

# PENENTUAN KONSENTRASI OPTIMUM GLUTARALDEHID UNTUK AMOBILISASI ENZIM $\alpha$ -AMILASE DARI *Bacillus Subtilis* ITBCCB148 PADA KITOSAN

Arum Widyasmara

Politeknik AKA Bogor

Jl. Pangeran Sogiri No 283, Bogor, Indonesia

## Abstrak

Pada penelitian ini telah dilakukan amobilisasi enzim  $\alpha$ -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 melalui metode ikatan silang pada matriks kitosan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui penentuan konsentrasi glutaraldehid untuk amobilisasi enzim  $\alpha$ -amilase dari *Bacillus Subtilis* ITBCCB148 pada kitosan. Tahap penelitian ini meliputi proses produksi, isolasi, pemurnian, dan penentuan kadar glutaraldehid untuk amobilisasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas spesifik enzim  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian hingga tahap dialisis adalah 4.504,15 U mg<sup>-1</sup> dan kemurniannya meningkat 4,87 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim. Aktivitas unit tertinggi enzim  $\alpha$ -amilase hasil amobilisasi pada matriks kitosan dengan penambahan konsentrasi glutaraldehid 0,4 %.

Kata kunci :  $\alpha$ -amilase, amobilisasi, *Bacillus subtilis* ITBCCB148, glutaraldehid, kitosan.

## Abstract

In this study, the  $\alpha$ -amylase enzyme from *Bacillus subtilis* ITBCCB148 was immobilized through crosslinking method on chitosan matrix. The aims of this study were to determine the glutaraldehyde concentration to immobilizing  $\alpha$ -amylase enzyme from *Bacillus Subtilis* ITBCCB148 on chitosan. The steps of this study were done as following: production process, isolation, purification, and determinate glutaraldehyd concentration to immobilization. The results showed that the specific activity of the purified  $\alpha$ -amylase enzyme after the dialysis stage was 4504.15 U mg<sup>-1</sup> and its purity increased 4.87 times than the crude extract enzyme. The highest unit activity of immobilized  $\alpha$ -amylase on chitosan is reached by added 0,4 % of concentration glutaraldehyde.

Key Words :  $\alpha$ -amylase, *Bacillus subtilis* ITBCCB148, chitosan, glutaraldehyde, immobilization

## PENDAHULUAN

Hidrolisis pati yang memiliki bobot molekul rendah dikatalisis oleh  $\alpha$ -amilase yang merupakan enzim komersial yang paling penting. Produk hasil hidrolisis telah diaplikasikan secara luas pada industri makanan, kertas dan tekstil.  $\alpha$ -amilase merupakan endoamilase yang mengkatalisis reaksi hidrolisis internal ikatan pada  $\alpha$ -1,4-glikosida dalam tepung secara acak (Konsula *et.al.*, 2004).

Dalam industri pangan, hidrolisis pati untuk menghasilkan gula pereduksi umumnya berlangsung pada reaksi secara *batch*, dimana secara ekonomis merugikan karena enzim hanya digunakan sekali. Agar enzim dapat digunakan berulang, amobilisasi enzim telah digunakan di beberapa industri. Saat ini,  $\alpha$ -amilase telah diamobilisasi secara kovalen pada mikrospore *poly (hydroxyethylmethacrylate)*, *poly (methylmethacrylate – acrylic acid)* dan

membran zirkonium.  $\alpha$ -amilase juga telah digunakan pada penyangga umum, seperti membran nitroselular dan manik kitosan secara fisik dan adsorpsi *ion-exchange* (Bayramoglu *et.al.*, 2004).

Proses amobilisasi  $\alpha$ -amilase dari isolat bakteri lokal *B.subtilis* ITBCCB148 telah sukses meningkatkan stabilitas enzim pada suhu tinggi dengan *Diethylaminoethyl Cellulosa* (DEAE-*Cellulosa*) meskipun stabilitas suhunya hanya meningkat 1,5 kali. Penggunaan berulang pada enzim amobil juga lebih baik dari enzim murni (Yandri dkk, 2010b).

Kitosan dapat digunakan sebagai penyangga untuk enzim maupun sel utuh. Kitosan [*poly- $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-deoxy-D-glucose*] merupakan produk deasetilasi dari kitin yang dihasilkan dari kerangka luar *family crustacea* yang memiliki kelarutan dalam larutan asam lebih tinggi dari kitin. Kitosan merupakan senyawa yang murah, inert, hidrofilik, penyangga yang biokompatibel, sehingga menarik untuk digunakan sebagai penyangga dalam amobilisasi enzim. Kehadiran gugus amina memfasilitasi ikatan kovalen pada enzim (Cetinus *et.al.*, 2003).

Ada beberapa metode yang digunakan untuk amobilisasi enzim pada kitosan. Antara lain metode penguapan pelarut, metode netralisasi, metode ikatan silang, dan metode gelasi ionotropik. Metode

ikatan silang menggunakan glutaraldehid sebagai media ikatan silang kitosan. Glutaraldehid memiliki dua gugus aldehid yang dapat berikatan dengan asam amino bebas pada kitosan dan protein enzim (Krajewska, 2004)

Berdasarkan hasil-hasil yang telah dilaporkan tersebut, maka pada penelitian ini dilakukan penentuan konsentrasi glutaraldehid untuk amobilisasi enzim  $\alpha$ -amilase dari *Bacillus Subtilis* ITBCCB148 pada kitosan.

## METODOLOGI PENELITIAN

### Alat dan Bahan

Mikroorganisme yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri *Bacillus subtilis* ITBCCB148. Bahan kimia yang digunakan adalah: ekstrak ragi, pati, agar NA, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KCl, FeSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaOH, CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O, I<sub>2</sub>, KI, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, fenol, Na-K tartrat, pereaksi Folin Ciocalteu, NaHCO<sub>3</sub>, asam dinitrosalisilat dan bahan kimia lain dengan derajat proanalisis. Untuk pemurnian enzim dilakukan dialisa dengan menggunakan kantong selofan dan buffer fosfat pH 6,5. Untuk amobilisasi digunakan kitosan produksi Sigma-Aldrich. Untuk preparasi amobilisasi digunakan glutaraldehid produksi Sigma-Aldrich. Protein standar untuk penentuan kadar

protein digunakan bovin serum albumin diperoleh dari E. Merck.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Sentrifuga Beckman, J2-21, *Gyrotory shaker* New Brunswick Scientific Co. Inc. Edison N. J. USA 610; Spektrofotometer UV-Visible Shimadzu; Mikropipet Socorex; Oven Memmert-Germany; Neraca analitis Sartorius-Germany; pH meter Fisher-Canada; pengaduk magnet NUOVA II-USA; *Autoclave* model N25X; pipet Eppendorf; peralatan gelas (gelas kimia; tabung reaksi; Erlenmeyer dan peralatan gelas lainnya).

## Metode penelitian

### Produksi Enzim $\alpha$ -amilase

Amilase diproduksi pada media fermentasi yang mengandung: pati 0,5%; ekstrak ragi 0,5%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,05%;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,02% dan  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,01% dengan pH 6,5. Suhu fermentasi 32°C; dan lama waktu fermentasi 72 jam (Yandri dkk, 2010a).

### Isolasi $\alpha$ -amilase

$\alpha$ -Amilase dalam media fermentasi dipisahkan dari sel bakteri lokal *B. subtilis* ITBCCB148 dengan sentrifuga dingin pada laju 5000 rpm selama 20 menit sehingga diperoleh ekstrak kasar enzim (Yandri dkk, 2010a).

### Pemurnian $\alpha$ -amilase

Pemurnian enzim dilakukan bertahap, yaitu: fraksinasi ekstrak kasar enzim dengan garam amonium sulfat berbagai tingkat kejenuhan dan dialisa sehingga diperoleh enzim hasil pemurnian (Yandri *et al.*, 2010a).

#### a. Fraksinasi dengan ammonium sulfat

Ekstrak kasar enzim yang telah diperoleh selanjutnya diendapkan dari larutannya dengan amonium sulfat  $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$  pada berbagai derajat kejenuhan yaitu (0-15)%; (15-30)%; (30-45)%; (45-60)%; (60-75)% dan (75-90)%.

Endapan protein enzim yang didapatkan pada tiap fraksi kejenuhan amonium sulfat, dipisahkan dari filtratnya melalui sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Endapan yang diperoleh dilarutkan dengan buffer fosfat 0,1 M pH 6,5 dan diuji aktivitasnya dengan metode Fuwa dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry. Filtrat yang diperoleh dari fraksi (0-15)% akan digunakan kembali untuk diendapkan dengan fraksi kejenuhan (15-30)% dan seterusnya.

#### b. Dialisis

Enzim hasil fraksinasi dengan aktivitas tertinggi kemudian dimurnikan melalui dialisis pada membran semipermeabel

(kantong selofan). Endapan tersebut dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis menggunakan buffer fosfat 0,01 M pH 6,5 selama 24 jam pada suhu dingin. Selama dialisis, dilakukan pergantian buffer selama 4 jam agar konsentrasi ion-ion di dalam kantong dialisis dapat dikurangi (Feraliana, 2011). Selanjutnya dilakukan uji aktivitas dengan metode Fuwa dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.

### Uji Aktivitas $\alpha$ -amilase

Pengujian aktivitas  $\alpha$ -amilase dilakukan dengan metode Fuwa (Fuwa, 1954) dan Mandels (Mandel *et.al.*, 1976).

#### a. Metode Fuwa

Aktivitas  $\alpha$ -amilase ditentukan dengan metode iodin (Fuwa, 1954). Enzim yang telah diencerkan dengan tepat sebanyak 250  $\mu$ L ditambahkan ke dalam 250  $\mu$ L larutan pati 0,2% dalam 0,1 mol/L bufer fosfat pH 6,0 dan diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 250  $\mu$ L HCl 1 N dan kemudian ditambahkan 250  $\mu$ L pereaksi iodin ( $I_2$  0,2% dan KI 2%), dan 4 mL air suling ke dalam campuran reaksi. Setelah campuran diaduk rata serapannya diukur pada  $\lambda$  600 nm. Kontrol dibuat dengan cara

yang sama, hanya menggunakan 250  $\mu$ L enzim yang sudah diinaktifkan.

Aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase ditentukan sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas Unit} = \frac{(\text{OD kontrol} - \text{OD sampel})}{\text{OD kontrol}} \times 2 \times 4 \times \text{FP}$$

#### b. Metode Mandels

Berdasarkan glukosa yang terbentuk. Sebanyak 0,5 mL enzim, 0,5 mL larutan pati 0,1% dalam bufer sitrat pH 6,0 dicampur, lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 60°C. Setelah itu ditambahkan 2 mL pereaksi asam dinitrosalisilat, dididihkan selama 10 menit pada penangas air dan didinginkan. Setelah dingin serapannya diukur pada panjang gelombang 510 nm. Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan dengan menggunakan kurva standar glukosa.

Pereaksi asam dinitrosalisilat (Mandels *et al.*, 1976) terdiri dari: asam dinitrosalisilat 1%, fenol 0,2%,  $Na_2SO_3$  0,05%, NaOH 1%, garam Rochel (NaK-tartrat) 40% 1mL. Campurkan semua zat dan cukupkan volume hingga 100 mL.

#### Penentuan konsentrasi glutaraldehid optimal pada amobilisasi enzim

Sebanyak 0,25 g serbuk kitosan dimasukkan ke dalam tabung sentrifus lalu distabilkan menggunakan buffer fosfat 0,1

M pH 6,5. Kemudian matriks dipisahkan dari larutannya melalui sentrifugasi lalu ditambahkan 0,25 mL enzim hasil dialisis dan 0,25 mL glutaraldehid dengan variasi konsentrasi yaitu 0%; 0,2%; 0,4%; 0,6%; 0,8% dan 1%. Campuran tersebut diaduk pada suhu ruang selama  $\pm$  30 menit, dicuci dengan buffer fosfat 0,1 M pH 6,5. Kemudian dipisahkan melalui sentrifugasi. Filtrat dipipet 0,25 mL sebagai kontrol pengujian mendels dan sisa filtrat dibuang. Endapan enzim kitosan ditambahkan dengan substrat amilum 0,1 % 0,5 mL dan diinkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit sambil diaduk tiap 10 menit. Campuran tersebut dipisahkan melalui sentrifugasi. Filtrat dipipet sebanyak 0,5 mL ke dalam tabung reaksi ditambahkan 1,0 mL pereaksi DNS dan dilakukan pengujian aktivitas enzim menggunakan metode Mandels. Konsentrasi glutaraldehid yang dapat memberikan aktivitas enzim tertinggi ditetapkan sebagai konsentrasi glutaraldehid optimum (Krajewska, 1990).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Produksi dan isolasi enzim $\alpha$ -amilase

Ekstrak kasar enzim  $\alpha$ -amilase yang diperoleh dari fermentasi pada suhu 32°C, pH 6,5, selama 72 jam memiliki aktivitas unit dan aktivitas spesifik berturut-turut

yaitu 98,20 U/mL dan 925,75 U/mg yang dapat dilihat pada tabel 1.

### Pemurnian $\alpha$ -amilase

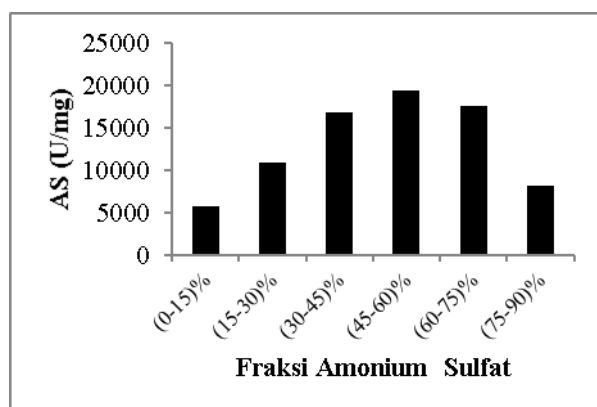
Ekstrak kasar enzim  $\alpha$ -amilase yang diperoleh kemudian dimurnikan. Pemurnian enzim yang dilakukan meliputi beberapa tahap yaitu fraksinasi dengan garam amonium sulfat dan dialisis.

#### 1. Fraksinasi dengan amonium sulfat

Fraksinasi bertujuan untuk memisahkan enzim dari sebagian besar air dan protein lain. Protein (enzim)  $\alpha$ -amilase akan mengendap pada tingkat kejenuhan amonium sulfat tertentu. Penambahan senyawa elektrolit ke dalam larutan enzim akan menyebabkan menurunnya kelarutan enzim, sehingga terbentuk endapan dari protein (enzim). Jika suatu garam dengan kelarutan dalam air yang besar seperti amonium sulfat ditambahkan ke dalam larutan protein, maka terjadi kompetisi antara garam dan protein untuk dapat larut dalam air. Molekul amonium sulfat yang lebih kecil akan lebih mudah larut dengan menarik molekul air yang menghidrasi molekul protein sehingga molekul-molekul protein saling berinteraksi membentuk agregat.

Fraksinasi enzim  $\alpha$ -amilase dilakukan dengan menambahkan garam amonium sulfat dengan berbagai tingkat kejenuhan, yaitu (0-15)%, (15-30)%, (30-45)%, (45-

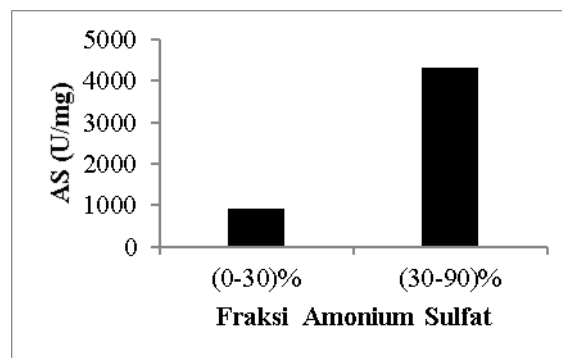
60)%, (60-75)%, dan (75-90)% ke dalam 100 mL ekstrak kasar enzim untuk penentuan pola fraksinasi pertama. Kemudian endapan enzim dilarutkan dengan 5 mL buffer fosfat 0,1 M pH 6,5. Hubungan antara kejenuhan amonium sulfat (0-100)% dengan aktivitas spesifik enzim  $\alpha$ -amilase dari *B. subtilis* ITBCCB148 dapat dilihat pada Gambar 1



**Gambar 1.** Hubungan antara kejenuhan amonium sulfat (0-90)% dengan aktivitas spesifik enzim  $\alpha$ -amilase dari *B. subtilis* ITBCCB148.

Berdasarkan Gambar 1, aktivitas spesifik tertinggi enzim  $\alpha$ -amilase ditunjukkan pada fraksi (45-60)% yaitu sebesar 19326 U/mg. Namun, dapat dilihat pula bahwa pada fraksi (30-45)% dan (60-75)% masih memiliki aktivitas spesifik cukup tinggi, yaitu 16795,37 dan 17506,52 U/mg. Oleh karena itu, proses fraksinasi selanjutnya hanya dibagi menjadi dua pola fraksi yaitu (0-30)% dan (30-90)%. Hal ini bertujuan untuk menambah rendemen protein (enzim) sehingga tidak kehilangan banyak enzim selama proses pemurnian dan aktivitas  $\alpha$ -amilase yang diperoleh cukup besar.

Hubungan antara kejenuhan amonium sulfat (0-30)% dan (30-90)% dengan aktivitas spesifik enzim  $\alpha$ -amilase dari *B. subtilis* ITBCCB148 dapat dilihat pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Hubungan antara kejenuhan amonium sulfat (0-30)% dan (30-90)% dengan aktivitas spesifik enzim  $\alpha$ -amilase dari *B. subtilis* ITBCCB148.

Berdasarkan Gambar 2, Fraksi (0-30)% memiliki aktivitas spesifik yang sangat rendah dibandingkan fraksi (30-90)%. Oleh karena itu, fraksi (0-30)% tidak digunakan pada proses pemurnian selanjutnya karena pada fraksi tersebut endapan enzim  $\alpha$ -amilase yang dihasilkan sangat sedikit sekali sehingga hanya enzim fraksi (30-90)% yang digunakan pada tahap pemurnian selanjutnya. Adapun aktivitas unit dan aktivitas spesifik enzim  $\alpha$ -amilase pada fraksi (30-90)% berturut-turut yaitu 923,97 U/mg dan 4315,31 U/mg. Aktivitas spesifik tersebut menunjukkan bahwa enzim hasil fraksinasi memiliki kemurnian lebih tinggi hingga 4,66 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim dengan perolehan 27.61% (Tabel 1).

## 2. Dialisis

Larutan enzim dari fraksi (30-90)% selanjutnya dimurnikan melalui dialisis selama 24 jam. Larutan enzim dimasukkan hingga setengah volume kantong selofan, kemudian didialisis menggunakan buffer fosfat 0,01 M pH 6,5. Proses dialisis ini bertujuan untuk memisahkan enzim dari ion-ion garam dan ion anorganik lain yang dapat mengganggu kestabilan enzim sehingga diperoleh enzim dengan kemurnian dan aktivitas yang tinggi. Dialisis didasarkan pada difusi partikel di dalam dan di luar membran semipermeabel (kantong selofan) oleh adanya perbedaan tekanan osmotik. Tekanan osmotik di dalam membran yang lebih besar menyebabkan keluarnya molekul-molekul kecil pada larutan protein (enzim) seperti ion-ion garam. Keluarnya molekul tersebut menyebabkan distribusi ion di dalam dan di luar membran tidak seimbang. Untuk

memperkecil pengaruh ini digunakan buffer dengan konsentrasi rendah di luar kantong selofan.

Selama proses dialisis berlangsung, perlu dilakukan pergantian buffer setiap 4 jam sekali agar konsentrasi ion-ion di dalam kantong dialisis dapat dikurangi sehingga tercapai kesetimbangan osmotik (Feraliana, 2011). Buffer diaduk menggunakan *magnetic stirrer* untuk mempercepat kesetimbangan osmotik. Dialisis dilakukan pada suhu dingin untuk mencegah denaturasi enzim. Enzim  $\alpha$ -amilase hasil dialisis memiliki aktivitas unit dan spesifik berturut-turut sebesar 498,75 U/mL dan 4504 U/mg. Enzim hasil dialisis memiliki kemurnian lebih tinggi hingga 4,87 kali dibandingkan ekstrak kasar enzim dengan perolehan 24,38% (Tabel 1).

Berikut ini merupakan rangkuman hasil dari rangkaian tahapan pemurnian dari enzim  $\alpha$ -amilase dari *B. subtilis* ITBCCB148.

**Tabel 1. Pemurnian enzim  $\alpha$ -amilase dari *B. subtilis* ITBCCB148**

Tahap	Volume Enzim (mL)	Aktivitas Unit (U/mL)	Aktivitas Total (U)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Tingkat Kemurnian (kali)	Perolehan (%)
Ekstrak Kasar	2500.00	98.20	245487.60	0.11	925.75	1.00	100.00
Hasil Fraksi (45-90%) ammonium sulfat	90.00	753.10	67779.38	0.17	4315.31	4.66	27.61
Hasil Dialisis	120.00	498.75	59849.89	0.11	4504.15	4.87	24.38



Pada Tabel 1 di atas, dapat dilihat bahwa enzim  $\alpha$ -amilase mengalami peningkatan aktivitas spesifik yang menunjukkan adanya peningkatan kemurnian enzim dari setiap tahap pemurnian. Hal ini didukung oleh penurunan kadar protein dan perolehan (%) enzim yang menunjukkan bahwa enzim telah bebas dari protein lain, sebagian besar air, dan ion-ion anorganik lainnya.

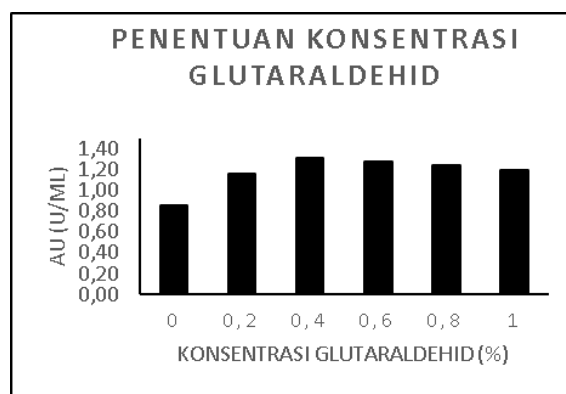
Aktivitas unit dan aktivitas spesifik enzim  $\alpha$ -amilase pada hasil fraksinasi ammonium sulfat berturut-turut yaitu 923,97 U/mg dan 4.315,31 U/mg. Aktivitas spesifik tersebut menunjukkan bahwa enzim hasil fraksinasi memiliki kemurnian lebih tinggi hingga 4,66 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim dengan perolehan 27,61%.

Enzim  $\alpha$ -amilase hasil dialisis memiliki aktivitas unit dan spesifik berturut-turut sebesar 498,75 U/mL dan 4.504 U/mg. Enzim hasil dialisis memiliki kemurnian lebih tinggi hingga 4,87 kali dibandingkan ekstrak kasar enzim dengan perolehan 24,38%

### Penentuan konsentrasi glutaraldehid optimal pada amobilisasi enzim

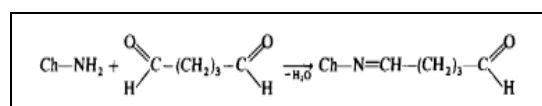
Penentuan konsentrasi glutaraldehid optimal untuk proses amobilisasi dilakukan dengan mengikat enzim  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian pada pH 7,0 dengan menambahkan glutaraldehid dengan variasi konsentrasi yaitu 0%; 0,2%; 0,4%; 0,6%;

0,8% dan 1%. Setelah ditambahkan substrat, campuran enzim amobil dan substrat diinkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit. Gambar 3 menunjukkan bahwa aktivitas unit tertinggi enzim  $\alpha$ -amilase hasil amobilisasi pada matriks kitosan dengan penambahan konsentrasi glutaraldehid 0,4 % yaitu sebesar 1,31 U/mL.



**Gambar 3.** Aktivitas unit enzim  $\alpha$ -amilase pada berbagai konsentrasi glutaraldehid yang ditambahkan.

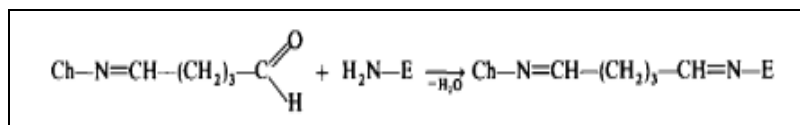
Glutaraldehid digunakan karena memiliki 2 gugus aldehid yang dapat berikatan dengan asam amino bebas pada kitosan dan protein. Gambar 4 menunjukkan reaksi yang terjadi antara kitosan dan glutaraldehid.



**Gambar 4.** Pembentukan ikatan kovalen antara kitosan dan glutaraldehid (Krajewska *et.al.*, 1990)

Sedangkan ikatan kovalen antara kompleks kitosan-glutaraldehid dan enzim ditunjukkan pada gambar 5.





Gambar 5. Pembentukan ikatan kovalen antara kompleks kitosan glutaraldehid dan enzim (Krajewska *et.al.*, 1990)

Dari gambar tersebut, menunjukkan bahwa enzim diamobilisasi pada kitosan oleh glutaraldehid dengan mekanisme adsorpsi sederhana. Sehingga reaksi dengan glutaraldehid dapat mengubah struktur enzim sehingga aktivitasnya berkurang (Krajewska *et.al.*, 1990).

### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Aktivitas spesifik enzim  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian hingga tahap dialisis adalah 4504,15 U mg<sup>-1</sup> dan kemurniannya meningkat hingga 4,87 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim dengan perolehan 24,38%.
2. Aktivitas unit tertinggi enzim  $\alpha$ -amilase hasil amobilisasi pada matriks kitosan didapatkan dengan penambahan konsentrasi glutaraldehid 0,4 %.

### DAFTAR PUSTAKA

Bayramoglu, G., M. Yilmaz, M.Y. Arica. 2004. Immobilization of a thermostable  $\alpha$ -amylase onto reactive membranes: kinetics characterization and application to continuous starch

hydrolysis. *Food Chemistry*, **84**: 591-599.

Cetinus S.A. and H. Nursevin Oztop. 2003. Immobilization of catalase into chemically

Feraliana. 2011. Amobilisasi Enzim  $\alpha$ -Amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dengan menggunakan Karboksi Metil Sephadex C-50 (CM-Sephadex C-50). *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Lampung. Bandar Lampung.

Fuwa, H. 1954. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrat. *The Journal of Biochemistry*, **41** (3): 583-603

Konsula, Z., M. Liakopoulou-Kyriakides. 2004. Hydrolysis of starches by the action of an  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, **39**: 1745-1749.

Krajewska, B., M. Leszko, W. Zaborska. 1990. *Urease Immobilized on Chitosan Membrane : Preparation and Properties*. *Journal of Chemical Technology Biotechnology*, **48** : 337-350.

- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall. 1951. Protein measurment with the Folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry* : 193-265.
- Mandels, M., R. Andreotti, C. Roche. 1976. Measurement of saccarifying cellulase. *Biotechnology Bioenginering* **6**: 21-33.
- Yandri, T. Suhartati, S. Hadi. 2010a. Purification and Characterization of Extracellular  $\alpha$ -Amilase Enzyme from Locale Bacteria Isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148, *European Journal of Scientific Research*, **39** (1): 64-67.
- Yandri, T. Suhartati, S. Hadi. 2010b. Immobilization of  $\alpha$ -amylase from locale bacteria isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148 with diethylaminoethyl cellulose (DEAE-Cellulose). *Material Science Researh India*, 7(1): 123-128.