

**PENGUJIAN PS-DAP SEBAGAI PENGONTROL ADSORPSI  $\alpha$ -AMILASE  
PADA FASA DIAM PS-DAP- $\beta$ CD DI BAWAH PENGARUH  
ION  $\text{Ca}^{2+}$  DAN  $\text{Cu}^{2+}$**

***TESTING PS-DAP AS  $\alpha$ -AMILASE ADSORPTION CONTROL  
IN THE STATIONARY PHASE OF PS-DAP- $\beta$ CD UNDER THE INFLUENCE  
OF  $\text{Ca}^{2+}$  + AND  $\text{Cu}^{2+}$  + ION***

**Ratu Fenny Muldiani, Sri Widarti**  
UP MKU Politeknik Negeri Bandung  
[ratu.fenny@polban.ac.id](mailto:ratu.fenny@polban.ac.id)

**ABSTRAK**

$\alpha$ -Amilase adalah salah satu bioproduk yang sudah digunakan secara luas dalam industri seperti industri gula, alkohol/bio-etanol, farmasi, deterjen, kertas, tekstil, dan bidang bioteknologi. Enzim ini mengambil 25-30% pasar dunia dalam industri enzim. Agar dapat dimanfaatkan,  $\alpha$ -amilase harus dimurnikan dari campurannya terlebih dahulu. Karena masih kompleksnya sistem pemisahan dan pemurniannya, harga  $\alpha$ -amilase dalam keadaan relatif murni masih mahal. Salah satu metode yang selektif dengan rangkaian pemisahan dan pemurnian yang lebih pendek adalah kromatografi afinitas. Metode kromatografi afinitas didasarkan interaksi secara spesifik dan reversibel antara ligan pada fasa diam di dalam kolom dengan  $\alpha$ -amilase. Fasa diam dalam kromatografi afinitas berbasis *cyclodextrin* terdiri atas tiga komponen utama, yaitu padatan pendukung (Polistiren/PS), lengan penghubung (Diaminopropana/DAP) dan ligan ( $\beta$ -Siklodextrin/ $\beta$ CD). Selain interaksi secara spesifik,  $\alpha$ -amilase pada ligan saat proses pemurnian dimungkinkan terjadi retensi  $\alpha$ -amilase pada padatan pendukung dan lengan penghubungnya. Di sisi lain, ion  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Cu}^{2+}$  diketahui dapat menstimulasi interaksi  $\alpha$ -amilase dengan substrat. Selain dapat menstimulasi interaksi antara  $\alpha$ -amilase dengan inhibitorynya  $\beta$ CD pada permukaan PS-DAP- $\beta$ CD di dalam kolom, ion-ion ini diperkirakan juga dapat memengaruhi interaksi  $\alpha$ -amilase dengan padatan pendukung dan lengan penghubung (PS-DAP). Penelitian ini bertujuan untuk menguji adsorpsi isothermal  $\alpha$ -amilase pada permukaan fasa diam tanpa ligan, PS-DAP di bawah pengaruh ion  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Cu}^{2+}$ . Hasil pengujian digunakan sebagai pengontrol adsorpsi  $\alpha$ -amilase pada fasa diam PS-DAP- $\beta$ CD.  $\alpha$ -amilase dialirkan dengan kecepatan konstan pada berbagai volume umpan pada konsentrasi tertentu dengan penambahan ion logam  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Cu}^{2+}$  1, 5, dan 9 mM mengikuti model adsorpsi Langmuir. Dari data adsorpsi isothermal, ditunjukkan bahwa penambahan konsentrasi ion  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Cu}^{2+}$  pada volume umpan mampu mengurangi retensi  $\alpha$ -amilase pada permukaan PS-DAP. Menurunnya tingkat retensi  $\alpha$ -amilase pada permukaan PS-DAP memungkinkan terjadinya peningkatan jumlah  $\alpha$ -amilase yang teradsorpsi oleh ligan. Selain mengurangi retensi,  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Cu}^{2+}$  juga secara umum menurunkan selektibilitas dan adsorpsi maksimum  $\alpha$ -amilase pada permukaan PS-DAP.

**Kata kunci:**  $\alpha$ -amilase, kromatografi afinitas, PS-DAP

### ABSTRACT

*$\alpha$ -Amylase is one of the most widely used bioproducts in industries such as sugar, alcohol / bio-ethanol, pharmaceutical products, detergent, paper, textile, and biotechnology industries. This enzyme takes 25-30% of the world market in the enzyme industry. In order to be utilized,  $\alpha$ -amylase should be purified from the mixture first. Because of the complexity of its separation and purification system, the price of pure  $\alpha$ -amylase is still expensive. One selective method with shorter separation and purification sequences is affinity chromatography. The affinity chromatography method is based on the specific and reversible interaction between the ligands in the stationary phase in the column with  $\alpha$ -amylase. The stationary phase in cyclodextrin-based affinity chromatography consists of three main components, namely solid support (Polystyrene / PS), linkage (Diaminopropane / DAP) and ligands ( $\beta$ -Siklodextrin /  $\beta$ CD). Thus, in addition to the specific interaction of  $\alpha$ -amylase in the ligand during the purification process, it may be possible to retain  $\alpha$ -amylase in its solid support and the linkage. On the other hand,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  ions are known to stimulate the interaction of  $\alpha$ -amylase with the substrate. These ions are probably able to stimulate the interaction between  $\alpha$ -amylase and their  $\beta$ CD inhibitors on the PS-DAP- $\beta$ CD surface in the column and it is also able to affect the  $\alpha$ -amylase interactions with the solid support and linkage (PS-DAP) interactions. The study aimed to test the isothermal adsorption of  $\alpha$ -amylase on the surface of the stationary phase without ligand, PS-DAP under the influence of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  ions. The test results were used as an  $\alpha$ -amylase adsorption controller in the PS-DAP- $\beta$ CD stationary phase.  $\alpha$ -Amylase flowed at a constant velocity at various feed volumes at a certain concentration with the addition of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  1, 5, and 9 mM metal ions following the Langmuir adsorption model. From the isothermal adsorption data it was shown that the addition of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  ions to the feed volume reduced the retention of  $\alpha$ -amylase on the PS-DAP surface. A decrease in the retention rate of  $\alpha$ -amylase on the surface of PS-DAP allows an increase in the amount of  $\alpha$ -amylase adsorbed by the ligand. In addition to reducing the retention of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  ions, it also generally decrease the selectivity and maximum adsorption of  $\alpha$ -amylase on the PS-DAP surface.*

**Keywords:**  *$\alpha$ -amilase, affinity chromatography, PS-DAP*

### PENDAHULUAN

$\alpha$ -Amilase adalah salah satu bioproduk yang sudah digunakan secara luas dalam industri seperti industri gula, alkohol/bio-etanol, farmasi, deterjen, kertas, tekstil, dan bidang bioteknologi. Enzim ini mengambil 25-30% pasar

dunia dalam industri enzim(Lia dkk, 2016).  $\alpha$ -Amilase ( $\alpha$ -1,4-glukan-4-glukanohidrolase, EC 3.2.1.1) adalah enzim yang bekerja sebagai katalis dalam reaksi hidrolisis polisakarida menjadi oligosakarida.

$\alpha$ -Amilase membutuhkan pemisahan dan pemurnian dari campurannya sebelum dapat digunakan. Semakin kompleks rangkaian pemisahan dan pemurnian, semakin tinggi biaya produksi. Karena masih kompleksnya sistem pemisahan dan pemurniannya, harga  $\alpha$ -Amilase dalam keadaan relatif murni masih mahal. Berbagai metode telah dikembangkan untuk memisahkan dan memurnikan  $\alpha$ -amilase. Pada umumnya, metode yang digunakan adalah kombinasi beberapa teknik pemisahan protein. Salah satu metode pemisahan yang dapat digunakan adalah kromatografi afinitas.

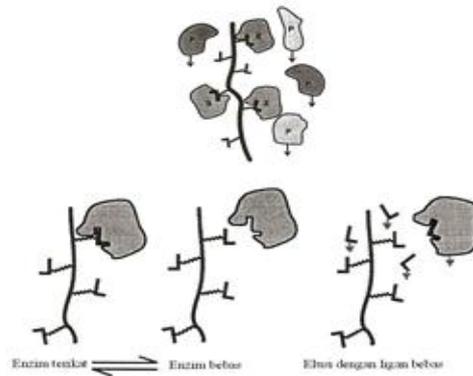
Dalam suatu campuran protein yang akan dipisahkan, terdapat enzim yang dapat berinteraksi secara spesifik dan reversibel dengan ligan tertentu yang diimobilisasi pada permukaan padatan pendukung sebagai fasa diam. Jika campuran protein dialirkan ke dalam kolom yang berisi ligan yang terimobilisasi pada padatan pendukung, enzim akan terikat pada ligan di dalam kolom, sedangkan protein lain akan mengalir ke luar dari kolom. Enzim yang terikat pada ligan dapat dielusi kembali menggunakan ligan, inhibitor, dan larutan bufer (Pakiman dkk., 2012).

Metode kromatografi afinitas didasarkan interaksi secara spesifik dan reversibel antara ligan pada fasa diam di dalam kolom dengan produk target. Fasa diam dalam kromatografi afinitas terdiri atas tiga komponen utama, yaitu padatan pendukung, lengan penghubung, dan ligan (Gambar 1).

Selain interaksi, secara spesifik produk target pada ligan saat proses pemurnian dimungkinkan terjadi retensi produk target pada padatan pendukung dan lengan penghubung. Salah satu fasa diam yang digunakan dalam pemurnian dan pemisahan  $\alpha$ -amilase secara kromatografi afinitas adalah fasa diam berbasis *cyclodextrin* (CD), yaitu PS-DAP- $\beta$ CD (Polistiren-diaminopropan- $\beta$  siklodextrin).

Selektivitas dan banyaknya enzim yang diperoleh kembali (*recovery*) berbanding lurus dengan parameter adsorpsinya pada permukaan fasa diam dalam kolom yaitu nilai pengikatan maksimum ( $q_m$ ) dan konstanta kesetimbangan ( $K_A$ ). Untuk mengetahui retensi  $\alpha$ -amilase pada setiap komponen fasa diam, perlu dihitung kapasitas adsorpsi  $\alpha$ -amilase dalam setiap bagian kolom.

Pada proses pemurnian  $\alpha$ -amilase, dimungkinkan terjadi retensi  $\alpha$ -amilase pada padatan pendukung dan lengan penghubung PS-DAP. Retensi  $\alpha$ -amilase yang terjadi pada PS-DAP melalui ikatan hidrogen antara gugus amina primer bebas dan  $\alpha$ -amilase dan ikatan tidak spesifik antara  $\alpha$ -amilase dengan padatan pendukung. Telah diketahui bahwa gugus amina primer bebas pada PS-DAP (lengan penghubung adalah 1,2 diaminopropana) dapat berikatan hidrogen dengan amina sekunder sehingga kemampuan amina primer berkurang ketika berikatan dengan  $\alpha$ -amilase (Widarti dkk., 2014).



Gambar 1. Pemisahan kromatografi afinitas. P=Protein lain, E=Enzim, L=Ligan

Beberapa ion logam diketahui dapat menstimulasi aktivitas  $\alpha$ -amilase. Contohnya, ion  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Cu}^{2+}$  5mM menstimulasi aktivitas enzim, ion  $\text{Ca}^{2+}$  dapat meningkatkan stabilitas termal enzim, ion  $\text{K}^+$ , dan ion  $\text{Mn}^{2+}$  menghambat aktivitas enzim. Ion  $\text{Zn}^{2+}$  dan ion  $\text{Mg}^{2+}$  tidak berpengaruh pada aktivitas  $\alpha$ -amilase *B. Amyloliquefaciens* (Gangadharan dkk., 2009). Ion  $\text{Ca}^{2+}$  juga meningkatkan keaktifan dan kestabilan termal beberapa  $\alpha$ -amilase rekombinan (Lia dkk, 2016).

Pada penelitian ini, diuji lebih lanjut pengaruh kehadiran ion  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Cu}^{2+}$  pada fasa diam tanpa ligan, PS-DAP. Peningkatan keaktifan dan kestabilan termal enzim  $\alpha$ -amilase dengan penambahan ion  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Cu}^{2+}$  memungkinkan terjadinya perubahan jumlah  $\alpha$ -amilase yang teretensi pada padatan pendukung dan lengan penghubung PS-DAP. Hasil penelitian dapat digunakan sebagai pengontrol fasa diam PS-DAP- $\beta$ CD pada adsorpsi  $\alpha$ -amilase di bawah pengaruh ion  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Cu}^{2+}$ .

## METODE PENELITIAN

Tahapan penelitian pengaruh ion  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Cu}^{2+}$  dalam adsorpsi  $\alpha$ -amilase pada permukaan fasa diam tanpa ligan PS-DAP adalah sebagai berikut.

### Tahap Persiapan Alat dan Bahan

Pada tahap persiapan, dilakukan pengadaan  $\alpha$ -amilase, Reagen Bradford, fasa diam dan kolom, *setting* alat (pompa, kolom kromatografi, tempat penampungan).

### Tahap *Packing* Fasa Diam ke dalam Kolom

Pada tahap *packing*, sebanyak 0,2 gram resin PS-DAP dikemas ke dalam kolom terbuat dari kaca, berdiameter dalam 2,5 mm, dan panjang 10 cm. Di bagian bawah kolom, diberi *fritz* yang terdiri atas kertas saring dan kapas untuk kromatografi dan bagian bawah kolom ditutup dengan penutup kolom. Pada saat pengemasan, 0,2 g resin kering diketuk perlahan agar tidak ada ruang kosong di dalam kolom. Setelah semua material masuk ke dalam kolom, kapas kromatografi ditambahkan sebagai *fritz* bagian atas

dan kolom ditutup dengan penutup kolom. Kolom disetimbangkan dengan air distilasi selama 3 jam dengan kecepatan alir air distilasi 0,25 mL/menit kemudian disetimbangkan dengan *buffer universal* pH 7. Kolom yang sudah selesai digunakan dibilas dengan air distilasi dan disimpan di dalam kulkas bersuhu 2-5 °C.

### Tahap Adsorpsi Isotermal

Kolom diumpan dengan larutan  $\alpha$ -amilase dengan konsentrasi konstan dalam berbagai volume.  $\alpha$ -Amilase dengan konsentrasi tertentu sebanyak 100  $\mu\text{L}$  dicampur dengan ion  $\text{Ca}^{2+}$  dengan konsentrasi 1 Mm lalu dialirkan ke dalam kolom dengan kecepatan 0,25 mL/menit. Kolom dikeringkan dengan udara sampai tidak ada lagi cairan yang keluar dari kolom.  $\alpha$ -amilase yang teretensi di dalam kolom dielusi menggunakan *bufer universal* pH 7. Eluat sebanyak 3 mL ditampung dan ditentukan konsentrasinya dengan menggunakan metode Bradford (Bradford, 1976). Pekerjaan diulang dengan volume umpan 50, 100, 200, 500, dan 600  $\mu\text{L}$  (diperoleh satu kurva adsorpsi isotermal). Pekerjaan diulang dengan mengganti konsentrasi ion  $\text{Ca}^{2+}$  dengan 5 dan 9 mM, masing-masing konsentrasi menghasilkan kurva adsorpsi isotermal. Langkah selanjutnya adalah mengulang semua pekerjaan adsorpsi isotermal dengan mengganti ion  $\text{Ca}^{2+}$  dengan ion  $\text{Cu}^{2+}$  sehingga diperoleh kurva adsorpsi isotermal pada setiap konsentrasi ion  $\text{Cu}^{2+}$ .

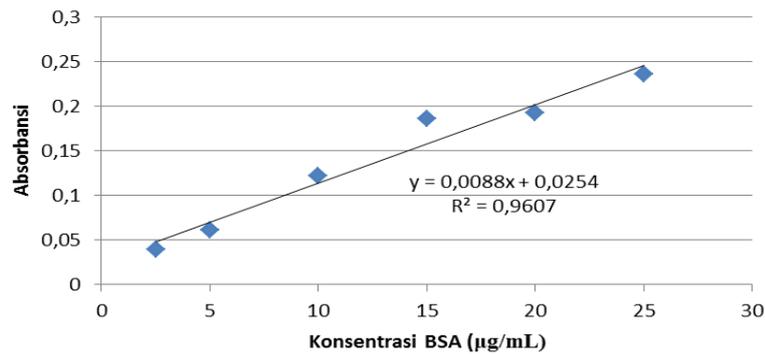
### Tahap Penentuan Kapasitas Adsorpsi $\alpha$ -amilase

Banyaknya  $\alpha$ -amilase yang teradsorpsi diukur dengan spektrometer kemudian konsentrasinya dihitung dengan menggunakan kurva standar protein lalu dikalikan dengan volume eluat yang ditampung. Untuk setiap konsentrasi ion  $\text{Ca}^{2+}$  dan ion  $\text{Cu}^{2+}$ , dibuat kurva  $V/q$  terhadap  $V$  sehingga akan diperoleh persamaan garis lurus dengan  $V$  adalah volume umpan dan  $q$  adalah jumlah  $\alpha$ -amilase (mg) yang terserap.

Dari persamaan garis lurus, dapat ditentukan nilai  $K_a$  dan  $q_m$ .  $1/q_m = \text{gradien garis}$  sehingga  $q_m = 1/\text{gradien garis}$ .  $K_a$  ditentukan dari titik potong persamaan garis,  $1/(q_m \times K_A) = \text{titik potong persamaan garis}$ .

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Untuk menentukan parameter adsorpsi, konsentrasi  $\alpha$ -amilase ditentukan dengan metode Bradford yang menggunakan kurva standar protein Bovine Serum Albumin (BSA). Kurva dibuat dengan mengalurkan absorbansi sebagai sumbu y dan konsentrasi BSA sebagai sumbu x (Gambar 3). Kurva memperlihatkan rentang linier konsentrasi BSA 2,5-25  $\mu\text{g/mL}$  yang dinyatakan sebagai persamaan garis  $y = 0,0088x + 0,0254$  dengan koefisien korelasi ( $R^2$ ) = 0,9607. Konsentrasi digunakan sebagai dasar perhitungan massa  $\alpha$ -amilase yang teradsorpsi ( $q$ ).

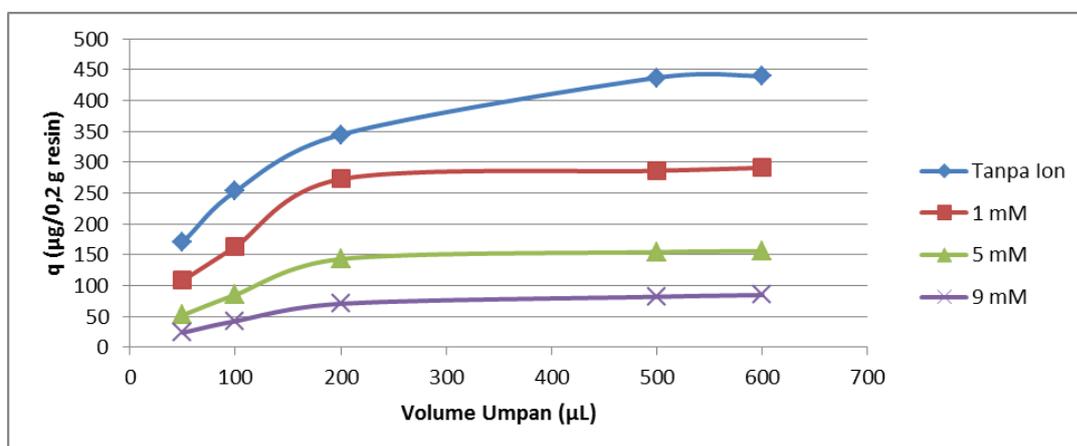


Gambar 2. Kurva Standar BSA

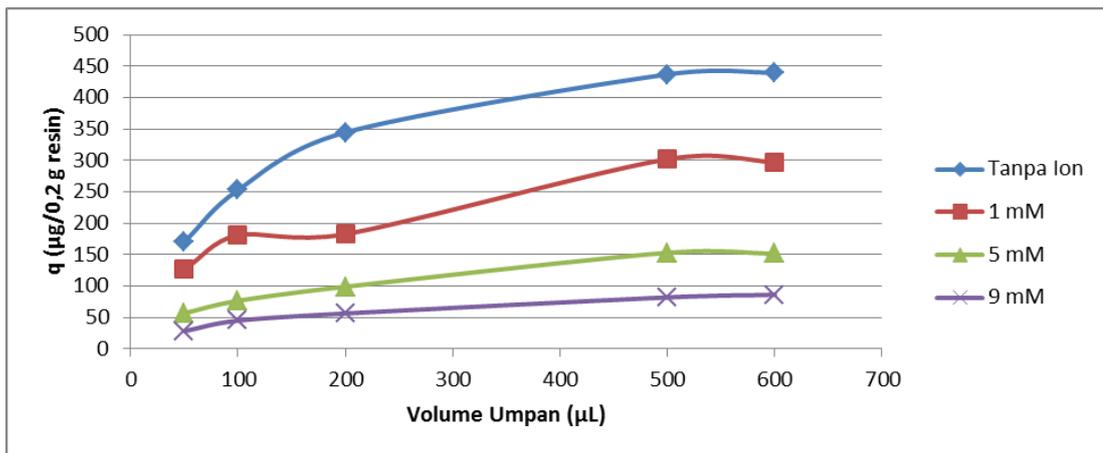
Menurut model adsorpsi Langmuir, jumlah kapasitas pengikatan maksimum ( $q_m$ ) dan tetapan kesetimbangan adsorpsi ( $K_A$ ) adalah besaran yang menunjukkan parameter adsorpsi. Model kesetimbangan isotherm adsorpsi mengikuti model kesetimbangan isotherm adsorpsi Langmuir. Jumlah adsorbat yang teradsorpsi ( $q$ ) merupakan fungsi konsentrasi adsorbat dalam umpan ( $C$ ) atau  $q = f(C)$  pada volume umpan yang tetap. Karena mol dapat berupa hasil kali konsentrasi ( $C$ ) dengan volume ( $V$ ) dan konsentrasi umpan dibuat konstan, kesetimbangan isotherm adsorpsi menjadi  $q = f(V)$ .

Kurva hasil penelitian menunjukkan hubungan antara  $q$  dan

volume umpan dengan penambahan ion  $Ca^{2+}$  (Gambar 3).  $Cu^{2+}$  (Gambar 4) mengindikasikan bahwa adsorpsi isothermal yang terjadi mengikuti model adsorpsi isothermal Langmuir. Pada gambar 3 dan 4, kurva menunjukkan ion  $Ca^{2+}$  dan  $Cu^{2+}$  memiliki pengaruh terhadap adsorpsi isothermal pada permukaan PS-DAP. Terlihat dari kurva adsorpsi bahwa peningkatan konsentrasi  $Ca^{2+}$  dan  $Cu^{2+}$  mampu menurunkan tingkat retensi  $\alpha$ -amilase pada permukaan PS-DAP. Dengan menurunnya tingkat retensi  $\alpha$ -amilase pada permukaan PS-DAP, memungkinkan terjadinya peningkatan jumlah  $\alpha$ -amilase yang teradsorpsi oleh ligan.



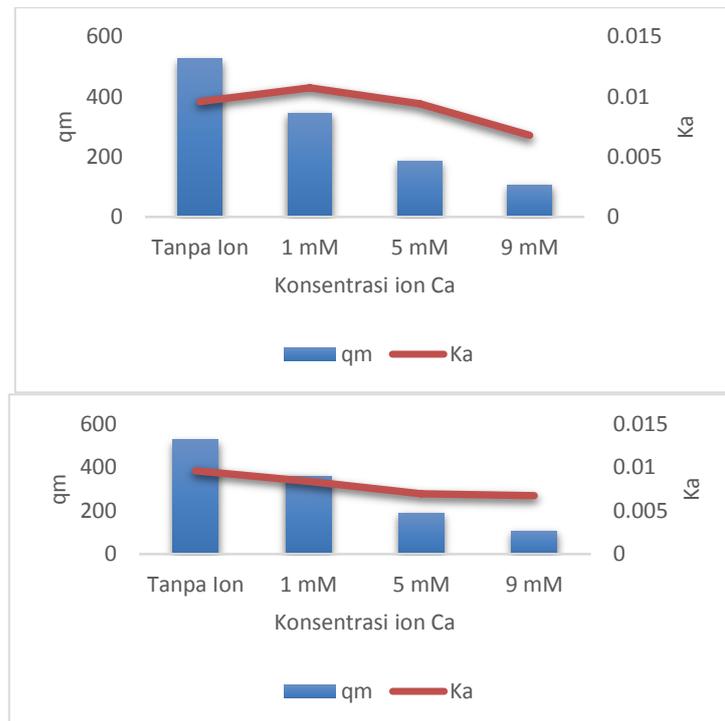
Gambar 3. Adsorpsi  $\alpha$ -amilase pada PS-DAP dengan Penambahan ion  $Ca^{2+}$



Gambar 4. Adsorpsi  $\alpha$ -amilase pada PS-DAP dengan Penambahan ion  $\text{Cu}^{2+}$

Dengan mengalurkan kurva antara  $V/q$  dengan volume umpam untuk masing-masing konsentrasi, dapat dihitung nilai  $q_m$  sebagai 1/kemiringan garis dan  $K_A$  dihitung dari nilai titik

potong garis dan nilai  $q_m$  (titik potong =  $1/(q_m \times K_A)$ ). Diperoleh nilai  $q_m$  dan  $K_A$  untuk berbagai konsentrasi ion  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Cu}^{2+}$  (Gambar 5).



Gambar 5. Pengaruh konsentrasi ion  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Cu}^{2+}$  terhadap nilai  $K_A$  dan  $q_m$

Berdasarkan gambar 5, semakin bertambahnya konsentrasi ion  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Cu}^{2+}$ , semakin menurun kapasitas

pengikatan maksimum  $\alpha$ -amilase pada permukaan PS-DAP. Demikian pula dengan laju adsorpsi yang menurun

dengan bertambahnya konsentrasi ion  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Cu}^{2+}$  kecuali pada konsentrasi ion  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM harga  $K_A$  mencapai keadaan maksimum ( $0,01\mu\text{L}^{-1}$ ).

### SIMPULAN

Penambahan konsentrasi ion  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Cu}^{2+}$  pada volume umpan mampu mengurangi retensi  $\alpha$ -amilase pada permukaan PS-DAP. Menurunnya tingkat retensi  $\alpha$ -amilase pada permukaan PS-DAP memungkinkan terjadinya peningkatan jumlah  $\alpha$ -amilase yang teradsorpsi oleh ligan. Selain mengurangi retensi ion  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Cu}^{2+}$ , juga secara umum menurunkan selektivitas dan adsorpsi maksimum  $\alpha$ -amilase pada permukaan PS-DAP.

Perlu penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan ion yang mampu mengurangi retensi  $\alpha$ -amilase lebih besar pada permukaan PS-DAP namun mampu meningkatkan *recovery* dan selektivitas  $\alpha$ -amilase oleh ligan melalui peningkatan parameter adsorpsi,  $q_m$  dan  $K_A$ .

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Politeknik Negeri Bandung melalui UPPM yang telah membiayai penelitian ini yang bersumber dari DIPA Politeknik Negeri Bandung sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Kegiatan Penelitian Mandiri No. 598.10/PL1.R7/LT/2016.

### DAFTAR PUSTAKA

Bradford, M. 1976. "Rapid and Sensitive Method for The

Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing The Principle Dye Binding", *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.

Gangadharan, D.; K.M. Nampoothiri; S. Sivarama krishnan, dan Ashok Pandey. 2008. "Biochemical Characterization of Raw-Starch-Digesting Alpha Amylase Purified from *Bacillus Amyloliquefaciens*", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 158, 3, 653–662.

Lia, Zhu; XuguoDuana dan Jing Wua. 2016. "Improving The Thermostability and Enhancing The  $\text{Ca}^{2+}$  Binding of Themalto hexaose-Forming  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus Stearothermophilus*", *Journal of Biotechnology*, 222, 65–72.

Pakiman, N.; N. H. Isa, ; Abol Hassan, M.A.; J.K. Walter, dan N. Abdullah. 2012. "Comparison of Binding Capacity and Affinity of Monoclonal Antibody Towards Different Affinity Resin Using High-Throughput Chromatography Methods", *Journal of Applied Sciences*, 12, 11, 1136–1141.

Widarti, Sri, Z. Nurrachman; M. Amran; Buchari B. 2014. "Diaminoalkane as Spacer Arm between Polystyrene and B-Cyclodextrin in Affinity Chromatography for A-Amylase Separation", *International Journal of Engineering Research and Application*, 4, 2, 709-714.