

**Pemurnian Parsial dan Karakterisasi Amilase dari Bakteri Laut *Arthrobacter arilaitensis* LBF-003**  
**(Partial Purification and Characterization Amylase from Marine Bacterium *Arthrobacter arilaitensis* LBF-003)**

**Dianti Rahmasari<sup>1</sup>, Wijanarka<sup>1</sup>, Sri Pujiyanto<sup>1</sup>, Nanik Rahmani<sup>2</sup>, & Yopi<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Jl. Prof. Sudharto SH. Tembalang 50275 Semarang, Jawa Tengah, Indonesia

<sup>2</sup>Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI, Jl. Raya Bogor Km 46, Cibinong 16911, Bogor, Jawa Barat, Indonesia  
**Email:** yopisunarya@gmail.com

**Memasukkan:** Juli 2015, **Diterima:** Desember 2015

**ABSTRACT**

Starch is an abundant carbon source in nature, and  $\alpha$ -amylase (1, 4- $\alpha$ -D-glucanohydrolase; EC 3.2.1.1), which hydrolyzes  $\alpha$ -1, 4-glucosidic linkage in starch-related molecules. Microbe  $\alpha$ -amylase production is a hydrolytic enzyme and one of interest in its microbial production has increased dramatically due to its wide spread use in food, textile, baking and detergent industries in recent years. Here we report  $\alpha$ -amylase from marine bacterium which was purified and characterized, as well as analyzed its hydrolysis product on starch. The enzyme of *Arthrobacter arilaitensis* partially purified by acetone precipitation with 90% and ion exchange chromatography produced specific activity 0.25 U/mg and 0.38 U/mg, and it's purity rate increased until 1.14 fold compared with former crude extract. Purified extracellular amylase had an optimum activity at temperature 50°C and pH 9.0. An apparent molecular mass was between 50-75 kDa, as estimated by zimogram electrophoresis. Hydrolysis products of this enzyme on starch were maltose, maltotriose and maltoheptaose.

**Keywords:** alfa amylase, marine bacterium, *Arthrobacter arilaitensis*, purification, characterization

**ABSTRAK**

Pati merupakan sumber karbon yang melimpah di alam, dan  $\alpha$ -amilase (1,4- $\alpha$ -D-glukanohidrolase; EC 3.2.1.1) yang menghidrolisis ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosidik pada molekul berpati. Produksi  $\alpha$ -amilase yang berasal dari mikroba dalam beberapa tahun ini telah mengalami peningkatan yang pesat karena pemanfaatan amilase yang luas dalam industri makanan, tekstil, roti dan detergen. Studi ini melaporkan pemurnian, karakterisasi, dan analisis produk hidrolisis  $\alpha$ -amilase dari bakteri laut pada pati. Enzim dari *Arthrobacter arilaitensis* ini dimurnikan secara parsial dengan pengendapan aseton 90%, dan kromatografi penukar ion menghasilkan aktivitas spesifik masing-masing sebesar 0,25 U/mg dan 0,38 U/mg, serta kemurniannya meningkat 1,14 kali dibandingkan dengan ekstrak kasarnya. Amilase ekstraseluler yang telah dimurnikan mempunyai aktivitas optimal pada pH 9 dan 50°C. Berdasarkan hasil zimogram, pita protein dari enzim amilase memiliki berat molekul antara 50-75 kDa. Produk hidrolisis enzim terhadap pati ini meliputi maltoheptosa, maltotriosa dan maltosa.

**Kata Kunci:** alfa amilase, bakteri laut, *Arthrobacter arilaitensis*, pemurnian, karakterisasi

**PENDAHULUAN**

Enzim  $\alpha$ -amilase (1,4- $\alpha$ -D-glukanohidrolase; EC 3.2.1.1) adalah enzim ekstraselular yang mendegradasi ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosidik polisakarida pati (Divakaran *et al.*, 2011). Selain penggunaannya dalam hidrolisis pati,  $\alpha$ -amilase juga dimanfaatkan secara luas dalam dunia industri seperti fermentasi, tekstil, kertas, obat-obatan, dan gula (Gupta *et al.* 2003). Hidrolisis pati oleh  $\alpha$ -amilase tersebut menghasilkan oligosakarida seperti maltooligo sakarida (Souza & Perolade 2010). Dalam beberapa tahun terakhir pertumbuhan minat dalam penggunaan maltooligosakarida semakin

meningkat dalam industri makanan seperti sebagai biopreservatif, pangan fungsional dan komponen penting dalam jumlah besar dari produk makanan lainnya (Barreteau *et al.* 2006).

Enzim  $\alpha$ -amilase banyak diproduksi dari berbagai jenis bakteri, fungi, tanaman, dan hewan baik yang berasal dari daratan maupun laut. Daerah lautan yang meliputi 71 persen dari permukaan bumi memiliki sangat banyak sumber enzim yang bermanfaat yang belum terekplor. Bakteri dan jamur dari laut menghasilkan enzim-enzim berbeda bergantung dari habitat dan fungsi ekologi mereka. Enzim dari mikroba laut menjadi poin yang sangat menarik dan telah

menjadi perhatian para peneliti mikroba dan beberapa enzim telah diisolasi dari air laut maupun sedimen laut (Chandrasekaran & Kumar, 1997).

Pada umumnya *Arthrobacter* sp diperoleh dari tanah, namun beberapa peneliti melaporkan *Arthrobacter* sp. yang diperoleh dari laut, seperti *A. antarcticus* (Kumar *et al.* 2010) dan *A. oxydans* (Wang *et al.* 2014) sedangkan Smith *et al.* (2005) telah melaporkan penelitian mengenai karakterisasi amilase dari *Arthrobacter psychrolactophilus*. Saat ini belum banyak penemuan  $\alpha$ -amilase yang diperoleh dari *Arthrobacter* sp khususnya purifikasi  $\alpha$ -amilase dari *Arthrobacter arilaitensis*. Pemurnian amilase dari genus bakteri laut lain telah dilaporkan pada beberapa bakteri seperti *Bacillus stearothermophilus* TII-12 (Lestari *et al.* 2011) dan *Hallobacillus amylyus* (Ashwini *et al.* 2011).

Dalam penelitian sebelumnya telah ditemukan kondisi optimum produksi enzim amilase dari *Arthrobacter arilaitensis* berupa komposisi media dan kondisi lingkungan produksi (Purnawan *et al.* 2015). Penelitian ini bertujuan untuk melakukan partial purifikasi enzim  $\alpha$ -amilase dari *Arthrobacter arilaitensis* serta melakukan karakterisasi serta uji hidrolisis untuk mengetahui jenis maltooligosakarida yang dihasilkan oleh enzim tersebut.

## BAHAN DAN CARA KERJA

Bakteri laut *Arthrobacter arilaitensis* diperoleh dari koleksi laboratorium biokatalis dan fermentasi, Puslit bioteknologi LIPI.

Produksi enzim amilase dari bakteri laut *Arthrobacter arilaitensis* dilakukan pada media yang terdiri atas 1% pati (Merck), 3,8% *Artificial Sea Water* (Marine art. SF-1), 0,1 % ekstrak ragi (Oxoid), 0,5% pepton (BD Bioscience), 0,5% maltosa (HiMedia), 0,5% kasein (Oxoid). Tahap pertama adalah penentuan waktu optimum untuk produksi enzim amilase. Kultur dilakukan selama 120 jam pada *orbital shaker* (Bioshaker BR 43FL) dengan kecepatan 150 rpm, suhu 30 °C dengan pengambilan sampel dilakukan setiap harinya. Ekstrak supernatan diperoleh dengan sentrifugasi pada 11000 rpm selama 10 menit pada 4°C. Supernatan yang dihasilkan diuji aktivitas amilasena.

Aktivitas enzim amilase ditentukan dengan metode (Bernfeld 1955) menggunakan *starch*

0,5% (w/v) (Merck) dalam buffer gysin-NaOH 0,05 M (pH 8) selama 15 menit reaksi. Campuran reaksi terdiri atas 0,25 ml filtrat enzim dan substrat glukosa 0,25 ml diinkubasi pada suhu 30°C selama 15 menit dan reaksi dihentikan dengan penambahan DNS 500  $\mu$ l dengan pemanasan pada suhu 100°C selama 10 menit dan pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 540 nm. Jumlah gula reduksi yang terbentuk diukur dengan menggunakan standar glukosa (Merck). Satu unit (U) aktivitas amilase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk menghasilkan 1  $\mu$ mol glukosa per menit di bawah kondisi reaksi. Substrat tanpa enzim digunakan sebagai kontrol.

Penentuan kadar protein dilakukan dengan metode UV-vis spektrofotometer (Shimadzu) pada panjang gelombang 280 nm dan *Bovine Serum Albumin* (Merck) sebagai standar. Nilai absorbansi yang diperoleh dikonversi menjadi konsentrasi dalam satuan ppm menggunakan persamaan yang didapat dari kurva standar protein.

Produksi amilase dilakukan berdasarkan penentuan waktu produksi optimum pada tahap sebelumnya pada erlenmeyer 2 L dengan media 400 mL. Supernatan yang diperoleh mengandung ekstrak kasar amilase yang dipisahkan dari endapan hasil kultur dan diuji aktivitas enzim beserta kadar proteinnya. Pemurnian parsial amilase *Arthrobacter arilaitensis* dilakukan dengan cara pengendapan oleh aseton dan kromatografi penukar ion (Akta prime plus). Pengendapan dengan aseton (Merck) dilakukan pada konsentrasi 30 - 90%. Pelet yang diperoleh dipisah dan disuspensi ke dalam 1 mL buffer gysin-NaOH pH 8.0 serta diuji aktivitas dan kadar proteinnya. Aktivitas yang tinggi menunjukkan persentase kejenuhan aseton yang optimum yang akan digunakan dalam tahap pemurnian selanjutnya.

Enzim hasil pengendapan oleh aseton dimurnikan dengan metode kromatografi penukar ion menggunakan matriks penukar anion HiTrap Q Sepharose Fast Flow (GE Healthcare). Sebanyak 1 ml enzim ekstrak kasar diaplikasikan kemudian dilusi secara gradien menggunakan NaCl 1 M dalam buffer kalibrasi (20 mM buffer Tris HCl pH 8.0). Kecepatan aliran untuk kromatografi penukar ion adalah 1 mL/menit.

Penentuan berat molekul dilakukan dengan konsentrasi akrilamida 10 % dan marker (Precision Plus Protein™ Standards). Sebanyak 10 µl sampel enzim ekstrak kasar, enzim hasil pemekatan dan hasil pemurnian kromatografi masing-masing dirunning pada elektrophoresis gel akrilamid. Proses elektroforesis berlangsung selama 2 jam pada tegangan 100 volt dan 30 mA. Hasil SDS-PAGE diwarnai dengan pewarna *coomasie brilliant blue*. Sedangkan hasil zymogram diwarnai dengan perendaman secara bertahap pada *miliQ*, Triton-X, buffer 50 mM buffer glicin-NaOH pH 8, lugol, NaCl 1 M dan asam asetat 3%.

Pengaruh pH, suhu amilase diukur dalam campuran reaksi 0.25 mL glukosa dan 0.25 mL partial enzim murni dalam kisaran pH 3-9. Bufer yang digunakan adalah bufer asetat (pH 3,0-5,0) 0,05 M, bufer fosfat (pH 6,0-7,0) 0,05 M dan buffer glicin-NaOH (pH 8,0-9,0) 0,05 M dan campuran enzim direaksikan pada suhu selama 15 menit. Pengaruh perbedaan suhu pada 30°C aktivitas amilase diukur dengan menggunakan pH dan diinkubasi pada suhu 30 sampai 100°C selama optimum yang diperoleh 15 menit.

Analisis hidrolisis dilakukan pada sampel enzim amilase hasil pemurnian dengan mereaksikannya pada substrat pati 0,5% lalu diinkubasi pada suhu 30°C dan pH 8 selama 3 jam lalu disentrifuge (Kubota 3740) pada kecepatan 7000 rpm, 4°C. Supernatan dianalisis dengan menggunakan HPLC (Agilent) dengan system kolom pengemas HiplexCa (Duo) (6.5 ID x 300 mm), eluen aquades atau *miliQ* 100%, suhu 85°C, laju alir 0,6 mL/min, dan detektor *refractive index detector* (RID).

## HASIL

### Penentuan waktu optimum untuk produksi amilase

Produksi harian amilase dari bakteri *A. arilaitensis* diuji pada pH 8 dan suhu 30°C (Gambar 1). Kurva pertumbuhan bakteri dan aktivitas enzim selama lima hari menunjukkan bahwa aktivitas enzim mencapai nilai tertinggi pada jam ke-72 sebesar 4,113 U/mL. Waktu produksi amilase optimum digunakan sebagai standar waktu panen pada produksi amilase selanjutnya.

### Produksi Amilase Ekstrak Kasar

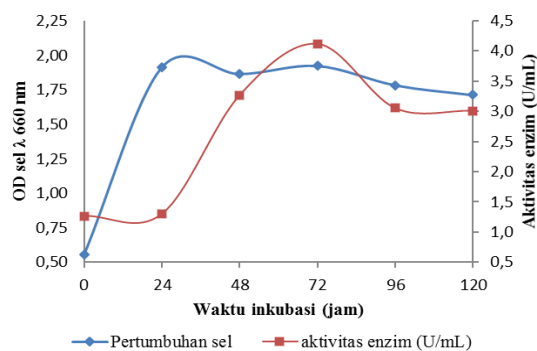
Bakteri *A. Arilaitensis* ditumbuhkan selama 3 hari dalam media cair pati lalu disentrifugasi dengan kecepatan 11000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan ekstrak kasar. Ekstrak kasar yang dihasilkan memiliki aktivitas 4,259 U/mL dan kadar protein 4,682 mg/mL.

### Pemurnian amilase dengan aseton dan kromatografi penukar ion

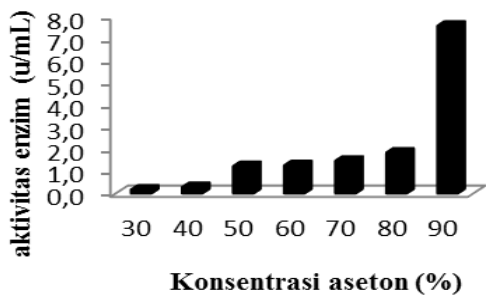
Pemurnian awal dilakukan pengendapan dengan cara penambahan aseton secara bertahap dengan beberapa konsentrasi dimulai dari 30% sampai 90%. Hasil pengendapan enzim yang ditunjukkan pada Gambar 2 mencapai aktivitas tertinggi pada konsentrasi aseton 90% dengan aktivitas sebesar 7,585 U/mL.

Enzim hasil pemekatan dengan aseton inilah yang kemudian dilanjutkan ke tahap pemurnian dengan kromatografi filtrasi penukar ion pada alat *AKTA-Prime Chromatography*. Metode pemurnian yang digunakan pada penelitian ini adalah metode *Anion Exchange Chromatography*. Metode penukar ion digunakan untuk memisahkan protein berdasarkan muatannya. Sampel yang keluar dari kolom kemudian ditampung pada pengumpul fraksi-fraksi. Fraksi-fraksi enzim pada kromatografi filtrasi penukar ion yang didapat selanjutnya diuji kadar protein dan aktivitas enzimnya. Hasil pemurnian amilase dengan kromatografi filtrasi penukar ion ditunjukkan pada Gambar 3. Hasil fraksinasi protein menghasilkan satu puncak protein (fraksi 9-25) dan puncak aktivitas amilase (fraksi 14-21).

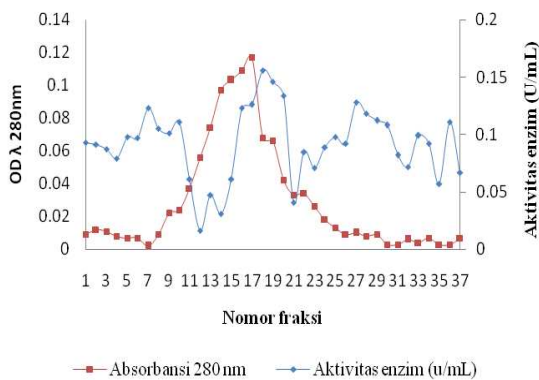
Analisis kuantitatif pada tiap tahap proses



**Gambar 1.** Aktivitas amilase dan kurva pertumbuhan bakteri *Arthrobacter arilaitensis* selama kultur 120 jam



**Gambar 2.** Aktivitas enzim amilase hasil pengendapan dengan berbagai konsentrasi aseton dari bakteri laut *A. arilaitensis*



**Gambar 3.** Absorbansi protein 280 nm dan aktivitas enzim amilase pada fraksi-fraksi hasil pemurnian dari bakteri laut *A. Arilaitensis*

pemurnian amilase *A. arilaitensis* ditentukan dengan mengukur aktivitas spesifik dan tingkat kemurnian yang ditunjukkan pada Tabel 1.

Amilase yang telah diendapkan dengan aseton 90% memiliki tingkat kemurnian yang lebih rendah yaitu sebesar 0,76 kali dibandingkan dengan larutan enzim kasarnya dengan perolehan (*yield*) 48,43%, sedangkan setelah kromatografi memiliki tingkat kemurnian yang meningkat yaitu sebesar 1,14 kali dengan *yield* 0,18%. Aktivitas total dan kadar protein total yang terkandung pada masing-masing tahap pemurnian mengalami penurunan, sedangkan aktivitas spesifik meningkat pada akhir tahap

pemurnian pada kromatografi penukar ion. Aktivitas spesifik akhir sedikit meningkat dari 0,334 menjadi 0,383 U/mg. Hasil ini menyatakan tingkat kemurnian enzim dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim. Tingkat kemurnian ini termasuk rendah. Oleh karena itu masih perlu diperlukan tahap pemurnian enzim yang lebih lanjut pada penelitian berikutnya.

**Analisis SDS-PAGE dan Zymogram**

Gel SDS PAGE yang diperlihatkan pada Gambar 4 menunjukkan bahwa enzim amilase ekstrak kasar mempunyai beberapa pita yang terlihat samar-samar, sedangkan setelah pengendapan ada enam pita protein yang lebih tebal dibanding ekstrak kasar. Untuk memastikan bahwa pita-pita protein yang terlihat pada hasil elektroforesis SDS-PAGE merupakan enzim yang kita inginkan, maka dilakukan teknik zimogram. Hasil percobaan pada teknik zimogram memperlihatkan bahwa terdapat satu pita tebal yang muncul pada sampel ekstrak kasar dan enzim hasil pengendapan pada berat molekul yang sama antara 50-75 kDa.

**Pengaruh PH terhadap Karakterisasi enzim**

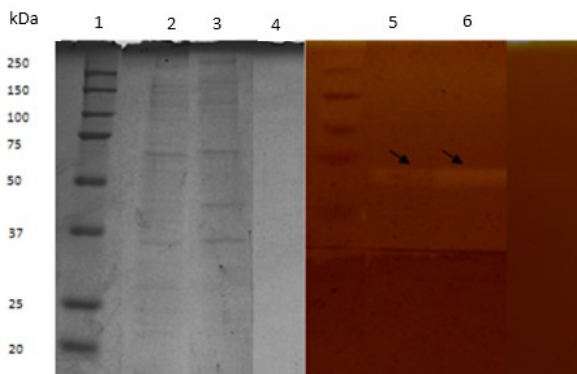
Penentuan pH optimum amilase dilakukan dengan menggunakan tiga jenis buffer yang berbeda yaitu buffer Asetat, Fosfat dan Glysin-NaOH dengan rentang pH 3-9. Berdasarkan hasil penelitian yang ditampilkan pada Gambar 4, terlihat bahwa pH optimum amilase *A. arilaitensis* dicapai oleh buffer Glysin-NaOH pH 9 dengan nilai aktivitas enzim sebesar 0.025 U/mL. (Gambar 5)

**Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim**

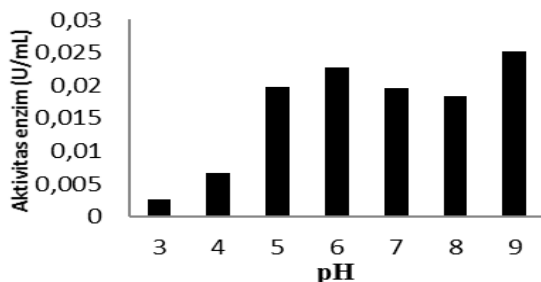
Pengaruh suhu terhadap aktivitas amilase *A. arilaitensis* dapat dilihat pada Gambar 6. Berdasarkan hasil yang diperoleh, terlihat bahwa variasi suhu yang diuji memberikan

**Tabel 1.** Analisis kuantitatif hasil pemurnian enzim amilase dari bakteri laut *A. arilaitensis*

Tahapan pemurnian	Volume enzim (mL)	Aktivitas Total (U)	Protein Total (mg)	Aktivitas spesifik (U/mg)	Yield (%)	Tingkat Kemurnian
Ekstrak kasar	100	156,6	468,2	0,334	100,00	1
Aseton 90%	10	75,85	297,5	0,254	48,43	0,762
Penukar ion	5	0,14	0,365	0,383	0,184	1146



**Gambar 4.** Analisis SDS PAGE (kiri) dan zimogram (kanan) dari  $\alpha$ -amilase *A. arilaitensis*. Sumur 1= marker; 2= ekstrak kasar; 3= hasil pengendapan dengan aseton; 4= hasil kromatografi penukar ion; 5 dan 6=  $\alpha$ -amilase dengan zona bening pada teknik zimogram yang menunjukkan hidrolisis pati dengan bobot molekul berkisar 50-75 kDa (tanda panah).

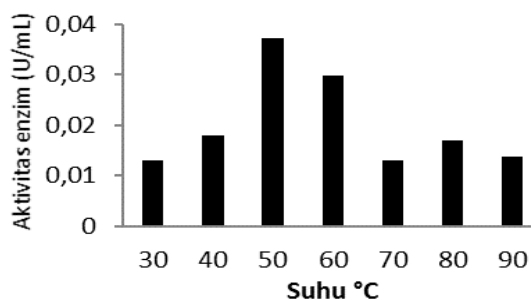


**Gambar 5.** Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim amilase hasil pemurnian parsial dari bakteri laut *A. arilaitensis*

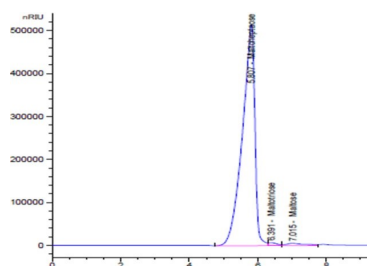
pengaruh terhadap aktivitas amilase *A. arilaitensis*. Amilase memiliki suhu optimum 50°C dengan nilai aktivitas sebesar 0,037 U/mL. Aktivitas enzim pada suhu 30-40° C menunjukkan aktivitas yang rendah kemudian meningkat secara signifikan pada suhu 50° C. Setelah melewati suhu optimum, aktivitas enzim menurun (Gambar 6).

**Analisis hidrolisis enzimatik pati oleh HPLC**

Sampel enzim hasil pemurnian dianalisis hasil hidrolisisnya terhadap pati dengan metode HPLC. Analisis dilakukan untuk mengetahui komponen oligosakarida yang dihasilkan enzim. Gambar 7 menunjukkan terdapat tiga puncak yang dihasilkan dari hasil hidrolisis pati oleh enzim hasil pemurnian parsial dengan produk hidrolisis terdiri atas maltoheptosa, maltotriosa dan maltosa. Waktu retensi, luas area serta jenis maltooligosakarida yang dihasilkan bisa dilihat pada



**Gambar 6.** Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim amilase hasil pemurnian parsial dari bakteri laut *A. arilaitensis*



**Gambar 7.** Grafik hasil HPLC dari hidrolisis pati oleh amilase hasil pemurnian parsial dari bakteri laut *A. arilaitensis*

**Tabel 2.** Hasil hidrolisis pati oleh amilase hasil pemurnian parsial dari bakteri laut *A. arilaitensis* menggunakan metode HPLC

No.	Waktu retensi (min)	Area (%)	Nama Produk
1	5,807	97,400	Maltoheptosa
2	6,391	0,945	Maltotriosa
3	7,015	1,654	Maltosa

Tabel 2. Produk maltoheptosa dengan luas area terbesar sebesar 97,4%, maltotriosa 0,945% dan maltosa 1,654%. Luas area menunjukkan besarnya konsentrasi oligosakarida yang dihasilkan namun dalam penelitian ini tidak dilakukan pengukuran secara kuantitatif besaran konsentrasi produk.

**PEMBAHASAN**

Aktivitas enzim amilase mengalami peningkatan dari jam ke-24 hingga jam ke-72 dan menurun setelah jam ke-72 hingga jam ke-120. Aktivitas enzim pada hari pertama pertumbuhan sel menunjukkan adanya aktivitas enzim yang rendah. Peningkatan aktivitas enzim mencapai aktivitas tertinggi pada hari ke-3. Peningkatan aktivitas

enzim disebabkan oleh semua bakteri sudah memanfaatkan substrat pati untuk mensekresikan enzim amilase. Smith *et al.* (2005) dalam penelitiannya melaporkan bahwa puncak aktivitas  $\alpha$ -amilase tertinggi pada bakteri *A. psychrolactophilus* terjadi pada jam ke 72-96. Penurunan aktivitas enzim terjadi setelah jam ke-72 dan berjalan konstan dari jam ke-96 hingga jam ke-120. Penurunan aktivitas dapat terjadi karena terbentuknya produk berupa glukosa atau maltooligosakarida. Produk ini akan menghambat kerja amilase dalam menghidrolisis substrat pati.

Amilase ekstraseluler dari *A. arilaitensis* dimurnikan secara parsial dengan pengendapan aseton 90%, dan kromatografi penukar ion. Pelarut organik aseton dipilih untuk pengendapan enzim karena kemudahan pemisahan enzim target dari cairan. Aktivitas enzim amilase dari konsentrasi aseton 30% terus meningkat hingga mencapai aktivitas tertinggi pada konsentrasi 90%. Pada proses pengendapan terjadi penurunan kadar protein dalam supernatan dan sebaliknya akan terjadi peningkatan protein dalam endapan. Terlihat bahwa pengendapan dengan pelarut organik seperti aseton menunjukkan penurunan aktivitas enzim karena pengaruh adanya reduksi aktivitas air. Kekuatan pelarutan air untuk suatu muatan dan molekul enzim hidrofilik akan berkurang dengan meningkatnya konsentrasi pelarut organik (Suzuki *et al.* 2006).

Aktivitas enzim setelah pemurnian dengan kromatografi penukar ion sangat menurun dibanding enzim hasil pengendapan. Aktivitas enzim yang menurun diimbangi dengan protein total yang menurun menghasilkan aktivitas spesifik yang meningkat. Protein total yang menurun disebabkan karena sudah dihasilkan protein spesifik dari enzim yang diinginkan. Aktivitas enzim yang menurun pada proses pemurnian dapat disebabkan karena sebagian protein terdenaturasi dan rusak oleh pengaruh perlakuan selama pemurnian. Bahan pengendap aseton juga dapat berperan untuk mendenaturasi enzim. Kehilangan aktivitas enzim juga dimungkinkan karena hilangnya kation-kation pada enzim hasil pemurnian selama proses pemurnian. Hal ini akan mengakibatkan turunnya aktivitas enzim murni secara signifikan. Kalsium yang merupakan kation bekerja secara khusus untuk mengaktifkan

aktivitas amilase. Menurut Shipra *et al.* (2011), amilase tidak dapat bekerja tanpa adanya ion kalsium di dalam struktur protein dalam enzim amilase tersebut sehingga  $\alpha$ -amilase merupakan kalsium metaloenzim.

Proses pemurnian banyak menghilangkan protein sehingga konsentrasi protein menjadi kecil dan tidak memperlihatkan adanya pita pada gel elektroforesis, namun di sisi lain pita protein yang ditunjukkan pada teknik zimogram menunjukkan zona bening dari protein  $\alpha$ -amilase yang mampu menghidrolisis pati. Berdasarkan pengamatan tersebut (Gambar 3) diketahui bahwa  $\alpha$ -amilase adalah pita protein yang berzona bening dengan rentang berat molekul berkisar antara 50-75 kDa. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Annamalai *et al.* (2011) terhadap amilase yang berasal dari bakteri laut *Bacillus cereus* memiliki bobot molekul 65 kDa. Amilase yang berasal dari bakteri laut *Pseudomonas* sp. memiliki bobot molekul 50 kDa (Liu *et al.* 2011). Penelitian lain yang dilakukan oleh Ragunathan & Padhmadas (2013) terhadap amilase *Streptomyces* spp. menyatakan amilase terestimasi sebesar 44 kDa.

Karakterisasi pH menunjukkan adanya pengaruh pH pada aktivitas amilase. Perubahan pH mempengaruhi perubahan struktur dari enzim, kemampuan mengikat substrat dan kemampuan katalitik enzim (Mihara *et al.* 1991). Pada penelitian ini menunjukkan bahwa enzim amilase *A. arilaitensis* memiliki aktivitas enzim yang tinggi pada kisaran pH 5,0-9,0. Penentuan pH optimum enzim amilase juga telah dilaporkan oleh Smith *et al.* (2005) dari *A. psychrolactophilus* yang menghasilkan pH optimum antara 5,0-9,0.

Suhu merupakan komponen penting dalam aktivitas enzim karena dapat menentukan energi katalisis enzim dan kecepatan reaksi katalisis. Akan tetapi, suhu pun dapat mempengaruhi tingkat kestabilan enzim karena pada suhu tertentu enzim dapat terdenaturasi sehingga kehilangan aktivitasnya. Pada suhu optimum, enzim mencapai titik aktivitas enzim yang optimum dan masih memiliki tingkat stabilitas yang tinggi sehingga enzim memiliki aktivitas paling tinggi tanpa terdenaturasi. Pada suhu ini enzim memiliki kecepatan paling tinggi untuk melaksanakan proses hidrolisis substrat.

Hasil penelitian optimasi suhu enzim amilase *A. arilaitensis* menunjukkan bahwa seiring dengan kenaikan suhu, aktivitas enzim meningkat dan terus naik sampai suhu optimum 50°C. Di atas suhu 50°C aktivitas enzim mulai menurun. Hal ini disebabkan oleh mulai terdenaturasinya enzim pada suhu tersebut. Menurut Poedjiadi & Supriyatin (2006), suhu yang terlalu tinggi (jauh dari suhu optimum suatu enzim) akan menyebabkan enzim terdenaturasi. Bila enzim terdenaturasi, maka bagian aktifnya akan terganggu yang menyebabkan konsentrasi efektif enzim menjadi berkurang. Hal ini menyebabkan laju reaksi enzimatik menurun. Smith *et al.* (2005) telah melaporkan suhu optimum dari enzim amilase yang dihasilkan dari *A. psychrolactophilus* yaitu pada 50°C.

Hidrolisis enzimatik oleh  $\alpha$ -amilase *A. arilaitensis* selama 3 jam menghasilkan maltooligosakarida; maltosa (C2), maltotriosa (C3) dan maltoheptosa (C7) (Gambar 5 dan Tabel 2). Maltoheptosa merupakan produk dari hasil hidrolisis yang dihasilkan paling banyak diikuti dengan maltosa dan maltotriosa. Hasil hidrolisis enzim ini tidak berbeda jauh dengan hasil Rahmani (2013) yang meliputi glukosa, maltosa dan maltotriosa melalui aksi  $\alpha$ -amilase dari *Brevibacterium* sp. sedangkan hasil dari Lestari *et al.* (2011) adalah maltotriosa, maltosa, dan glukosa melalui aksi  $\alpha$ -amilase dari *Bacillus stearothermophilus* TII-12. Hasil hidrolisis yang beragam tersebut menunjukkan bahwa pola pemecahan enzim  $\alpha$ -amilase terjadi secara acak, sehingga  $\alpha$ -amilase *A. arilaitensis* adalah termasuk endoenzim. Menurut Souza dan Perolade (2010), produk akhir reaksi  $\alpha$ -amilase adalah oligosakarida dengan berbagai panjang dengan konfigurasi- $\alpha$ ,  $\alpha$ -limit dekstrin, yang merupakan campuran maltosa, maltotriosa, dan oligosakarida bercabang yang terdiri dari 6-8 unit glukosa yang mengandung ikatan  $\alpha$ -1,4 dan  $\alpha$ -1,6. Pada hasil penelitian ini glukosa tidak dapat terdeteksi pada hasil hidrolisis substrat dengan metode HPLC. Glukosa yang dihasilkan pada proses hidrolisis diduga memiliki konsentrasi yang sangat kecil. Mekanisme awal kerja enzim amilase adalah mendegradasi molekul pati menjadi oligosakarida dan tahap kedua terjadi pembentukan glukosa dan maltosa sebagai hasil akhir.

## KESIMPULAN

Bakteri laut *Arthrobacter arilaitensis* memproduksi enzim amilase dengan aktivitas tertinggi pada jam ke-72 dengan aktivitas 4,259 U/ml. Pengendapan dengan aseton 90% merupakan konsentrasi terbaik untuk memekatkan enzim ini dengan aktivitas spesifik sebesar 0,25 U/mg, dan pemurnian dengan kolom Sepharose memiliki aktivitas spesifik sebesar 0,38 U/mg. Kemurnian amilase hasil kromatografi meningkat 1,14 kali. Amilase hasil pemurnian memiliki aktivitas optimum pada suhu 50°C dan pH 9,0. Analisis zimogram menunjukkan adanya pita protein dengan berat molekul berkisar antara 50-75 kDa. Produk hasil hidrolisis amilase terhadap pati meliputi maltosa, maltotriosa, dan maltoheptosa.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini dibiayai oleh DIPA Pusat Penelitian Bioteknologi\_LIPI Tahun Anggaran 2015.

## DAFTAR PUSTAKA

- Annamalai, N., R. Thavasi, S. Vijayalakshmi, S., & T. Balasubramanian. 2011. Extraction, Purification and Characterization of Thermostable, Alkaline Tolerant  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus cereus*. *Indonesia Jurnal Microbiologi*. 51(4): 424-429.
- Ashwini, K., G. Kumar, L. Karthik, & KV. Rao. 2011. Optimization, production and partial purification of extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. *marini*. *Applied Science research*. 3(1): 33-42.
- Barreteau H, D. Cedric, & M. Philippe. 2006. Production of oligosaccharides as promising new food additive generation. *Food Technology and Biotechnology*. 44 (3): 323-333.
- Bernfeld, P. 1955.  $\alpha$ - Amylase and  $\beta$ -methodes. *Journal Enzymol*. 149-158.
- Chandrasekaran, M. & R. Kumar. 1997. Marine microbial enzymes. [www.eolss.net/sample\\_chapters/c17/e6-58-08-02.pdf](http://www.eolss.net/sample_chapters/c17/e6-58-08-02.pdf).
- Divakaran D, A. Chandran & RP. Chandran. 2011. Comparative Study on Production of a-

- Amylase from *Bacillus licheniformis* Strains. *Brazilian Journal Microbiology*. 42(4): 1397-1404.
- Gupta, R., P. Gigras, H. Mohapatra, VK. Goswami, & B. Chauhan. 2003. Microbial  $\alpha$ -Amylases: A Biotechnological Perspective. *Proceedings Biochemical*. 38: 1599-1616.
- Kumar, P., R. Manorama, Z. Begum, & S. Shivaji. 2010. *Arthrobacter antarcticus* sp. nov., Isolated from An Antarctic Marine Sediment. *International Journal Systematic Evolution Microbiology*. 60: 2263-2266.
- Lestari, P., Richana, N., Darwis, A., Syamsu, K., & Murdiyatmo, U. 2011. Purifikasi dan Karakterisasi  $\alpha$ -Amilase Termotabil dari *Bacillus stearothermophilus* TII-12. *Jurnal AgroBiogen*. 7(1): 56-62.
- Liu, J., Zhang, Z., Zhu, H., Dang, H., Lu, J., & Cui, Z. 2011. Isolation and Characterization of  $\alpha$ -amylase from marine *Pseudomonas* sp. K6-28-040. *African Journal Biotechnology*. 10(14): 2733-2740.
- Mihara, H., Sumi, H., Yoneta, T., Mizumoto, H., Ikeda, R., Seiki, M., & Maruyama, M. 1991. A Novel Fibrinolytic Enzyme Extracted from The Earthworm *Lumbricus rubellus*. *Japan Journal Physiology*. 41: 461-472.
- Poedjiadi, A. & T. Supriyatin. 2006. *Dasar-dasar Biokimia*. UI-Press. Jakarta.
- Purnawan, A., Y. Capriyanti, PA. Kumiadin, N. Rahmani, & Yopi. 2015. Optimasi Produksi Enzim Amilase dari Bakteri Laut Jakarta *Arthrobacter arilaitensis*. *Jurnal Biologi Indonesia*.
- Ragunathan, R. & R. Padhamas. 2013. Production, purification and characterization of  $\alpha$ -amylase using *Streptomyces* spp. PDS1 and *Rhodococcus* spp. Isolated from Western Ghats. *International Journal Current Microbiology Applied Science*. 2(8): 206-214.
- Rahmani, N., Rohanah, Sukarno, A. Andriani, & Yopi. 2013. Production of maltooligosaccharides from Black Potato (*Coleus tuberosus*) Starch by  $\alpha$ -Amylase from a Marine Bacterium (*Brevibacterium* sp.). *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*. 7(3): 129-136.
- Shipra, D., S. Surendra, S. Vinni. & LS. Manohar. 2011. Biotechnological Applications of Industrially Important Amylase Enzyme. *International Journal Pharmaceutical Biology Science*. 2(1): 486-496.
- Smith, M & J. Zahnley. 2005. Characteristics of the Amylase of *Arthrobacter psychrolactophilus*. *Journal Indian Microbiology and Biotechnol*. 32: 439-448.
- Souza, PM & OM. Perolade. 2010. Application of Microbial  $\alpha$ -Amylase in Industry-Review. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41: 850-861.
- Suzuki, Y., T. Nagayama, H. Nakano, & K. Oishi, K. 2006. Purification and Characterization of a Maltotriogenic  $\alpha$ -Amylase I and A Maltogenic  $\alpha$ -Amylase II Capable of Cleaving  $\alpha$ -1,6-Bonds in Amylopectin. *Starch*. 39: 211-214.
- Wang, D. M. Lu, X. Wang, Y. Jiao, Y. Fang, Z. Liu, & S. Wang. 2014. Improving Stability of A Novel Dextran-degrading Enzyme from Marine *Arthrobacter oxydans* KQ11. *Carbohydrat Polymers*. 103: 294-299.