisme tertentu yang meliputi DNA dan sintesis enzim, jadi tidak ada perubahan jumlah tetapi

perubahan massa. Pada fasa log (exponensial) sel mulai membelah dan masuk ke dalam periode pertumbuhan, reproduksi sel paling aktif dan waktu generasinya konstan. Pada fase stasioner, laju pertumbuhan lambat sehingga jumlah bakteri yang hidup dan mati seimbang dan populasinya stabil. Penyebab terhentinya pertumbuhan bakteri pada fase ini adalah ketika konsentrasi sel sangat besar kekurangan nutrisi, akumulasi produk limbah dan lain-lain (Tortora *et al.*, 2001). Selama fase stasioner beberapa spesies mikroba mensintesa beberapa produk yang tidak berperan penting dalam pertumbuhan sel yang disebut metabolit sekunder. Pada fase kematian jumlah kematian akhirnya melebihi jumlah sel-sel baru terbentuk dan koloni memasuki fase kematian atau penurunan fase logaritmik (Tortora *et al.*, 2001).

2.5 Penentuan Aktivitas Enzim Amilase dengan Metode DNS

Aktivitas enzim didefinisikan sebagai suatu jumlah enzim yang dapat menyebabkan perubahan atau transformasi substrat sebanyak 1 mikromol per menit pada suhu dan lingkungan optimal selama pengukuran aktivitas berlangsung. Secara umum aktivitas enzim itu dinyatakan dalam satuan unit (U), besarnya setara dengan 16,67 nkat/mL (Dybkaer, 2001).

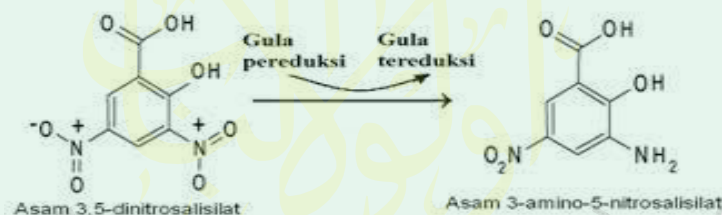
Aktivitas enzim amilase dihitung berdasarkan data kadar glukosa relatif sebagai mg glukosa yang dihasilkan oleh 1 mL filtrat kasar amilase. Satu Unit aktifitas enzim didefinisikan sebagai banyaknya μmol glukosa yang dihasilkan dari hidrolisa media pati oleh 1 mL ekstrak kasar enzim amilase selama masa inkubasi. Untuk melihat besarnya satu unit aktifitas enzim tersebut digunakan rumus (Kombong, 2004):

$$AE = \frac{C}{BM \text{ produk } \times t} \times \frac{H}{E} \dots\dots\dots (2.1)$$

Keterangan:

- AE = Aktifitas enzim (Unit/mL)
 C = Konsentrasi glukosa
 BM = Berat Molekul Glukosa = 180 g/mol
 T = Waktu Inkubasi (menit)
 H = Volume total enzim-substrat (mL)
 E = Volume enzim (mL)

Metode kuantitatif yang dapat digunakan dalam uji aktivitas amilase adalah dengan mengamati kadar gula tereduksi yang dihasilkan oleh hidrolisis enzim terhadap substrat. Dari berbagai cara uji aktivitas amilase yang paling sering digunakan dalam penelitian adalah dengan menggunakan metode dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959) atau Somogy-Nelson (Somogy, 1952).



Gambar 2.5 Reaksi DNS dengan Gula

Reaksi dengan DNS yang terjadi merupakan reaksi redoks pada gugus aldehid gula dan teroksidasi menjadi gugus karboksil. Sementara itu DNS sebagai oksidator akan tereduksi membentuk 3-amino dan asam 5-nitrosalisilat. DNS merupakan senyawa aromatis yang akan bereaksi dengan gula reduksi maupun komponen pereduksi lainnya untuk membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat, suatu senyawa yang mampu menyerap dengan kuat radiasi gelombang elektromagnetik pada 540 nm. Semakin banyak komponen pereduksi yang terdapat dalam sampel, maka akan semakin banyak pula molekul asam 3-amino-

5-nitrosalisilat yang terbentuk dan mengakibatkan serapan semakin tinggi. Reaksi ini berjalan dalam suasana basa. Bila terdapat gula reduksi pada sampel, maka larutan DNS yang awalnya berwarna kuning akan bereaksi dengan gula reduksi sehingga menimbulkan warna jingga kemerahan (Miller, 1959):

2.6 Pemurnian Enzim

Pemurnian enzim adalah suatu proses memisahkan enzim yang diinginkan dari senyawa lain yang mengganggu (Wardani dan Ahsanatun, 2012) dan menurut Channel (1998) pemurnian berarti membebaskan suatu bahan dari bahan-bahan lain yang tidak diinginkan atau sering disebut pengotor. Ada dua metode umum yang dapat digunakan untuk pemisahan enzim yaitu dengan penyaringan manual atau dengan sentrifugasi (Lawati, 2013).

Sentrifugasi merupakan tahap awal pemurnian enzim. Sentrifugasi akan menghasilkan supernatan yang jernih dan endapan yang terikat kuat pada dasar tabung, yang kemudian dipisahkan secara normal. Sel-sel mikroba biasanya mengalami sedimentasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit (Scopes, 1982; Walsh and Headon, 1994). Menurut Cooper (1994), prinsip sentrifugasi berdasarkan pada kenyataan bahwa setiap partikel yang berputar pada laju sudut yang konstan akan memperoleh gaya keluar (F). Besar gaya ini bergantung pada laju sudut ω (radian/detik) dan radius pertukarannya (sentimeter) (Sariningsih, 2000).

Proses pemisahan dengan sentrifugasi merupakan sistem pemisahan berdasarkan ukuran dan berat molekul. Partikel dengan berat, ukuran, dan bentuk yang berbeda akan mengendap pada kecepatan yang berbeda. Proses sentrifugasi

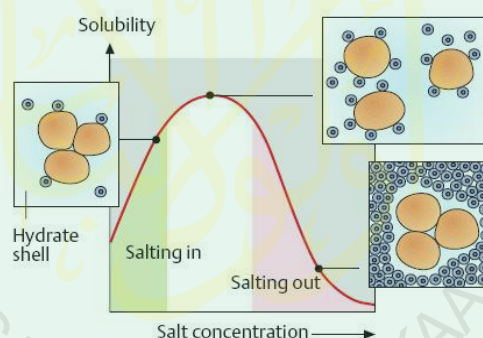
terhadap enzim-enzim yang bersifat rapuh dilakukan pada suhu rendah, sehingga kehilangan aktivitas enzim dapat dijaga seminimal mungkin (Suhartono, 1989). Penambahan garam terhadap kelarutan protein berbeda-beda, tergantung pada konsentrasi dan jumlah muatan ionnya dalam larutan. Semakin tinggi konsentrasi dan jumlah muatan ionnya, semakin efektif garam dalam mengendapkan protein (Yazid dan Nursanti, 2006).

2.7 Pemurnian dengan Ammonium Sulfat

Pemurnian adalah proses penambahan senyawa yang dapat menggumpalkan dan memisahkan protein dari bahan lain sehingga didapatkan protein yang lebih murni (Suhartono *et al*, 1989). Menurut Chaplin dan Bucke (1990), pemurnian protein merupakan metode yang berguna untuk pemekatan protein dan sering dilakukan pada tahap awal dari pemurnian enzim. Pemurnian protein dapat dilakukan dengan beberapa cara antara lain perubahan pH, penambahan pelarut organik dan penambahan garam.

Pemekatan protein dengan penambahan garam ke dalam larutan enzim merupakan cara yang banyak dilakukan. Garam yang dapat digunakan berupa natrium klorida, natrium sulfat, atau ammonium sulfat. Ammonium sulfat lebih sering digunakan karena memiliki beberapa kelebihan dibandingkan garam-garam yang lain, yaitu mempunyai kelarutan yang tinggi, tidak mempengaruhi aktivitas enzim, mempunyai kelarutan yang tinggi, tidak mempengaruhi aktivitas enzim, mempunyai aktivitas enzim, mempunyai daya pengendapan yang efektif, mempunyai efek penstabil terhadap kebanyakan enzim, dapat digunakan pada berbagai pH dan harganya murah (Scopes, 1982).

Ion garam yang ditambahkan akan mempengaruhi kelarutan protein. Penambahan garam pada konsentrasi tinggi akan menurunkan kelarutan protein. Hal ini dikarenakan adanya peningkatan muatan listrik di sekitar protein yang akan menarik molekul-molekul air dan protein. Interaksi hidrofobik sesama molekul protein pada suasana ionik tinggi akan menyebabkan pengendapan protein, yang disebut *salting out*. Protein yang hidrofobitasnya tinggi akan mengendap lebih dahulu, sedangkan protein yang memiliki sedikit residu non polar akan tetap larut meskipun pada konsentrasi garam yang lebih tinggi. Pada konsentrasi rendah, ion-ion ini akan melindungi molekul-molekul protein dan mencegah bersatunya molekul-molekul ini sehingga protein melarut, peristiwa ini disebut *salting in* (Scopes, 1982; Walsh and headon, 1994).



Gambar 2.6 Mekanisme *salting in* dan *salting out* (Suhartono *et al*, 1989).

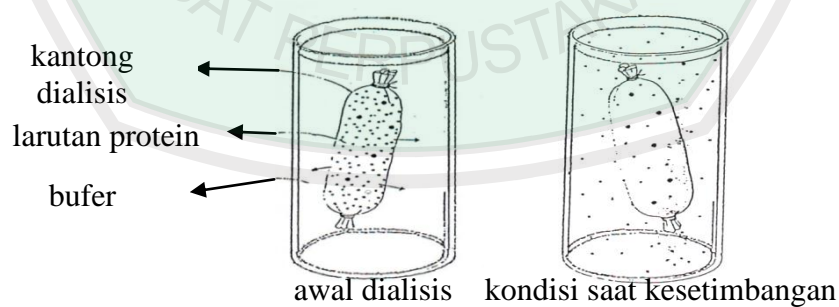
Selain keuntungan yang diperoleh, penggunaan ammonium sulfat juga menimbulkan kerugian antara lain konsentrasi garam yang tertinggal dalam produk tinggi, kurang efisien dalam menghilangkan impurities, dan ammonium sulfat tidak bersifat buffer sehingga dapat membebaskan ammonia yang mengakibatkan kemungkinan penambahan nilai pH (Suhartono *et al*, 1989). Fraksinasi menggunakan ammonium sulfat menghasilkan protein yang mengandung kadar garam yang tinggi. Ammonium sulfat yang terkandung dalam

protein dapat dihilangkan dengan cara dialisis enzim di dalam larutan buffer (Werdani *et al*, 2012).

2.8 Dialisis

Pada pembuatan koloid, sering kali terdapat ion-ion yang dapat mengganggu kestabilan koloid tersebut. Ion-ion pengganggu ini dapat dihilangkan dengan suatu proses yang disebut dialisis. Proses ini bertujuan untuk menghilangkan garam dan zat terlarut lainnya yang mempunyai berat molekul yang lebih rendah daripada protein enzim. Prinsip dialisis yaitu memisahkan molekul-molekul yang besar dari molekul yang kecil dengan bantuan membran semipermeabel (Kristanti, 2001).

Dialisis dapat dilakukan dengan menggunakan kantong selofan, kantong ini memiliki ukuran pori-pori yang lebih kecil dari ukuran protein sehingga protein tidak dapat keluar dari kantong selofan. Penggunaan kantong selofan memiliki beberapa keuntungan yaitu mudah digunakan, kantong ini memiliki harga yang relatif murah dan mudah didapatkan (Kristanti, 2001):



Gambar 2.7 Kantong Selofan

Dialisis merupakan proses *transport* solut melalui membran, dimana solut dipindahkan antara dua cairan. Pada proses dialisis terjadi perpindahan garam ammonium sulfat yang mempunyai berat molekul rendah dari sampel berganti

dengan larutan buffer dalam dialisat. Pada waktu garam bergerak melalui pori-pori membran, garam teradsorpsi pada permukaan membran dan selanjutnya bergerak dari sisi membran yang satu ke sisi membran yang lain. Proses ini dipertahankan oleh adanya tekanan osmotik (Aulanni'am, 2005).

Buffer digunakan saat dialisis untuk melarutkan senyawa non protein, selain itu menurut Fennema (1985), buffer berfungsi menjaga kestabilan pH enzim, karena perubahan pH dapat mempengaruhi aktivitas enzim dan pH yang ekstrim dapat merusak enzim. Efektifitas buffer dipengaruhi oleh konsentrasi dan bahan penyusun buffer.

2.9 Analisis Protein Menggunakan Metode Biuret

Analisa protein dengan menggunakan metode biuret warna kompleks ungu menunjukkan adanya protein. Intensitas warna yang dihasilkan merupakan ukuran jumlah ikatan peptida yang ada dalam protein. Ion Cu^{2+} dari pereaksi biuret dalam suasana basa akan bereaksi dengan polipeptida atau ikatan-ikatan peptida yang menyusun protein, dan membentuk senyawa kompleks berwarna ungu atau violet. Reaksi ini positif terhadap dua buah ikatan peptida atau lebih, tetapi negatif untuk asam amino bebas atau satu ikatan peptida (Bintang, 2010).

Reaksi reagen biuret dengan protein ini menghasilkan dua spektrum cahaya maksimum. Reagen ini dicampurkan dengan larutan protein, kemudian diukur serapannya yaitu pada panjang gelombang 540 nm. Penyerapan cahaya oleh protein disebabkan oleh ikatan peptida residu ritosil triptofonildan fenilalanin, juga turut dipengaruhi oleh gugus non protein yang mempunyai sifat menyerap cahaya. Penyerapan maksimum albumin pada serum terlihat pada

panjang gelombang 546 nm. Kerugian dari metode ini adalah penetapannya tidak murni menunjukkan kadar protein, melainkan bisa saja kadar senyawa yang mengandung benzena gugus fenol, gugus sulfhidrin, ikut terbaca kadarnya.

2.10 Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis adalah alat untuk mengukur transmittan atau absorbansi suatu sampel sebagai fungsi panjang gelombang. Panjang gelombang cahaya UV atau visible bergantung pada mudahnya promosi elektron, akan menyerap pada panjang gelombang yang lebih pendek. Molekul yang memerlukan energi lebih sedikit akan menyerap cahaya dalam daerah tampak (senyawa berwarna) yang mempunyai elektron yang lebih mudah dipromosikan daripada senyawa yang menyerap pada panjang gelombang UV (Khopkar, 2003).

Spektrofotometer UV-Vis dapat digunakan untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif. Pada aspek kuantitatif, suatu berkas radiasi dikenakan pada larutan sampel dan intensitas sinar radiasi yang diteruskan akan diukur besarnya. Radiasi yang diserap oleh larutan sampel ditentukan dengan membandingkan intensitas cahaya yang diteruskan dengan intensitas atau kekuatan radiasi cahaya yang diserap (Rohman *et al*, 2010).

Pemilihan panjang gelombang yang digunakan untuk analisis kuantitatif adalah panjang gelombang yang mempunyai absorbansi maksimal, dilakukan dengan membuat kurva hubungan antara absorbansi dan panjang gelombang dari suatu larutan baku dengan konsentrasi tertentu. Ada beberapa variabel yang dapat mempengaruhi absorbansi yaitu: jenis pelarut, pH larutan, suhu, konsentrasi tinggi dan zat pengganggu (Rohman *et al.*, 2007).

Hukum Lambert-Beer menyatakan bahwa intensitas yang diteruskan oleh larutan zat penyerap berbanding lurus dengan tebal kuvet dan konsentrasi larutan. Kuantitas spektroskopi biasanya mengukur transmitans ($T = I/I_0$) dan absorbansi ($A = \log 1/T$). Adapun persamaan hukum Lambert-Beer adalah sebagai berikut (Rohman *et al*, 2010):

$$A = \log 1/T = \log I/I_0 = a.b.c = -\log T$$

Dimana:

- A = Absorbansi
- a = Absorpsivitas
- b = Tebal kuvet
- c = Konsentrasi larutan (mol/L)
- T = Transmitan

Rumus ini dapat dijelaskan bahwa cahaya atau radiasi dengan intensita I_0 yang melewati bahan setebal b berisi sejumlah n partikel (ion, atom atau molekul) akan mengakibatkan intensitas berkurang menjadi I . Berkurangnya intensitas radiasi tergantung dari luas penampang (S) yang menyerap partikel, dimana luas penampang sebanding dengan jumlah partikel (n) (Hayati, 2007).

2.11 Hasil Penelitian dalam Perspektif Islam

Allah Swt memerintahkan kepada umat manusia untuk mengelola dan menggali kekayaan atau potensi yang terpendam dalam bumi untuk di dapat dimanfaatkan dalam kemaslahatan hidup umat manusia. Tumbuhan merupakan ciptaan Allah yang tak sesederhana yang kita pikirkan. Sebenarnya dalam pertumbuhan sebuah tumbuhan mengalami proses-proses yang amat sangat rumit, yang tidak mudah kita nalar secara sederhana, bahkan makhluk Allah Swt seperti hewan, herbivora, karnivora dan pengurai mendapat manfaat dari tumbuhan. Firman Allah Swt dalam surat Shaad ayat 27:

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا بَطْلًا ۚ ذَٰلِكَ ظَنُّ الَّذِينَ كَفَرُوا ۖ فَوَيْلٌ لِلَّذِينَ

كَفَرُوا مِنَ النَّارِ ﴿٢٧﴾

Artinya: “Dan kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada antara keduanya tanpa sia-sia. Yang demikian itu adalah anggapan orang-orang kafir, maka celakalah orang-orang kafir itu karena mereka akan masuk neraka” (QS.Shaad.27).

Makna yang terkandung dalam adalah bahwasanya Allah menciptakan langit dan segala isinya yang bermanfaat bagi makhluk-Nya dan Allah menciptakan bumi dengan segala isinya yang berupa hal-hal yang bermanfaat, baik dipermukaan maupun di dalam perut bumi, dan Allah tidak menciptakan apa-apa yang ada di antara langit dan bumi, baik yang diketahui maupun yang tidak diketahui sebagai kesia-siaan.

Ayat di atas dapat diketahui bahwa Allah menciptakan segala sesuatunya pasti ada manfaatnya. Seperti halnya dengan bekatul yang banyak mengandung karbohidrat sehingga dapat dihidrolisis menjadi glukosa yang bermanfaat untuk bahan pemanis. Di dalam ayat-ayat Al-Qur`an, Allah menyuruh manusia supaya memperhatikan keberagaman dan keindahan disertai seruan agar merenungkan ciptaan-ciptaan-Nya yang amat menakjubkan. Firman Allah dalam QS. Al-An'am: 99 berbunyi:

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا نُخْرًا مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِنَ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِّنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَبِهٍ ۗ أَنْظِرُوا إِلَىٰ ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ ۗ

إِنَّ فِي ذَٰلِكُمْ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ ﴿٩٩﴾

Artinya: *“Dan Dialah yang menurunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan dengan air itu segala macam tumbuh-tumbuhan Maka Kami keluarkan dari tumbuh-tumbuhan itu tanaman yang menghijau. Kami keluarkan dari tanaman yang menghijau itu butir yang banyak; dan dari mayang korma mengurai tangkai-tangkai yang menjulai, dan kebun-kebun anggur, dan (kami keluarkan pula) zaitun dan delima yang serupa dan yang tidak serupa. perhatikanlah buahnya di waktu pohonnya berbuah dan (perhatikan pulalah) kematangannya. Sesungguhnya pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman”.* (Q.S. al-An’am [6]: 99).

Beberapa enzim amilase yang berasal dari bakteri mempunyai kemampuan yang lebih untuk mendegradasi amilosa kristalin dibandingkan dengan enzim amilase yang berasal dari fungi (Aklyosov, 2004). Salah satu manfaat dari enzim amilase yang dihasilkan oleh bakteri amilolitik adalah untuk menghidrolisis amilosa menjadi glukosa.

Al-Quran menjadi pedoman bagi manusia untuk mencari jawaban atas penciptaan langit dan bumi dengan menggunakan akal pikirannya. Dalam surat al-An’am ayat 99 menjelaskan betapa besarnya kekuasaan Allah Swt jika kita memikirkannya. Ciptaan Allah Swt memiliki maksud yang telah dijelaskan oleh al-Qur’an agar manusia dapat mengetahuinya. Allah Swt memberikan kesempatan yang seluas-luasnya kepada manusia untuk mengambil manfaat dari alam semesta.

Pemanfaatan limbah ini dapat terwujud dari pemikiran manusia yang peduli dengan lingkungan dan keinginannya untuk memanfaatkan sesuatu yang tidak bermanfaat menjadi lebih bermanfaat, sehingga dapat terealisasi dalam pemanfaatan limbah tersebut. Upaya pemanfaatan limbah ini berupa mengkonversikan bekatul menjadi glukosa yang dapat memberikan manfaat pada manusia. Selain itu, glukosa juga dapat dimanfaatkan sebagai bahan dari beberapa

produk misalnya obat-obatan, beberapa produk pangan lainnya. Keterkaitan enzim dalam proses hidrolisisnya, merupakan bentuk pemanfaatan lain dari produk yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Firman Allah Swt dalam surat As Sajadah ayat 27:

أَوَلَمْ يَرَوْا أَنَّا نَسُوقُ الْمَاءَ إِلَى الْأَرْضِ الْجُرُزِ فَنُخْرِجُ بِهِ زَرْعًا تَأْكُلُ مِنْهُ أَنْعَامُهُمْ وَأَنْفُسُهُمْ أَفَلَا يُبْصِرُونَ

Artinya: *Dan apakah mereka tidak memperhatikan, bahwasanya kami menghalau (awan yang mengandung) air ke bumi yang tandus, lalu kami tumbuhkan dengan air hujan itu tanaman yang daripadanya makan hewan ternak mereka dan mereka sendiri. Maka apakah mereka tidak memperhatikan?(QS. as Sajadah:27)*

Ayat tersebut menjelaskan tentang arti tanaman untuk hewan ternak dan manusia. Tanaman tersebut diintegrasikan pada hasil pertanian, dimana padi yang dimanfaatkan sebagai makanan pokok manusia, sedangkan limbahnya seperti jerami dan bekatul dimanfaatkan sebagai pakan ternak. Ayat ini juga menjelaskan bahwa hasil dari keduanya (hasil pertanian dan limbahnya) dapat dimanfaatkan sebagai makanan.

Perkembangan ilmu pengetahuan membuktikan bahwa ayat-ayat di atas mengisyaratkan adanya ilmu-ilmu struktur dan keturunan lingkungan, tingkatan bumi yang merupakan hakikat yang belum disingkap manusia. Segala sesuatu yang nampak di mata insan yang berada di langit dan di bumi dikembalikan kepada Allah Swt. Sehingga melalui kegiatan berfikir, merenungkan dan menganalisis ciptaan-ciptaan Allah Swt dengan diikuti rasa tawakkal yang memberikan kepada manusia kekuatan iman dan mengakui kelemahan diri (tidak sombong) dihadapan kebesaran Allah Swt.

BAB III

METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari – Agustus 2015 di Laboratorium Biotek Jurusan Kimia, Mikrobiologi dan Genetika Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *autoclave*, seperangkat alat gelas, rak tabung reaksi, tabung reaksi, pipet mikro, bluetip, kuvet, *hot plate*, neraca analitik, bola hisap, laminar, Bunsen, kawat ose, *shaker incubator*, *magnetic stirrer*, sentrifugasi, *vortek*, pH meter, kapas, *aluminium foil*, kantong plastik, kertas selofan, *plastic wrap*, karet dan spektrofotometer UV-Vis.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri amilolitik (hasil isolasi bekatul dari penelitian sebelumnya), *Nutrient Agar (Criterion)*, Amilosa 1%, $MgSO_4$, yeast ekstrak, pepton, NaCl, $CaCl_2$, aquades, glukosa anhidrat, $(NH_4)_2SO_4$, HCl, $BaCl_2$, Bovine Serum Albumin (BSA), NaOH, $CuSO_4$, asam 3,5 dinitrosalisilat (DNS), KNa-tatrat, alkohol 70%, EDTA, $NaHCO_3$, dan larutan buffer fosfat pH 6.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dimulai dengan peremajaan isolat bakteri amilolitik dengan menggunakan media *starch agar* kemudian produksi enzim dalam media *soluble starch*. Ekstrak kasar enzim amilase dimurnikan menggunakan pengendapan ammonium sulfat dengan fraksi 20–40% (F1), 40–60% (F2), 60–80% (F3). Enzim amilase hasil pemurnian ditentukan aktivitasnya menggunakan metode DNS dan endapan yang diperoleh didialisis dengan buffer fosfat pH 6,0 selama 24 jam pada suhu 5⁰C. Kemudian ditentukan kadar protein dengan metode biuret serta penentuan aktivitas spesifik enzim amilase. Masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 3 (tiga) kali.

3.4 Tahapan Penelitian

Pada penelitian ini akan dilakukan beberapa tahap, yaitu;

1. Pembuatan Media
2. Peremajaan Isolat
3. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri
4. Produksi Ekstrak Kasar Enzim Amilase
5. Pemurnian Ekstrak Kasar Enzim Amilase
6. Pengukuran Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Amilase
7. Penentuan Aktivitas Spesifik Enzim Amilase
8. Pengukuran Kadar Protein Enzim Amilase

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1. Pembuatan Media Selektif Bakteri Amilolitik (Santos dan Martin, 2003).

Media selektif agar (untuk uji kualitatif) ditimbang dengan komposisi 1% *soluble starch* 0,2 % yeast ekstrak, 0,5 % pepton, 0,05 % NaCl, 0,05 % MgSO₄, 0,015 % CaCl₂, dan 2 % agar. Kemudian ditambahkan dengan aquades sebanyak 250 mL dan dilarutkan hingga mendidih sambil diaduk dengan *magnetik stirrer*, kemudian media tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL dan disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 2 jam.

Media selektif tanpa agar (untuk kurva pertumbuhan) ditimbang dengan komposisi 1% *soluble starch*, 0,2 % yeast ekstrak, 0,5 % pepton, 0,05 % NaCl, 0,05 % MgSO₄, dan 0,015 % CaCl₂. Kemudian ditambahkan dengan aquadest sebanyak 200 mL dan dilarutkan hingga mendidih sambil diaduk dengan *magnetik stirrer*, kemudian media tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL dan disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 2 jam.

3.5.2. Peremajaan Isolat Bakteri Amilolitik

Peremajaan bakteri dilakukan dengan mengambil 1 ose isolat amilolitik hasil isolasi dari penelitian (Asadullah, 2014), kemudian digoreskan pada media *starch agar* miring, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang.

3.5.3. Uji Bakteri Penghasil Amilase secara Kualitatif

Isolat murni yang diperoleh diuji kemampuannya untuk menghasilkan enzim amilase dengan cara diinokulasikan ke dalam media agar. Media kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Untuk memperjelas zona bening ditambahkan dengan larutan iodin (komposisi KI 4,0 g, I₂ 4,0 g, dalam 600 mL akuades) dan ditunggu selama 15 menit untuk pengamatan zona bening (Sudiana *et al.*, 2002):

$$\text{Ratio ZB} = \frac{\text{Diameter Zona Bening (DZB)}}{\text{Diameter Koloni Bakteri (DKB)}}$$

3.5.4. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri Amilolitik

Sebanyak satu ose isolat amilolitik hasil peremajaan diinokulasikan ke dalam 25 mL media selektif tanpa agar, kemudian di shaker pada kecepatan 125 rpm selama 24 jam. Inokulum diambil 20 mL dan dipindahkan dalam 200 mL media selektif tanpa agar baru. Inokulum diambil 4 mL tiap 4 jam sekali dan diukur jumlah sel dan aktivitas amilasanya pada panjang gelombang 540 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, sehingga didapatkan nilai OD (*Optical Density*). Kurva pertumbuhan ditentukan dengan membuat plot antara waktu inkubasi, absorbansi dan aktivitas enzim. Aktivitas enzim amilase ditentukan dengan mengukur kadar glukosa dengan metode DNS.

3.5.5. Produksi Enzim Amilase (Naiola, 2008).

Inokulum diambil sebanyak 5 mL dan dipindahkan dalam 50 mL media selektif tanpa agar. Inokulum diinkubasi hingga fase yang menghasilkan enzim amilase tertinggi yaitu pada jam ke-32 (fase log) sesuai kurva pertumbuhan kemudian di *shaker incubator* pada suhu ruang dengan kecepatan 130 rpm. Ekstrak kasar enzim diperoleh dengan mensentrifugasi kultur pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C, supernatan yang diperoleh adalah ekstrak kasar enzim

3.5.6. Analisis Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Amilase dengan Metode DNS

3.5.7.1. Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Disiapkan 6 tabung reaksi, masing-masing diisi dengan larutan glukosa dengan konsentrasi 0, 200, 300, 400, 500 dan 600 ppm. Setelah itu diambil 1 mL dari masing-masing konsentrasi dan dimasukkan kedalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan ke dalam tabung reaksi 1 mL reagen DNS dan dihomogenkan. Ditutup mulut tabung dengan aluminium foil dan dipanaskan dalam air mendidih selama 5-15 menit sampai larutan berwarna merah-coklat. Kemudian ditambahkan 1 mL larutan K-Na-Tartrat 40 %. Tabung reaksi didinginkan dan ditambahkan dengan aquades hingga volumenya menjadi 10 mL dan dihomogenkan. Selanjutnya diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

3.5.7.2. Uji Aktivitas Enzim Amilase

Sebanyak 1 ml ekstrak kasar enzim hasil sentrifugasi dicampur dengan 1 ml substrat (pati terlarut 1% dalam buffer fosfat 0,2 M pH 6) lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 30° C. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 mL asam 3,5

dinitrosalisilat (DNS) kemudian dikocok kuat-kuat dengan *vortex* dan dipanaskan dalam air mendidih selama 5-10 menit. Lalu didinginkan di dalam air es selama 20 menit. Setelah dingin diukur absorbansinya pada $\lambda=540$ nm. Blanko mendapat perlakuan yang sama dengan sampel, namun penambahan enzim dilakukan setelah campuran dipanaskan. Satu unit aktivitas α -amilase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk melepas 1 μmol gula pereduksi/menit atau setara dengan 1 μmol glukosa/menit (Tresnawati, 2004). Aktivitas amilase ditentukan dengan mengkonversi nilai absorbansi yang diperoleh dari konsentrasi glukosa standart, kemudian dihitung dengan menggunakan rumus (Kombong, 2004):

$$AE = \frac{C}{BM \text{ glukosa} \times t} \times \frac{H}{E}$$

Dimana:

- AE = Aktifitas enzim (Unit/mL)
- C = Konsentrasi glukosa
- BM = Berat Molekul Glukosa = 180 g/mol
- t = Waktu Inkubasi (menit)
- H = Volume total enzim-substrat (mL)
- E = Volume enzim (mL)

3.5.7. Pemurnian Ekstrak Kasar Enzim Amilase (Ardiansyah *et al.*, 2008)

Pemurnian ekstrak kasar enzim amilase dilakukan dengan cara pengendapan bertahap $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dengan fraksi kejenuhan 20–40 %, 40–60 %, 60–80 %, dengan tahapan sebagai berikut:

3.5.8.1. Pengendapan 20 – 40 %

Amonium sulfat ditimbang sebanyak 2,42 gr kemudian ditambahkan ke dalam 20 mL larutan ekstrak kasar amilase dalam *beaker glass* 50 mL. Penambahan

dilakukan sedikit demi sedikit diaduk menggunakan pengaduk magnetik selama 30 menit pada suhu dingin. Setelah semua $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang ditambahkan larut kemudian didiamkan selama 24 jam pada suhu 4°C . Endapan dipisahkan dengan sentrifugasi menggunakan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4°C selama 30 menit. Dihasilkan supernatan I dan endapan I. Supernatan I digunakan untuk pengendapan bertingkat fraksi berikutnya, sedangkan endapannya dimurnikan lebih lanjut dengan dialisis. Enzim murni yang diperoleh kemudian diukur aktivitas dan kadar proteinnya.

3.5.8.2. Pengendapan 40 – 60 %

Supernatan I dimasukkan ke dalam *beaker glass* 50 mL kemudian ditambah dengan 2,6 gr $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Penambahan dilakukan sedikit demi sedikit diaduk menggunakan pengaduk magnetik selama 30 menit pada suhu dingin. Setelah semua $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang ditambahkan larut kemudian didiamkan selama 24 jam pada suhu 4°C . Endapan dipisahkan dengan sentrifugasi menggunakan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4°C selama 30 menit. Dihasilkan supernatan II dan endapan II. Supernatan II digunakan untuk pengendapan bertingkat fraksi berikutnya, sedangkan endapannya dimurnikan lebih lanjut dengan dialisis. Enzim murni yang diperoleh kemudian diukur aktivitas dan kadar proteinnya.

3.5.8.3. Pengendapan 60 – 80 %

Supernatan II dimasukkan ke dalam *beaker glass* 50 mL kemudian ditambah dengan 2,8 gr $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Penambahan dilakukan sedikit demi sedikit diaduk menggunakan pengaduk magnetik selama 30 menit pada suhu dingin. Setelah semua $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang ditambahkan larut kemudian didiamkan selama 24 jam pada suhu

4°C. Endapan dipisahkan dengan sentrifugasi menggunakan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4°C selama 30 menit. Dihasilkan supernatan III dan endapan III. Supernatan III digunakan untuk pengendapan bertingkat fraksi berikutnya, sedangkan endapannya dimurnikan lebih lanjut dengan dialisis. Enzim murni yang diperoleh kemudian diukur aktivitas dan kadar proteinnya.

3.5.8.4. Dialisis

Dialisis dilakukan menggunakan kantung selofan. Kantung selofan dipotong 5 cm kemudian direndam dalam larutan EDTA 1 mM dan 20 % NaHCO₃ selama 10 menit. Setelah didiamkan selama 10 menit, larutan tersebut dibuang dan kantung dialisis direndam kembali dengan air bebas ion selama 10 menit sebanyak 2 kali.

Masing-masing endapan I, II dan III dilarutkan dalam 5 mL larutan buffer fosfat 0,2 M pH 6. Masing-masing endapan yang larut dimasukkan ke dalam kantong selofan dan kedua ujung kantong diikat dengan benang. Selanjutnya didialisis dengan cara merendam kantong selofan dalam 100 mL larutan buffer fosfat 0,05 M pH 6 pada posisi tergantung. Dialisis dilakukan dengan menggunakan pengaduk magnetik dengan kecepatan 100 rpm, pada suhu dingin selama 24 jam. Setelah 8 jam dilakukan penggantian buffer dengan konsentrasi dan pH yang sama.

Untuk mengetahui bahwa dialisis sudah selesai buffer diuji dengan larutan BaCl₂ 1 M, caranya 2 mL buffer dimasukkan dalam tabung reaksi ditambah HCl 0,1 M dengan beberapa tetes BaCl₂. Apabila sudah tidak terbentuk endapan dialisis dihentikan. Masing-masing larutan enzim yang diperoleh dari dialisis diuji aktivitasnya dan enzim dengan aktivitas tertinggi ditentukan kadar proteinnya.

3.5.8. Pengukuran Kadar Protein Enzim Amilase dengan Metode Biuret

3.5.8.1. Pembuatan Kurva Standar BSA

Disiapkan larutan protein Bovine Serum Albumin (BSA) dengan konsentrasi 5 mg/mL. Disiapkan 6 tabung reaksi, masing-masing diisi 0 (blanko), 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, dan 1.0 mL larutan protein standar. Masing-masing tabung reaksi ditambah aquades sampai volume total masing-masing 4 mL. Kemudian ditambahkan 6 mL pereaksi Biuret ke dalam masing-masing tabung reaksi dan dihomogenkan. Tabung reaksi disimpan pada suhu kamar selama 30 menit sampai terbentuk warna ungu yang sempurna. Diukur serapan masing-masing larutan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 550 nm.

3.5.8.2. Penentuan Kadar Protein dalam Enzim Amilase

Larutan enzim amilase dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan aquades sampai volume larutan sebanyak 4 mL. Ditambahkan pereaksi biuret sebanyak 6 mL ke dalam campuran larutan dan dihomogen. Kemudian didiamkan selama 30 menit atau sampai larutan berwarna ungu sempurna. Diukur absorbansi larutan pada panjang gelombang 550 nm. Dibuat kurva standart sesuai absorbansi larutan yang dihasilkan, sehingga ditemukan persamaan $y = ax + b$.

3.5.9 Penentuan Aktivitas Spesifik Enzim Amilase

Aktivitas spesifik enzim dapat ditentukan dengan membagi aktivitas enzim dengan kadar protein. Penentuan aktivitas spesifik enzim amilase ini hanya pada enzim amilase hasil pemurnian dengan fraksi pengendapan yang mempunyai aktivitas tertinggi yaitu fraksi F₂.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini telah dilakukan proses pemurnian enzim amilase. Tujuan pemurnian enzim amilase adalah untuk memisahkan enzim yang diinginkan dari senyawa lain yang tidak dikehendaki dan untuk meningkatkan aktivitas enzim. Penelitian ini menggunakan ekstrak kasar enzim amilase dari bakteri amilolitik endogenous bekatul (hasil isolasi dari penelitian Asadullah (2014)). Tujuan dari penelitian ini adalah melakukan pemurnian enzim amilase secara parsial menggunakan amonium sulfat. Penelitian ini meliputi beberapa tahapan diantaranya produksi ekstrak kasar enzim amilase, pemurnian ekstrak kasar enzim amilase secara fraksinasi menggunakan amonium sulfat pada konsentrasi 20–40 %, 40–60 %, dan 60–80 %. Kemudian dilanjutkan proses dialisis, hasil dialisis diuji aktivitas enzim dan fraksinasi tertinggi hasil pemurnian ditentukan kadar protein dan aktivitas spesifiknya.

4.1 Media Pertumbuhan dan Peremajan Bakteri Amilolitik

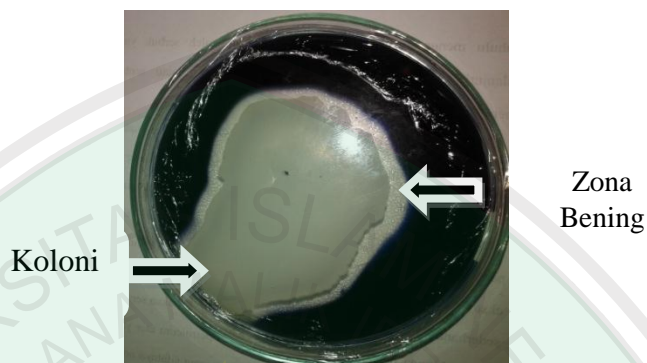
Bakteri dapat tumbuh dalam medium yang mengandung satu atau lebih persyaratan nutrisi. Keragaman yang luas dalam tipe nutrisi bakteri, memerlukan penyiapan medium yang beragam untuk menumbuhkannya. Medium biasa dapat disebut substrat. Medium harus mengandung nutrisi dan oksigen yang dibutuhkan mikroba (Nurcahyo. 2011). Mikroba autotrof dapat tumbuh pada media sederhana karena mempunyai kemampuan mensintesis bahan organik menjadi karbohidrat, protein, asam nukleat, lipid dan vitamin. Sedangkan mikroba heterotrof

menggunakan media non sintetik. Sering digunakan bahan mentah seperti pepton, ekstrak daging, ekstrak ragi sehingga media tersebut dapat digunakan oleh berbagai jenis mikroba (Indriyanto, 1995).

Isolat yang digunakan pada penelitian ini adalah isolat amilolitik BK 4 (hasil isolasi dari penelitian Asadullah, 2014). Isolat diremajakan terlebih dahulu agar menghasilkan amilase secara optimal. Peremajaan isolat amilolitik dilakukan pada media selektif agar sebagai media umum untuk semua isolat bakteri amilolitik. Menurut Thomas *et al.*, (2011) nutrisi yang terkandung di dalam media *strach* agar yang merupakan media sintetik terdefinisi yang digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme amilolitik dimana terdiri dari pati 1 %, *yeast extract*, pepton, MgSO₄, CaCl₂, dan *bacteriological* agar. Pepton merupakan molekul organik umumnya yang mengandung karbon sebagai tulang punggungnya seperti karbohidrat, lemak, protein yang terdapat pada Agar bukan sebagai sumber nutrisi bagi mikroorganisme namun fungsinya lebih bersifat mekanis yaitu memadatkan media cair sehingga sel tidak larut dalam cairan. Peremajaan bakteri ini dilakukan dengan menggoreskan isolat bakteri amilolitik pada media selektif agar baru. Koloni tersebut kemudian dimurnikan dengan metode *streak kuadran* pada media agar miring dan diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu ruang. Koloni murni yang diperoleh digunakan sebagai stok isolat untuk uji selanjutnya. Peremajaan dilakukan secara aseptis dengan tujuan untuk menghindari terjadinya kontaminasi yang akan mempengaruhi pertumbuhan bakteri.

4.2 Uji Bakteri Penghasil Amilase secara Kualitatif

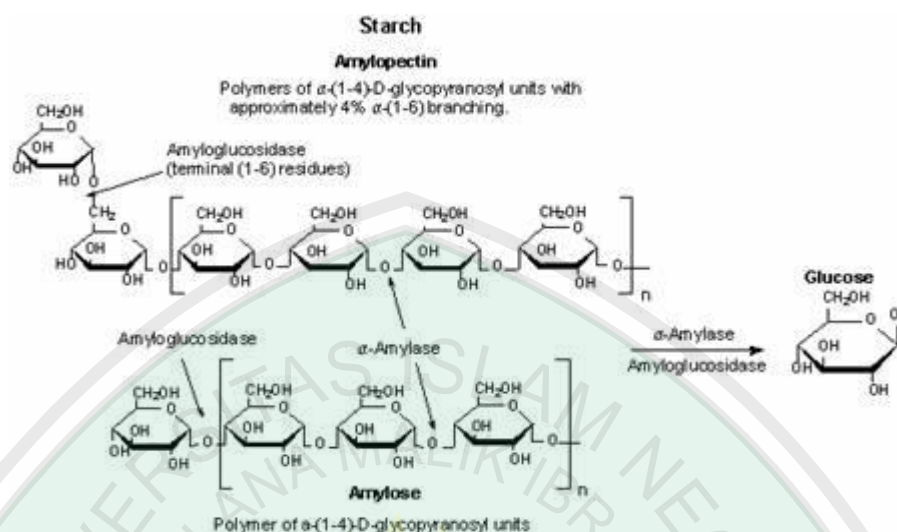
Uji bakteri amilolitik secara kualitatif dilakukan pada media selektif agar untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri BK 4 dalam menghasilkan enzim amilase dari isolat yang telah berhasil diisolasi dari penelitian (Asadullah, 2014):



Gambar 4.1 Penambahan Iodin Pada Media

Gambar 4.1 hasil uji bakteri amilolitik secara kualitatif menggunakan media padat selektif agar dengan metode inokulasi. Isolat yang menghasilkan amilase ekstraseluler terlihat dari pembentukan zona bening di sekitar koloni bakteri. Pembentukan zona bening menunjukkan bahwa pati yang terdapat di dalam media dihidrolisis oleh enzim amilase menjadi senyawa yang sederhana seperti maltosa, dekstrin dan glukosa (Winarno 1983). Indeks amilolitik ini ditentukan berdasarkan pembentukan zona bening di sekitar koloni bakteri. Diameter zona bening (DZB) sebesar 14,5 cm dan diameter koloni (DK) sebesar 8,6 cm, sehingga untuk indeks amilolitik sebesar 1,69 cm. Diameter zona bening pada umumnya berukuran lebih besar dibandingkan dengan diameter koloni, karena enzim amilase disekresikan ke lingkungan sekitarnya oleh bakteri amilolitik. Zona bening mengidentifikasi bahwa amilosa telah terhidrolisis menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti disakarida ataupun monosakarida. Hal ini juga sesuai dengan pernyataan Winarno (1992), bahwa kerja α -amilase adalah mendegradasi

amilosa menjadi maltosa dan maltotriosa yang terjadi secara acak. Berikut adalah mekanisme kerja enzim:



Gambar 4.2 Mekanisme Kerja Enzim Amilase.

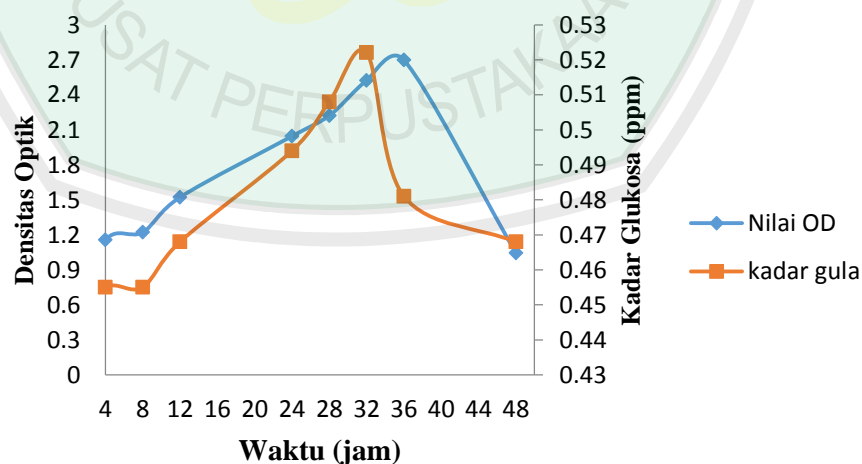
Gambar 4.2 merupakan mekanisme proses hidrolisis amilosa menjadi glukosa. α -amilase merupakan enzim ekstraseluler yang menghidrolisis ikatan 1,4- α -glikosida, enzim ini memecah ikatan 1-4 yang terdapat dalam amilum dan disebut endo amilase sebab enzim ini memecah bagian dalam atau bagian tengah molekul amilum. Penentuan adanya amilase dengan didasarkan pada metode iodine. Uji positif ditandai dengan terbentuknya daerah terang dengan latar biru/ungu disekitar kultur (media pertumbuhan yang mengandung pati) setelah penambahan larutan KI/I_2 (Poedjiadi, 2006).

Zona bening ini terjadi karena enzim amilase yang disekresikan oleh sel bakteri menghidrolisis molekul pati disekitarnya sehingga kompleks amilum-iodine dengan warna biru kehitaman (disebabkan oleh penambahan iodine ke dalam media) berkurang/hilang. Warna biru/ungu merupakan warna dari kompleks pati-iodine dan pati akan saling berinteraksi, iodine tersebut terperangkap dalam struktur pati. Pada akhirnya terjadi kompleks pati-iodine tersebut yang berwarna. Reaksi

tersebut merupakan reaksi yang bersifat spesifik terhadap pati. Dengan demikian, uji tersebut dapat digunakan sebagai analisis pati dalam sampel baik kualitatif maupun kuantitatif. Aktivitas amilase dapat diperiksa dengan hilangnya warna biru/ungu pada medium pertumbuhan setelah penambahan iodin (Fessenden, 1986).

4.3 Kurva Pertumbuhan Bakteri Amilolitik

Pola pertumbuhan bakteri merupakan pola yang menunjukkan fase pertumbuhan dari suatu mikroorganisme. Pertumbuhan mikroorganisme dapat didefinisikan sebagai peristiwa peningkatan volume suatu organisme yang disertai peningkatan biomassa sel. Pertumbuhan bakteri yang ditentukan dengan pengukuran OD dapat diterjemahkan ke dalam jumlah bakteri (biomassa) seperti yang pernah dilakukan oleh Kambourova *et al.*, (1995). Kurva pertumbuhan diperoleh dengan membuat plot antara waktu inkubasi, densitas optik dan aktivitas amilase seperti pada gambar 4.3



Gambar 4.3 Grafik Nilai Densitas Optik dan Kadar Glukosa (ppm).

Berdasarkan kurva pertumbuhan yang telah diperoleh pada gambar 4.3 tampak bahwa fase adaptasi berada pada saat jam ke-0 sampai jam ke-8. Pada fase adaptasi, bakteri masih menyesuaikan diri dengan nutrisi yang ada di dalam media, sehingga pertumbuhannya belum optimal. Pada jam ke-8 sampai jam ke-34 merupakan fase logaritma. Pada fase logaritma, bakteri membelah diri secara eksponensial. Pada jam ke-34 sampai jam ke-44 merupakan fase stasioner. Pada fase stasioner, laju pembiakan sel sama dengan laju kematian sel sehingga jumlah keseluruhan bakteri tetap. Kecepatan pertumbuhan bakteri mulai melambat karena semakin berkurangnya nutrisi yang terkandung dalam media pertumbuhan.

Kurva pertumbuhan dan produktivitas gula reduksi dilakukan untuk mengetahui fase logaritmik atau eksponensial bakteri dengan kadar gula reduksi tertinggi, dan digunakan untuk waktu panen enzim amilase. Fase eksponensial ditandai dengan pembelahan sel secara cepat membutuhkan gula sederhana sebagai sumber energi dalam jumlah yang banyak pula, sehingga pada fase ini mikroba akan menyekresikan amilase yang berperan dalam pemecahan amilosa menjadi gula sederhana. Sedangkan produktivitas gula reduksi ditentukan dengan mengukur kadar gula reduksi menggunakan metode asam 3,5 dinitrosalisilat (DNS) diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm. Kondisi optimum untuk produksi enzim perlu dicari untuk mengetahui aktivitas enzim tertinggi dari mikroorganisme penghasilnya. Berdasarkan kurva pertumbuhan yang telah diperoleh hasil tertinggi pada jam ke-32 yaitu merupakan fase logaritma. Pada jam ke-32 nilai densitas optik dan produktivitas gula reduksi dari bakteri amilolitik 2,522 dan 0,522 ppm. Tingkat konsentrasi gula reduksi tertinggi menunjukkan bahwa pada kondisi tersebut bakteri memproduksi banyak

enzim. Sehingga hasil tertinggi dari kurva pertumbuhan akan digunakan sebagai waktu panen enzim saat produksi enzim amilase.

4.4 Produksi Ekstrak Kasar Enzim Amilase

Produksi ekstrak kasar enzim dilakukan untuk memperoleh enzim yang terdapat dalam bakteri amilolitik. Produksi enzim dilakukan pada jam ke-32 sebelum memasuki jam ke-34 (fase stasioner), pada fase ini mikroorganisme tidak lagi melakukan pembelahan sel. Produksi ekstrak kasar enzim amilase dilakukan dengan menambahkan pati 1% (w/v) ke dalam media produksi sebagai substrat untuk menghasilkan amilase. Penambahan pati bertujuan untuk menginduksi amilase sehingga diharapkan amilase yang dihasilkan maksimal karena pati juga merupakan sebagai makronutrien yang penting untuk pertumbuhan sel (Brock *et al.*, 1994 dan Gupta *et al.*, 2003).

Hal yang harus diperhatikan pada saat produksi enzim adalah kecepatan sentrifugasi yang digunakan. Proses untuk memisahkan sel bakteri dari media produksinya dapat dilakukan menggunakan sentrifugasi dingin sehingga didapatkan ekstrak kasar enzim amilase. Produksi ekstrak kasar enzim amilase dilakukan dengan mensentrifugasi pada suhu 4⁰C. Sentrifugasi berfungsi untuk memisahkan sel bakteri dengan ekstrak kasar enzim amilase. Menurut Bintang (2010) pada suhu ini juga merupakan suhu penyimpanan yang baik dimana aktivitas mikroorganisme tidak terjadi dan untuk menghindari denaturasi protein.

Supernatan yang diperoleh adalah ekstrak kasar enzim. Supernatan yang berupa ekstrak kasar amilase kemudian dipisahkan dengan endapannya. Supernatan yang diperoleh setelah proses sentrifugasi dari 50 mL inokulum

sebesar 45 mL. Supernatan digunakan untuk menentukan aktivitas ekstrak kasar enzim amilase dan pemurnian ekstrak kasar enzim amilase. Apabila larutan enzim ini tidak langsung diuji aktivitasnya maka dapat disimpan dalam lemari pendingin untuk menghambat pertumbuhan mikroba atau mencegah rusaknya enzim karena adanya mikroba lain.

4.5 Pengaruh Variasi Konsentrasi Amonium Sulfat Terhadap Aktivitas Enzim Amilase Hasil Pemurnian Parsial (Fossi *et al.*, 2005 dalam Ardiansyah *et al.*, 2008)

Pemurnian merupakan tahap penambahan reagen sehingga terjadi pengendapan protein. Reagen yang biasa digunakan adalah garam (amonium sulfat, sodium sulfat). Reagen yang dipilih pada penelitian ini adalah garam amonium sulfat. Ekstrak kasar enzim amilase pada tahap pertama dimurnikan secara parsial dengan metode fraksinasi amonium sulfat. Keuntungan menggunakan garam amonium sulfat adalah kelarutan tinggi dalam air, harganya murah, tidak dipengaruhi struktur protein, tidak memberi pengaruh yang berarti pada enzim, dan tidak beracun. Larutan enzim yang terjadi selanjutnya didialisis untuk menghilangkan kadar garam amonium sulfat.

4.4.1. Pengendapan Ammonium sulfat

Proses pemurnian ekstrak kasar enzim amilase diawali dengan fraksinasi bertingkat garam amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 20–40 % (F_1), 40–60 % (F_2), 60–80 % (F_3). Penggunaan variasi konsentrasi ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan ammonium sulfat terhadap aktivitas amilase. Amonium sulfat ditambahkan sedikit demi sedikit dan diatur dengan

menggunakan *magnetic stirrer*, hal ini bertujuan agar kontak antara enzim dengan garam dapat berlangsung dengan baik.

Menurut (Aulanni'am, 2005), penambahan amonium sulfat berpengaruh terhadap protein yang terendapkan selama proses pemurnian. Amonium sulfat ditambahkan dengan konsentrasi yang tinggi yaitu 80 % amonium sulfat jenuh dan bentuk garam yang ditambahkan berupa bahan padat. Penambahan amoniuim sulfat pada kondisi jenuh dimaksudkan agar terdapat kumpulan molekul protein bila telah melewati titik jenuh. Ketika konsentrasi garam amonium sulfat meningkat secara bertahap pada saat fraksinasi, beberapa molekul air akan tertarik oleh ion garam amonium sulfat, yang menurunkan jumlah molekul air yang tersedia untuk berinteraksi dengan asam amino hidrofilik dari protein, sehingga protein yang mengandung asam amino hidrofilik akan mengendap (*salting out*). Pada konsentrasi rendah, ion-ion garam akan melingdingi molekul-molekul protein, peristiwa ini disebut *salting in* (Scopes, 1987).

Proses pemurnian dilakukan pada kondisi dingin untuk mengurangi inaktivasi, dimana peningkatan suhu akibat proses pelarutan dengan bantuan *magnetic stirrer* dapat menyebabkan denaturasi. Proses pengendapan disempurnakan dengan menyimpan enzim yang telah ditambahkan amonium sulfat selama semalam pada suhu 4°C. Selama proses penyimpanan molekul-molekul protein beragregasi tetapi tidak langsung semua mengendap, sebagian agregat protein melayang dan terkumpul di bagian permukaan membentuk suatu lapisan. Pemurnian diperoleh dengan cara sentrifugasi pada suhu 4°C selama 15 menit dengan kecepatan 5.000 rpm. Kemudian pelarutan hasil sentrifugasi dengan buffer fosfat 0,05 M pH 6.0 dan larutan enzim yang dihasilkan kemudian diukur

kadar proteinnya. Endapan yang diperoleh merupakan sel bakteri, sedangkan supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim amilase (Ek).

Tabel 4.1 Hasil Pemurnian dengan Ammonium Sulfat

Fraksi Amonium Sulfat	Jumlah Endapan yang diperoleh (mg)
F1 (20–40%)	0,0162
F2 (40–60%)	0,1571
F3 (60–80%)	0,0143

Dari tabel 4.1 endapan yang diperoleh adalah protein enzim dan protein-protein lain. Aktivitas ekstrak kasar sebagai acuan peningkatan kemurnian enzim amilase setelah dimurnikan. Ekstrak kasar amilase (F_0) mempunyai aktivitas sebesar $5,27 \times 10^{-2}$ U/mL. Aktivitas enzim amilase kasar (F_0) sangat kecil bila dibandingkan dengan aktivitas enzim amilase setelah pemurnian. Aktivitas ekstrak kasar amilase selisihnya tidak terlalu banyak dibanding dengan aktivitas enzim yang telah dimurnikan. Hal ini disebabkan karena di dalam ekstrak kasar enzim amilase masih terdapat banyak protein dan non enzim. Pemurnian dengan penambahan ammonium sulfat mengakibatkan kadar protein amilase menurun karena protein non enzim dalam amilase terendapkan.

4.4.2. Dialisis

Fraksinasi menggunakan amonium sulfat menghasilkan protein yang mengandung kadar garam yang tinggi. Amonium sulfat yang terkandung dalam protein dapat dihilangkan dengan cara dialisis enzim di dalam larutan buffer menggunakan membran selofan. Perebusan ke dalam larutan EDTA dan sodium karbonat dilakukan terhadap kantong selofan sebelum digunakan untuk menghilangkan protein yang mungkin menempel di kantong dan untuk menghindari kontaminasi dari bahan kimia selama proses pabrikan. EDTA

merupakan ligan yang dapat berkoordinasi dengan suatu ion logam membentuk senyawa kompleks lewat kedua nitrogen dan keempat gugus karboksil-nya atau disebut ligan multidentat yang mengandung lebih dari dua atom koordinasi per molekul. Buffer yang digunakan adalah buffer fosfat 0,05 M pH 6,0, dimana proses dialisis dilakukan selama 24 jam pada suhu 4°C untuk mengurangi penurunan aktivitas enzim. Penggunaan buffer ini selain untuk melarutkan protein, juga untuk menjaga kestabilan pH enzim karena perubahan pH dapat mempengaruhi aktivitas enzim dan pH yang ekstrim dapat merusak enzim.

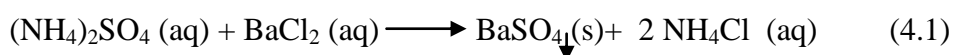
Prinsip dialisis adalah difusi, yaitu terjadinya perpindahan zat terlarut dari larutan berkonsentrasi tinggi ke larutan berkonsentrasi yang rendah. Pada awal dialisis karena konsentrasi garam di dalam kantong yang lebih tinggi daripada di luar kantong menyebabkan buffer masuk ke dalam kantong. Selanjutnya garam akan keluar dari kantong hingga tercapai kondisi keseimbangan dimana konsentrasi garam di dalam dan di luar kantong sama. Proses dialisis dilakukan dengan memasukkan enzim ke dalam kantong dialisis dan merendamnya dalam larutan buffer. Untuk mengoptimalkan amonium sulfat berdifusi ke luar membran, dialisis disertai pengadukan dengan *magnetic stirrer*. Pada tahap dialisis juga terjadi proses pemisahan molekul berdasarkan ukuran melalui pori membran selofan. Pori ini memungkinkan molekul kecil, seperti pelarut, garam, dan metabolit kecil untuk berdifusi melintasi membran, sedangkan molekul yang lebih besar, seperti enzim akan tertahan di dalam membran selofan (Voet, 1995).

Tabel 4.2 Nilai Aktivitas dan Kenaikan Aktivitas Amilase Hasil Pemurnian

Fraksi Amonium Sulfat	Rata-Rata Aktivitas Amilase (U/mL)	Kenaikan Aktivitas Amilase Dibanding Ekstrak Kasar
F ₁ (20-40%)	$6,24 \times 10^{-2}$	1,2
F ₂ (40-60%)	$7,03 \times 10^{-2}$	1,3
F ₃ (60-80%)	$5,97 \times 10^{-2}$	1,1

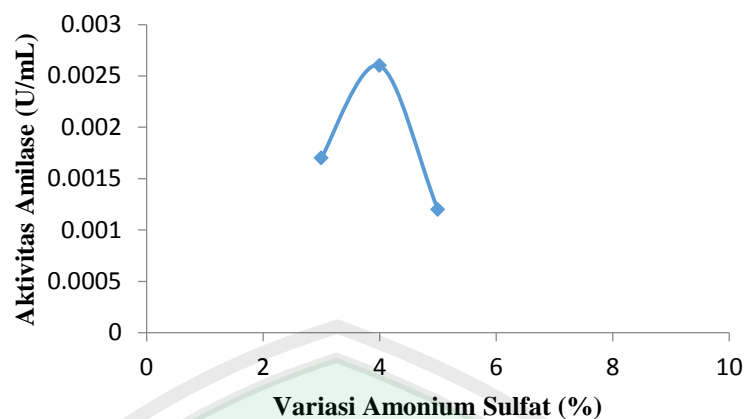
Tabel 4.2 juga menunjukkan bahwa tingkat pemurnian enzim mengalami peningkatan setelah pengendapan dan dialisis secara berturut-turut yaitu kali dan kali dibandingkan nilai aktivitas enzim kasar. Peningkatan aktivitas menunjukkan telah berkurangnya komponen protein non enzim. Peningkatan aktivitas menyebabkan tingkat kemurnian setelah dialisis mengalami peningkatan 1,2 kali, hal ini menunjukkan bahwa molekul-molekul yang mengotori telah berkurang dan tingkat kemurnian pun akan semakin meningkat dengan melakukan beberapa metode pemurnian yang lebih selektif. Tingkat kemurnian enzim amilase dapat ditentukan berdasarkan kenaikan aktivitasnya dengan aktivitas awal (aktivitas ekstrak kasar). Hal ini menunjukkan bahwa dengan penambahan ammonium sulfat ke dalam larutan enzim dengan konsentrasi tersebut, protein-protein enzim dapat mengendap secara optimum. Enzim amilase dengan aktivitas tertinggi kemudian ditentukan aktivitas spesifiknya.

Selama dialisis buffer fosfat perlu diganti pada saat mencapai kesetimbangan konsentrasi antara bagian dalam dan bagian luar dan difusi terus berlanjut. Keberadaan amonium sulfat dalam larutan buffer maka dilakukan dengan penambahan BaCl_2 . Amonium sulfat akan bereaksi dengan BaCl_2 menghasilkan endapan putih BaSO_4 . Proses dialisis dihentikan saat penambahan BaCl_2 dalam larutan buffer tidak lagi menghasilkan endapan putih BaSO_4 yang mengidentifikasi bahwa tidak ada lagi amonium sulfat yang terkandung di dalam fraksi amonium sulfat. Hal ini sesuai dengan reaksi berikut:



Enzim amilase hasil dialisis ditentukan aktivitasnya dengan metode DNS.

Aktivitas enzim amilase hasil pemurnian ditunjukkan pada gambar 4.4 berikut:



Gambar 4.4 Grafik Aktivitas Amilase pada Berbagai Fraksi Pengendapan Ammonium Sulfat

Gambar 4.4 menunjukkan bahwa dengan adanya penambahan ammonium sulfat ke dalam larutan enzim, aktivitas enzim amilase mengalami perubahan. Dengan penambahan amonium sulfat dari konsentrasi rendah, yaitu pada fraksi 20–40 % (F1) dan 40–60 % (F2), aktivitas amilase terus meningkat. Hal ini dikarenakan dengan adanya ammonium sulfat di dalam larutan ekstrak kasar enzim, ion-ion garam ammonium sulfat akan bersaing dengan protein untuk berikatan dengan molekul air sehingga protein-protein enzim banyak yang terendapkan (*salting in*). Namun pada saat penambahan ammonium sulfat dengan konsentrasi lebih tinggi, yaitu fraksi 60–80 % (F3), nilai aktivitas amilase turun. Hal ini dikarenakan protein enzim telah banyak yang terendapkan pada fraksi sebelumnya sehingga pada fraksi ini protein enzim yang berada di dalam supernatan hanya tinggal sedikit yang menyebabkan protein yang mengendap juga semakin sedikit dan aktivitasnya terus menurun (*salting out*).

4.6 Penentuan Aktivitas Enzim Amilase Menggunakan Metode DNS

Aktivitas enzim didefinisikan sebagai kecepatan pengurangan substrat atau kecepatan pembentukan produk pada kondisi optimum. Satu unit aktivitas enzim amilase merupakan kemampuan enzim amilase dalam menghidrolisis pati untuk menghasilkan 1 mg/mL glukosa pada kondisi optimum. Aktivitas enzim banyak dipengaruhi oleh beberapa faktor yang menentukan efektivitas kerja suatu enzim. Besar kecilnya aktivitas enzim amilase ini akan mempengaruhi kadar gula reduksi (glukosa) yang dihasilkan. Apabila faktor pendukung tersebut berada pada kondisi yang optimum, maka kerja enzim akan maksimal. (Lehninger, 1993).

Pengujian aktivitas amilase pada penelitian ini dilakukan dengan mereaksikan 1 mL enzim dengan 1 mL larutan soluble starch 1% dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit. Selama proses inkubasi, terjadilah reaksi antara enzim dengan substrat yang menghasilkan gula reduksi berupa glukosa. Reaksi ini merupakan reaksi hidrolisis amilosa menjadi glukosa dengan menggunakan enzim amilase. Glukosa yang dihasilkan kemudian direaksikan dengan pereaksi DNS untuk menyempurnakan reaksi yang terjadi dan untuk menstabilkan warna ditambahkan KNa-Tartrat 40 % sebelum campuran dingin. Kadar glukosa yang diperoleh inilah yang menunjukkan aktivitas ekstrak kasar amilase dalam menghasilkan glukosa.

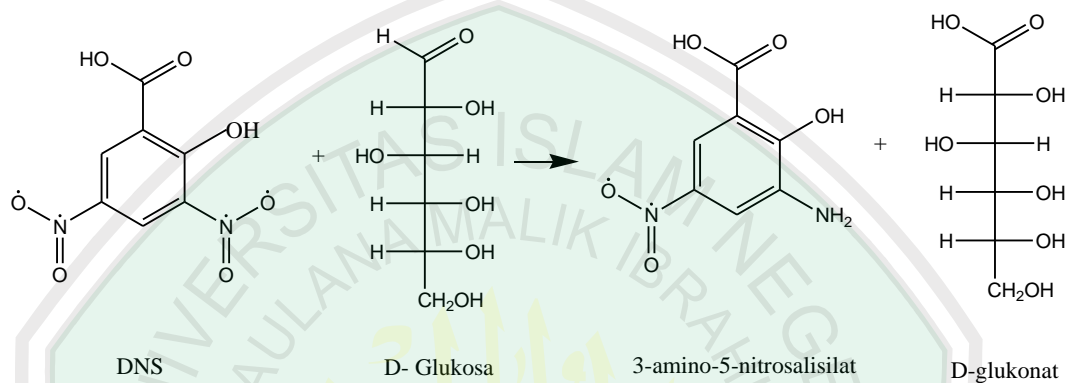
Aktivitas amilase dapat diukur dengan menggunakan metode asam 3,5 dinitrosalisilat (DNS). Komponen pereaksi DNS adalah asam dinitrosalisilat, garam *rochelle* (KNa-Tartrat), fenol, sodium bisulfit, dan natrium hidroksida. Menurut Miller (1959), komponen-komponen DNS tersebut memiliki fungsi, yaitu asam 3,5-dinitrosalisilat untuk mereduksi glukosa dalam keadaan basa yang

dibantu oleh natrium hidroksida, garam *rochelle* untuk menghilangkan pengaruh senyawa yang mengganggu sehingga kompleks warna tetap stabil, fenol berfungsi untuk stabilisasi warna yang terbentuk, dan sodium bisulfit untuk menghilangkan pengaruh oksigen terlarut yang dapat mengoksidasi glukosa produk.

Analisa ekstrak kasar enzim amilase secara kualitatif dilakukan menggunakan metode DNS. Analisa metode DNS merupakan analisis untuk menentukan kadar gula reduksi yang dihasilkan dari aktivitas enzim. Kadar gula reduksi ditentukan dengan membuat kurva standart glukosa yang berfungsi untuk mengetahui konsentrasi larutan dengan nilai absorbansinya. Kurva standart dibuat dengan ditentukan terlebih dahulu panjang gelombang maksimumnya untuk mengetahui panjang gelombang yang memberikan serapan tertinggi pada sampel saat dilakukan pengukuran absorbansi. Pada penelitian ini didapatkan pada panjang gelombang 540 nm untuk penentuan aktivitas enzim, sehingga didapat kurva standart yang merupakan persamaan garis regresi (lampiran 4) $y = 0,001x - 0,044$, dengan nilai $R^2 = 0,963$ mendekati satu antara nilai absorbansi sebagai ordinat dan konsentrasi protein DNS sebagai absis.

Uji aktivitas α -amilase dengan asam dinitrosalisilat (DNS) didasarkan pada prinsip reaksi reduksi-oksidasi. Hidrolisis pati menghasilkan molekul oligosakarida dan monosakarida yang mempunyai ujung gugus pereduksi. Ujung gugus pereduksi tersebut mampu mereduksi asam dinitrosalisilat yang berwarna kuning menjadi spesi tereduksinya yang berwarna jingga. Perubahan warna tersebut dapat ditentukan dengan analisis spektrofotometer UV-Vis. Adanya aktivitas α -amilase menghasilkan molekul oligosakarida dan monosakarida yang mempunyai gugus pereduksi. Dengan demikian, jumlah ujung gugus pereduksi

dalam larutan bertambah. Adanya penambahan jumlah ujung pereduksi ini akan mempengaruhi perubahan warna pada uji DNS. Pada uji DNS ini, larutan pati diinkubasi dengan α -amilase pada suhu optimumnya. Aktivitas α -amilase pada uji DNS ini ditentukan dengan membandingkan nilai absorbansi sampel dengan kontrol. Reaksi yang terjadi dapat dilihat pada Gambar 4.5



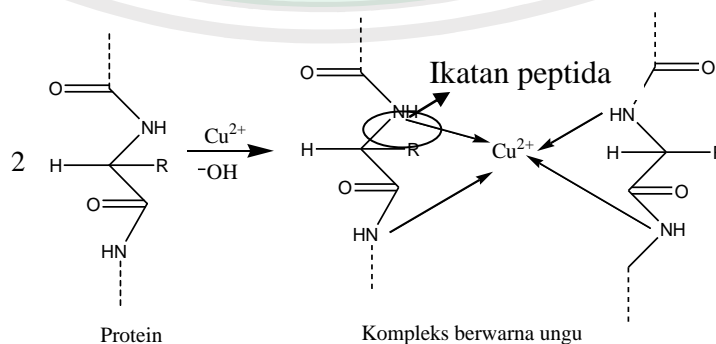
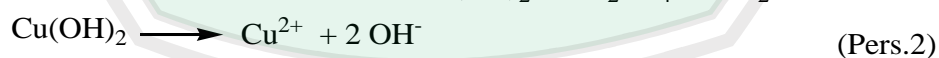
Gambar 4.5 Reaksi glukosa dengan pereaksi asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS)
(Kismiati dan Ni Nayam, 2010)

Adanya aktivitas α -amilase ditunjukkan dengan perubahan warna larutan dari kuning menjadi jingga. Hal ini disebabkan oleh reduksi gugus nitro (-NO₂) menjadi amina (-NH₂) oleh ujung gula pereduksi hasil degradasi pati oleh α -amilase. Pada pengujian aktivitas α -amilase dengan metode DNS ditentukan dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm. Semakin banyak komponen pereduksi yang terdapat dalam sampel, maka akan semakin banyak pula molekul asam 3-amino-5-nitrosalisilat yang terbentuk dan mengakibatkan serapan semakin tinggi, reaksi ini berjalan dalam suasana basa (Kismiati dan Ni Nayam, 2010). Hasil pengukuran aktivitas ekstrak kasar amilase menunjukkan ekstrak kasar amilase mempunyai rata-rata aktivitas sebesar $5,27 \times 10^{-2}$ U/mL.

4.7 Penentuan Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik Enzim Amilase dengan Metode Biuret (Aiyer, 2004 dalam Ardiansyah *et al.*, 2008)

Aktivitas spesifik adalah jumlah unit enzim permiligram protein. Aktivitas spesifik enzim amilase, digunakan untuk mengukur aktivitas amilase spesifik pada protein enzim. Aktivitas spesifik enzim dapat ditentukan dengan membagi aktivitas enzim dengan kadar proteinnya. Penentuan aktivitas spesifik enzim amilase ini hanya pada enzim amilase hasil pemurnian dengan fraksi pengendapan yang mempunyai aktivitas tertinggi yaitu fraksi F₂ (Lehninger, 1997). Kadar protein ditentukan dengan mengkonversikan serapan pada kurva standar Bovin Serum Albumin (BSA) yang sudah diketahui konsentrasinya dalam persamaan regresi linier $Y=0,0001x + 0,020$ (Lampiran 9).

Kadar protein hasil pemurnian ditentukan dengan metode Biuret. Dasar metode ini adalah pada kondisi basa. Reaksi antara protein dan reagen biuret dapat berlangsung sempurna yang ditandai dengan perubahan warna larutan dari bening sehingga terbentuk senyawa kompleks berwarna biru/ungu. Reaksi pembentukan senyawa kompleks antara protein dan reagen biuret ditunjukkan pada Gambar 4.6 berikut:



Gambar 4.6 Reaksi Dugaan Antara Protein Dan Reagen Biuret (Gilvery, 1996 dalam Mufidah, 2013)

Warna kompleks ungu atau violet terbentuk karena adanya reaksi antara Ion Cu^{2+} dari pereaksi biuret dalam suasana basa dengan polipeptida atau ikatan-ikatan peptida yang menyusun protein. Reagen biuret pada metode ini mengandung ion Cu^{2+} yang akan bereaksi dengan gugus N pada ikatan peptida protein dalam suasana basa dimana ion Cu^{2+} hanya dapat mengikat protein jika larutan dikondisikan menjadi basa, dalam hal ini NaOH pada reagen biuret merupakan agen pembuat suasana basa (Bintang, 2010).

Poliipeptida dari protein dengan dua atau lebih ikatan peptida memberikan ciri warna ungu yang muncul akibat pelarutan protein dengan kuprisulfat pada pH basa. Warna ini disebabkan karena terjadi pembentukan kompleks ion Cu(II) dengan empat atom nitrogen, dua di antara yang lain adalah dua rantai peptida. Reaksi ini sama dengan reaksi empat molekul amonia dengan Cu(II) yang memberikan ion kompleks biru kupri tetraamina. Ion amonium sangat berperan dalam penentuan pembentukan kompleks biru dengan Cu(II) dalam pereaksi biuret (Robyt dan White, 1989).

Tabel 4.3 Rata-rata Aktivitas Spesifik Amilase dengan Fraksi Ammonium sulfat 40–60 %

Fraksi Ammonium Sulfat	Aktivitas Amilase (U/mL)	Kadar Protein ($\mu\text{g/mL}$)	Aktivitas Spesifik Amilase (U/ μg)
40–60 %	$2,14 \times 10^{-2}$	577,7	$3,71 \times 10^{-5}$

Tabel 4.3 menunjukkan bahwa aktivitas spesifik amilase nilainya lebih kecil dari aktivitas amilase. Hal ini disebabkan pengukuran aktivitas amilase lebih spesifik pada protein enzim sehingga aktivitas spesifik diperoleh dengan mengukur aktivitas amilase per kadar protein yang dikandungnya.

Hasil pemurnian secara parsial menggunakan ammonium sulfat dengan konsentrasi 40–60 % terhadap enzim amilase dari bakteri amilolitik endogenous bekatul (hasil isolasi dari penelitian (Asadullah, 2014) pada penelitian ini nilainya lebih rendah bila dibandingkan dengan aktivitas enzim amilase pada penelitian sebelumnya. Wardani (2012) menyebutkan hasil purifikasi parsial enzim yang diendapkan dengan ammonium sulfat mempunyai nilai aktivitas spesifik enzim 7.13 U/mg dengan tingkat kemurnian 12.96 kali dibandingkan enzim kasar. Selain itu Sinatari *et al.*, (2013) menyebutkan bahwa aktivitas spesifik ekstrak kasar selulase sebesar 0,212 Unit/mg protein, sedangkan aktivitas spesifik selulase yang paling tinggi berada pada fraksi 2 (20–40 % amonium sulfat) meningkat 3,5 kali dari aktivitas spesifik ekstrak kasar enzimnya yaitu sebesar 0,749 U/mg protein.

4.8 Hasil Penelitian dalam Perspektif Islam

Pemurnian ekstrak kasar amilase dari isolat amilolitik (hasil isolasi dari penelitian (Asadullah, 2014) ini bertujuan untuk meningkatkan aktivitas enzim amilase dalam menghasilkan glukosa. Upaya pemanfaatan limbah ini berupa mengkonversikan bekatul menjadi glukosa yang dapat memberikan manfaat pada manusia berupa produk misalnya obat-obatan, beberapa produk pangan lainnya.

Allah SWT menerangkan dalam firmannya surat ar Rahman ayat 10 – 13:

وَالْأَرْضُ وَضَعَهَا لِلْأَنَامِ ﴿١٠﴾ فِيهَا فَكِّهَةٌ وَالنَّخْلُ ذَاتُ الْأَكْمَامِ ﴿١١﴾ وَالْحَبُّ ذُو الْعَصْفِ وَالرَّيْحَانُ ﴿١٢﴾ فَبِأَيِّ آلَاءِ رَبِّكُمَا تُكَذِّبَانِ ﴿١٣﴾

Artinya:” Dan bumi telah dibentangkannya untuk makhluknya. Didalamnya ada buah-buahan dan pohon kurma yang mempunyai kelopak mayang. Dan biji-bijian yang berkulit dan bunga-bunga yang harum baunya. Maka nikmat Rabb-mu yang manakah yang kamu dustakan (QS. 55 : 10-13).

Berdasarkan ayat diatas ‘Ali bin Abi Thalhah meriwayatkan dari Ibnu ‘Abbas r.a mengenai *والْحَبُّ وَالْعَصْفُ* “Dan biji-bijian yang berkulit, ”ia mengatakan:“Yakni, kulit yang menutupinya”. Dan yang dimaksud “*Maka nikmat Rabb-mu yang manakah yang kamu dustakan?*” Maksudnya, nikmat Rabb kalian yang manakah wahai sekalian manusia dan jin yang kalian dustakan? Demikian penafsiran yang diberikan oleh Mujahid dan beberapa ulama lainnya. Hal itu pula yang ditunjukkan oleh susunan ayat setelahnya. Dengan kata lain, nikmat-nikmat sudah sangat jelas bagi kalian, sedang kalian bergelimang dengannya tanpa dapat mengingkari dan mendustakannya (Katsir, 2006). Maksud dari biji-bijian yang berkulit adalah segala jenis tanaman yang menghasilkan biji-bijian yang memiliki kulit pelindung, yang akan menjaga rasa, warna, aroma serta kandungan nutrisinya seperti padi, gandum dan lain sebagainya.

Ayat diatas dapat diketahui bahwa Allah menciptakan segala sesuatunya pasti ada manfaatnya. Menurut ekologi memang tidak ada makhluk yang percuma diciptakan oleh Allah Swt dalam al Qur’an surat asy Syu’ara ayat 7:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَىٰ الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِن كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

Artinya: “Dan Apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?” (QS asy Syu’ara: 7).

Dalam tafsir Al-Qurthubi (Muhyidin, *et al.*, 2005) dijelaskan bahwa Allah memperingatkan akan keagungan dan kekuasaan-Nya, bahwa jika mereka melihat dengan hati dan mata mereka niscaya mereka mengetahui bahwa Allah adalah yang berhak untuk disembah, karena Maha Kuasa atas segala sesuatu. Manusia yang memiliki pemahaman yang terbatas tentang penciptaan alam semesta ini

hanya menjadi hiasan semata di bumi atau bahkan hanya menjadi pengganggu, tidak ada nilai yang lebih berharga yang bisa diambil dan dimanfaatkan.

Hikmah dari penelitian ini menjelaskan bahwa setiap makhluk hidup saling bergantung satu sama lain seperti bakteri amilolitik yang dapat tumbuh subur pada bekatul yang kaya akan amilosa, semata-mata demi kebutuhan manusia dalam pemanfaatan enzim amilase dalam produksi glukosa. Limbah ini sebenarnya bisa dimanfaatkan untuk menghasilkan produk dengan nilai ekonomis lebih tinggi bila dibandingkan hanya untuk pakan ternak saja.



BAB V

KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil pembahasan dapat disimpulkan bahwa ada pengaruh konsentrasi amonium sulfat terhadap aktivitas enzim amilase. Didapatkan hasil berturut-turut fraksi amonium sulfat F₁ (20-40%) $6,24 \times 10^{-2}$, F₂ (40-60%) $7,03 \times 10^{-2}$, F₃ (60-80%) $5,97 \times 10^{-2}$. Amilase dalam bentuk ekstrak kasar memiliki aktivitas sebesar $5,27 \times 10^{-2}$ U/mL, setelah dimurnikan dengan (NH₄)₂SO₄ meningkat 1,2 kali dari aktivitas ekstrak kasarnya. Aktivitas spesifik enzim hanya pada enzim amilase yang mempunyai aktivitas tertinggi yaitu F₂ dengan cara membagi aktivitas amilase dengan kadar proteinnya. Aktivitas amilase $2,14 \times 10^{-2}$ (U/mL) dan kadar protein 577,7 (μg/mL) dan didapatkan aktivitas spesifik amilase $3,71 \times 10^{-5}$ U/μg.

5.2 Saran

Untuk melengkapi dan menyempurnakan penelitian ini disarankan untuk melakukan penelitian lanjutan sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan uji kualitatif protein enzim hasil pemurnian menggunakan elektroforesis SDS-PAGE
2. Enzim amilase hasil pemurnian perlu diaplikasikan untuk hidrolisis pada berbagai substrat yang mengandung pati untuk menghasilkan glukosa

DAFTAR PUSTAKA

- Aiyer, P.V.D, 2004, *Effect Of C:N Ratio On Alpha Amylase Production By Bacillus Licheniformis SPT 27*, African J. Of Biotechnology, Vol 3 (10) : 519-522.
- Aklyosov. 2004. Principles of The Enzymatic Degradation of Cellulosa. http://aklyosov.home_comlast.net/volume.2.htm Diakses 1 Januari 2012
- Anonymous. 2012. <http://bisakimia.com>. Diakses tanggal 10 Oktober 2013.
- Apriyantono, A., Fardiaz, D., Puspitasari, N.L, Sedarnawati, dan Budiyanto, S. 1983. *Petunjuk Laboratorium Analisis Pangan*. Bogor: IPB Press
- Apun, K., Jong, B. C. dan Salleh, M. A. 2000. Screening and Isolation of a Cellulolytic and Amylolytic Bacillus From Sagu Pith Waste. *General Application Microbial* 46: 263-267.
- Ardiansyah. 2013. *Mengenal Bekatul Lebih Jauh*. diakses tanggal 4 juni 2013.
1997. *Proses Ekstrusi Untuk Pengolahan Hasil Samping Penggilingan Padi (Menir dan Bekatul)*. Prosiding Seminar Tek. Pangan. IPB tidak diterbitkan.
- Ardiansyah. 2010. Bekatul Sumber Prebiotik (Laboratory of Nutrition, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University-Sendai, Jepang dan Departemen Gizi Masyarakat, FEMA-IPB). Diakses 15 Juli 2013.
- Asadullah, M. 2014. *Isolasi Bakteri Amilolitik Dari Bekatul Dan Uji Kemampuan Untuk Produksi Enzim Amilase Kasar Pada Berbagai Jenis Media Produksi*. Skripsi.UIN press. Malang
- Astuti, dan Rahmawati, A. 2010. Asimilasi Kolesterol dan Dekonjugasi Garam Empedu oleh Bakteri Asam Laktat (BAL) dari Limbah Kotoran Ayam Secara In Vitro. *Prosiding Seminar Nasional Penelitian, Pendidikan dan Penerapan MIPA*. Jurusan Pendidikan Pendidikan Biologi FMIPA UNY.
- Aulanni'am. 2005. *Protein dan Analisisnya*, Malang: Citra Mentari Grup.
- Bailey, J. E. 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals* 2nd Edition. USA: Mc Graw-Hill Inc.
- Ballschmiter, M., Futterer, O., dan Liebl, W. 2006, *Identification and Characterization of a Novel Intracellular Alkaline α -Amylase from The Hyperthermophilic Bacterium Thermotoga maritima MSB8*, Appl. and Env. Microbiol, Vol 72 (3) : 2206-2211.
- Bintang, M. 2010. *Biokimia: teknik penelitian*. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Bollag DM, Endelstein SJ. 1991. *Protein Methods*. New York: Wiley-Liss.
- Brock., Michael TM., Jhon MM., and Jack P. 1986. *Biology of Microorganism*. Science Hill Inc. New Jersey.

- Brock, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J. M., and Parker, J. 1986. *Biology of Microorganism*. New York: Prentice-Hall International, Inc.
- Channel, Richard. 1998. *Natural Product Isolation*. New Jersey: Humana press
- Chaplin MF, Bucke C. 1990. *Enzyme Technology*. New York: Cambridge Univ.
- Corderio CA, Martin ML & Luciano AB. 2002. *Production and properties of α -amylase from thermophilic Bacillus sp. Brazilian Journal of Microbiology*. 33: 57-61.
- De Pa Dua, L.S., N.Bunyapraphatsara R.H.M.J Lemmens. 1999. Plant research of South – East Asia : Medicinal and Poisonous Plant I. Prosea. No: 12 (1). 705 hal.
- Dybkaer, R. 2001. Unit "Katal" for Catalytic Activity. *J Pure Appl Chem* 73: 927–931
- Fennema OR, 1985. *Food Chemistry*. New York: McGraw-Hill.
- Fessenden, 1986. *Kimia organik Jilid 2*. Jakarta: Erlangga
- Fossi, B.T., Tavea, F., dan Ndjouenkeu, R. 1995. *Production and Partial Characterization of a Thermostable Amylase from Ascomycetes Yeast Strain Isolated from Starchy Soils. African J. of Biotechnology* Vol. 4 (1):14-18.
- Hamdiyati, Y. 2001. *Pertumbuhan dan Pengendalian Mikroorganisme*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Handayani D., Mubarik NR., dan Listiyawati S. 2002. *Isolasi dan Karakterisasi Amilase Ekstra Seluler dari Kapang Asal Limbah Cair Tapioka*.
- Harris ELV.1989. *Protein Purification Methods: A Practical Approach*. England: IRS Press
- Hayati, E.K. 2007. *Buku Ajar Dasar-Dasar Analisis Spektroskopi*. Malang: KJM UIN Malang.
- Houston, D.F. 1972. *Rice: Chemistry and Technology*. St. Paul, MN: The American Association of Cereal Chemist Inc.
- Indah, S. 2009. Pra Rancangan Pabrik Pembuatan Glukosa Dari Pati Jagung Dengan Proses Hidrolisa Dengan Kapasitas 12000 Ton/Tahun. *Skripsi Teknik Kimia*. Medan: USU Reporatory.
- Irianto, K. 2007. *Mikrobiologi: Menguak Dunia Mikroorganisme*. Bandung: CV. Yrama Widya.
- Jenni R. 2003. *Program Enzim Selulase-Hemiselulase pada Proses Drinking Kertas Koran Bekas*. *Jurnal Matematika dan Sain*. 8 : 67-71.
- Katsir, I. 2006. *Shahih Tafsir Ibnu Katsir*. Jilid 2. Penerjemah: Abu Ihsan al-Atsari, dkk. Bogor: Pustaka Ibnu Katsir
- Khopkar, 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.

- Kristanti ND. 2001. Pemurnian parsial dan karakterisasi lipase ekstraseluler dari kapang r. *Oryzae* TR 32 /tesis/. Bogor: program pascasarjana Ilmu Pangan, Institut Pertanian Bogor.
- Kombong, H . 2004. Evaluasi Daya Hidrolitik Enzim Glukoamilase dari Filtrat Kultur *Aspergillus niger*. *Jurnal Ilmu Dasar*. 5: 16–20
- Lawati, Nuni. 2013. Pemurnian parsial dan karakterisasi enzim kitinase dari *Beauveria bassiana*. *Skripsi*. Bogor: Program Studi Biokimia FMIPA Institut Pertanian Bogor.
- Lehninger, A. L. 1993. *Biochemistry*. New York: Worth Publisher Inc
- Lehninger, A. L. 1997. *Biochemistry*. New York: Worth Publisher Inc.
- Lestari, P. 2000. Eksplorasi Enzim Termotabil dari Mikroba Termofil, fakultas Biologi, Univ. Jendral Sudirman, Purwokerto. J. Hayati. 17: 21-25
- Maier, R. M., Pepper, I. L., dan Gerba, C. P. 2000. *Environmental Microbiology*. London: Academic Press.
- Mayes, P.A., granner DK., Rodwell, V,W., dan Martin, D.W. 1990. *Biokimia Harper Edisi 20*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran.
- Miller GL, 1959. *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. *Anal. Chem.*, 31: 426–428.
- Muawanah, Anna. 2006. Produksi Enzim Xilanase Termotabil dari *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 pada Substrat Bagasse Tebu. *Skripsi*. Bogor: Program Studi Ilmu Pangan Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Muchtadi S., Nurleni., dan Made. 1992. *Enzim dalam Industri Pangan*. Institut Pertanian Bogor. Bandung.
- Muhyidin MR. 2009. *Tafsir Al-Qurthubi*. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Murray, Robet K., et al. 2006. *Biokimia Harper edisi 27*. Jakarta : EGC
- Mutia, Y., Evi, A., dan Susila, A,R., 2013, pengaruh Kandungan CaO dari jenis Adsorben Semen terhadap Kemurnian Gliserol, *Journal Teknik Kimia*, 19 (2) : 33-42
- Naiola, E. 2008. *Isolasi dan Seleksi Mikroba Amilolitik Dari Makanan Fermentasi Ragi Tapai Gambut Di Kalimantan Selatan*. Berk. Penel. Hayati 13 : 109 – 114.
- Palmer, T. 1985. *Understanding Enzyme 3rd*. New York: Ellishorwood Publisher.
- Pelszar, M. J. and Chan, E. C. S. 2008. *Elements of Microbiology*. New York: Mc Graw Hill Book Company.
- Poedjiadi, A., dan Suprayanti, T. 2006. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: UI Press

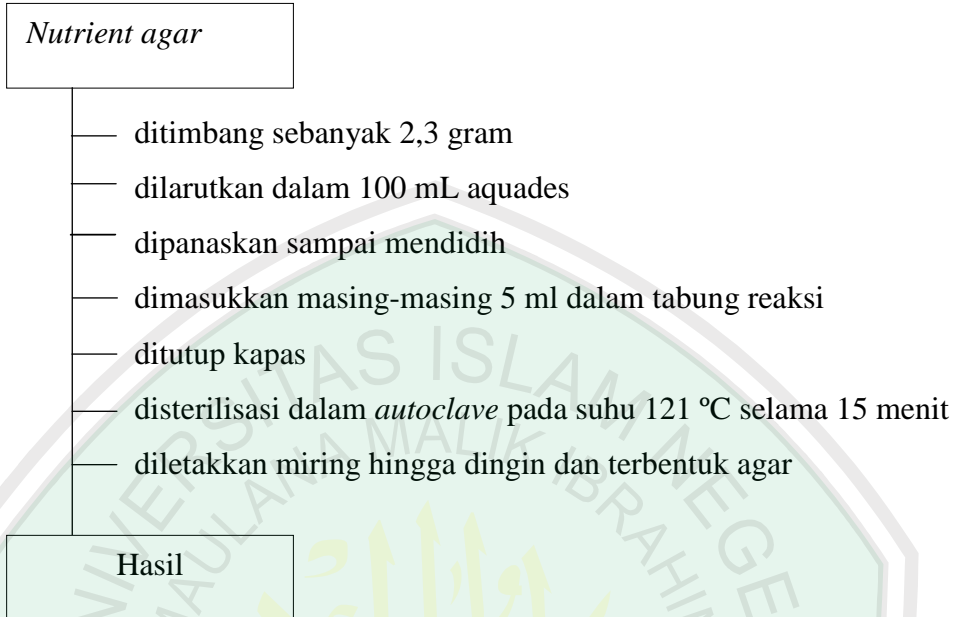
- Poernomo AT., dan Joko DA. 2003. *Uji Aktivitas Crude Enzim Proteolitic Bacillus substilis FNCC 0059 Hasil Fermentasi Curah*. Majalah Farmasi Erlangga. 3 : 103-107.
- Prescott, S. C. dan C. G. Dunns. 1981. *Industrial Microbiology*. Wesport. Conecticut: The AVI Publishing Co. Inc
- Rachman, A. 1989. *Pengantar Teknologi Fermentasi*. Bogor: IPB
- Reddy, N.S *et al.*, 2003. *An Overview Of The Microbial α -Amylase Family*, African J. Of Biotechnology. Vol 2 (12): 645-648
- Rohman, Abdul dan Ganjar, I. 2010. *Analisis Obat Secara Spektrofotometri dan Kromatografi*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Rosmimik., Richana N., Lestari P dan Said J. 2011. *Studi Penambahan Ion Kalsium Terhadap Aktivitas dan Stabilitas α -amilase Bacillus Stearothermophilus T II-12*. Mikrobiol Indonesia. 6 : 12-14.
- Santos EO, and Martins ML. 2003. *Effect Product of the Medium Composition on Formation of Amylase by Bacillus sp.* Brazilian Arch Biol Technol. 46 : 129 – 134.
- Scopes RK. 1987. *Protein Purification Principles and Practice*. Edisi ke-2. New York: SpingerVerlag
- Sebayang, F. 2005. *Isolasi dan Pengujian Aktivitas Enzim α -amilase dari Aspergillus niger dengan Menggunakan Media Campuran Onggok dan Dedak*. Jurnal Komunikasi Penelitian Volume 17 (5).
- Shahib MN. 1992. *Pemahaman Seluk Beluk Biokimia dan Penerapan Enzim*. Citra Aditya Bakti.
- Shaw, J.F., Lin, F.P., Chen, S.C., dan Chen, H.C. 1995, *Purification and Properties of an extracellular α - amylase from Thermus sp.*, Bot. Bull. Acad. Sin, Vol. 36: 195–200.
- Sinatari dkk. 2013. *Pemurnian Selulase Dari Isolat Kb Kompos Termofilik Desa Bayat Klaten Menggunakan Fraksinasi Amonium Sulfat*. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Diponegoro: *Chem Info* Vol 1, No 1, Hal 130 - 140 , 2013
- Somogyi, M. 1952. Notes on Sugar Determination. *Journal of Biological Chemistry* vol. 200, No. 1, 19-23.
- Standbury PF, Whitaker A. 1984. *Principle of Ferm Tecnology*. New York: Perguson Press.
- Sudarmaji *et al.* 1989. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Penerbit Liberty.
- Sudiana, I. M., Kanti, A., Rahmansyah, M., Widawati, S., Suliasih, Rahayu R. W., dan Imanuddin, H. 2002. *Populasi dan karakterisasi bakteri selulolitik yang diisolasi berbagai ketinggian lokasi di taman nasional gunung Halimun*.

Laporan teknik proyek inventarisasi dan karakterisasi sumberdaya hayati. Indonesia: Puslit biologi-LIPI.

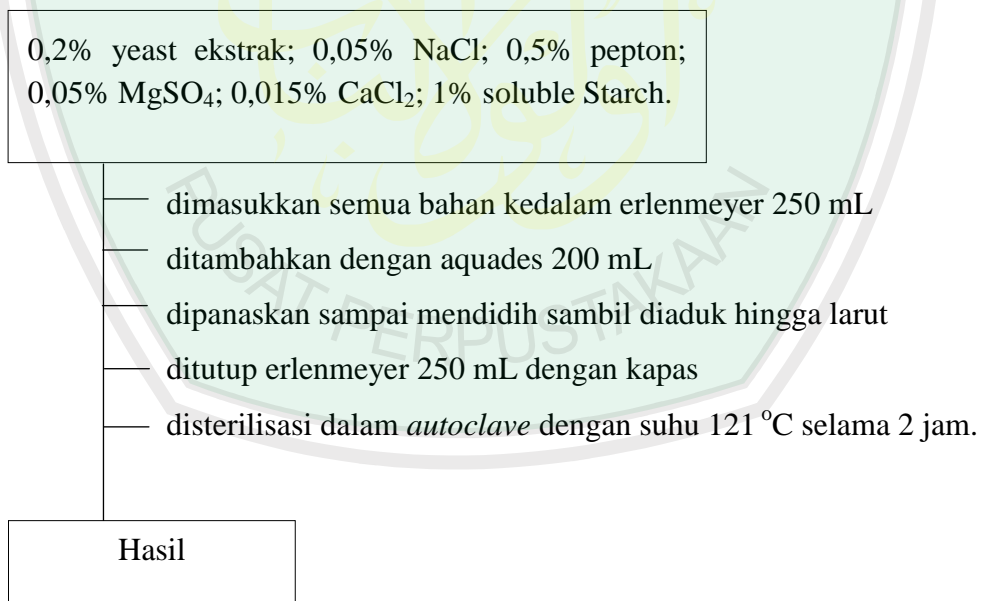
- Suhartono MT. 1989. *Enzim & Bioteknologi.* Bogor: Pusat Antar Universitas Bioteknologi. IPB
- Suprpti, L. 2003. Studi Karakteristik Sifat Fisik dan Kimia Tepung Beberapa varietas Ubi jalar (*Ipomea batatas L.*). Skripsi tidak diterbitkan. Malang: Jurusan Teknologi Hasil Pertanian F.T Unibraw.
- Tortora, G., Fince, B. R. and Case, C. L. 2001. *Introduction Microbiologi* edisi 7. San Fransisco Spanyol: Addison Weasly angman.
- Tresnawati T., dkk. 2004. *Isolasi Bakteri Amilolitik Toleran pH 9 Dari Tanah Di Taman Wisata Alam Situ Gunung Sukabumi.* PKMI tidak terbit. IPB Bogor.
- Wardani, A., Ahsanatun S. 2012. *Purifikasi dan Strategi Enzim.* Yogyakarta: universitas Gadjah mada.
- Wage, JR, L.G, 1995. *Organic Chemistry Third Edition.* IncNew Jersey United State of America: Prentice-hall
- Webb EC, Dixon M. 1979. *Enzymes.* New York: Academic Press
- Wijesekera, R.O.B. 1991. *The Medicinal Plant Industry.* CRC Press, London. 236 hal.
- Whittaker JR. 1994. *Principles of Enzymology for the Food Sciences.* New York: marcel Dekker Inc.
- Winarno FG. 1986. *Enzim pangan.* Gramedia. Jakarta.
- Yuliar. 2008. *Skrining Bioantagonistik Bakteri untuk Agen Biokontrol Rhizoctonia dan Kemampuannya dalam Menghasilkan Surfaktin.* Biodiversitas Vol. 9 : 83-86.
- Yazid dan Nursanti. 2006. *Penuntun Praktikum Biokimia Untuk Mahasiswa Analis.* Yogyakarta : Penerbit Andi

Lampiran 1. Diagram Alir Penelitian

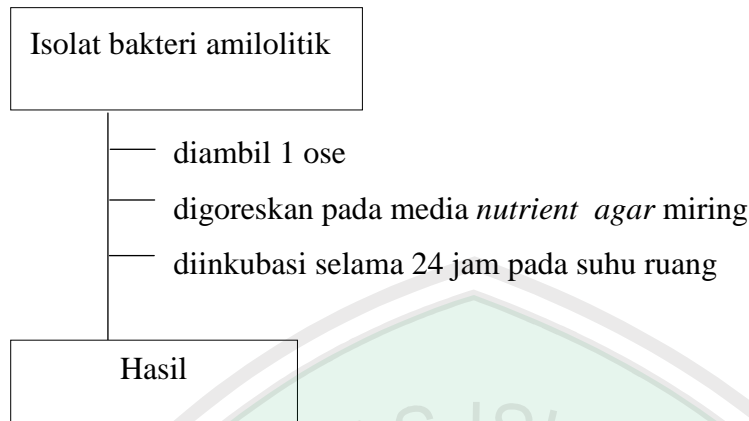
L.1.1 Pembuatan media *Nutrient Agar*



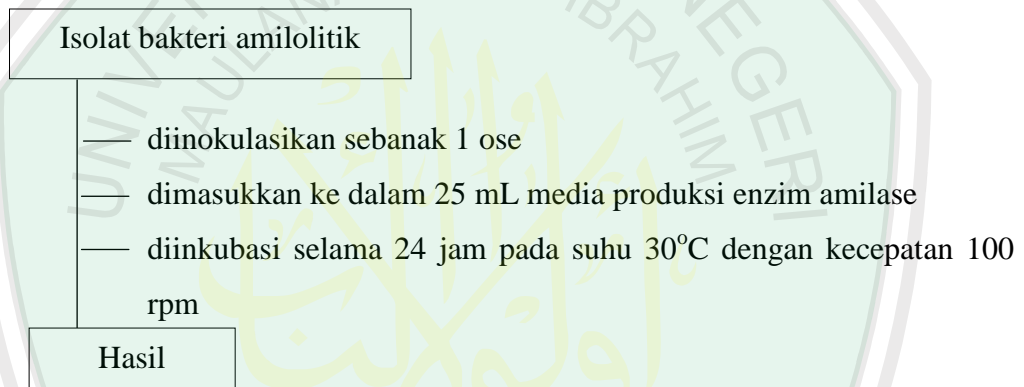
L.1.2 Pembuatan media produksi Enzim Amilase



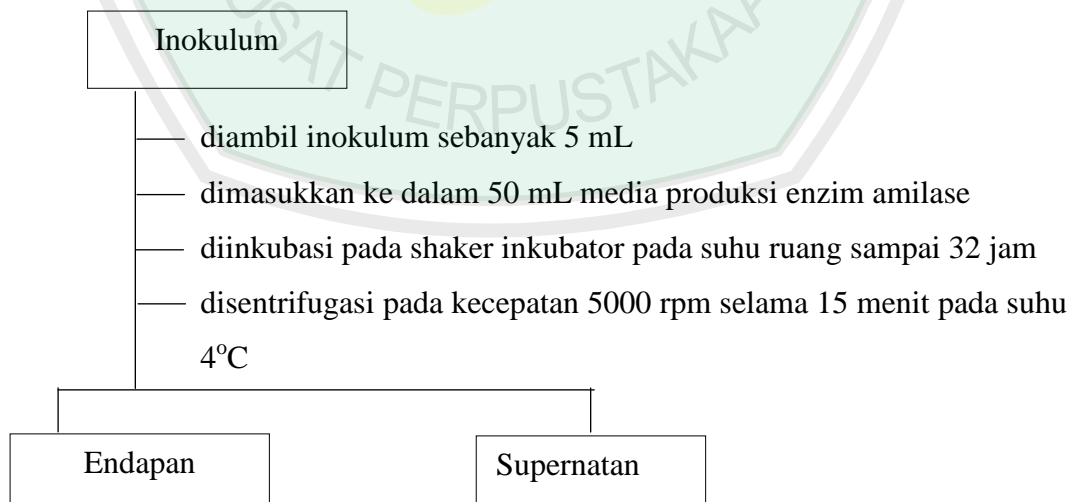
L.1.3 Peremajaan Isolat



L.1.4 pembuatan Inokulum



L.1.5 Produksi Enzim Amilase



L.1.6 Pengukuran Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Amilase dengan Metode DNS

L.1.6.1 Penentuan Panjang Gelombang

Larutan glukosa 100 ppm

- diambil 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- di tambahkan 1 mL DNS dan dihomogenkan
- ditutup dengan alumunium foil
- dipanaskan dalam air mendidih selama 5-15 menit sampai larutan berwarna merah kecoklatan
- ditambahkan 1 mL larutan Kna-Tartrat 40%
- didinginkan tabung dan ditambah dengan aquades hingga volume menjadi 10 mL dan dihomogenkan
- diukur pada panjang gelombang 500-550nm dengan interval 10 pada spektrofotometer UV-Vis

Hasil

L.1.6.2 Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Larutan glukosa 0, 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm

- dipipet 1 mL dan dimasukkan kedalam tabung reaksi
- ditambah 1 mL reagen DNS
- dihomogenkan
- ditutup mulut tabung dengan alumunium foil
- dipanaskan dalam air mendidih selama 5-15 menit
- ditambahkan 1 mL larutan k-Na-Tartrat 40%
- didinginkan dan ditambah aquades sampai volumenya 10 mL
- dihomogenkan

Hasil

L.1.6.3 Analisa Glukosa

Ekstrak kasar enzim amilase

- dipipet 1 mL dan dimasukkan kedalam tabung reaksi
- dicampur dengan 1 mL larutan substrat
- diinkubasi selama 40 menit pada suhu 50 °C
- diambil 1 mL campuran larutan enzim-substrat
- ditambahkan 1 mL reagen DNS dan dihomogenkan
- dipanaskan dalam air mendidih selama 5-15 menit
- ditambahkan 1 mL K-Na-Tartrat 40%
- didinginkan dan ditambah aquades sampai volumenya 10 mL
- divortex kemudian didiamkan
- ditentukan serapannya pada panjang gelombang 540 nm

Hasil

L.1.7 Pemurnian Ekstrak Kasar Enzim Amilase (Monika, 2007)

L.1.7.1 Pengendapan fraksi 20–40 %

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

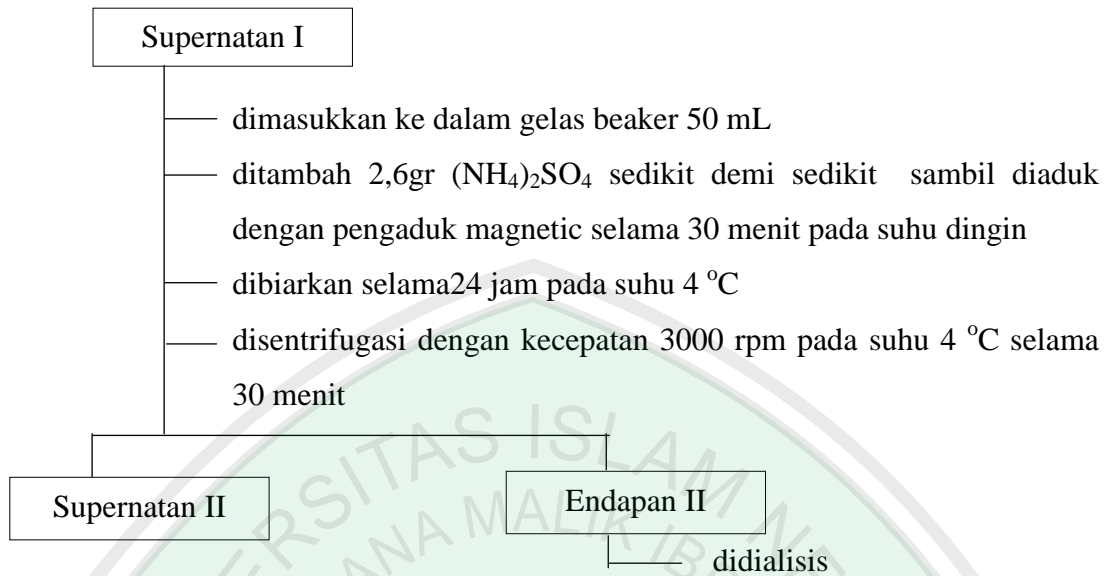
- ditimbang sebanyak 2,42 gr
- dimasukkan dalam beaker gelas yang berisi 20 mL ekstrak kasar amilase sedikit demi sedikit dengan pengaduk magnetik 30 menit pada suhu dingin
- didiamkan selama 24 jam pada suhu 4 °C
- disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4 °C selama 30 menit

Supernatan I

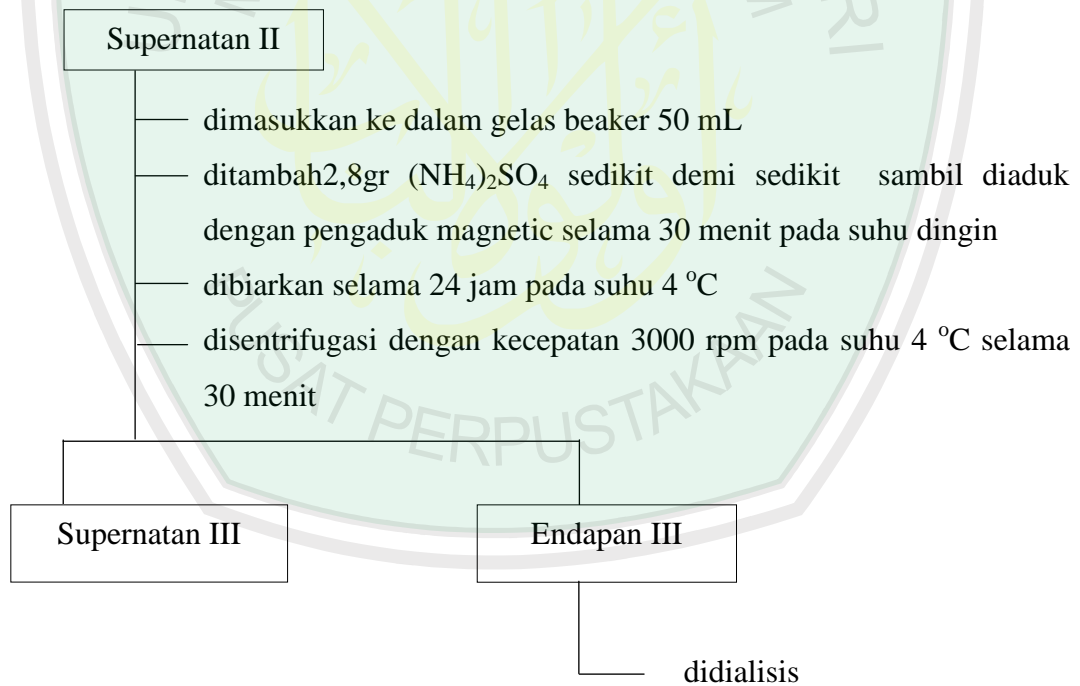
Endapan I

— didialisis

L.1.7.2 Pengendapan fraksi 40–60 %

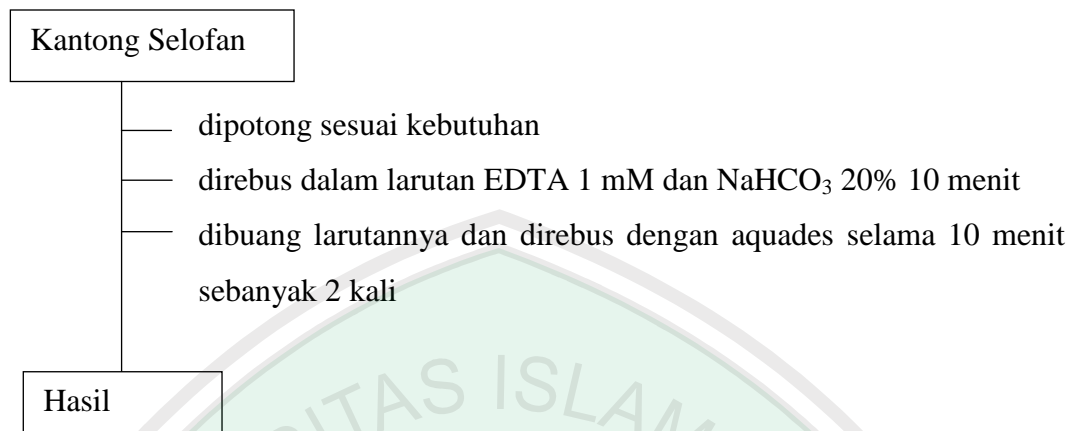


L.1.7.3 Pengendapan fraksi 60–80 %

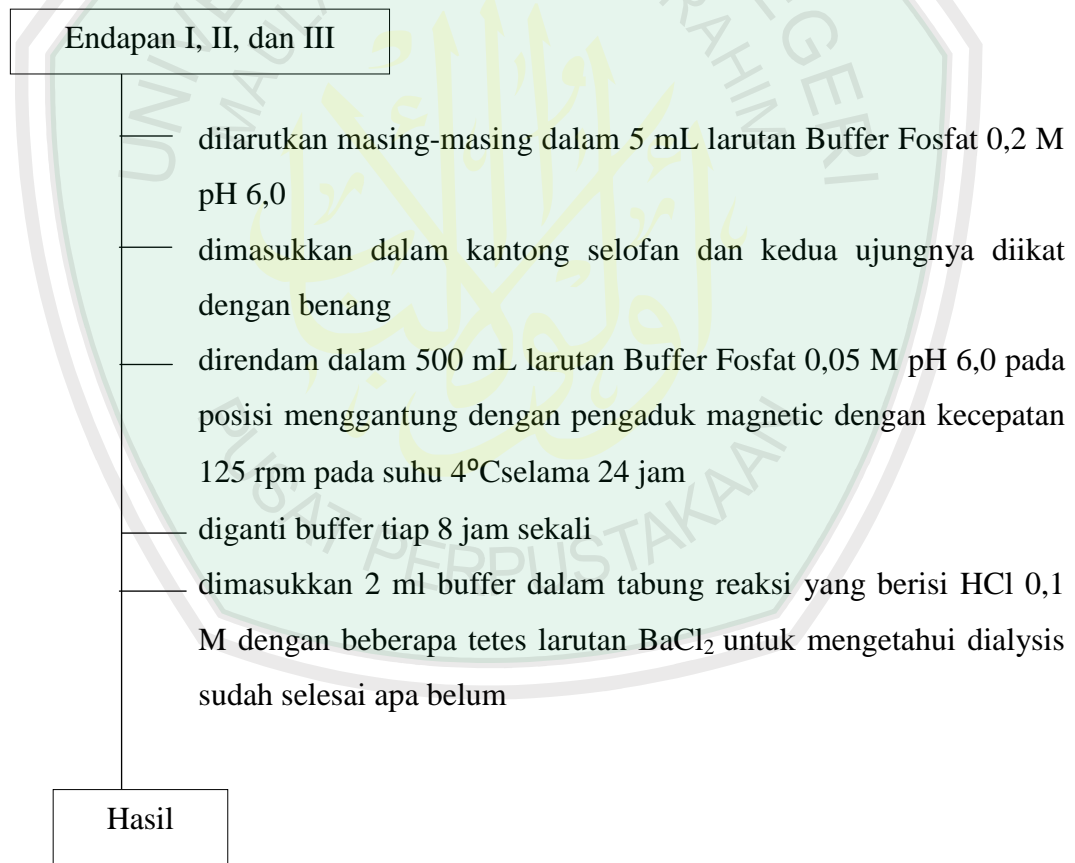


L.1.7.6 Dialisis

L.1.7.6.1 Pretreatment Kantong Selofan

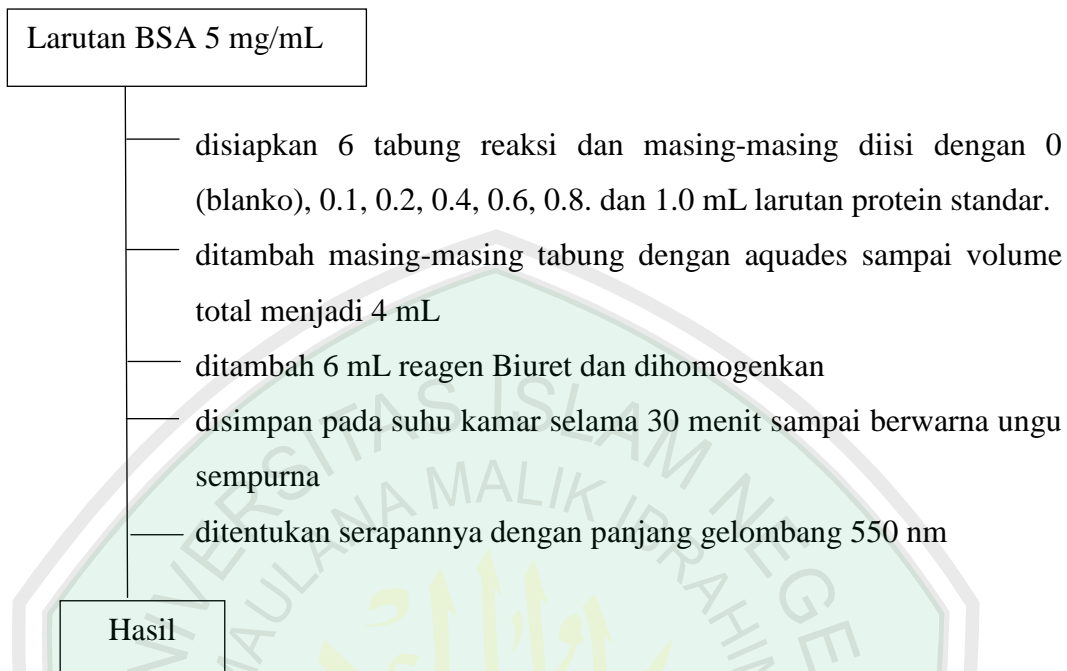


L.1.7.6.2 Dialisis

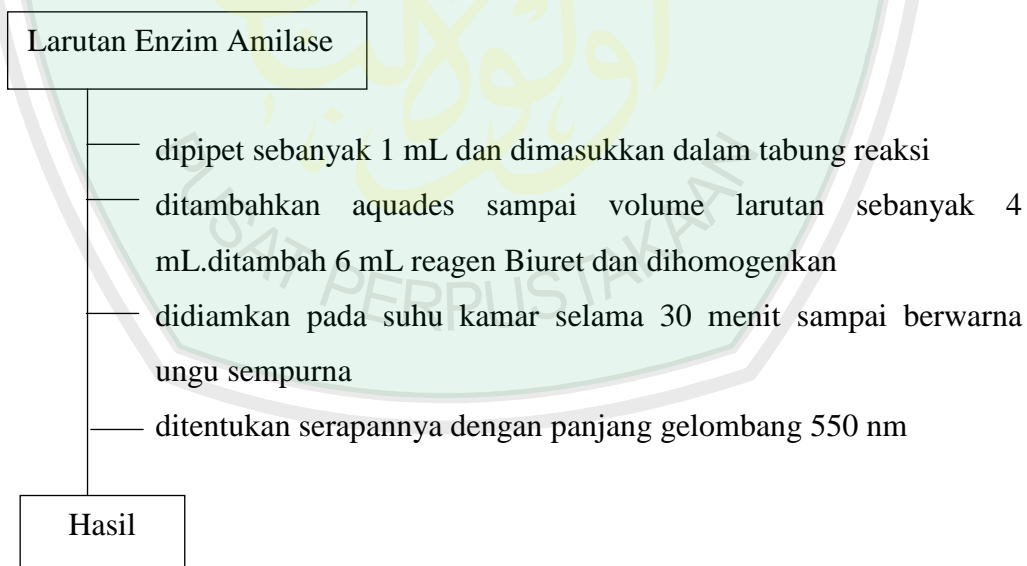


L.1.8 Pengukuran Kadar Protein Amilase Metode Biuret (AOAC, 1995)

L.1.8.1 Pembuatan Kurva Standar BSA



L.1.8.2 Penentuan Kadar Protein dalam Enzim Amilase



Lampiran 2. Pembuatan Reagen

L.2.1. Pembuatan Media untuk Produksi Enzim Amilase

Media yang digunakan untuk produksi enzim amilase dengan komposisi 0,2% yeast ekstrak, 0,5% pepton, 0,05% NaCl, 0,05% MgSO₄, 0,05% CaCl₂, 2% bacteriological agar dan 1% *soluble starch* (Santos dan Martin, 2003). Kemudian ditambahkan dengan aquadest sebanyak 1000 mL, dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut, kemudian media tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL, kemudian disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 2 jam.

L.2.2. Pembuatan Larutan Standart Glukosa

Cara membuat larutan stok glukosa standart 100 ppm adalah:

$$100 \text{ ppm} = \frac{1 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} = \frac{10 \text{ mg}}{100 \text{ mL}}$$

untuk membuat larutan standart 100 ppm diperlukan 10 mg glukosa anhidrat, dilarutkan dengan aquades dan ditandabatkan dalam labu takar 100 mL. Kemudian larutan glukosa dengan konsentrasi 0; 2; 4; 6; 8 dan 10 ppm sebanyak 100 mL dibuat sesuaidengan menggunakan rumus pengenceran sebagai berikut :

- a. Konsentrasi 200 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 100 \text{ ppm} = 100 \times 200 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 2 \text{ mL}$$

b. Konsentrasi 300 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 100 \text{ ppm} = 100 \times 300 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 4 \text{ mL}$$

c. Konsentrasi 400 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 100 \text{ ppm} = 100 \times 400 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 6 \text{ mL}$$

d. Konsentrasi 500 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 100 \text{ ppm} = 100 \times 500 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 8 \text{ mL}$$

e. Konsentrasi 600 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 100 \text{ ppm} = 100 \times 600 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 10 \text{ mL}$$

L.2.3. Pembuatan Larutan Standar BSA

$$\text{BSA } 5 \text{ mg/mL} = \frac{5 \text{ mg}}{1 \text{ mL}} = \frac{500 \text{ mg}}{100 \text{ mL}}$$

Untuk pembuatan 100 mL larutan BSA 5 mg/mL dibutuhkan 500 mg BSA, dilarutkan dengan aquades dan ditanda bataskan dalam labutakar 100 mL.

L.2.4. Pembuatan Reagen DNS (Miller, 1959)

Ditimbang asam 3-5 dinitrosalisilat sebanyak 1 gram, 0,2 gram fenol, 0,05 gram sodium sulfit, dan 1 gram natrium hidrosida. Kemudian semua bahan dilarutkan dengan akuades dalam labutakar 100 mL dan ditera. Sebanyak 1 mL garam Rochelle 40 % ditambahkan segera setelah terbentuknya kompleks warna antara DNS dan gula pereduksi hasil hidrolisis .

L.2.5. Pembuatan Reagen Biuret (AOAC, 1995)

Reagen biuret dibuat dengan melarutkan 0,15 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan 0,6 g KNa-Tatrat dalam labu ukur 50 mL. kemudian larutan ditambah 30 mL NaOH dan digenapkan dengan aquades dalam labu ukur 100 mL.

L.2.6. Pembuatan Larutan buffer Fosfat 0,2 M (Latifah, 2013)

L.2.7.1. Larutan NaH_2PO_4 0,2 M

Larutan ini diperoleh dengan persamaan sebagai berikut:

$$M = \frac{\text{massa}}{Mr} \times \frac{1000}{V_{\text{pelarut}}}$$

$$0,2 = \frac{\text{massa}}{120} \times \frac{1000}{1000}$$

$$\text{massa} = 24 \text{ gram}$$

untuk membuat larutan sebanyak 1000mL diperlukan 24 gram NaH_2PO_4 0,2 M dilarutkan dengan aquades dan ditandabataskan dalam labu ukur 1000 mL.

L.2.7.2. Larutan Na₂HPO₄ 0,2 M

Untuk membuat 1000 mL larutan Na₂HPO₄ massa yang harus diambil adalah:

$$M = \frac{\text{massa}}{Mr} \times \frac{1000}{V_{\text{pelarut}}}$$

$$0,2 = \frac{\text{massa}}{142} \times \frac{1000}{1000}$$

$$\text{massa} = 28,4 \text{ gram}$$

sebanyak 28,4 gram Na₂HPO₄ dilarutkan dengan aquades dan ditandabatkan dalam labu ukur 1000 mL.

L.2.7.3. Pembuatan Larutan Buffer Fosfat 0,2 M pH 6

Contoh: volume NaH₂PO₄ 0,2 M yang diambil sebanyak 34 mL



$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{Na}_2\text{HPO}_4]}{[\text{NaH}_2\text{PO}_4]}$$

$$6,0 = -\log 6,2 \cdot 10^{-8} + \log \frac{0,2 \text{ M} \times v}{0,2 \times 34 \text{ mL}}$$

$$6,0 = 7,21 + \log \frac{0,2 \text{ M} \times v}{6,8 \text{ mmol}}$$

$$\frac{0,2 \text{ M} \times v}{6,8 \text{ mmol}} = \text{antilog } 1,21$$

$$0,2 \text{ M} \times v = 6,8 \text{ mmol} \times 16,218$$

$$0,2 \text{ M} \times v = 110,282 \text{ mmol}$$

$$v = 551,41 \text{ mL} \approx 551 \text{ mL.}$$

Lampiran 3. Menentukan Kurva Pertumbuhan Bakteri Amilolitik BK 4

L.3.1. Kurva Pertumbuhan Bakteri Amilolitik BK

Tabel L.3.1 Data Kurva Pertumbuhan Bakteri Amilolitik BK 4 ata penen

Waktu	Nilai OD
0	0,481
4	1,155
8	1,221
12	1,522
24	2,045
28	2,221
32	2,522
36	2,698
48	1,045

Gambar L.3.1 Grafik Kurva Pertumbuhan Bakteri Amilolitik BK 4



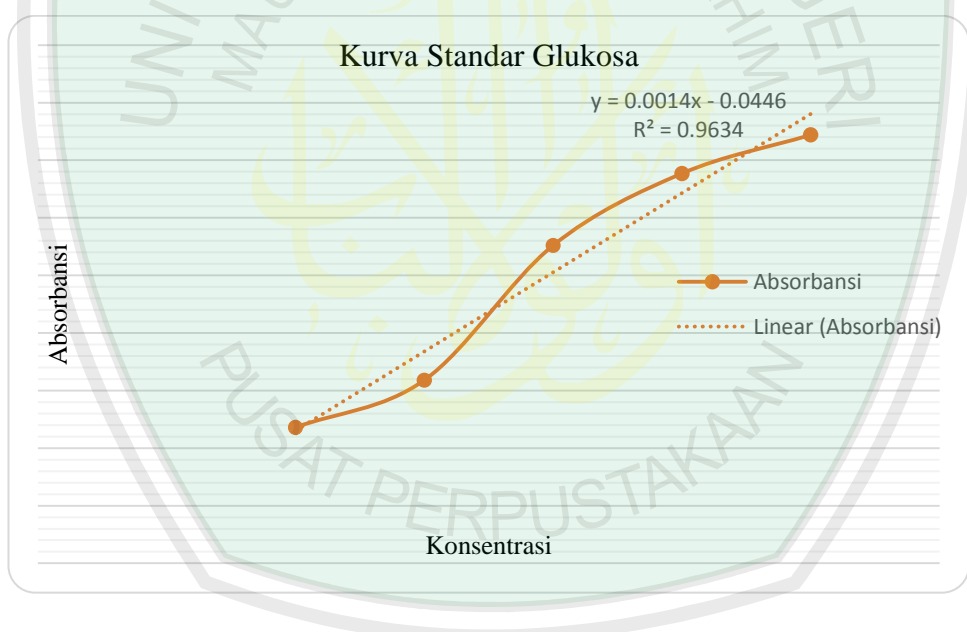
Lampiran 4. Menentukan Kurva Standar Larutan Glukosa

L.4.1. Kurva Standar Larutan Glukosa

Tabel L.4.1 Data Absorbansi larutan Glukosa Pada λ 540 nm

Konsentrasi Glukosa (ppm)	Absorbansi
200	0,05
300	0,14
400	0,19
500	0,26
600	0,31

Gambar L.4.2 Grafik Kurva Standar Glukosa

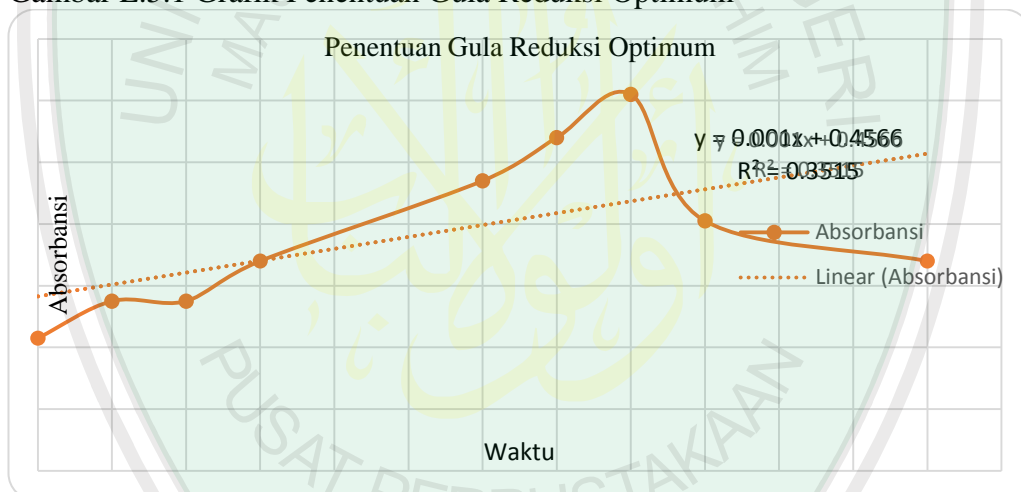


Lampiran 5. Penentuan Gula Reduksi Pada Kurva Pertumbuhan Berdasarkan Kurva Standar Glukosa.

L.5.1. Tabel Aktivitas Gula Reduksi Pada Kurva Pertumbuhan Berdasarkan Kurva Standar Glukosa

Waktu	Absorbansi
0	0,443
4	0,455
8	0,455
12	0,468
24	0,494
28	0,508
32	0,522
36	0,481
48	0,468

Gambar L.5.1 Grafik Penentuan Gula Reduksi Optimum



Lampiran 6. Pengukuran Absorbansi dan Aktivitas Ekstrak Kasar Amilase

L.6.1. Nilai Absorbansi Ekstrak Kasar Enzim Amilase

Tabel L.6.1 Nilai absorbansi Ekstrak kasar Amilase

Ulangan	Nilai Absorbansi
I	0,157
II	0,152
III	0,155

L.6.2. Menentukan Aktivitas Ekstrak Kasar Amilase

Pengukuran aktivitas ekstrak kasar amilase pada suhu 37 °C dengan waktu inkubasi 30 menit dapat dilakukan dengan menggunakan persamaan kurva standar glukosa sebagai berikut:

Persamaan kurva standar glukosa

Diketahui: $y = ax + b$

$$y = 0,0014x + 0,0446$$

$$x = (y + 0,0446)/0,0014$$

misal absorbansi ekstrak kasar (y) = 0,157

maka $x = (0,157 + 0,0446) / 0,0014$

$$x = 144$$

Sedangkan untuk menentukan aktivitas ekstrak kasar amilase dapat diketahui dengan menggunakan persamaan:

$$\text{Unit Aktivitas} = \frac{C}{BM_{\text{produk}} \times t} \times \frac{H}{E}$$

Dimana: C = Konsentrasi gulareduksi (ppm)

BM = Berat molekul glukosa

t = Waktu inkubasi (menit)

H = Volume enzim-substrat (mL)

E = Volume enzim (mL)

Misal: konsentrasi gula reduksi sebesar 144 maka aktivitas ekstrak kasar amilase adalah

$$\begin{aligned} \text{Unit aktivitas} &= \frac{144 \text{ ppm}}{180 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{mol}} \times 30 \text{ menit}} \times \frac{2 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \\ &= 0,533333333 \mu\text{mol/ mL menit} \approx 5,33 \times 10^{-2} \mu\text{mol/mL menit} \end{aligned}$$

Satu unit aktivitas amilase dinyatakan dengan banyaknya mikro mol glukosa yang dihasilkan oleh 1 mL ekstrak kasar selulase per menit pada kondisi tertentu, sehingga aktivitas yang diperoleh adalah $5,33 \times 10^{-2}$ Unit/mL. Data konsentrasi gula reduksi dan aktivitas ekstrak kasar ditunjukkan pada Tabel L.6.2

Tabel L.6.2 Nilai Konsentrasi Gula Reduksi dan Aktivitas Ekstrak Kasar Amilase

Ulangan	Kadar Gula Reduksi (ppm)	Aktivitas Ekstrak Kasar (U/mL)
I	144	$5,33 \times 10^{-2}$
II	140,429	$5,20 \times 10^{-2}$
III	142,572	$5,28 \times 10^{-2}$
	Rata-rata Aktivitas	$5,27 \times 10^{-2}$

Lampiran 7. Menentukan Absorbansi dan Aktivitas Enzim Amilase

L.7.1 Nilai Absorbansi Enzim Amilase

Tabel L.7.1 Nilai Absorbansi Enzim Amilase

Enzim	Nilai Absorbansi Amilase		
	F1	F2	F3
I	0,246	0,251	0,237
II	0,146	0,217	0,178
III	0,182	0,195	0,173

Ket:

F1 : Fraksi 20-40%

F2 : Fraksi 40-60%

F3 : Fraksi 60-80%

L.7.2 Menentukan Aktivitas Enzim Amilase

Dengan menggunakan persamaan seperti pada lampiran L.5.2, maka akan diperoleh konsentrasi gula reduksi dan aktivitas enzim amilase yang ditunjukkan pada Tabel L.7.2 dan L.7.3

Tabel L.7.2 Kadar Gula Reduksi Enzim Amilase

Enzim	Kadar Gula Reduksi (ppm)		
	F1	F2	F3
I	207,571	211,143	201,143
II	136,143	186,857	127,174
III	161,857	171,143	155,429

Tabel L.7.3 Nilai Aktivitas Enzim Amilase

Enzim	Aktivitas Enzim (Unit/mL)		
	F1	F2	F3
I	$7,69 \times 10^{-2}$	$7,82 \times 10^{-2}$	$7,45 \times 10^{-2}$
II	$5,04 \times 10^{-2}$	$6,92 \times 10^{-2}$	$4,71 \times 10^{-2}$
III	$5,99 \times 10^{-2}$	$6,34 \times 10^{-2}$	$5,76 \times 10^{-2}$
Rata-rata	$6,24 \times 10^{-2}$	$7,03 \times 10^{-2}$	$5,97 \times 10^{-2}$

Lampiran 8. Pengaruh Fraksi Ammonium Sulfat terhadap Aktivitas Amilase

L.8.1 Data dan Uji Statistik Pengaruh Fraksi Ammonium Sulfat Terhadap Aktivitas Enzim Amilase

Tabel L.8.1.1 Pengaruh Fraksi Ammonium Sulfat Terhadap Absorbansi Gula Reduksi

Enzim	Nilai Absorbansi		
	F1	F2	F3
I	0,246	0,251	0,237
II	0,146	0,217	0,178
III	0,182	0,195	0,173
Rataan Absorbansi	0,192	0,221	0,192

Tabel L.8.1.2 Aktivitas Amilase pada Variasi Fraksi Ammonium Sulfat

Enzim	Aktivitas Enzim (Unit/mL)			Jumlah
	F1	F2	F3	
I	$7,69 \times 10^{-2}$	$7,82 \times 10^{-2}$	$7,45 \times 10^{-2}$	
II	$5,04 \times 10^{-2}$	$6,92 \times 10^{-2}$	$4,71 \times 10^{-2}$	
III	$5,99 \times 10^{-2}$	$6,34 \times 10^{-2}$	$5,76 \times 10^{-2}$	
Total	$18,72 \times 10^{-2}$	$21,08 \times 10^{-2}$	$17,92 \times 10^{-2}$	
Rata-rata Aktivitas	$6,24 \times 10^{-2}$	$7,03 \times 10^{-2}$	$5,97 \times 10^{-2}$	

Kenaikan aktivitas amilase bila dibandingkan dengan ekstrak kasarnya dapat ditentukan dengan rumus berikut:

$$\text{kenaikan aktivitas} = \frac{\text{aktivitas enzim amilase}}{\text{aktivitas ekstrak kasar amilase}}$$

Tabel L.8.1. 3 Kenaikan Aktivitas Amilase Pada Berbagai Fraksi Pengendapan

Fraksi Ammonium Sulfat	Aktivitas Amilase (U/mL)	Kenaikan Aktivitas Amilase Dibanding Ekstrak Kasar
F1	$6,24 \times 10^{-2}$	1,2
F2	$7,03 \times 10^{-2}$	1,3
F3	$5,97 \times 10^{-2}$	1,1

Aktivita sekstrak kasar = $5,27 \times 10^{-2}$

Lampiran 9. Menentukan Kurva Standar BSA

L.9.1 Menghitung Konsentrasi Larutan BSA

a. Volume 0,1 mL

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ 10 \text{ mL} \times M_1 &= 0,1 \text{ mL} \times 5 \text{ mg/mL} \\ M_1 &= 0,05 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

b. Volume 0,2 mL

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ 10 \text{ mL} \times M_1 &= 0,2 \text{ mL} \times 5 \text{ mg/mL} \\ M_1 &= 0,1 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

c. Volume 0,4 mL

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ 10 \text{ mL} \times M_1 &= 0,4 \text{ mL} \times 5 \text{ mg/mL} \\ M_1 &= 0,2 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

d. Volume 0,6 mL

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ 10 \text{ mL} \times M_1 &= 0,6 \text{ mL} \times 5 \text{ mg/mL} \\ M_1 &= 0,3 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

e. Volume 0,8 mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$10 \text{ mL} \times M_1 = 0,8 \text{ mL} \times 5 \text{ mg/mL}$$

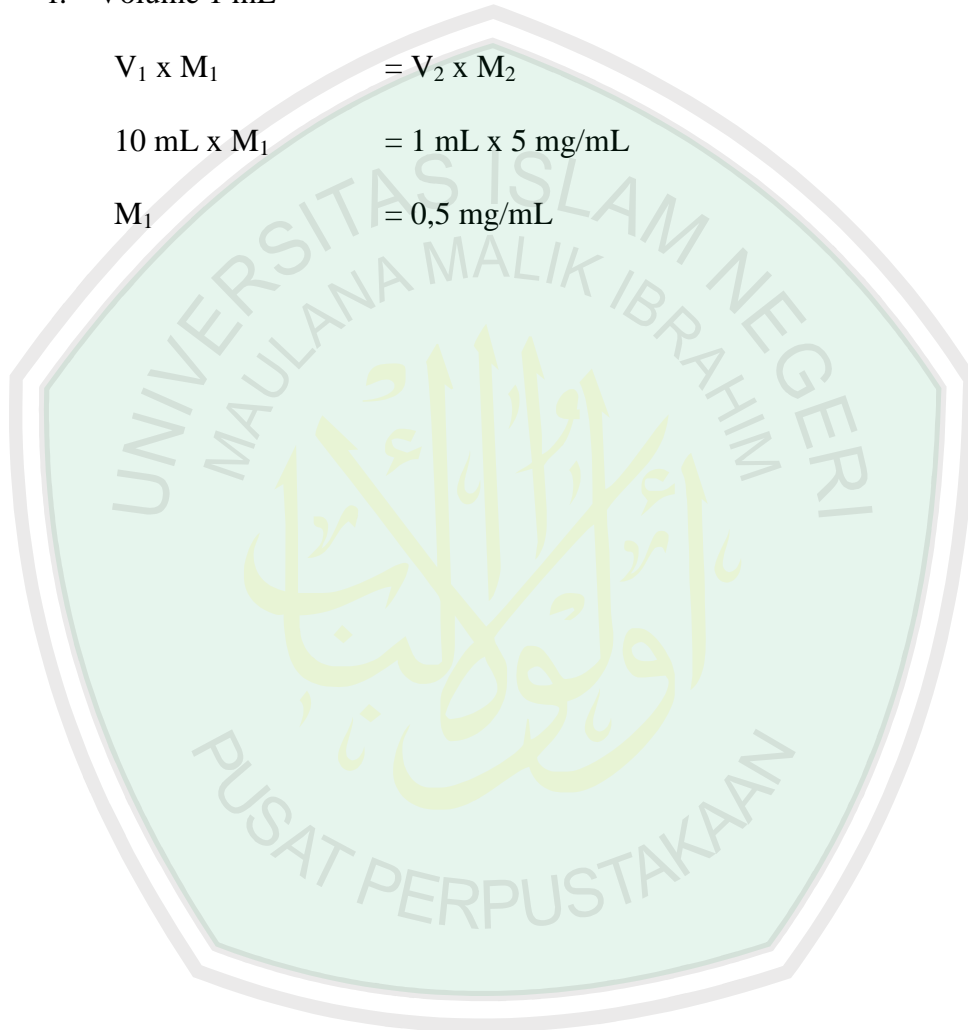
$$M_1 = 0,4 \text{ mg/mL}$$

f. Volume 1 mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$10 \text{ mL} \times M_1 = 1 \text{ mL} \times 5 \text{ mg/mL}$$

$$M_1 = 0,5 \text{ mg/mL}$$



L.9.2 Menentukan Nilai Absorbansi Larutan BSA

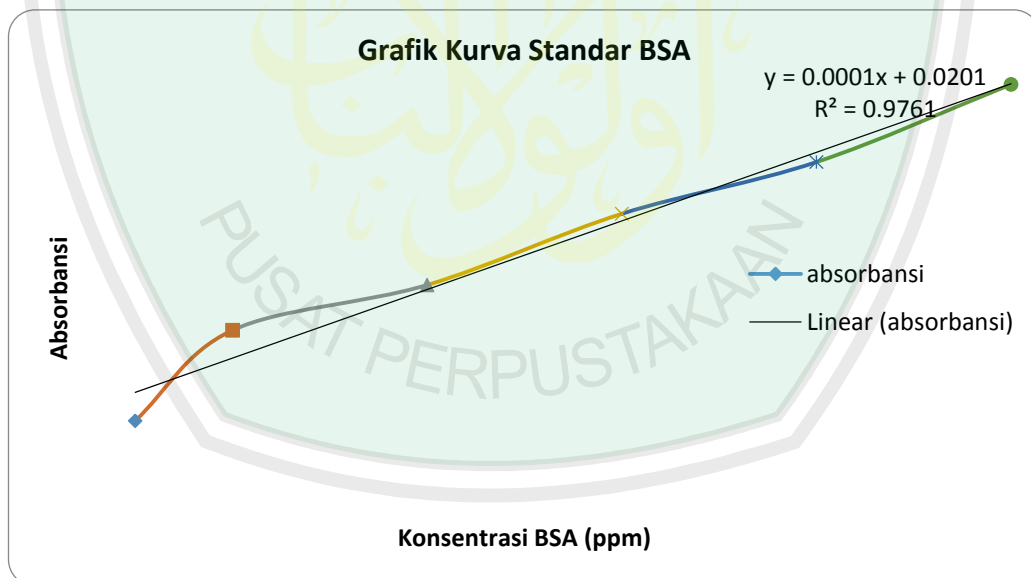
$$\text{ppm} = \text{mg/L}$$

$$0.05 \text{ mg/mL} = 0.05 \text{ mg}/0.001 \text{ L} = 50 \text{ mg/L} = 50 \text{ ppm}$$

Tabel L.9.2 Data Absorbansi Larutan BSA pada λ 500 nm

Konsentrasi BSA (ppm)	Absorbansi
50	0,021
100	0,035
200	0,042
300	0,053
400	0,061
500	0,073

Gambar L.9.2 Grafik Kurva Standar Larutan BSA



Lampiran 10. Menentukan Aktivitas Spesifik Amilase

L.10.1 Menentukan Kadar Protein Amilase

Kadar protein amilase atau X ditentukan dengan menggunakan persamaan linear dari kurva standar larutan BSA sebagaimana berikut:

$$\begin{aligned} \text{Misal : } y &= ax + b \\ y &= 0,0001x + 0,0201 \\ 0,053 &= 0,0001x + 0,0201 \\ x &= 731 \text{ ppm} \approx 731 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

Tabel L.10.1 Data Absorbansi dan Kadar Protein Pada Fraksi dengan Aktivitas Tertinggi (F2)

Ulangan	Absorbansi	Aktivitas Amilase (U/mL)	Kadar Protein ($\mu\text{g/mL}$)	Aktivitas Spesifik Amilase (U/ μg)
I	0,053	$2,71 \times 10^{-2}$	731	$3,71 \times 10^{-5}$
II	0,038	$2,15 \times 10^{-2}$	581	$3,70 \times 10^{-5}$
III	0,022	$1,56 \times 10^{-2}$	421	$3,71 \times 10^{-5}$
Rata-rata		$2,14 \times 10^{-2}$	577,7	$3,71 \times 10^{-5}$

L.10.2 Menghitung Aktivitas Spesifik Amilase

Data aktivitas amilase dan data kadar protein yang diperoleh dari fraksi pengendapan dengan aktivitas amilase tertinggi (F2) ditentukan aktivitas spesifiknya dengan menggunakan persamaan berikut:

$$\text{Aktivitas spesifik} = \frac{\text{unit Aktivitas}}{\text{kadar protein}}$$

Diketahui: aktivitas amilase $2,14 \times 10^{-2}$ dan kadar proteinnya 577,7 maka:

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas spesifik} &= \frac{2,14 \times 10^{-2} \text{ U/mL}}{577,7 \mu\text{g/mL}} \\ &= 3,7 \times 10^{-5} \text{ Unit}/\mu\text{g} \end{aligned}$$

Lampiran 11

Tabel L.4 amonium sulfat (gram) yang ditambahkan pada setiap liter enzim (scopes,1987)

		S2(%)																	
		5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	
S1 (%)	0	27	55	84	113	144	176	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	
	5		27	56	85	115	146	179	212	246	282	319	357	397	439	481	526	572	
	10			28	57	86	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	
	15				28	58	88	119	151	185	219	255	292	331	371	413	430	501	
	20					29	59	89	121	154	188	223	260	298	337	378	421	465	
	25						29	60	91	123	157	191	227	265	304	344	386	429	
	30							30	61	92	126	160	195	232	270	309	351	393	
	35								30	62	94	128	163	199	236	275	316	358	
	40									31	63	96	130	166	202	241	281	322	
	45										31	64	97	132	169	206	245	286	
	50											32	65	99	135	172	210	250	
	55												32	66	101	138	175	215	
	60													33	67	103	140	179	
	65														33	67	103	140	179
	70															34	69	105	143
	75																34	70	107
80																	35	72	
																		36	

Perhitungan :

Banyaknya amonium sulfat yang ditambahkan dalam 1 liter larutan enzim untuk fraksi (S1-S2) = 20–40 % adalah 121 gram, sehingga untuk 20 mL enzim, amonium sulfat yang harus ditambahkan adalah

$$\frac{121 \text{ gram}}{1000 \text{ mL}} = \frac{x}{20 \text{ mL}}$$

$$\frac{121 \text{ gram} \cdot 20 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} = 2,42 \text{ gram}$$

Fraksi (S1-S2) = 40–60% adalah 130 gram, sehingga untuk 20 mL enzim, ammonium sulfat yang harus ditambahkan adalah :

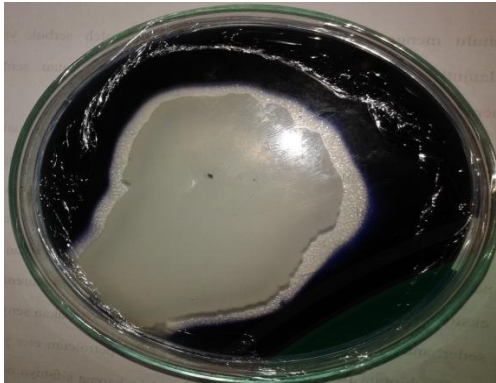
$$\frac{130 \text{ gram}}{1000 \text{ mL}} = \frac{x}{20 \text{ mL}}$$

$$\frac{130 \text{ gram} \cdot 20 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} = 2,6 \text{ gram}$$

Fraksi (S1-S2) = 60–80% adalah 140 gram, sehingga untuk 20 mL enzim, ammonium sulfat yang harus ditambahkan adalah :

$$\frac{140 \text{ gram}}{1000 \text{ mL}} = \frac{x}{20 \text{ mL}}$$

$$\frac{140 \text{ gram} \cdot 20 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} = 2,8 \text{ gram}$$

DOKUMENTASI

Isolat Bakteri Amilolitik BK 4



Pembuatan Media Produksi



Sterilisasi Media Produksi



Sentrifugasi Ekstrak Kasar Enzim Amilase



Pembuatan Reagen DNS



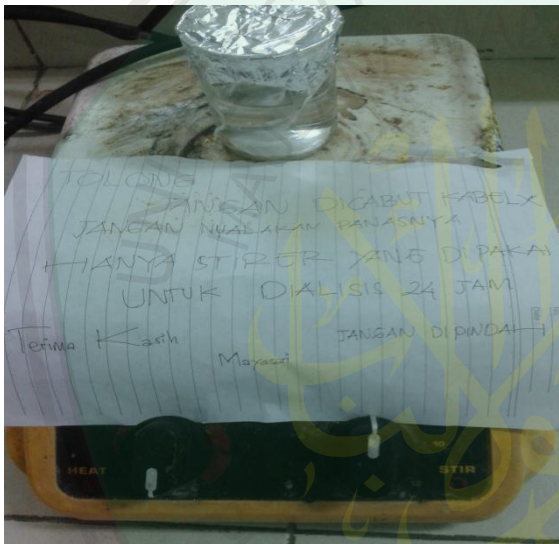
Pembuatan Kurva Standar Glukosa



Pemanasan untuk Uji Aktivitas Enzim



Pengukuran Aktivitas Enzim Amilase Dengan Spektrofotometer



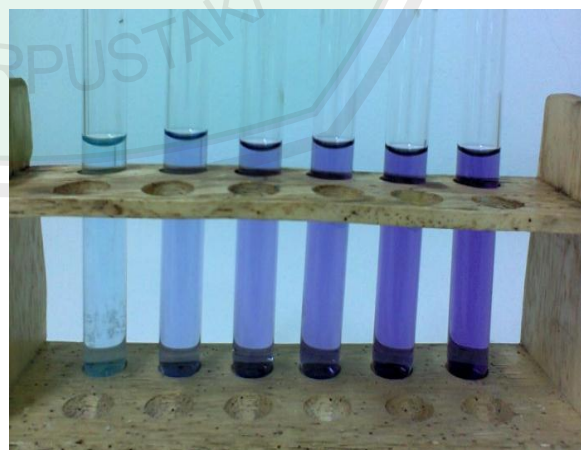
Proses Dialisis



Pengendapan Amonium Sulfat



Reagen Biuret



Pembuatan Kurva Standar BSA

Lembar Persembahan

“Rasa syukur yang mendalam, skripsi ini kupersembahkan kepada”:

Kedua Orang tuaku (**Bpk. Abd. Hamid dan Ibu Musrifah**) yang tak pernah putus mendoakanku, usaha, pengorbanan, kasih sayang, moral maupun materi, senantiasa berharap aku bisa jadi lebih berguna dengan ilmuku, dalam setiap langkahku. Untuk orang tuaku “Aku minta maaf” .

Adikku tersayang, Yudi, Ipunk dan Arif. Saudaraku (K pipit, K Titin, Linda, Ririn, Anis, K fitri, K Aida, K ila, K Efa, Aini, Atul, Leha, Ilul, Mila, Rorok dan Olip) Doa dan tawa kalian selalu memberikan hiburan dan keceriaan disetiap hari-hari ku. Paman dan bibiku tersayang, Om bagong (Ruzi) dan Om Fahor beserta Istri. Terimakasih atas doa, kasih sayang dan nasehatnya.

Terimakasih kepada guruku Mr.Makin, guru TK, MTs, SMA dan dosenku ibu Rachmawati Ningsih, dan ibu Akyunul Jannah dan ibu Anik Maunatin, yang telah sabar membimbing dan memberikan semangat.

Teman-teman kecilku (Fakih, Fendi, Fitri, Uvi, Susi, Nafi, Lip, Hanafi,Dani,Habibi, Andi, Riadi dan K Bojes n K Imam) Sahabatku SMA (Tika, Eva, Fitri, Memed, Mumun, Yakin, Mirul, Fi'i, Rosi) Fashion Holic (Echa, Nuna dan Fitri) Teman-teman Kontraan (Oci, Vida, Diah, Wanti, Daus, She, Ima, Ninis dan Ilul) dan teman-teman kimia '10. Tak cukup kata-kata untuk menggambarkan persahabatan dan persaudaraan diantara kita, kecuali rasa syukur kuucapkan kepada Allah Swt karena telah mengenal kalian. Semoga kita selalu dipertemukan dalam kedaan kebaikan dan lebih baik. Smg semuanya, sukses selalu ya... ^^ Terimakasih atas dukungan dan motivasinya, semoga kita bisa slalu menjaga silaturrahi kita...^^