

## **Aktivitas *Immobilized $\alpha$ -Amylase* dan *Free $\alpha$ -Amylase* dari *Zoogloea ramigera* ABL 1 dalam Medium Pati Cair dengan Perlakuan Faktor Lingkungan**

**Activity of Immobilized and Free  $\alpha$ -Amylase from *Zoogloea ramigera* ABL 1 on Liquid Starch Medium using Treatment of Environmental Factors**

**Endah Retnaningrum\* dan Zukrotun Nafisah**

Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta  
E-mail: endah\_retna@yahoo.com \*Penulis untuk korespondensi

### **Abstract**

The aim of this research was to characterize activity of immobilized and free  $\alpha$ -amylase from amylolytic isolate of *Zoogloea ramigera* ABL 1 with different environment conditions, such as pH; temperatures, and metal ions. Amylases were harvested from the cultivation liquid starch medium of bacteria by centrifugation at the highest enzyme activities. These enzymes furthermore were immobilized by reacting it with Ca-alginate. Enzymes without that reaction were prepared as free enzymes. Both amylases were characterized based on those specific activities at temperature 30°C; pH s (4-10), pH 7; temperatures (10-80°C), and addition 1 mM of metal ions (CaCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>) at the previous optimum temperature and pH. Specific activities of immobilized amylase at all different environment conditions were more stable and higher than free amylases. Immobilized amylases were stable at temperature ranging from 10–60°C, and their optimum activities occurred at 30°C. Those immobilized amylases were also stable at pH ranging from 4–7, with optimum activity at pH 7. The highest activity of immobilized amylase was affected by the addition of 1 mM MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O. On the other side, free enzyme was affected by the addition of 1 mM CaCl<sub>2</sub>. Therefore, it can be concluded that immobilization technique of amylase from *Zoogloea ramigera* ABL 1 can be carried out to enhance specific activity of enzyme at wide range of pH, temperature, and metal ion.

**Key words:** Amylolytic, specific activity, liquid starch medium, Ca-alginate

### **Abstrak**

Penelitian ini bertujuan mengetahui karakter aktivitas *immobilized amylase* dan *free amylase* dari isolat amilolitik *Zoogloea ramigera* ABL 1 dengan beberapa kondisi lingkungan yang berbeda, seperti suhu, pH, temperatur, dan ion logam. Amilase dengan aktivitas enzimatis tertinggi diunduh dari kultur bakteri dalam medium pati cair melalui sentrifugasi. Enzim hasil pengunduhan kemudian diperlakukan *immobilization technique* dengan direaksikan Ca-alginate. Enzim tanpa perlakuan *immobilization technique* merupakan *free amylase*. Kedua amilase kemudian dikarakterisasi berdasar aktivitas spesifik enzim pada kondisi temperatur 30°C; pH (4–10), pH 7; temperature (10–80°C), dan penambahan 1 mM ion logam (CaCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>) dengan temperatur dan suhu optimum hasil penelitian sebelumnya. Aktivitas spesifik *immobilized amylase* pada semua kondisi lingkungan lebih stabil dan tinggi daripada *free amylase*. *Immobilized amylase* bersifat stabil pada kisaran suhu 10–60°C, dan aktivitas optimumnya terjadi pada suhu 30°C. *Immobilized amylase* tersebut juga stabil pada kisaran pH 4–7, dengan aktivitas optimum berada pada pH 7. Aktivitas *immobilized amylase* yang tertinggi terjadi pada penambahan 1 mM ion logam MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O. Sebaliknya, *free enzyme* dipengaruhi oleh penambahan 1 mM CaCl<sub>2</sub>. Perlakuan *immobilization technique* pada amilase dari *Zoogloea ramigera* ABL 1 terbukti dapat digunakan untuk meningkatkan aktivitas spesifik enzim dengan kisaran pH dan temperatur yang luas, serta penambahan ion logam.

**Kata kunci:** Amilolitik, aktivitas spesifik, medium pati cair, Ca-alginate

Diterima: 13 Juli 2010, disetujui: 25 Januari 2011

## Pendahuluan

Enzim banyak dimanfaatkan di bidang industri misalnya industri farmasi, pangan, minuman, tekstil, penyamakan kulit dan kertas. Saat ini, kebanyakan enzim yang digunakan di bidang industri di Indonesia masih merupakan enzim impor, sehingga harganya masih sangat mahal. Salah satu enzim yang banyak digunakan di bidang industri adalah enzim  $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ -1,4-glukan-4-glukanhidrolase, EC 3.2.1.1) yang mengkatalisis pemecahan glikosidik  $\alpha$ -D-(1,4) pada pati, glikogen dan oligosakarida. Enzim  $\alpha$ -amilase dapat diperoleh dari berbagai sumber antara lain dari mikrobia (Sisilia *et al.*, 2004). Beberapa penelitian mengenai produksi amilase dari isolat mikrobia telah dilakukan yaitu antara lain dari kapang *Penicillium fellutanum* hasil isolasi dari *soil rhizosfer* tanaman mangrove (Kathirean dan Manivannan, 2006), kapang *Aspergillus sp.* JGI 12 dalam medium kultur padat (Alva *et al.*, 2007), bakteri *Bacillus sp.* hasil isolasi dari limbah industri (Thippeswamy *et al.*, 2006).

Aktivitas enzim amilase merupakan salah satu parameter penting yang perlu diketahui untuk dapat menentukan kemampuan katalisis enzim dalam menghasilkan produk. Aktivitas amilase tersebut sangat dipengaruhi oleh berbagai faktor antara lain pH, temperatur, dan keberadaan ion logam. Setiap enzim  $\alpha$ -amilase tertentu mempunyai sifat katalitik yang sangat spesifik dan berbeda antara satu enzim  $\alpha$ -amilase dengan enzim  $\alpha$ -amilase lainnya (Mubarik *et al.*, 2003). Penelitian telah dilakukan yaitu mengenai karakter perombakan pati oleh  $\alpha$ -amilase dari berbagai galur bakteri genus *Bacillus* (Mitsuiki *et al.*, 2005), sifat amilase dari isolat bakteri termofilik pada *Bacillus sp.* (Carvalho *et al.*, 2008), dan karakter biokimia  $\alpha$ -amilase dari khamir *Cryptococcus flavus* (Wanderley *et al.*, 2004). Penelitian mengenai ekspresi protein  $\alpha$ -amilase juga telah dilakukan yaitu dari isolat bakteri *Bacillus subtilis* AX20 (Najafi dan Deobagkar, 2005).

Pada umumnya enzim larut dalam air, sehingga penggunaan enzim tidak efisien karena hanya dapat digunakan sekali terutama untuk sistem *batch* dalam skala besar. Salah satu teknik yang dapat digunakan untuk

mengoptimalkan penggunaan dan kerja enzim yaitu dengan *immobilization technique*. *Immobilization technique* dapat dilakukan dengan menjebak suatu enzim ke dalam suatu bahan pembawa sehingga enzim akan terikat oleh bahan pembawa tersebut. Beberapa kelebihan penggunaan *immobilization technique* terhadap enzim yaitu antara lain dapat meningkatkan aktivitas enzim, memudahkan pemisahan produk dengan enzim, dan dapat digunakan secara berulang. Penelitian mengenai karakter aktivitas *immobilized enzyme* telah dilakukan, yaitu pada enzim lipase dari *Pseudomonas cepasica* untuk keperluan produksi biodiesel (Noureddini *et al.*, 2005). Penelitian mengenai aktivitas immobilized  $\alpha$ -amilase masih sedikit dilakukan. Untuk itu perlu dilakukan suatu penelitian terutama mengenai aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase dari *Zoogloea ramigera* ABL 1 yang diisolasi dari limbah padat Pabrik tapioka yang diperlakukan dengan *immobilization technique* dan tanpa *immobilization technique* dengan berbagai perbedaan pH, temperatur dan perlakuan ion logam tertentu.

Tujuan penelitian ini, membandingkan aktivitas spesifik amilase dari *Zoogloea ramigera* ABL 1 dengan *immobilization technique* dan tanpa *immobilization technique* pada berbagai faktor lingkungan yaitu pH, temperatur dan ion logam.

## Metode Penelitian

### Isolasi dan Penapisan Amilolitik *Zoogloea ramigera* ABL 1

Beberapa isolat bakteri amilolitik diisolasi dari limbah padat pabrik tepung tapioka di Dusun Nangsri, Desa Srihardono, Kecamatan Pundong, Kabupaten Bantul, Yogyakarta. Sampel sebanyak 1 gram diencerkan secara seri dengan akuades steril kelipatan 10 yaitu  $10^{-1}$  sampai  $10^{-6}$ . Selanjutnya sebanyak 0, 1 mL suspensi sampel diinokulasikan secara *pour plate* pada medium agar pati. Medium agar pati yang digunakan terdiri dari (w/v, g/1000 ml) : 10 g ekstrak khamir, 10 g pati, 0,5 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,13 g  $K_2HPO_4$ , 15 g agar, pH diatur 7 (Thippeswamy *et al.*, 2006). Kultur selanjutnya ditumbuhkan

pada temperatur 30°C dan diinkubasi selama 48 jam sampai terjadi pertumbuhan koloni bakteri.

Beberapa isolat bakteri amilolitik, diuji kemampuan dalam menghasilkan amilase dengan cara ditumbuhkan dalam medium agar pati dengan konsentrasi pati 1% (Mohapatra *et al.*, 1998). Kultur isolat bakteri selanjutnya diinkubasikan selama 48 jam dengan temperatur 30°C. Tiap-tiap isolat bakteri ditetesi larutan Lugol's iodine di sekitar tepi koloni bakteri dengan ulangan sebanyak 3 kali. Pembentukan zona bening di sekitar koloni bakteri menunjukkan kemampuan isolat bakteri dalam menghasilkan amilase. Indeks amilolitik bakteri kemudian dihitung dengan membandingkan antara diameter zona bening yang terbentuk dan diameter koloni isolat bakteri (Thippeswamy *et al.*, 2006). Isolat bakteri ABL 1 selanjutnya dipilih dengan kriteria yaitu mempunyai indeks amilolitik tinggi.

Isolat bakteri ABL 1 dengan sifat amilolitik tertinggi, kemudian diidentifikasi sebagai *Zoogloea ramigera* yaitu berdasar pengamatan karakter morfologi koloni, morfologi sel, dan pengujian sifat biokimia. Hasil pengamatan karakter tersebut dibandingkan dengan *Bergey's Manual of Bacteriology* (Holt *et al.*, 2000).

#### **Pengukuran Pertumbuhan dan Pengunduhan $\alpha$ -Amilase dari *Zoogloea ramigera* ABL 1**

*Zoogloea ramigera* ABL 1 ditumbuhkan dalam medium agar pati dan diinkubasi selama 48 jam dengan kondisi temperatur 30°C. Pada waktu interval tertentu, yaitu jam ke- 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, dan 48, *Zoogloea ramigera* ABL 1 diukur pertumbuhannya dengan menghitung jumlah *colony forming unit* dengan metode *pour plate*. Pada saat interval waktu pengamatan pertumbuhan *Zoogloea ramigera* ABL 1 tersebut,  $\alpha$ -amilase yang dihasilkan juga diunduh dengan cara dipisahkan dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 1630 g (rotor tipe 1420) selama 15 menit sehingga dihasilkan amilase ekstrak kasar (*crude enzyme amylase*).

#### **Pengujian Aktivitas Spesifik $\alpha$ -Amilase *Zoogloea ramigera* ABL 1**

Penentuan aktivitas spesifik  $\alpha$ -amilase dilakukan dengan cara menentukan aktivitas  $\alpha$ -amilase per kadar protein  $\alpha$ -amilase tersebut. Pengujian aktivitas  $\alpha$ -amilase dilakukan dengan cara mereaksikan 500  $\mu$ l larutan pati 2% [w/v] (pati dilarutkan dalam 0,2 mol/l bufer fosfat pH 7,0), 250  $\mu$ l bufer fosfat (pH 7,0), dan 250  $\mu$ l enzim ekstrak kasar. Reaksi tersebut diinkubasi selama 30 menit pada suhu 30°C (Biswanger, 2004). Kemudian reaksi dihentikan dengan cara memanaskan tabung reaksi dalam penangas air suhu 100°C. Kemudian maltosa yang dihasilkan dalam reaksi enzim diuji dengan reagen asam dinitrosalisilat dan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 575 nm. Sebagai pembanding konsentrasi maltosa, digunakan larutan stok standar maltosa. Aktivitas amilase dapat ditentukan dengan banyaknya enzim amilase yang dapat membebaskan 1  $\mu$ mol maltosa / menit (Miller, 1959).

Pengukuran kandungan total protein dalam enzim ekstrak kasar dilakukan dengan metode Lowry *et al.*, (1951). Sampel sebanyak 1 mL ditambah 1 mL NaOH 2N dan dipanaskan pada temperatur 100°C selama 10 menit dalam penangas air. Setelah dingin ditambahkan 5 mL reagen pembentuk kompleks (2% w/v Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dalam akuades, 1% w/v CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O dalam akuades, 2% w/v kalium natrium tartrat dalam akuades) dan dibiarkan selama 10 menit pada temperatur kamar. Kemudian ditambahkan 0,5 mL reagen *Folin-Ciocalteu*, dihomogenkan dengan vortex, dan dibiarkan selama 30–60 menit. Sebagai pembanding konsentrasi protein sampel digunakan larutan stok standar protein berupa albumin dengan konsentrasi 4 mg/mL protein dalam akuades. Larutan stok standar protein kemudian diencerkan dengan akuades sehingga diperoleh larutan stok protein mengandung konsentrasi protein 0, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, dan 2000 ( $\mu$ g/mL). Selanjutnya, sampel yang telah siap dan larutan stok protein yang telah diencerkan dibaca absorbansinya pada 660 nm (Lowry *et al.*, 1951).

Satu unit aktivitas spesifik amilase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan produk setara dengan 1  $\mu$ mol maltosa/menit pada kondisi pengukuran (U) dalam konsentrasi protein tertentu (mg) (Miller, 1959; Mohapatra *et al.*, 1998).

#### **Immobilization technique pada Crude Enzyme $\alpha$ -Amilase Melalui Penjebakan dalam Ca-alginat**

*Immobilization technique* pada enzim dilakukan dengan mencampurkan 4 ml *crude enzyme* dengan 25 ml 2% Ca-alginat. Setelah itu larutan diteteskan ke dalam 75 ml larutan 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  dingin dan diinkubasi selama 24 jam 4°C hingga terbentuk *beads*. *Beads* yang terbentuk dicuci dengan menggunakan akuades steril dan ditimbang untuk direaksikan dengan substrat. (Woodward, 1985). *Beads* yang digunakan yaitu sebanyak 1 gram dan direaksikan dengan 1 ml substrat pati cair.

#### **Pengujian Aktivitas Immobilized $\alpha$ -Amylase dan Free Amylase Pada Berbagai Kondisi pH, Temperatur dan Perlakuan Ion Logam**

Enzim ekstrak kasar yang telah diperlakukan *immobilization technique* dan tanpa *immobilization technique* diuji aktivitas enzimnya pada kondisi pH berbeda yaitu pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, dan 10, dengan suhu inkubasi 30°C. Aktivitas *free enzyme* dan *immobilized enzyme* juga diperlakukan pada berbagai suhu inkubasi yaitu 10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C dan 80°C dengan pH 7. Adapun aktivitas *immobilized amylase* dan *free enzyme* dengan perlakuan ion logam dilakukan dengan pemberian ion logam berupa  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4$ , selama 10 menit pada konsentrasi 1 mM dengan temperatur dan pH optimum yang telah diperoleh pada pengujian sebelumnya.

#### **Analisis Data**

Data mengenai indeks amilolitik beberapa isolat bakteri yang diisolasi dari limbah padat Pabrik Tapioka dianalisis statistik dengan menggunakan *one way ANOVA*, dan untuk mengetahui beda nyata antarsampel digunakan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) dengan taraf kepercayaan 95%. Analisis kinetika pertumbuhan *Zoogloea*

*ramigera* ABL 1 dilakukan dengan menghitung nilai n, k, g dan  $\mu$ . Data aktivitas spesifik *immobilized amylase* dan *free amylase* pada *Zoogloea ramigera* ABL 1 dengan berbagai kondisi lingkungan berupa pH, temperatur dan pemberian ion logam ditampilkan dalam bentuk tabel dan grafik.

## **Hasil dan Pembahasan**

### **Isolasi dan Penapisan Amilolitik *Zoogloea ramigera***

Hasil isolasi bakteri dari limbah padat pabrik tepung tapioka di Dusun Nangsri, Desa Srihardono, Kecamatan Pundong, Kabupaten Bantul, Yogyakarta, diperoleh sebanyak 4 jenis isolat (Tabel 1). Isolat bakteri ABL 1 menunjukkan indeks amilolitik tertinggi apabila dibandingkan dengan ketiga isolat lainnya. Isolat bakteri ABL 1 selanjutnya dipilih untuk pengujian berikutnya. Indeks amilolitik yang tinggi pada isolat bakteri ABL 1 tersebut menunjukkan kemampuan memecah amilum yang lebih baik dibandingkan dengan ketiga isolat lainnya. Kemampuan pemecahan amilum berkaitan dengan sekresi enzim amilase oleh isolat bakteri tersebut. Pengeluaran enzim amilase oleh mikrobia akan memecah amilum di dalam media agar pati menjadi produk berupa molekul gula reduksi yang dapat digunakan oleh mikrobia tersebut untuk pertumbuhannya. Pengujian dengan menggunakan reagen iod di sekitar koloni bakteri penghasil amilase akan menunjukkan terbentuknya zona jernih di sekitar koloni bakteri.

Karakterisasi isolat bakteri ABL 1 berdasarkan karakter morfologi koloni, morfologi sel dan karakter fisiologis ditunjukkan pada Tabel 2. Berdasarkan perbandingan karakter bakteri dalam *Bergey's Manual of Bacetriology*, isolat bakteri ABL 1 dapat diidentifikasi sebagai *Zoogloea ramigera* (Holt *et al.*, 2000).

### **Pertumbuhan dan Aktivitas Spesifik $\alpha$ -Amilase *Zoogloea ramigera* ABL 1**

Pertumbuhan *Zoogloea ramigera* ABL 1 dalam medium cair pati dengan temperatur 30°C dan pH 7 selama waktu inkubasi 48 jam

menunjukkan pada waktu jam ke-0 sampai jam ke-6 pertumbuhan *Z. ramigera* ABL 1 berjalan lambat (Tabel 1). Hal ini karena bakteri tersebut masih berada pada fase lag yaitu masih beradaptasi dengan kondisi lingkungan dan media pertumbuhannya. Energi yang dihasilkan akan digunakan untuk pertumbuhan seluler saja.

Pertumbuhan *Z. ramigera* ABL 1 semakin meningkat yaitu pada jam ke-8 hingga jam ke-24 dan bakteri berada pada fase logaritmik. Pada fase ini ini kecepatan pertumbuhan bakteri paling tinggi dan waktu generasinya sangat pendek. Setelah jam ke-24 pertumbuhan bakteri terlihat konstan. Hal ini

ditunjukkan dengan tidak adanya penambahan jumlah bakteri yang signifikan. Fase ini merupakan fase stasioner dan kecepatan pertumbuhan bakteri mulai menurun karena substratnya makin lama makin habis dan lama-kelamaan bakteri akan mati. Setelah dilakukan penghitungan parameter kinetika pertumbuhan bakteri yang meliputi kecepatan pertumbuhan rerata ( $k$ ), kecepatan pertumbuhan spesifik ( $\mu$ ), dan waktu generasi ( $g$ ). Isolat bakteri *Z. ramigera* ABL 1 menunjukkan kecepatan pertumbuhan rerata ( $k$ :  $0,2658 \text{ jam}^{-1}$ ), kecepatan pertumbuhan spesifik ( $\mu$ :  $0,184 \text{ jam}^{-1}$ ), dan waktu generasi ( $g$ :  $3,76 \text{ jam}$ ).

**Tabel 1.** Indeks amilolitik 4 isolat bakteri dari limbah padat tapioka.

No.	Jenis Isolat Bakteri	Indeks Amilolitik
1.	ABL 1	$1,550 \pm 1,017^b$
2.	ABL 2	$0,198 \pm 0,515^a$
3.	ABL 3	$0,286 \pm 0,488^a$
4.	ABL 4	$0,100 \pm 0,0004^a$

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama tidak menunjukkan beda nyata pada uji DMRT  $\alpha=5\%$

**Tabel 2.** Karakter morfologi koloni, morfologi sel, dan fisiologis kultur Isolat Bakteri ABL 1.

Karakter					
Morfologi Koloni Bakteri		Morfologi Sel Bakteri		Fisiologis Kultur Bakteri	
a. Bentuk koloni	<i>Irregular</i>	a. Bentuk	Batang pendek	a. Kebutuhan O <sub>2</sub>	Aerob
b. Elevasi	<i>Convex papillate</i>	b. Ukuran	1,0–1,3 $\mu\text{m}$ X 2,1–3,6 $\mu\text{m}$	b. Motilitas	Positif
c. Bentuk tepi	<i>Lobate</i>	c. Spora	Tidak ada spora	c. Matriks gelatin antar sel	Positif
d. Struktur dalam	<i>Coarsely granular</i>	d. Reaksi Gram	Gram negatif	d. Pertumbuhan suhu > 60°C	Negatif
e. Opacity	<i>Translucent</i>	e. Pengecatan ZN	Tidak tahan asam	e. Pertumbuhan suhu < 5°C	Negatif
				f. Pertumbuhan suhu optimum 28–37°C	Positif
				g. Adanya akumulasi poli- $\beta$ -hidroksibutirat dalam sel	Positif
				h. Pigment fluoresen	Negatif
				i. Fermentasi glukosa	Negatif
				j. Fermentasi xilosa	Positif
				k. Oksidase	Positif
				l. Urease	Positif
				m. Reduksi nitrat	Positif
				n. Pembentukan indol	Negatif
				o. Penggunaan sitrat	Negatif
				p. Hidrolisis gelatin	Positif
				q. Katalase	Positif
				r. Pembentukan H <sub>2</sub> S dari sistein	Negatif
				s. Pembentukan NH <sub>3</sub> dari asparagin	Positif

Pertumbuhan *Z. ramigera* ABL 1 dalam medium cair pati selama waktu inkubasi 48 jam memperlihatkan peningkatan dan penurunan aktivitas spesifik amilase (Gambar 1). Produksi amilase oleh *Zoogloea ramigera* ABL 1 pada medium pati cair dapat terukur pada waktu jam ke-2 yaitu pada waktu bakteri berada pada fase lag, dengan aktivitas spesifik 5,04 U/mg protein. Produksi amilase tersebut mengalami peningkatan dan mencapai maksimum yaitu pada jam ke 10 yaitu pada saat bakteri berada pada fase logaritmik, dengan aktivitas spesifik 12,47 U/mg protein. Selanjutnya, terjadi penurunan produksi amilase yaitu pada jam ke-48 yaitu saat bakteri memasuki fase stationer dan berlanjut ke fase kematian, dengan aktivitas spesifik 4,21 U/mg protein. Penurunan aktivitas spesifik amilase tersebut diduga karena pengaruh faktor laju degradasi enzim amilase, dan adanya *feed back inhibition*. Pada saat pertumbuhan bakteri mulai berada pada fase stationer dan berlanjut ke fase kematian serta enzim amilase telah melakukan aktivitas katalisis terhadap substrat pati, sel bakteri akan menghasilkan peptidase yang akan menyebabkan degradasi enzim amilase (Price dan Stevens, 1982). Adapun *feedback inhibition* terhadap aktivitas amilase disebabkan ada penumpukan produk dari hasil katalisis enzim amilase yang selanjutnya dapat menekan sintesis enzim amilase (Moat dan Foster, 1995).

#### **Aktivitas Spesifik Immobilized $\alpha$ -Amylase dan Free Amylase pada Berbagai Kondisi pH, Temperatur dan Perlakuan Ion Logam**

Secara keseluruhan pada berbagai kondisi pH, temperatur, dan perlakuan ion logam aktivitas spesifik *immobilized  $\alpha$ -amylase* lebih tinggi daripada *free amylase*, seperti disajikan pada Gambar 2, Gambar 3, dan Gambar 4.

Aktivitas spesifik *immobilized  $\alpha$ -amylase* dan *free amylase* pada berbagai kondisi pH menunjukkan perbedaan nyata yaitu seperti disajikan pada Gambar 2. Pada perlakuan berbagai kondisi pH, aktivitas spesifik *immobilized  $\alpha$ -amylase* menunjukkan peningkatan aktivitas dengan naiknya pH, tetapi pada pH 8 sampai pH 10 aktivitas spesifik *immobilized amylase* menunjukkan

penurunan. Aktivitas spesifik *immobilized amylase* tertinggi sebanyak 39,85 U/mg protein yaitu terjadi pada substrat dengan pH 7. Adapun aktivitas spesifik *free amylase* tidak menunjukkan perbedaan nyata antara berbagai perlakuan pH, dan aktivitas spesifik tertinggi 3,07 U/mg yaitu terjadi pada substrat dengan pH 8.

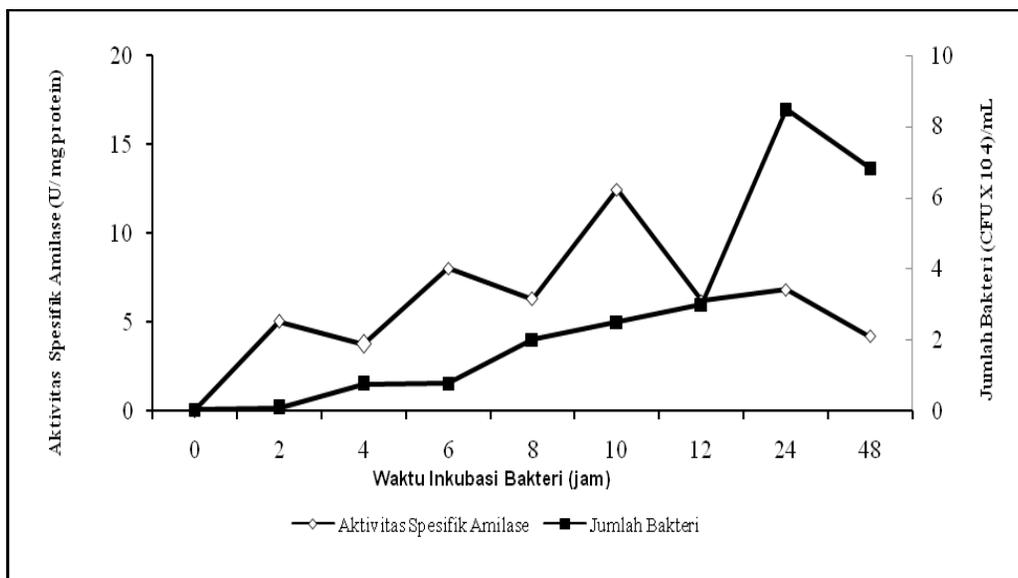
Perbedaan aktivitas spesifik antara *immobilized amylase* dan *free amylase* pada berbagai kondisi pH tersebut disebabkan oleh dua faktor. Faktor pertama yaitu perbedaan perlakuan ada dan tidaknya penjebakan dalam matriks berupa alginat antara *immobilized amylase* dan *free amylase*. Faktor kedua yaitu perbedaan kondisi pH substrat yang selanjutnya menyebabkan perbedaan konsentrasi ion  $H^+$  dan  $OH^-$  dalam substrat tersebut yang akhirnya dapat memengaruhi aktivitas spesifik amilase.

Pada *immobilized amylase*, amilase diperlakukan penjebakan dengan menggunakan matriks alginat. Matriks alginat merupakan polimer berupa asam D-mannuronat dan asam L-guluronat (Woodward, 1985). Asam-asam ini akan berikatan dengan rantai samping asam amino pada bagian enzim, sehingga menyebabkan bentuk konformasi enzim akan tetap sesuai dengan substrat. Pada *immobilized amylase* pH 7, konsentrasi ion  $H^+$  lebih tinggi dibandingkan dengan pH 8. Ion  $H^+$  tersebut akan berikatan dengan asam alginat yang bermuatan negatif dan menyebabkan penurunan probabilitas ikatan antar rantai samping asam amino pada bagian sisi aktif amilase. Akibatnya pada kondisi pH 7 jumlah enzim amilase yang aktif lebih besar dibandingkan dengan enzim amilase yang inaktif daripada kondisi pH 8.

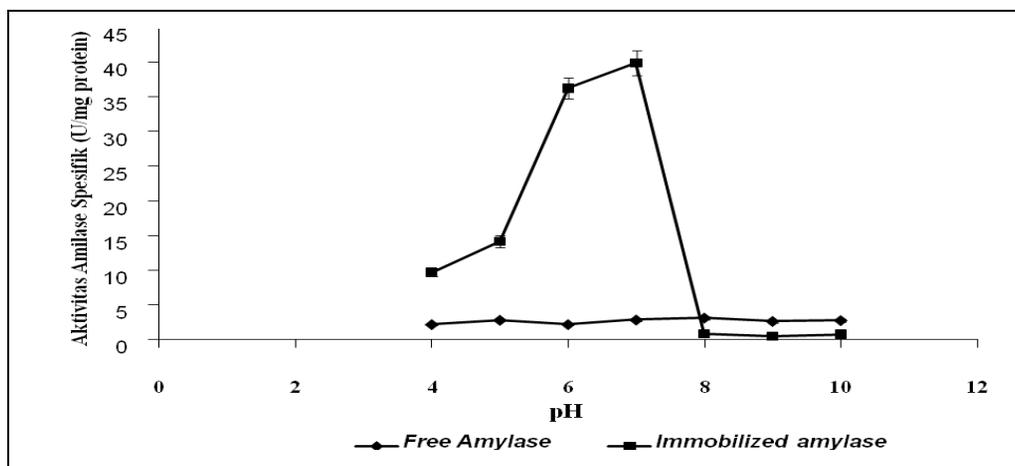
Sebaliknya pada *free amylase*, aktivitas spesifik enzim pada pH 8 lebih tinggi daripada *free amylase* pH 7. Hal ini juga berkaitan dengan konsentrasi ion  $OH^-$  dan  $H^+$  di dalam substrat pati. Pada kondisi pH 8, konsentrasi ion  $OH^-$  lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi ion  $H^+$ . Konsentrasi ion  $H^+$  yang rendah menyebabkan probabilitas ikatan antara ion  $H^+$  dan bagian rantai samping asam amino pada sisi aktif amilase menjadi lebih kecil. Akibatnya jumlah enzim amilase yang inaktif lebih kecil dibandingkan dengan jumlah enzim yang aktif.

Aktivitas spesifik *immobilized α-amylase* dan *free α-amylase* dari *Zoogloea ramigera* ABL 1 dalam medium pati cair pada perlakuan berbagai temperatur disajikan pada Gambar 3. Aktivitas spesifik *immobilized α-amylase* pada kondisi temperatur yang semakin tinggi menunjukkan penurunan dan mencapai optimum pada suhu 30°C yaitu sebesar 46,03 U/mg protein. Sebaliknya aktivitas spesifik *free α-amylase* di atas temperatur 30°C mengalami kenaikan dan mencapai optimum pada temperatur 70°C yaitu sebesar 11,99 U/ mg protein, serta mengalami penurunan pada temperatur 80°C.

Perbedaan aktivitas spesifik *immobilized amylase* dan *free amylase* pada berbagai temperatur disebabkan *immobilized amylase*, amilase dijebak dalam suatu matriks alginat sehingga enzim tidak dapat bergerak bebas dalam larutan. Penjebakan amilase dalam matriks alginat menyebabkan konformasi enzim lebih stabil dan struktur amilase lebih sesuai saat terjadi ikatan antara amilase dan substrat (Woodward, 1985). Mempercepat reaksi antara enzim dengan substrat tidak diperlukan temperatur lebih tinggi, hanya perlu temperatur 30°C untuk memperoleh aktivitas spesifik amilase optimum.

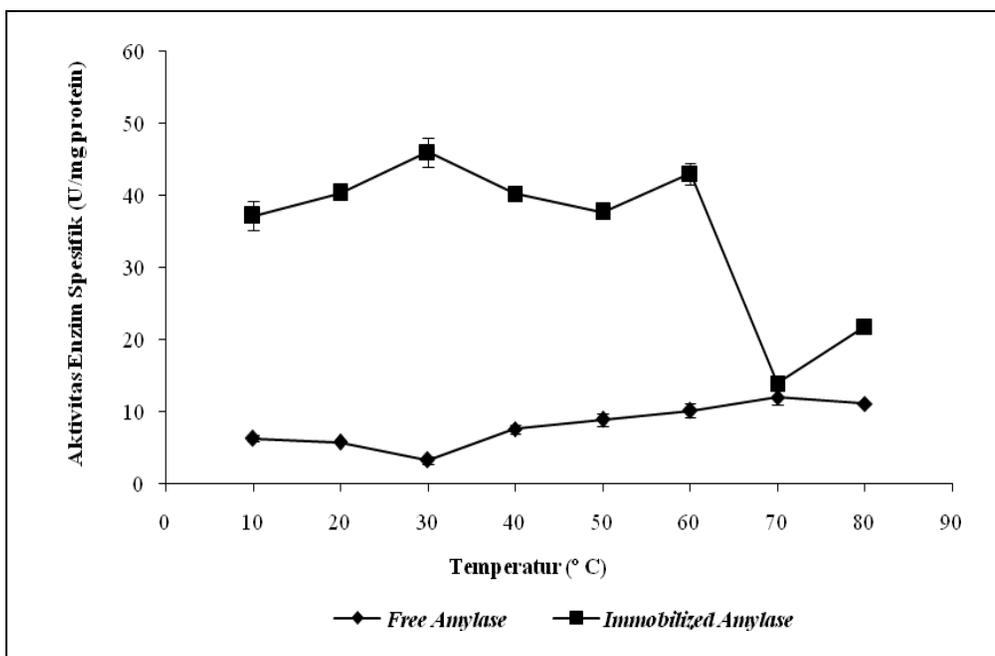


Gambar 1. Pertumbuhan dan aktivitas spesifik α- Amilase dari *Zoogloea ramigera* ABL 1 selama waktu inkubasi 48 jam.

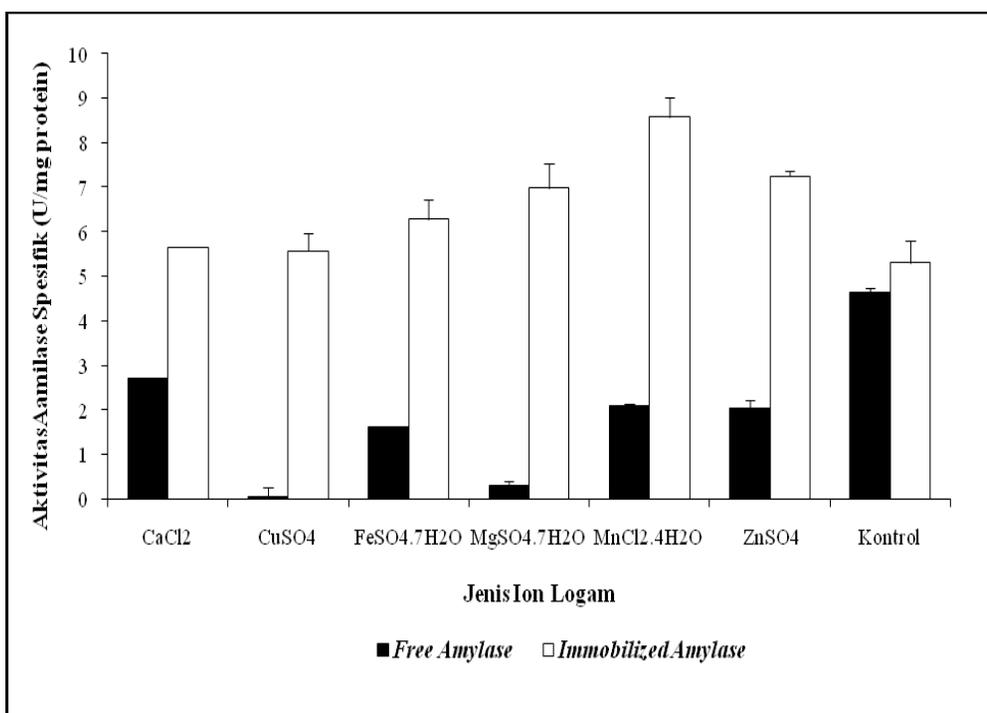


Gambar 2. Aktivitas Spesifik *immobilized α-amylase* dan *free amylase* dari *Zoogloea ramigera* ABL 1 pada Perlakuan Berbagai pH dengan Suhu 30°C.

Aktivitas Immobilized  $\alpha$ -Amylase dan Free  $\alpha$ -Amylase



**Gambar 3.** Aktivitas Spesifik Immobilized  $\alpha$ -amylase dan Free  $\alpha$ -amylase dari *Zoogloea ramigera* ABL 1 pada Perlakuan Berbagai Temperatur dengan pH 7.



**Gambar 4.** Aktivitas Spesifik Immobilized  $\alpha$ -amylase dan Free  $\alpha$ -amylase dari *Zoogloea ramigera* ABL 1 pada Perlakuan berturut-turut pH 7; Suhu 30°C untuk Immobilized  $\alpha$ -amylase dan pH 8; suhu 70°C untuk Free  $\alpha$ -amylase dengan Ion Logam CaCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub> Sebanyak 1 mM Selama 10 Menit.

Temperatur optimum untuk aktivitas spesifik *free amylase* jauh lebih tinggi dibandingkan *immobilized amylase*. *Free amylase* berada bebas dalam larutan dengan posisi yang bervariasi. Pada kondisi temperatur lebih rendah kemungkinan untuk membentuk reaksi kompleks antara enzim dengan substrat lebih kecil, karena posisi enzim dan substrat yang tidak beraturan sehingga probabilitas terjadinya reaksi antara sisi aktif enzim dan substrat juga kecil. Temperatur lingkungan yang lebih tinggi selanjutnya dapat mempercepat tumbukan antar molekul dalam larutan, sehingga probabilitas terbentuknya kompleks enzim dan substrat juga besar. Sebaliknya, kondisi temperatur yang terlalu tinggi akan menurunkan aktivitas spesifik amilase, karena temperatur yang terlalu tinggi akan menyebabkan terjadinya denaturasi enzim (Moat dan Foster, 1995). Penurunan aktivitas spesifik amilase terjadi pada temperatur 80°C yaitu sebesar 11,18 U/mg protein. Hasil penelitian sebelumnya mengenai *immobilization thermostable amylase* dari *Bacillus licheniformis* (Termamyl 60 L) dengan bahan pembawa berupa selulosa, menunjukkan kenaikan aktivitas enzim 44% lebih tinggi daripada *free amylase*. Aktivitas optimum *free amylase* Termamyl 60 L terjadi pada suhu 90°C; pH 7, sedangkan *immobilized amylase* Termamyl 60 L terjadi pada suhu 95°C; pH 7-9. (Varavinit *et al.*, 2002). Aktivitas *immobilization amylase* dari *B. circulans*. GRS. 313 dengan bahan pembawa Ca-alginat juga telah dilakukan dan menunjukkan perbedaan antara aktivitas enzim pada kondisi suhu dan pH yang berbeda. Aktivitas *immobilized amylase* dari *B. circulans*. GRS 313 pada suhu 57°C; pH 4,9 menunjukkan kenaikan dua kali lebih tinggi daripada suhu 50°C; pH 4,1 yaitu sebesar 25,6 U/mg protein (Dey *et al.*, 2003).

Pada pengujian aktivitas spesifik amilase dengan perlakuan berbagai ion logam diperoleh hasil yang sangat berbeda antara *immobilized amylase* dan *free amylase*. Pengujian aktivitas katalitik untuk kedua amilase tersebut dilakukan pada pH dan temperatur optimum yang telah diperoleh pada pengujian sebelumnya. Kondisi temperatur dan pH optimum untuk aktivitas katalitik *immobilized amylase* yaitu dilakukan pada pH

7, temperatur 30°C. Kondisi temperatur dan pH optimum untuk aktivitas katalitik *free amylase* yaitu dilakukan pada pH 8, temperatur 70°C.

Beberapa ion logam yang diberikan dalam pengujian aktivitas spesifik *immobilized amylase* dan *free amylase* yaitu CaCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O dan ZnSO<sub>4</sub>, masing-masing dengan konsentrasi 1 mM selama 10 menit. Tiap-tiap ion logam tersebut mempunyai sifat yang berbeda dan dapat berikatan dengan enzim amilase. Ion-ion logam tersebut dapat bersifat kofaktor atau inhibitor, yaitu tergantung dari sifat ion logam tersebut dan jenis amilase yang digunakan. Sebagian besar  $\alpha$ -amilase merupakan *metalloenzim* yaitu mengandung kurang lebih 1 sampai 10 ion Ca<sup>2+</sup> dalam setiap satu molekul amilase (Ahmadi *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2003). Kandungan Ca<sup>2+</sup> pada  $\alpha$ -amilase dari *Bacillus sp.* GHA1 dengan *Molar Absorption Coefficient* ( $\epsilon$  280) menggunakan *Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrofotometer* menunjukkan adanya 3 ion Ca dalam setiap molekul enzim (Ahmadi *et al.*, 2010) Ion logam Ca<sup>2+</sup> tersebut berperan sebagai kofaktor, yaitu akan berikatan kuat pada sisi aktif enzim dan berperan dalam mengkatalisis suatu reaksi enzimatik. Selanjutnya, ion logam Ca<sup>2+</sup> tersebut juga akan menstabilkan konformasi atau struktur 3 dimensi enzim amilase (Sivaramakrishnan *et al.*, 2006).

*Immobilized amylase* dengan pemberian berbagai logam menunjukkan aktivitas spesifik jauh lebih besar dibandingkan dengan aktivitas spesifik *free amylase*, yaitu seperti disajikan pada Gambar 4. Perbedaan aktivitas spesifik *immobilized amylase* dan *free amylase* dengan perlakuan beberapa ion logam tersebut secara umum disebabkan oleh beberapa faktor. Faktor-faktor tersebut yaitu meliputi perbedaan sifat jenis ion, perlakuan temperatur, interaksi antara ion logam dengan enzim dan substrat, serta adanya matriks alginat pada *immobilized amylase*.

Pada *free amylase* dengan temperatur 70°C, pemberian ion logam dapat menyebabkan reaksi yang lebih cepat antara ion logam yang diberikan dan substrat maupun dengan enzim. Akibatnya ion logam yang diberikan pada *free amylase* justru menjadi

inhibitor dalam reaksi katalisis enzim. Sifat inhibitor ion logam tersebut ditunjukkan dengan hasil pengujian aktivitas spesifik amilase yang lebih rendah pada *free amylase* dengan perlakuan ion logam daripada dengan tanpa perlakuan ion logam (kontrol). Amilase yang diunduh dari sel *Zoogloea ramigera* ABL 1 kemungkinan merupakan holoenzim yaitu enzim yang sudah berikatan dengan suatu kofaktor dan mempunyai kemampuan untuk mempercepat reaksi katalisis dalam sel bakteri tersebut, sehingga dengan adanya perlakuan ion logam menyebabkan terganggunya aktivitas katalitik dari enzim. Untuk membuktikan bahwa amilase dari *Zoogloea ramigera* ABL 1 adalah *metalloenzyme*, perlu dilakukan penelitian lanjut dengan pemberian EDTA sebagai *chelating agent*. Savchenko *et al.*, (2002) melaporkan pemberian 2 mM EDTA terhadap *metalloenzyme* amilase dari *Pyrococcus furiosus* (mengandung 2 ion  $\text{Ca}^{2+}$ /molekul enzim) mengakibatkan penurunan aktivitas enzim sebesar 10%. Ahmadi *et al.*, (2010), juga melaporkan perlakuan 5 mM dan 10 mM EDTA terhadap *metalloenzyme* amilase dari *Bacillus sp.* GH1 (mengandung 3 ion  $\text{Ca}^{2+}$  / molekul enzim) mengakibatkan penurunan aktivitas enzim masing-masing 14% dan 34% .

*Immobilized amylase* pada berbagai perlakuan ion logam menunjukkan adanya aktivitas spesifik enzim lebih besar daripada tanpa perlakuan ion logam (kontrol). Aktivitas spesifik *immobilized amylase* yang lebih besar tersebut disebabkan oleh peran matriks alginat yang digunakan untuk menjebak enzim dalam *immobilized amylase*. Matriks alginat mempunyai daya afinitas yang tinggi terhadap ion logam (Rasyid dan Rahmat, 2002), sehingga menyebabkan kemampuan matriks alginat dalam mengikat ion logam juga tinggi. Selanjutnya adanya ion logam terutama yang bersifat sebagai inhibitor tidak akan mengganggu aktivitas katalisis enzim *immobilized amylase* tersebut.

Pengaruh pemberian tiap-tiap jenis ion logam yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata antara aktivitas spesifik *immobilized amylase* dan *free amylase*. Pada *free amylase* perlakuan ion  $\text{CaCl}_2$  menunjukkan aktivitas spesifik enzim paling besar, diikuti oleh Mn

$\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , dan  $\text{CuSO}_4$ . Sedangkan pada *immobilized amylase* perlakuan ion  $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  menunjukkan aktivitas spesifik enzim paling besar, diikuti oleh  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ .

## Simpulan dan Saran

### Simpulan

*Immobilized  $\alpha$ -amylase* dari *Zoogloea ramigera* ABL 1 pada semua perlakuan faktor lingkungan yaitu pH, temperatur, dan pemberian beberapa ion logam dengan konsentrasi 1 mM, mempunyai aktivitas spesifik lebih tinggi daripada *free amylase*. Stabilitas aktivitas spesifik *immobilized amylase* berada pada kisaran pH luas yaitu pH 4–7, mencapai aktivitas optimum pada pH 7. Sedangkan stabilitas aktivitas spesifik *free amylase* hanya terjadi pada pH 8. Pada perlakuan temperatur, stabilitas aktivitas katalisis *immobilized amylase* juga berada pada kisaran temperatur yang luas yaitu 10–60°C dan mencapai aktivitas tertinggi yaitu pada temperatur 30°C. Sebaliknya stabilitas aktivitas *free amylase* berada pada kisaran temperatur yang lebih sempit yaitu 50–70°C, mencapai aktivitas tertinggi yaitu pada temperatur 70°C. Stabilitas aktivitas *immobilized amylase* terbukti tidak terganggu dengan adanya pemberian 1 mM beberapa ion logam yaitu  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  dan  $\text{ZnSO}_4$ . Pemberian ion  $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 mM juga terbukti dapat menaikkan aktivitas katalitik *immobilized amylase*. Adapun stabilitas aktivitas *free amylase* terganggu dengan adanya pemberian 1 mM beberapa ion logam yaitu  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  dan  $\text{ZnSO}_4$ , kecuali pada penambahan 1 mM ion  $\text{CaCl}_2$  dapat meningkatkan aktivitas *free amylase* meskipun aktivitasnya lebih rendah daripada kontrol. *Immobilization technique* enzim pada amilase dari *Zoogloea ramigera* ABL 1 terbukti dapat menjaga stabilitas aktivitas spesifik amilase tetap berada dalam aktivitas yang tinggi saat enzim berada pada kisaran pH, suhu dan pemberian ion logam dengan jenis dan konsentrasi tertentu.

## Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjut mengenai kinetika dari enzim *immobilized amylase* sehingga dapat diperoleh nilai Km dan V maks yang dapat digunakan sebagai acuan untuk penerapan skala industri.

## Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada semua staf dan teknisi Laboratorium Mikrobiologi dan laboratorium Biokimia, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta yang telah menyediakan fasilitas dalam pelaksanaan penelitian ini.

## Daftar Pustaka

- Ahmadi, A., Ghobadia, S., Khajehb, K., Nomanpour, B. dan Dalfarab, A.B. 2010. Purification of  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus* sp. GHA1 and Its Partial Characterization. *J. of The Iranian Chemical Society*, 7 (2): 432–440.
- Alva, S., Anupama, J., Savla, J., Chiu, Y.Y., Vyshali, P., Shruti, M., Yogeetha, B.S., Bhavya D., Purvi, J., Ruchi, K., Kumudini, B.S. dan Varalakshmi, K.N. 2007. Production and Characterization of Fungal Amylase Enzyme Isolated from *Aspergillus* sp. JGI 12 in Solid State Culture. *African J. Biotechnology*, 6 (5): 576–581.
- Biswanger. 2004. *Practical Enzymology*. Wiley-VLH Verlag GmbH and Co.Kga A.Weinheim, pp: 22–26.
- Carvalho, R.V., Côrrea, T.L.R., Matos da Silva, J.C., de Oliveira Mansur, L.R.C. dan Martins, M.L.L. 2008. Properties of an Amylase From Thermophilic *Bacillus* sp. Brazilian. *J. Microbiology*, 39: 102–107.
- Dey, G., Singh dan Banerjee, R. 2003. Immobilization of  $\alpha$ - amylase Produced *Bacillus circulans*. GRS 313. *Brazilian archives of biology and Technlogy*, 46 : 167–176.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K. dan Chauchan, B. 2003. Microbial  $\alpha$ -amilase: a Biotechnological Perspective. *Process. Biochem.*, 38: 1599–1616.
- Holt, G.J., Krieg, R.N., Sneath, H.A.P., Staley, T.J. dan Williams, S.T. 2000. *Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology*. 9<sup>th</sup> ed. Ippincott. Williams and Wilkins. Philadelphia. USA.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. dan Randal, R.J. 1951. Protein Measurement with The Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193–265.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 37: 426–428.
- Mitsuiki, S., Mukae, K., Sakai, M., Goto, M., Hayashida, S. dan Furukawa, K. 2005. Comparative characterization of raw starch hydrolyzing  $\alpha$ -amylase from various *Bacillus* strains. *Enzyme and Microbial Tech.*, 37: 410–416.
- Moat, A.G. dan Foster, J.W. 1995. *Microbial Physiology*. Third edition. A John Wiley & Sons, Inc. Publication. New York.
- Mohapatra, B.R., Banerjee, U.C. dan Bapuji, M. 1998. Characterization of A Fungal Amylase from *Mucor* sp. Associated with the Marine Sponge *Spirastrella* sp. *J. Biotechnol.*, 60: 113–117.
- Mubarik, N.R., Damayanti, E. dan Listiyowati, S. 2003. Isolasi dan Karakterisasi Amilase dari Kapang Alkalotoleran Asal Limbah Cair Tapioka. *Biota*, VIII (1): 1–8.
- Najafi, M.F. dan Deobagkar, D. 2005. Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* AX20. *Protein Expression and Purification*, 41: 349–354.
- Noureddini, H., Gao, X. dan Philkana, R.S. 2005. Immobilized *Pseudomonas cepasia* lipase for Biodiesel Fuel production from soybean soil. *Bioresources Technology*, 96: 769–777.
- Price, N.C. dan Stevens, L. 1982. *Fundamentals of Enzymology*. Oxford University Press. New York.
- Rasyid, A. dan Rachmat, R. 2002. Modifikasi Metode Ekstraksi Natrium Alginat Untuk Meningkatkan Nilai Viskositas. Seminar Nasional Rumput Laut dan Mini Symposium Mikroalga. Makasar.
- Savchenko, A., Vieille, C., Kang, S. dan Zeikus, G.J. 2002. *Pyrococcus furiosus*  $\alpha$ -Amylase Is Stabilized by Calcium and Zinc. *Biochemistry*, 41: 6193–6201.
- Sisilia, S.W., Mursyanti, E. dan Atmodjo, P.K. 2004. Pola Pertumbuhan dan Produksi  $\alpha$ -Amilase *Bacillus amyloliquefaciens* pada Substrat Pati Jagung dengan Variasi pH Awal Media dan Waktu Inkubasi. *Biota*, IX (2): 84–91.
- Sivaramkrishnan, S., Gangadharan, D., Madhavan, K., Nampoothiri, Soccol, C.R. dan Pandey, A. 2006.  $\alpha$ -Amylases from Microbial Sources – An Overview Recent Developments. *Food Technol. Biotechnol.*, 44 (2): 173–184.

*Aktivitas Immobilized  $\alpha$ -Amylase dan Free  $\alpha$ -Amylase*

- Thippeswamy, S., Girigowda, K. dan Mulimani, V.H. 2006. Isolation and Identification of  $\alpha$  - Amylase Producing *Bacillus sp.* From Dhal Industry Waste. *Indian J. of Biochem & Biophysics*, 43: 295–298.
- Varavinit, S., Chaokasem, N. dan Shobsngob, S. 2002. Immobilization of a Thermostable alpha-amylase. *Science Asia*, 28: 247–251.
- Wanderley, K.J., Torres, F.A.G., Moraes, L.M.P. dan Ulhoa, C.J. 2004. Biochemical characterization of  $\alpha$ -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *FEMS Microbiology Letters*, 231: 165–169.
- Woodward, J. 1985. Immobilised Cells and Enzymes, a Practical Approach. IRL Press. Washington DC. p: 39-44.