

# BAB I PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Industri enzim telah berkembang pesat dan memainkan peran yang cukup penting dalam pengaplikasiannya di berbagai bidang. Penggunaan enzim dalam prosesnya terus mengalami peningkatan setiap tahun sebesar 10-15% karena memiliki fungsi utama sebagai katalis hayati untuk organisme. Meskipun begitu dalam penerapannya kebutuhan enzim di Indonesia masih belum terpenuhi, oleh karena itu Indonesia harus terus mengimpor enzim. Hal ini mendorong para peneliti untuk membuat kemajuan lebih besar dalam teknologi, salah satunya mengeksplorasi peran mikroorganisme dalam industri (Istia'nah et al., 2020).

Enzim memainkan peran penting dalam setiap proses biokimia. Enzim mengkatalisis setiap reaksi dalam rangkaian proses metabolisme, baik untuk membentuk maupun memecah molekul kompleks menjadi molekul yang lebih sederhana. Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu konsentrasi substrat, suhu, pH, aktivator dan inhibitor (Azhar, 2016). Secara umum, dalam penggunaannya enzim sangat berpengaruh untuk banyak hal dan sangat penting dalam dunia industri. Sejak tahun 1960, proses enzimatik mulai digunakan dalam industri. Enzim dapat menghemat energi dan ramah lingkungan, oleh karena itu enzim akan menjadi primadona industri saat ini dan di masa depan (Rodrigo et al., 2022).

Perkembangan teknologi aplikasi enzim, teknologi fermentasi, dan rekayasa genetika menyebabkan penggunaan enzim dalam dunia industri semakin meningkat. Salah satu jenis enzim yang penggunaannya terus meningkat adalah enzim amilase. Enzim amilase merupakan kelompok enzim yang memiliki kemampuan untuk memecahkan ikatan glikosida pada amilum (Purnawan et al., 2015). Menurut Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (1999), enzim ini menyumbang 30% dari semua enzim di dunia. Industri makanan, detergen, pengolahan air limbah, dan bahkan industri kertas telah menggunakan enzim amilase. Jenis enzim ini juga termasuk enzim yang ramah lingkungan dan tidak mengubah rasa atau produk industri makanan (George dan George, 2020).

Pemanfaatan enzim di Indonesia semakin banyak, terutama dalam bidang bioindustri. Selama bertahun-tahun, enzim amilase yang merupakan salah satu kelompok enzim yang dapat diproduksi oleh mikroorganisme, telah banyak digunakan dalam berbagai industri, baik di industri pangan maupun non-pangan. Namun, kebutuhan ini belum terpenuhi sehingga enzim harus diimpor dari luar negeri (Naiola, 2001). Enzim amilase sangat penting dalam penggunaannya di bidang industri, karena enzim ini menghidrolisis molekul pati menjadi polimer yang terdiri dari unit glukosa. Dalam penerapannya enzim amilase memiliki nilai komersial yang cukup tinggi dengan jamur dan bakteri sebagai sumber yang mendominasi dalam pengaplikasiannya. Beberapa contoh penggunaannya yaitu di bidang industri makanan, fermentasi dan farmasi. Produksi amilase sangat penting untuk konversi pati menjadi oligosakarida. Pati merupakan unsur penting dalam makanan manusia dan merupakan tempat penyimpanan utama produk dari banyak tanaman yang penting secara ekonomi seperti gandum, sagu, beras, jagung, tapioka dan kentang (Souza dan Magalhaes, 2010).

Enzim amilase terdiri dari beberapa jenis, salah satunya yaitu enzim  $\alpha$ -amilase atau endo-amilase yang dapat menghidrolisis  $\alpha$ -1,4 glikosidik untuk menghasilkan dekstrin, oligosakarida, dan monosakarida (Ariandi, 2016).

Enzim  $\alpha$ -amilase dapat memecahkan amilopektin, hal tersebut dapat menghasilkan dekstrin dengan berat molekul (BM) yang lebih rendah, serta dapat menghasilkan maltosa dan oligosakarida yang lebih besar. Peran ion kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) yang terdapat pada molekul  $\alpha$ -amilase tidak secara langsung dapat membentuk enzim-substrat, tetapi memiliki peran lain yaitu dapat membantu molekul enzim untuk menghasilkan kondisi stabil dan memiliki aktivitas yang ideal (George dan George, 2020).  $\alpha$ -Amilase biasa disebut dengan endo-amilase karena enzim tersebut tersubstrat memecah pati secara acak dari tengah dan bagian dalam molekul untuk menghasilkan dekstrin, oligosakarida, maltosa, dan D-glukosa (Jabeen et al., 2019). Enzim  $\alpha$ -amilase dapat diisolasi dari berbagai sumber, seperti tanaman, hewan, dan mikroorganisme, namun diketahui untuk keperluan industri, sebagian besar enzim ini diisolasi dari berbagai jenis mikroba. Mengisolasi enzim dari mikroba (bakteri) dibandingkan dengan tumbuhan ataupun hewan memiliki beberapa keuntungan, seperti mudah ditumbuhkan, pertumbuhan cepat, skala produksi sel dapat ditingkatkan dengan mudah, biaya produksi relatif lebih rendah, dan masih banyak keuntungan lainnya (Silaban dan Simamora, 2018).

Bakteri adalah kelompok mikroorganisme prokariotik (bersel tunggal) yang hidup berkoloni dan tidak memiliki selubung inti. Mereka dapat hidup di mana saja (Holderman et al., 2017). Salah satu hal yang berpengaruh terhadap pertumbuhan sel bakteri adalah suhu. Suhu berpengaruh nyata terhadap ketahanan struktur sel bakteri dan kerja enzim. Bakteri berdasarkan suhu pertumbuhannya dapat dikelompokkan menjadi bakteri psikrofilik ( $-5$ - $30^{\circ}\text{C}$ ) dengan suhu optimum  $10$ - $20^{\circ}\text{C}$ , bakteri mesofilik ( $10$ - $45^{\circ}\text{C}$ ) dengan suhu optimum  $20$ - $40^{\circ}\text{C}$ , dan bakteri termofilik ( $25$ - $80^{\circ}\text{C}$ ) dengan suhu optimumnya mencapai  $50$ - $60^{\circ}\text{C}$  (Boleng, 2015).

Bakteri termofilik juga telah mampu menghasilkan enzim yang stabil terhadap panas (enzim termostabil). Isolasi enzim termostabil dari organisme termofilik memiliki banyak manfaat, sehingga dapat digunakan dalam industri yang biasanya menggunakan suhu tinggi. Meningkatnya kecepatan reaksi dapat menghemat waktu, tenaga, dan biaya operasional, mengurangi kemungkinan kontaminasi, memudahkan pemisahan senyawa volatil, dan menjadi lebih stabil selama masa penyimpanan yang lebih lama (Irdawati et al., 2015). Penggunaan bakteri termofilik dan enzim termostabil yang dibuat untuk digunakan dalam industri semakin berkembang. Bakteri ini dikumpulkan dari berbagai habitat (Firliani et al., 2015). Bakteri termofilik dapat diisolasi dari berbagai tempat seperti kawah, sumber air panas, gunung berapi dan daerah bersuhu tinggi lainnya (Novitasari dan Herdyastuti, 2014).

Berdasarkan data yang diperoleh, beberapa peneliti telah berhasil mengisolasi bakteri amilolitik dari sumber air panas. Satu diantaranya adalah penelitian yang dilakukan oleh Novitasari dan Herdyastuti, (2014) menyatakan bahwa bakteri termofilik dapat diperoleh dari sumber air panas Singgahan Tuban, Jawa Timur sebagai penghasil enzim amilase. Penelitian pemurnian dan pemanfaatan enzim  $\alpha$ -amilase dari berbagai jenis mikroorganisme telah dilakukan oleh Lestari et al. (2011) yang memurnikan enzim  $\alpha$ -amilase dari *Bacillus stearothermophilus* TII-12 dengan metode

ultrafiltrasi, pengendapan aseton, dan gel filtrasi (Sephadex G-100). Aktivitas total, protein total, dan rendemen menurun, tetapi aktivitas spesifik meningkat. Penelitian yang dilakukan oleh Yandri dan Wulandari (2009), pemurnian enzim  $\alpha$ -amilase dari *Rhizopus oryzae* optimum pada pH 5,5 dan suhu 55°C. Aktivitas spesifik enzim hasil pemurnian sebesar 829,46 U/mg protein, hampir 38 kali lebih besar daripada ekstrak kasar, yang memiliki aktivitas spesifik sebesar 22,096 U/mg protein. Selain itu untuk pengaruh ion logam pada penelitian yang dilakukan oleh Arfah et al. (2015) dari isolat bakteri *Bacillus* sp. RSAII-1b aktivitas amilase pada ekstrak kasar optimum dengan penambahan ion  $\text{Ca}^{2+}$  10 mM dapat meningkatkan aktivitas amilase hingga 32,89% sedangkan ion  $\text{Zn}^{2+}$  dapat menurunkan aktivitas amilase hingga 25%, kemudian penelitian yang dilakukan oleh Merkuriana (2023), menyatakan bahwa ekstrak kasar amilase dapat digunakan dalam pemanfaatan pati beras ketan untuk dihidrolisis menjadi sirup maltosa pada suhu 65°C dan pH 5,7.

Sirup maltosa merupakan salah satu gula dari bahan alami yang perlu dikembangkan karena lebih ramah lingkungan dibandingkan dengan gula sintesis yang dihasilkan melalui proses kimiawi. Sirup maltosa dihasilkan melalui proses pati dengan bantuan enzim  $\alpha$ -amilase untuk memecah molekul pati menjadi gula sederhana. Amilase menguraikan polisakarida menjadi maltosa, sehingga diperlukan kondisi optimum enzim untuk menghasilkan produk yang maksimal. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Susanto, (2013) bahwa enzim amilase dapat menghidrolisis pati ubi jalar cilembu untuk menghasilkan sirup maltosa dengan karakteristik nilai DE 51,9%, kadar air mencapai 69,27%, dan viskositas 0,40 dPas.

Berdasarkan uraian tersebut, maka dilakukan isolasi, karakterisasi dan pemurnian parsial enzim  $\alpha$ -amilase dari isolat bakteri termofil *Enterobacter hormaechei* SRL.40-2-1. Karakterisasi enzim ini meliputi pengujian aktivitas enzim terhadap pH, suhu, substrat, waktu inkubasi, pengaruh ion logam, pengaruh stabilitas pH dan pengaruh stabilitas suhu. Prosedur pemurnian parsial meliputi sentrifugasi, fraksinasi amonium sulfat dan dialisis membran selofan sehingga mampu menghasilkan enzim  $\alpha$ -amilase dengan aktivitas enzim optimum dalam pengaplikasiannya menghidrolisis pati sagu menjadi sirup maltosa.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, rumusan masalah adalah sebagai berikut:

1. apakah enzim  $\alpha$ -amilase dari isolat bakteri termofil *Enterobacter hormaechei* SRL.40-2-1 mampu menghidrolisis pati sagu menjadi maltosa?
2. bagaimana karakteristik enzim  $\alpha$ -amilase dari isolat bakteri termofil *Enterobacter hormaechei* SRL.40-2-1?
3. apakah pemurnian enzim secara parsial (fraksinasi dengan amonium sulfat dan dialisis) dapat meningkatkan aktifitas spesifik enzim  $\alpha$ -amilase dari isolat bakteri termofil *Enterobacter hormaechei* SRL.40-2-1?
4. apakah enzim  $\alpha$ -amilase dalam menghidrolisis pati sagu dapat menghasilkan sirup maltosa?
5. bagaimana karakteristik sirup maltosa yang dihasilkan menggunakan dialisat enzim  $\alpha$ -amilase dalam menghidrolisis pati sagu?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. mengisolasi enzim  $\alpha$ -amilase dari isolat bakteri termofil *Enterobacter hormaechei* SRL.40-2-1 dan menentukan aktivitas enzim.
2. mengkarakterisasi sifat fisik dan kimia enzim  $\alpha$ -amilase (*crud* enzim) dari isolat bakteri termofil *Enterobacter hormaechei* SRL.40-2-1.
3. memurnikan secara parsial enzim  $\alpha$ -amilase melalui proses fraksinasi amonium sulfat dan dialisis. Enzim hasil pemurnian secara parsial ditentukan aktivitas spesifik enzim  $\alpha$ -amilase dari isolat bakteri termofil *Enterobacter hormaechei* SRL.40-2-1.
4. memperoleh sirup maltosa yang dihasilkan dari pati sagu menggunakan dialisat enzim  $\alpha$ -amilase dari isolat bakteri termofil *Enterobacter hormaechei* SRL.40-2-1.
5. mengkarakterisasi sifat fisik dan kimia sirup maltosa yang diperoleh dari hidrolisis pati sagu dengan enzim  $\alpha$ -amilase dari isolat bakteri termofil *Enterobacter hormaechei* SRL.40-2-1.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut:

1. memberikan informasi tentang hasil isolasi dan aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase dari isolat bakteri termofil *Enterobacter hormaechei* SRL.40-2-1.
2. memberikan informasi tentang karakteristik sifat fisik dan kimia dari isolat bakteri termofil *Enterobacter hormaechei* SRL.40-2-1.
3. memberikan informasi tentang pemurnian secara parsial (fraksinasi dengan amonium sulfat dan dialisis) dari isolat bakteri termofil *Enterobacter hormaechei* SRL.40-2-1.
4. memberikan informasi tentang karakteristik sirup maltosa yang dihasilkan dari hidrolisis pati sagu dengan menggunakan enzim  $\alpha$ -amilase dari isolat bakteri termofil *Enterobacter hormaechei* SRL.40-2-1.

## **BAB II METODE PENELITIAN**

### **2.1 Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri termofil SRL.40-2-1, yeast ekstrak, *Nutrient Agar* (NA), *agar base*, pepton, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O (Merck), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck), CH<sub>3</sub>COOH (Merck), CH<sub>3</sub>COONa (Merck), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Merck), BaCl<sub>2</sub> (Merck), KCl (Merck), NaCl (Merck), MgCl<sub>2</sub> (Merck), ZnCl<sub>2</sub> (Merck), CaCl<sub>2</sub> (Merck), NaOH (Merck), CuCl<sub>2</sub> (Merck), CdCl<sub>2</sub> (Merck), K-Na tartrat, amilum standar (Merck), pati sagu, iodin, DNS (*3,5-dinitro salisilat acid*), *Bovin Serum Albumin* (BSA), maltosa (Merck), fenol (Merck), *folin-ciocalteu* (Merck), BaOH.8H<sub>2</sub>O, etanol 95%, akuades, dan membran selofan.

### **2.2 Alat Penelitian**

Peralatan utama yang digunakan adalah pH meter, vortex, jarum ose, *shaker waterbath* (WBS-18), spektrofotometer UV-Vis, *autoclave* (Model 8000 *DNE Napco*), lampu spiritus, *centrifuge* (*Hermle Z 366 K*), mikropipet (100-1000 µL), neraca analitik (*Ohaus*), *hotplate* magnetik strirer, cawan petridis, inkubator (*Memmert*), digital *viscometer* (biobase) dan alat-alat gelas yang umum digunakan di laboratorium.

### **2.3 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini telah dilaksanakan sejak bulan Mei-Desember 2024. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Anorganik, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan alam serta di Laboratorium Bioteknologi Terpadu, Fakultas Peternakan, Universitas Hasanuddin.

### **2.4 Prosedur Penelitian**

#### **2.4.1 Persiapan substrat dan Pembuatan Media**

##### **a. Persiapan Substrat Pati Sagu**

Substrat pati sagu (2%) dibuat dengan menimbang pati sagu sebanyak 2 g kemudian dilarutkan dengan sedikit akuades lalu dipanaskan hingga jernih dan homogen. Selanjutnya dicukupkan dengan akuades hingga mencapai volume 100 mL.

##### **b. Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)**

Media *Nutrient Agar* (NA) dibuat dengan menimbang *Nutrient Agar* sebanyak 1,2 g kemudian ditambahkan 120 mL akuades. Media Dipanaskan hingga larut sempurna. Media yang sudah larut kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. Media NA dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan cawan petri yang sudah steril. Ditutup tabung reaksi dengan kapas yang sudah disterilkan (Susanti et al., 2022).

##### **c. Pembuatan Media Selektif**

Media selektif amilolitik dibuat dengan menimbang 0,2% bacto-ekstrak ragi, 0,5% bacto-pepton, 0,05% MgSO<sub>4</sub>, 0,05% NaCl, 0,015% CaCl<sub>2</sub>, 2% agar dan 1 % pati.

Dipanaskan hingga larut dan diatur pH 7. Media disterilisasi di dalam autoklaf pada suhu 121°C tekanan 2 atm selama 15 menit. Dituang ke dalam cawan petri steril (Mawati et al., 2021) dimodifikasi.

#### **d. Pembuatan Media Inokulum**

Proses pembuatan media inokulum dimulai dengan menimbang 0,375 g pati; 0,2 g bacto-ekstrak ragi; 0,5 g bacto-pepton; 0,025 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,0025 g NaCl; dan 0,04 g  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  kemudian dilarutkan dengan akuades hingga volume 50 mL. Larutan dipanaskan hingga larut dan diatur pH 7. Media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit (Arfah et al., 2015) dimodifikasi.

#### **e. Pembuatan Media Produksi**

Proses pembuatan media produksi dimulai dengan menimbang 3,75 g pati; 2,0 g bacto-ekstrak ragi; 5 g bacto-pepton; 0,25 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,025 g NaCl; dan 0,4 g  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  kemudian dilarutkan dengan akuades hingga volume 500 mL. Larutan dipanaskan hingga larut dan diatur pH 7. Media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit (Arfah et al., 2015) dimodifikasi.

#### **2.4.2 Pembuatan Reagen DNS**

Reagen DNS dibuat dengan mencampurkan 1 g DNS kedalam 20 mL NaOH 2 N dan 50 mL akuades. Selanjutnya ditambahkan 30 g Na-K-Tartrat dan diaduk hingga homogen. Larutan ditambahkan akuades hingga volumenya mencapai 100 mL (Elfirta et al., 2023).

#### **2.4.3 Peremajaan Bakteri**

Bakteri termofil diambil sebanyak 2 ose kemudian digores pada media *Nutrient Agar* (NA) pada cawan petri dan media agar miring pada tabung reaksi. Media diinkubasi pada suhu 40°C selama 24 jam (Anggraeni dan Triajie, 2021) dimodifikasi.

#### **2.4.4 Pengujian Secara Kualitatif Enzim $\alpha$ -Amilase dari Isolat Bakteri Termofil *Enterobacter hormaechei* SRL.40-2-1**

Pengujian secara kualitatif dilakukan untuk mengetahui adanya enzim  $\alpha$ -amilase pada bakteri yang diuji. Pengujian ini dimulai dengan koloni bakteri digoreskan pada media selektif amilolitik yang telah memadat dan diinkubasi pada suhu 40°C di dalam inkubator selama 2 hari. Adanya aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase dapat dilihat dengan munculnya zona bening di sekitar koloni bakteri setelah ditetesi dengan larutan iodin (Istia'nah et al., 2020) dimodifikasi.

#### **2.4.5 Isolasi Enzim $\alpha$ -Amilase dari Isolat Bakteri Termofil *Enterobacter hormaechei* SRL.40-2-1**

Biakan bakteri termofil murni diambil 1 ose dari stok kultur yang umur 24 jam dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang telah diisi 50 mL media inokulum, lalu diinkubasi dalam inkubator *shaker* pada suhu 45°C, 150 rpm, selama 24 jam. Selanjutnya, 10% inokulum aktif dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi media

produksi steril, kemudian media produksi yang berisi inokulum aktif diinkubasi dalam inkubator *shaker* pada suhu 45°C, 150 rpm, selama 45 jam. Selanjutnya dilakukan pemisahan sel dari media dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm, dengan suhu 4°C, selama 15 menit. Supernatan (filtrat) yang dihasilkan merupakan ekstrak kasar enzim  $\alpha$ -amilase. Ekstrak kasar yang diperoleh kemudian diuji aktivitas enzim dan kadar proteinnya (Arfah dkk., 2015) dimodifikasi.

## 2.4.6 Penentuan Aktivitas Enzim dan Aktivitas Spesifik Enzim $\alpha$ -Amilase

### a. Penentuan Aktivitas Enzim Amilase

Prinsip uji aktivitas amilase didasarkan pada jumlah gula reduksi (maltosa) yang dihasilkan dari hidrolisis pati dengan menggunakan metode DNS. Sebanyak 0,5 mL ekstrak kasar amilase; 0,5 mL larutan buffer fosfat pH 6; dan 0,5 mL substrat pati sagu 2% diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Setelah itu campuran ditambahkan 1,5 mL pereaksi DNS, lalu dikocok dengan vortex selama 10 detik. Selanjutnya campuran tersebut dipanaskan di dalam air mendidih selama 10 menit, kemudian didinginkan dalam air es. Hasil reaksi diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 514 nm. Kadar maltosa hasil hidrolisis pati oleh enzim  $\alpha$ -amilase dapat dihitung dengan menggunakan kurva kalibrasi larutan standar maltosa pada kisaran 50-800 ppm (Arfah, 2016) dimodifikasi. Perhitungan kadar maltosa dilakukan dengan mensubstitusikan absorbansi larutan yang diperoleh pada penentuan kadar maltosa ke dalam persamaan regresi kurva kalibrasi larutan standar maltosa. Kadar maltosa yang diperoleh digunakan untuk menentukan aktivitas enzim dengan rumus pada persamaan (1).

$$\text{Aktivitas Enzim (U/mL)} = \frac{[\text{maltosa}] \times F_p}{\text{BM} \times V \times t} \quad (1)$$

Keterangan:

[maltosa]	= kadar maltosa (ppm)
F <sub>p</sub>	= faktor pengenceran
BM	= bobot molekul maltosa
V	= volume enzim yang digunakan dalam mL
t	= waktu inkubasi dalam satuan menit

Aktivitas enzim yang diperoleh dinyatakan dalam unit/mL, dimana satu unit aktivitas  $\alpha$ -Amilase adalah sejumlah enzim yang menghasilkan 1  $\mu$ mol gula reduksi (maltosa) permenit pada kondisi tertentu.

### b. Penentuan Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik

Penentuan kadar protein ditentukan berdasarkan metode Lowry. Campuran 2 mL larutan enzim dan 2,75 mL pereaksi Lowry B, dikocok dengan vortex. Campuran tersebut kemudian didiamkan pada suhu kamar selama 15 menit, selanjutnya ditambahkan 0,25 mL pereaksi *folinciocalteu* (Lowry A) dan dikocok dengan vortex. Setelah itu, campuran tersebut didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit agar reaksi berjalan sempurna. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 730 nm (Melisha et al., 2016).

Perhitungan kadar protein enzim dilakukan dengan mensubstitusikan absorbansi larutan yang diperoleh pada penentuan kadar protein enzim ke dalam persamaan regresi kurva kalibrasi larutan standar BSA. Kadar protein yang diperoleh, selanjutnya digunakan untuk menentukan aktivitas spesifik enzim menggunakan rumus pada Persamaan 2 (Al-Agamy et al., 2021):

$$\text{Aktivitas Spesifik (U/mg)} = \frac{\text{Aktivitas Enzim (U/mL)}}{\text{Kadar Protein (mg/mL)}} \quad (2)$$

#### **2.4.7 Karakterisasi Enzim $\alpha$ -Amilase dari Isolat Bakteri Termofilik**

##### **a. Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim $\alpha$ -Amilase**

Substrat pati sagu 1,5% dan larutan buffer fosfat pH 7 masing-masing sebanyak 0,5 mL dimasukkan ke dalam 5 tabung reaksi. Selanjutnya ke 5 tabung tersebut ditambahkan 0,5 mL ekstrak kasar enzim  $\alpha$ -amilase. Campuran tersebut dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 40, 45, 50, 55, dan 60°C selama 30 menit. Setelah itu, ditambahkan 1,5 mL pereaksi DNS dan dihomogenkan menggunakan vortex. Campuran dipanaskan selama 10 menit, kemudian pengukuran absorbansi dikerjakan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 514 nm (Istia'nah et al., 2020) dimodifikasi.

##### **b. Pengaruh Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Enzim $\alpha$ -Amilase**

Substrat pati sagu 1,5% dan larutan buffer fosfat pH 7 masing-masing sebanyak 0,5 mL dimasukkan ke dalam 5 tabung reaksi. Selanjutnya ditambahkan 0,5 mL ekstrak kasar enzim  $\alpha$ -amilase. Campuran tersebut dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu optimum 50°C selama 15, 30, 45, 60, dan 90 menit. Setelah itu, ditambahkan 1,5 mL pereaksi DNS dan dihomogenkan menggunakan vortex. Campuran dipanaskan selama 10 menit, kemudian pengukuran absorbansi dikerjakan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 514 nm (Istia'nah et al., 2020) dimodifikasi.

##### **c. Pengaruh Konsentrasi pH Terhadap Aktivitas Enzim $\alpha$ -Amilase**

Substrat pati sagu 1,5% dan larutan buffer (buffer sitrat pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; dan buffer fosfat pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5) masing-masing sebanyak 0,5 mL dimasukan kedalam 8 tabung reaksi. Selanjutnya ditambahkan 0,5 mL ekstrak kasar enzim  $\alpha$ -amilase. Campuran tersebut dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu optimum 50°C selama waktu inkubasi optimum 30 menit. Setelah itu, ditambahkan 1,5 mL pereaksi DNS dan dihomogenkan menggunakan vortex. Campuran dipanaskan selama 10 menit, kemudian pengukuran absorbansi dikerjakan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 514 nm (Istia'nah et al., 2020) dimodifikasi.

##### **d. Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Enzim $\alpha$ -Amilase**

Substrat pati sagu dipipet sebanyak 0,5 mL dengan konsentrasi 1,4%, 1,6%, 1,8%, 2%, dan 2,2% kedalam tabung 5 reaksi kemudian ditambahkan 0,5 mL larutan buffer fosfat pH 6 (pH optimum). Selanjutnya ke dalam campuran tersebut ditambahkan 0,5 mL

ekstrak kasar enzim  $\alpha$ -amilase. Campuran diinkubasi pada suhu optimum  $50^{\circ}\text{C}$  selama waktu inkubasi optimum 30 menit. Setelah itu, ditambahkan 1,5 mL pereaksi DNS dan dihomogenkan menggunakan vortex selama 10 detik. Campuran dipanaskan selama 10 menit di air yang mendidih, kemudian pengukuran absorbansi dikerjakan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (514 nm) (Istia'nah et al., 2020) dimodifikasi.

#### **e. Pengaruh Ion Logam Terhadap Aktivitas Enzim $\alpha$ -Amilase**

Penambahan ion logam untuk mengetahui jenis logam yang berperan sebagai aktivator atau inhibitor. Ekstrak kasar enzim  $\alpha$ -amilase dan larutan buffer fosfat pH 6 (pH optimum) disiapkan masing-masing 0,5 mL kedalam 24 tabung reaksi. Setelah itu, ditambahkan 0,5 mL substrat pati sagu optimum 2%. Selanjutnya ditambahkan berbagai jenis ion logam seperti:  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CdCl}_2$ , dan  $\text{ZnCl}_2$  pada konsentrasi 5, 10 dan 50 mM dan dihomogenkan menggunakan vortex. Campuran lalu diinkubasi pada suhu optimum  $50^{\circ}\text{C}$  selama waktu inkubasi optimum 30 menit. Selanjutnya, sebanyak 1,5 mL pereaksi DNS ditambahkan pada larutan tersebut dan dihomogenkan menggunakan vortex lalu campuran dipanaskan selama 10 menit, kemudian pengukuran absorbansi dikerjakan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 514 nm (Arfah et al., 2015) dimodifikasi.

#### **f. Penentuan Stabilitas pH**

Penentuan stabilitas pH terhadap aktivitas enzim dapat dilakukan dengan cara prainkubasi enzim. Sebanyak 0,5 mL enzim ditambahkan dengan 0,5 mL substrat pati sagu pada kondisi optimum 2%; 0,5 mL buffer sitrat pH 5 dan dan buffer fosfat pH 6, serta 0,5 mL ion logam  $\text{CaCl}_2$  10 mM. Prainkubasi dilakukan selama 2 jam pada suhu optimum  $50^{\circ}\text{C}$  dan diuji aktivitas  $\alpha$ -amilase menggunakan metode DNS selang waktu 30 menit (Arfah, 2016).

#### **g. Penentuan Stabilitas Suhu**

Penentuan stabilitas suhu terhadap aktivitas enzim dapat dilakukan dengan cara prainkubasi enzim. Sebanyak 0,5 mL enzim ditambahkan dengan 0,5 mL substrat pada kondisi optimum 2%; 0,5 mL buffer sitrat pH optimum (pH 5) dan 0,5 mL ion logam  $\text{CaCl}_2$  10 mM. Prainkubasi dilakukan selama 3 jam pada suhu  $50^{\circ}\text{C}$  dan  $60^{\circ}\text{C}$ . Aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase diuji menggunakan metode DNS selang waktu 30 menit (Arfah, 2016).

### **2.4.8 Pemurnian Enzim $\alpha$ -Amilase dari Isolat Bakteri Termofilik**

#### **a. Pengendapan dengan Amonium Sulfat**

Enzim ekstrak kasar hasil isolasi dari isolat bakteri termofil SRL.40-2-1 selanjutnya difraksinasi menggunakan ammonium sulfat pada tingkat kejenuhan yang berbeda (0-20%, 20-40%, 40-60%, dan 60-80%). Sebanyak 250 mL enzim  $\alpha$ -amilase ekstrak kasar ditambahkan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan 0-20% secara bertahap sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan lambat dalam kondisi dingin hingga larut sempurna dan didiamkan selama 24 jam pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ .

selanjutnya disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit untuk memisahkan filtrat dan endapan. Filtrat yang diperoleh diukur volumenya dan dilanjutkan untuk tahap fraksinasi tingkat kejenuhan selanjutnya, sedangkan endapan dilarutkan dengan 10 mL buffer fosfat 0,2 M pH 6 hingga terjadi pemekatan. Selanjutnya ditentukan kadar protein dan aktivitas enzim untuk masing-masing fraksi. Fraksi dengan aktivitas paling besar kemudian dimurnikan dengan cara dialisis (Ningtyas dkk., 2023) dimodifikasi.

## **b. Dialisis**

Proses dialisis dimulai dengan memasukkan fraksi enzim terbaik kedalam kantong selofan, kemudian bagian atas dan bawah kantong selofan diikat menggunakan benang. Dilakukan dialisis dengan merendam kantong selofan dalam buffer fosfat 50 mM pH 6 sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu 5°C. Setiap 2 jam larutan buffer fosfat harus diganti selama 6 jam. Setiap larutan buffer yang dikeluarkan diuji dengan larutan Ba(OH)<sub>2</sub>.8H<sub>2</sub>O 2% untuk mengetahui apakah masih terdapat garam. Proses dialisis dihentikan jika sudah tidak mengandung garam yang ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna putih. Larutan enzim hasil dialisis selanjutnya diuji kembali aktivitas dan kadar protein totalnya (Tazkiyah dkk., 2017).

### **2.4.9 Aplikasi Enzim α-Amilase dari Isolat Bakteri Termofil SRL.40-2-1 Menghidrolisis Pati Sagu Menjadi Sirup Maltosa**

Produksi sirup maltosa dilakukan menggunakan kondisi optimum enzim hasil karakterisasi. Substrat pati sagu 2% dilarutkan dalam 150 mL buffer sitrat pH 5 yang mengandung ion logam CaCl<sub>2</sub> 10 mM dan digelatinasi pada suhu 80°C selama 15-20 menit. Suhu kemudian diturunkan menjadi 50°C dan ditambahkan 0,329; 0,658; dan 0,987 Unit enzim hasil dialisis (variasi konsentrasi enzim). Kembali dipanaskan diatas *hotplate stirrer* selama 60 menit pada suhu 60°C. Larutan kemudian diturunkan suhunya untuk diatur pH-nya menjadi pH optimum. Aktivitas enzim dihentikan melalui proses pemanasan pada suhu 80°C selama 30 menit. Disaring produk untuk menghilangkan sisa-sisa pengotor yang mungkin masih ada di dalam larutan (Diopol et al., 2023) dimodifikasi. Produk sirup maltosa yang diperoleh kemudian dianalisis kadar gula total dengan metode fenol-sulfat dan kadar gula reduksi dengan metode DNS. Hasil dari analisis tersebut diperoleh konsentrasi total gula, gula reduksi dan nilai DE pada setiap variasi konsentrasi enzim.

### **2.4.10 Karakterisasi Sirup Maltosa yang Dihasilkan dari Hidrolisis Pati Sagu Menggunakan Enzim α-Amilase dari Isolat Bakteri Termofil SRL.40-2-1**

#### **a. Penentuan Nilai Dekstrosa Ekuivalen**

Penentuan nilai Dekstrosa Ekuivalen (DE) terlebih dahulu harus mengetahui nilai gula reduksi dan gula total pada produk sirup maltosa, sebagai berikut:

#### **1. Penentuan Gula Reduksi dengan Metode DNS**

Produk sirup maltosa sebanyak 1,5 mL setiap variasi konsentrasi di masukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1,5 mL reagen DNS. Larutan kemudian

dihomogenkan dengan vortex selama 10 detik dan dipanaskan di air yang mendidih selama 10 menit. Didinginkan dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum (514 nm). Larutan standar yang digunakan adalah larutan standar maltosa dengan konsentrasi 50-800 ppm dengan akuades sebagai blanko. Kadar maltosa yang diperoleh (Lampiran 13) melalui hasil substitusi kedalam persamaan regresi kurva kalibrasi kemudian digunakan untuk menentukan nilai dekstrosa ekuivalen (DE). Nilai DE dapat diperoleh dengan menggunakan rumus pada persamaan 3 (Putri dan Sukandar, 2008).

$$DE = \frac{\text{Konsentrasi gula reduksi}}{\text{Konsentrasi total gula}} \times 100\% \quad (3)$$

## 2. Penentuan Total Gula dengan Metode Fenol-Sulfat

Produk sirup maltosa sebanyak 1,5 mL ditambahkan dengan 0,75 mL larutan fenol 5% dan 3,75 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> yang diteteskan secara perlahan-lahan melalui dinding tabung. Selanjutnya didiamkan selama 10 menit dan dihomogenkan dengan vortex selama 10 detik. Larutan tersebut kemudian didiamkan pada suhu ruang selama 20 menit hingga terjadi perubahan warna, diukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum 491 nm. Larutan standar yang digunakan adalah maltosa pada konsentrasi 0,02-0,16 mg/mL dan akuades sebagai blanko. Kadar maltosa yang diperoleh (Lampiran 14) melalui hasil substitusi kedalam persamaan regresi kurva kalibrasi larutan standar maltosa metode fenol-sulfat kemudian digunakan untuk menentukan nilai dekstrosa ekuivalen (DE) dengan menggunakan rumus pada persamaan 3.

### b. Kadar Air

Sampel sirup maltosa ditimbang sebanyak 1,94 g dalam cawan petri yang sudah diketahui bobotnya kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C, setelah itu didinginkan cawan petri di dalam desikator dan ditimbang. Diulangi prosedur yang sama hingga memperoleh bobot yang tetap. Kadar air dapat dihitung menggunakan persamaan 4 (Wilberta et al., 2021) dimodifikasi.

$$\text{Kadar Air (\%)} = \frac{(B-C)}{(B-A)} \times 100 \% \quad (4)$$

Keterangan:

A = berat kering cawan (g)

B = berat kering cawan dan sampel awal (g)

C = berat kering cawan dan sampel setelah dikeringkan

### c. Uji Organoleptis

Pemeriksaan organoleptis meliputi warna dan rasa.

**d. Uji Derajat Keasaman**

Penentuan pH dilakukan menggunakan pH meter. Uji pH diukur dengan cara mencelupkan secara langsung ke dalam sirup maltosa. Dilihat dan dicatat angka konstan yang tertera pada pH meter (Yuwanda et al., 2023).

**e. Uji Viskositas**

Pengujian viskositas dilakukan dengan cara memasukkan sampel ke dalam wadah lalu dipasang *spindle*-L No 4. Pastikan spindle terendam sampai batas yang ditentukan dalam sampel. Pengujian dilakukan pada kecepatan 12 rpm. Dicatat hasil yang tertera pada layar viskositas (Yuwanda et al., 2023).