

Artikel Review: Produksi dan Aplikasi α -Amilase Bakteri Psikrofilik di Bidang Pangan

Reni Nurjasmi, Sarah Aprilia, Riki Ruhimat, Rifki Rahmatullah

Program Studi Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Institut Pertanian Bogor, Bogor, Jawa Barat
Email: reni_nurjasmi@yahoo.co.id

Abstrak

Pada lingkungan ekstrem yang memiliki suhu rendah seperti samudera Arktik, Antartika dan danau glasial telah banyak ditemukan bakteri psikrofilik. Beberapa bakteri memiliki enzim hidrolitik α -amilase yang berperan menghidrolisis amilum menjadi gula sederhana seperti maltosa, maltotriosa, dan glukosa. Struktur α -amilase psikrofilik sangat fleksibel akibat pengurangan interaksi hidrofobik dan peningkatan residu hidrofilik. Struktur unik ini menyebabkan enzim optimal pada suhu rendah yaitu 0-20°C. Enzim berkualitas tinggi dapat diperoleh melalui tahapan produksi yang dilakukan secara terpadu, meliputi isolasi bakteri psikrofilik, fermentasi pada suhu rendah, dan pemurnian secara bertahap. Teknik *Response Surface Methodology* sering digunakan untuk memperoleh produksi enzim yang tinggi namun ekonomis. Enzim yang telah diisolasi dari bakteri psikrofilik dimurnikan melalui proses pengendapan menggunakan ammonium sulfat, dialisis, serta berbagai teknik kromatografi yang dilakukan secara bertahap untuk mendapatkan enzim murni yang siap dikarakterisasi. Karakterisasi biokimia menunjukkan aktivitas enzim yang tinggi pada suhu rendah, kisaran pH 6,5-8,0 dan sangat bergantung pada ion kalsium untuk menjaga struktur tetap stabil. Analisis kinetika mengungkapkan α -amilase psikrofilik memiliki nilai Michaelis constant (K_m) rendah, mengindikasikan nilai afinitas tinggi sehingga dapat bekerja optimal dengan ketersediaan substrat terbatas. Keunggulan tersebut banyak dimanfaatkan dalam berbagai bidang tidak terkecuali industri pengolahan pangan, seperti produksi sirup, bakeri, minuman fermentasi, dan pengolahan makanan beku. Kemampuan α -amilase beradaptasi pada suhu rendah merupakan keuntungan dalam industri pengolahan pangan karena dapat menghemat energi sehingga berdampak pada biaya produksi yang lebih rendah. Pemanfaatan α -amilase psikrofilik juga menjadi solusi untuk mewujudkan industri pengolahan pangan yang ramah lingkungan.

Kata kunci: Amilum, Bakteri psikrofilik, α -amilase, Pengolahan pangan

Abstract

Psychrophilic bacteria have been widely found in extreme low-temperature environments such as the Arctic and Antarctic oceans and glacial lakes. Some of these bacteria possess the hydrolytic enzyme α -amylase, which functions to hydrolyze starch into simple sugars such as maltose, maltotriose, and glucose. The structure of psychrophilic α -amylase is highly flexible due to reduced hydrophobic interactions and an increased number of hydrophilic residues. This unique structure allows the enzyme to function optimally at low temperatures, specifically 0–20 °C. High-quality enzymes can be obtained through integrated production stages, including the isolation of psychrophilic bacteria, low-temperature fermentation, and stepwise purification. Response Surface Methodology is often employed to achieve high yet economical enzyme yields. The enzyme isolated from psychrophilic bacteria is purified through ammonium sulfate precipitation, dialysis, and several chromatographic techniques performed sequentially to obtain a pure enzyme ready for characterization. Biochemical characterization reveals high enzyme activity at low temperatures, an optimal pH range of 6.5–8.0, and a strong dependence on calcium ions to maintain structural stability. Kinetic analysis shows that psychrophilic α -amylase has a low Michaelis constant (K_m), indicating high substrate affinity that enables optimal performance even when substrate availability is limited. These advantages are widely

<https://ejournal.urindo.ac.id/index.php/pertanian>

Article History :

utilized in various fields, particularly the food-processing industry, such as syrup production, baking, fermented beverages, and frozen-food processing. The ability of α -amylase to function at low temperatures provides significant benefits for food processing because it reduces energy requirements, thereby lowering production costs. The application of psychrophilic α -amylase also offers a promising solution for achieving environmentally friendly food-processing industries.

Keywords: Starch, Psychrophilic bacteria, α -amylase, Food processing

PENDAHULUAN

Amilase merupakan grup enzim hidrolitik yang berperan memecah amilum dan polisakarida menjadi gula sederhana seperti maltosa, maltotriosa, dan glukosa. Amilase termasuk dalam kelompok glikosil-hidrolase yang berperan penting dalam metabolisme karbohidrat. Dalam industri pangan, enzim ini dimanfaatkan untuk memodifikasi viskositas bahan berbasis amilum, membuat sirup glukosa, meningkatkan proses fermentasi, dan mengembangkan tekstur serta cita rasa produk olahan [1].

Amilase dikelompokkan menjadi tiga kelompok besar yaitu α -amilase, β -amilase, dan γ -amilase. Peran masing-masing adalah memecah ikatan α -1,4-glikosidik di dalam rantai amilum, melepaskan maltosa dari ujung non-pereduksi, serta menghidrolisis ikatan α -1,4 dan α -1,6 dengan produk akhir glukosa. Namun, α -amilase merupakan enzim yang paling banyak digunakan dalam industri pangan karena bisa menggunakan amilum dari berbagai sumber serta proses hidrolisis efektif dan efisien serta stabil [2].

Mikroorganisme banyak digunakan sebagai penghasil α -amilase karena mudah dilakukan pengendalian dan peningkatan proses produksinya serta bisa dimodifikasi

secara genetik untuk mengoptimalkan produktivitas dan stabilitas enzim, antara lain adalah bakteri psikrofilik. Bakteri ini mampu tumbuh optimal pada suhu lingkungan 0-15°C, seperti laut kutub, es glasial, sedimen dasar laut dingin, serta ekosistem kriosfer lainnya [3].

Kemampuan bakteri psikrofilik hidup pada lingkungan bersuhu rendah karena menghasilkan enzim yang memiliki struktur sangat fleksibel dan energi aktivasi yang rendah. Kemampuan ini menyebabkan bakteri tetap aktif pada suhu dingin. α -amilase yang diisolasi dari bakteri psikrofilik memiliki aktivitas katalitik yang berpengaruh nyata terhadap suhu rendah dibandingkan enzim non psikrofilik, sehingga enzim ini bersifat labil pada suhu tinggi. Sifat ini justru sangat menguntungkan dalam pengolahan pangan karena kualitas produk seperti nutrisi, warna, dan aroma tidak akan mengalami kerusakan selama proses menggunakan suhu rendah serta bermanfaat untuk mengontrol proses agar terhindar dari hidrolisis yang berlebihan [4].

Dalam rangka mewujudkan ketersediaan pangan yang efektif dan efisien dibutuhkan industri pangan berteknologi minim energi, keberlanjutan dan mampu menjaga kualitas produk secara stabil. Hal ini dapat dicapai,

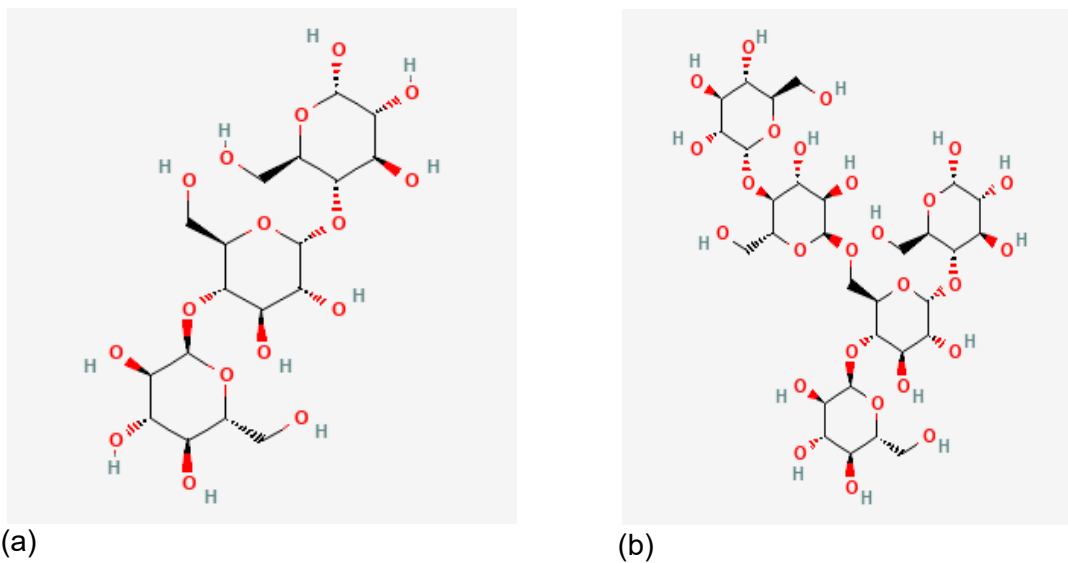
salah satunya dengan memanfaatkan α -amilase bakteri psikrofilik. Pemanfaatan α -amilase yang berasal dari bakteri ini bisa dikembangkan sebagai salah satu arah riset dan aplikasi bioteknologi yang sangat penting seperti pengolahan amilum, fermentasi berbasis suhu rendah, produksi makanan beku, serta pengembangan oligosakarida fungsional, sehingga dapat menjadi salah satu unggulan dalam inovasi bioproses modern.

AMILUM

Bakteri psikrofilik merupakan mikrob yang hidup dan berfungsi optimal pada suhu rendah, dan dapat menghasilkan utama enzim cold-active seperti α -amilase psikofilik yang memecah ikatan α -1,4 glikosidik pada pati [5]. Enzim ini menunjukkan aktivitas katalitik yang tinggi pada temperatur rendah sehingga menarik untuk aplikasi bioteknologi yang membutuhkan proses pada suhu dingin. Cold-active α -amilase diisolasi baik dari lingkungan laut dingin maupun lingkungan darat beku dan dipelajari untuk pemanfaatan industri karena kemampuan katalitiknya pada suhu yang menekan aktivitas enzim mesofilik [6]. Enzim-enzim ini memiliki potensi besar dalam industri pangan karena kemampuannya untuk memproses bahan pada kondisi suhu rendah, yang tidak hanya menghemat energi tetapi juga menjaga kualitas komponen pangan yang sensitif terhadap panas.

Amilum adalah substrat utama dari enzim α -amilase yang diketahui bergantung pada ion

Cl^- (klorida). Amilum disintesis secara alami oleh tumbuhan sebagai sumber energi dan cadangan makanan. Bahan baku industri pangan banyak menghasilkan pati atau amilum, seperti jagung, gandum, padi, dan kentang dengan variasi dan komposisi amilum yang berbeda. Amilum terusun atas rantai polisakarida α -glukan, yaitu amilosa (25-28%) dan amilopektin (72-75%) [7]. Amilosa adalah polimer glukosa tidak larut air yang membentuk rantai lurus dengan ikatan α -1,4-glikosidik, sementara amilopektin adalah polisakarida larut air dengan rantai bercabang yang dihubungkan ikatan α -1,4 dan α -1,6-glikosidik (Gambar 1). Perbandingan ini sangat krusial karena enzim α -amilase (EC 3.2.1.1) secara spesifik menyerang ikatan α -1,4-glikosidik di bagian dalam rantai. Akibatnya, struktur linear amilosa membuatnya lebih rentan terhadap hidrolisis cepat menjadi maltosa dan oligosakarida sederhana. Sebaliknya, struktur yang sangat bercabang pada amilopektin menghambat proses hidrolisis lengkap karena α -amilase tidak dapat memutus ikatan α -1,6, sehingga menghasilkan campuran dekstrin rantai pendek dan α -limit dekstrin. Dalam proses produksi enzim, bakteri psikrofilik sering dikultivasi dalam media yang kaya amilum, dimana komposisi amilosa/amilopektin ini dapat mempengaruhi efisiensi induksi sintesis α -amilase.



Gambar 1 Struktur 2-dimensi amilosa CAS:9005-82-7 (a), dan amilopektin CAS:9037-22-3 (b)

α -AMILASE BAKTERI PSIKROFIK

Alpha-amilase dari bakteri psikrofilik merupakan enzim ekstraseluler yang telah berevolusi untuk berfungsi optimal pada suhu rendah, biasanya antara 0-20°C, dengan aktivitas maksimum yang sering kali turun drastis di atas 30°C. Adaptasi katalitik ini dipengaruhi oleh struktur molekulnya yang unik. Dibandingkan dengan homolognya dari mesofil atau termofil, alpha-amilase psikrofilik umumnya memiliki komposisi asam amino yang lebih fleksibel. alpha-amilase psikrofilik memiliki kandungan residu asam amino seperti serin dan treonin yang lebih tinggi, serta residu asam amino alifatik yang lebih rendah dibandingkan dengan enzim mesofil. Fakta ini mendukung fleksibilitas struktur enzim untuk berfungsi optimal di suhu rendah karena peningkatan asam amino hidrofilik dan reduksi interaksi hidrofobik intramolekul [8].

Konformasi ini mengurangi jumlah interaksi hidrofobik intramolekul dan ikatan non-kovalens lainnya, sehingga menjaga domain katalitik dalam keadaan "lemas" yang memungkinkan gerak molekul yang cukup untuk katalisis efektif bahkan pada energi kinetik rendah di lingkungan dingin.

Fleksibilitas looping permukaan pada alpha-amilase psikrofilik lebih tinggi dibandingkan homolog mesofiliknya, yang menjadi kunci adaptasi katalitik pada suhu rendah dengan menjaga domain katalitik tetap aktif meski pada energi kinetik rendah [9]. Bagian *trade-off* dari fleksibilitas ini adalah stabilitas termal yang rendah, karena struktur yang longgar lebih mudah terdenaturasi ketika energi panas meningkat [10]. Sisi aktifnya, yang mengandung triad katalitik aspartat dan glutamat, tetap terpelihara, tetapi lingkungan sekitarnya yang lebih polar memungkinkan

akses dan pergantian substrat yang efisien pada suhu rendah, menjadikannya katalis yang sempurna untuk lingkungan dingin.

Bakteri penghasil alpha-amilase psikrofilik dapat diisolasi dari berbagai relung ekologis yang secara permanen dingin, seperti samudera Arktik dan Antartika, danau glasial, lapisan es abadi (permafrost), serta lingkungan buatan manusia seperti ruang pendingin [1, 11]. Genus bakteri seperti *Pseudoditeromonas*, *Alteromonas*, *Flavobacterium*, dan beberapa spesies *Bacillus* psikrotoleran dikenal sebagai produsen enzim ini yang potensial. Produksi enzim secara ekonomis memerlukan strategi kultivasi yang cermat. Fermentasi submerged (SmF) pada suhu rendah (10-15°C) dengan pengadukan yang optimal untuk menjaga aerasi sering digunakan. Sumber karbon seperti pati dari limbah industri makanan atau tepung ikan, yang mudah tersedia di daerah beriklim dingin, dapat dimanfaatkan sebagai substrat induk untuk menginduksi sintesis enzim. Pendekatan Fermentasi Substrat Padat (SSF) menggunakan limbah pertanian juga sedang dieksplorasi. Fakta yang menarik bahwa tekanan osmotik tinggi dan kadar ion logam tertentu di lingkungan aslinya sering kali

berarti bahwa produksi alpha-amilase ini dapat dioptimalkan dengan penambahan NaCl atau ion kalsium dalam media fermentasi, yang bertindak sebagai stabilisator enzim sekaligus induser fisiologis.

PRODUKSI α -AMILASE

Produksi alpha-amilase dari bakteri sangat bergantung pada optimasi kondisi kultivasi untuk mencapai hasil yang maksimal secara ekonomis. Proses ini umumnya dilakukan melalui fermentasi tersubmersi dalam bioreaktor, di mana parameter kunci seperti suhu, pH, komposisi media, dan kecepatan pengadukan dikontrol secara ketat. Bakteri penghasil amilase, seperti genus *Bacillus*, *Geobacillus*, dan *Pseudomonas*, memerlukan sumber karbon yang murah dan berkelimpahan seperti pati dari limbah pertanian contohnya kulit pisang, onggok singkong atau bekatul sebagai substrat utama dan induser sintesis enzim α -amilase [12, 13]. Sumber nitrogen organik seperti pepton, ekstrak ragi, atau limbah industri makanan contohnya tepung ikan juga penting untuk mendukung pertumbuhan biomassa dan produksi enzim ekstraseluler α -amilase [14].

Tabel 1. Media produksi enzim α -amilase

No.	Media Produksi	Sumber Referensi
1	Dedak gandum, kulit kentang	[14]
2	Butiran alginat diimobilisasi	[35]
3	Pati, ekstrak yeast, CaCl ₂	[36]
4	Limbah agro-industri dalam fermentasi terendam	[37]

5	Tongkol jagung, dedak padi, dedak gandum	[14]
6	Ekstrak yeast dan pepton	[36]
7	Tepung singkong, dedak padi, dan CMC	[38]
8	Tepung pati	[39]
9	Media Pepton Starch	[40]

Optimasi melalui desain eksperimen, seperti Response Surface Methodology (RSM), sering digunakan untuk menentukan kondisi terbaik yang memungkinkan interaksi sinergis antara berbagai faktor [15]. Sebagai contoh, produksi enzim dapat dipacu pada suhu 35-50°C dan pH netral hingga sedikit basa yaitu 6,0-7,5 untuk bakteri mesofil [16], sedangkan bakteri termofilik memerlukan suhu lebih tinggi yaitu 50-70°C [17]. Aerasi dan agitasi yang adequate juga krusial untuk memastikan transfer oksigen dan pencampuran nutrisi yang homogen, yang pada akhirnya mendukung sekresi enzim secara maksimal ke dalam medium fermentasi.

Inovasi dalam strategi produksi alpha-amilase terus dikembangkan untuk meningkatkan hasil dan efisiensi ekonomi. Fermentasi substrat padat semakin banyak dipilih karena menawarkan keunggulan simulasi habitat alami mikroba, konsentrasi enzim tinggi, penggunaan air dan energi rendah, serta pemanfaatan limbah lignoselulosa seperti sekam padi, dedak gandum, dan ampas tebu sebagai substrat sekaligus pendukung fisik. Pendekatan lain yang menjanjikan adalah rekayasa metabolik dan genetika pada strain bakteri untuk menciptakan galur super yang mampu

mengekspresikan alpha-amilase secara berlebihan [18]. Teknik ini meliputi kloning gen amilase ke dalam vektor ekspresi yang kuat dan transformasinya ke dalam sel inang seperti *Bacillus subtilis* atau *Escherichia coli* yang umumnya diakui aman.

Strategi imobilisasi sel dan enzim dalam berbagai matriks juga diterapkan untuk memungkinkan penggunaan berulang katalis biologis dalam reaktor kontinu, sehingga menurunkan biaya katalis per siklus produksi. Integrasi proses *downstream* seperti ultrafiltrasi dan kromatografi afinitas yang lebih efisien juga turut berkontribusi pada perolehan enzim murni dengan aktivitas spesifik tinggi, yang siap untuk aplikasi industri lebih lanjut.

PURIFIKASI α -AMILASE

Pengambilan sampel, isolasi, dan kultur bakteri psikrofilik. Sumber isolat amilolitik psikrofilik berasal dari lingkungan dingin seperti samudera Arktik dan Antartika, danau glasial, lapisan es abadi, lingkungan buatan manusia seperti ruang pendingin, dan limbah industri dingin [1]. Prosedurnya dimulai dengan pengambilan sampel dilokasi yang ditentukan, inokulasi pada medium selektif yang mengandung substrat pati, dan inkubasi pada suhu rendah yang sesuai dengan sifat

isolat amilolitik psikrofilik umumnya pada rentang suhu 0–15°C. Koloni yang menghasilkan zona klarifikasi pada medium pati dipilih sebagai produsen α -amilase ekstraseluler sementara enzim intraseluler biasanya dilakukan pemecahan sel setelah biomassa tumbuh [19].

Produksi enzim α -amilase dan ekstraksi. Setelah isolat terpilih, produksi enzim dilakukan pada kultur cair dengan medium kaya sumber karbon dan nutrisi pendukung. Kultur dijalankan pada suhu rendah optimal produksi 0–15 °C untuk enzim sangat dingin. Enzim ekstraseluler bisa langsung dikonsentrasikan untuk supernatan kultur sedangkan enzim intraseluler dilakukan pemanenan biomassa kemudian diberi perlakuan sonikasi > 20 kHz atau ekstraksi secara mekanik atau enzimatik agar enzim terpisah. Optimalisasi kondisi nutrisi dan waktu fermentasi panen dilakukan untuk mendapatkan nilai produksi [20, 2].

Langkah pemurnian dipakai adalah metode purifikasi konvensional mencakup presipitasi ammonium sulfat untuk mengkonsentrasikan dan menghilangkan protein larut yang tidak diinginkan, dilanjutkan dialisis untuk menghilangkan garam. Tahapan kromatografi pertukaran ion diterapkan untuk memisahkan berdasarkan muatan, diikuti kromatografi filtrasi gel menggunakan Sephadex G-100 atau Superdex untuk pemisahan berat ukuran molekul. Kromatografi afinitas khusus digunakan saat ligan tersedia untuk α -amilase. Kombinasi

teknik ini efektif untuk memperoleh enzim dengan spesifisitas tinggi yang cocok untuk aplikasi pangan [2].

Analisis aktivitas amilase diukur dengan metode pengurangan gula pereduksi DNS atau dengan substrat berlabel sehingga menghasilkan sinyal kuantitatif satuan aktivitas (U) ditentukan sebagai μmol gula per menit pada kondisi standar. Selanjutnya, dilakukan pemantauan pemurnian spesifisitas enzim (U/mg protein), pemulihan (%) dan purifikasi lipatan [21].

KARAKTERISASI α -AMILASE

Cold-active α -amilase memiliki sejumlah karakteristik unik yang menjadikannya sangat menarik untuk aplikasi industri, terutama di bidang pangan. α -Amilase yang dihasilkan oleh bakteri psikrofilik umumnya memiliki energi aktivasi rendah dan aktivitas relatif tinggi pada suhu rendah, yang dikaitkan dengan peningkatan fleksibilitas lokal di daerah situs aktif, namun fleksibilitas ini sering kali berbanding terbalik dengan stabilitas konformasional, menjadikannya lebih sensitif terhadap panas dibandingkan amilase mesofilik atau termofilik [22, 23, 1]. Berdasarkan penelitian [24], dua isolat bakteri yang diisolasi dari Antartik, yaitu *Arthrobacter* sp. (isolat 226) dan *Carnobacterium iners* (isolat 227), menunjukkan aktivitas α -amilase yang optimal pada suhu rendah, yaitu 20°C. Aktivitas enzim ini menurun secara signifikan pada suhu di atas 25°C, menunjukkan sifat termolabil yang khas pada enzim psikrofilik.

Enzim menunjukkan aktivitas signifikan pada suhu dekat 0–20°C sehingga memungkinkan reaksi enzimatik tanpa pemanasan intensif. Karakteristik ini menjadi keunggulan utama dalam aplikasi industri pangan yang membutuhkan pengolahan pada suhu rendah. Fleksibilitas di situs aktif menurunkan energi aktivasi dan meningkatkan laju reaksi pada suhu rendah. Adaptasi struktural ini merupakan hasil evolusi mikroorganisme psikrofilik terhadap lingkungan dingin mereka. Banyak amilase psikrofilik kehilangan aktivitas pada suhu > 40°C, menandakan stabilitas termal yang rendah [1].

Karakteristik lain yang menonjol adalah stabilitas enzim dalam kondisi salinitas tinggi. A-amilase dari *Halomonas sp.* KS41843 yang diisolasi dari Antartika dapat mempertahankan hingga 95% aktivitasnya pada kadar NaCl 4 M, menandakan potensinya sebagai enzim amilase cold-active dan halofilik [25]. Enzim α -amilase dari *Bacillus sp.* dsh19-1 (AmyD-1) menunjukkan aktivitas optimum pada suhu 20°C dan pH 6,0, dengan kemampuan mempertahankan 35,7% aktivitas pada suhu 4°C, serta toleransi garam yang ekstrem dengan aktivitas maksimal pada 2,0 M NaCl [26]. Sifat halotoleran ini berpotensi diaplikasikan pada pengolahan produk pangan dengan kadar garam yang tinggi. Kondisi pH yang disenangi α -amilase berkisar pH 8, menunjukkan stabilitasnya pada kondisi alkali [20].

Aktivitas katalitik dan stabilitas struktural pada sejumlah α -amilase psikrofilik

sangat bergantung pada keberadaan ion-ion logam, terutama kalsium (Ca^{2+}). Ion Ca^{2+} berperan penting dalam menjaga integritas struktur tiga dimensi enzim, sehingga meningkatkan stabilitasnya terhadap denaturasi, bahkan pada suhu rendah [27]. Selain Ca^{2+} , ion logam lain seperti natrium (Na^+) dan kalium (K^+) dilaporkan dapat memiliki efek aktivasi pada enzim tertentu. Sebaliknya, ion logam berat seperti merkuri (Hg^{2+}) dan kadmium (Cd^{2+}) umumnya bersifat inhibitor kuat karena dapat berikatan dengan gugus sulfhidril (-SH) pada sisi aktif enzim, yang menyebabkan inaktivasi. Efek dari ion-ion logam ini tidak universal dan sangat bergantung pada sumber serta karakteristik molekular dari masing-masing α -amilase, di mana enzim dari genus bakteri yang berbeda dapat menunjukkan respons yang beragam terhadap ion logam yang sama [28]. Pemahaman tentang karakteristik ini menjadi krusial dalam industri pangan, keberadaan ion-ion alami dalam bahan baku atau yang sengaja ditambahkan seperti garam atau kalsium dapat secara signifikan memodulasi efisiensi enzim selama proses produksi makanan berbasis pati, seperti pembuatan sirup glukosa atau bir.

KRISTALISASI DAN STRUKTUR α -AMILASE

Kristalisasi α -amilase psikrofilik dilakukan dengan metode difusi uap antara *hanging-drop* atau *sitting-drop*, di mana tetesan protein dicampur dengan buffer kristalisasi dan dibiarkan mencapai kondisi supersaturasi terhadap reservoir untuk memicu

pembentukan kristal. Studi kristalografi awal pada α -amilase psikrofilik dari *Alteromonas* dan *Pseudoalteromonas* melaporkan bahwa kondisi optimal sangat bergantung pada homologi enzim dan sering memerlukan skrining kondisi komersial diikuti optimasi untuk memperoleh kristal difraksi-kualitas tinggi. Sampel α -amilase psikrofilik, homogenitas protein melalui presipitasi terkontrol, dialisis, dan kromatografi sebelum kristalisasi sering ditonjolkan sebagai langkah penting karena heterogenitas sampel menghambat pembentukan kisi kristal yang baik [22].

Penelitian pada α -amilase psikrofilik menunjukkan bahwa penambahan kofaktor seperti Ca^{2+} atau ligand acarbose atau acarviostatin ke larutan protein sering meningkatkan kemungkinan terbentuknya kristal yang memerangkap ligand dalam situs aktif, sehingga memudahkan pemetaan interaksi pengikatan untuk desain aplikasi pangan. Selain itu, karena enzim α -amilase psikrofilik cenderung lebih fleksibel, kondisi kristalisasi pada temperatur rendah dan penyesuaian laju evaporasi dari rasio antara drop dan reservoir menjadi parameter krusial yang dilaporkan berkali-kali dalam literatur kristalografi enzim psikrofilik [29].



Gambar 1. (a) Struktur α -amilase *Pseudoalteromonas haloplanctis* (RCSB PDB), (b) Celah situs aktif α -amilase *Pseudoalteromonas haloplanctis* terletak di ujung karboksil dari $(\beta/\alpha)_8$ -bareel. Residu katalitik ditunjukkan dalam warna putih dan residu aromatik yang diperkirakan berperan penting dalam pengikatan substrat dan atau inhibitor ditunjukkan dalam warna ungu [22]

Struktur tiga dimensi α -amilase psikrofilik yang pertama kali diselesaikan yaitu α -amilase dari *Alteromonas* atau *Pseudoalteromonas sp.* 1KXH menegaskan kerangka GH13 klasik

dengan domain A berupa $(\beta/\alpha)_8$ -barrel yang menampung residu katalitik, domain B sebagai sisipan loop untuk pengikatan substrat, dan domain C yang berkontribusi pada stabilitas

permukaan enzim. Analisis struktur kompleks enzim dan ligand pada enzim psikrofilik memperlihatkan bahwa residu katalitik dan subsitus pengikatan sangat konservatif, tetapi adaptasi dingin tercapai melalui perubahan pada permukaan yang meningkatkan fleksibilitas aktif pada suhu rendah merupakan fenomena yang dapat dijelaskan oleh studi kristalografi dan komparatif struktur [30].

Perspektif aplikasi pangan melihat struktur dengan level adaptasi dingin untuk menjelaskan kemampuan α -amilase psikrofilik mempertahankan aktivitas hidrosilasi pati pada suhu rendah. Kemampuan ini merupakan suatu keuntungan dalam proses pangan dingin seperti pembuatan jus dingin, pengolahan tepung dingin, atau *proofing* roti pada suhu rendah karena situs aktif yang fleksibel mempertahankan akses substrat tanpa pemanasan berlebih [31, 32]. Lebih jauh, pemahaman struktur memungkinkan rekayasa terarah seperti mutagenesis residu permukaan atau stabilisasi lokal untuk meningkatkan stabilitas formulasi pangan atau menyesuaikan spesifisitas substrat sesuai kebutuhan industri makanan merupakan pendekatan yang telah dicontohkan pada studi rekayasa α -amilase dingin [33].

APLIKASI α -AMILASE DI BIDANG PANGAN

Potensi pemanfaatan α -amilase dalam pengolahan pangan sangat besar karena karakteristiknya yang aktif pada suhu rendah, terutama hidrolisis pati yang menghasilkan gula sederhana tanpa melalui pemanasan,

sehingga kualitas nutrisi bahan makanan seperti produk tinggi protein dan vitamin tetap terjaga. Oleh karena itu, dalam produksi bahan pangan premium, enzim psikrofilik lebih efisien dibandingkan α -amilase mesofilik.

α -Amilase memiliki banyak aplikasi yang sangat penting bagi industri amilum. Selama proses likuefaksi amilum, α -amilase berperan penting dalam menghidrolisis amilum. Sirup glukosa dan fruktosa merupakan produk dari proses sakarifikasi amilum. Sirup fruktosa banyak digunakan dalam industri minuman sebagai pemanis buatan yang dapat dengan mudah dibentuk melalui isomerisasi sirup glukosa tinggi di bawah aksi enzim glukosa isomerase. Sementara dalam industri baking, α -amilase dimanfaatkan untuk menghidrolisis pati pada adonan roti menjadi dekstrin berukuran kecil. Kemudian ragi memfermentasi dekstrin tersebut yang menyebabkan viskositas adonan berkurang, sehingga laju fermentasi serta tekstur dan volume produk meningkat. Selain itu, rasa, kualitas pemanggangan, dan warna kerak roti juga menjadi lebih baik. Enzim ini akan meningkatkan retensi kelembutan roti serta memperpanjang masa simpan makanan karena berfungsi sebagai agen anti-staling. Konsentrasi α -amilase harus tetap terkontrol karena sedikit penggunaan berlebih dari enzim ini dapat menyebabkan rasa lengket pada roti. Untuk menghindari kelengketan ini, sebaiknya α -amilase digunakan bersama pullulanase yang secara spesifik berfungsi menghidrolisis

senyawa penyebab kelengketan pada roti setelah perlakuan dengan amilase.

α -amilase psikrofilik juga potensial dimanfaatkan dalam industri minuman fermentasi, salah satunya menguraikan amilum menjadi gula pada suhu rendah dalam pembuatan bir, kvass, atau minuman tradisional berbahan baku sereal. Karakteristik α -amilase psikrofilik yang mampu bekerja pada suhu rendah dapat menghindari produk dari kontaminasi mikroba yang umumnya tumbuh pada suhu hangat. Proses dingin juga dapat menghindari terbentuknya zat *off-flavor* akan mengurangi kualitas produk.

Penerapan α -amilase psikrofilik di bidang pangan lainnya adalah pengolahan makanan beku. Modifikasi amilum dalam matriks makanan beku dapat dilakukan tanpa proses pencairan. Metode ini menyebabkan enzim dapat mempertahankan struktur produk serta menjaga kualitas tekstur dan rasa. Selain itu, hidrolisis amilum pada suhu rendah dapat membantu mengurangi energi produksi karena tidak memerlukan pemanasan. Berbagai keunggulan yang dimiliki enzim ini berpotensi membuka peluang besar pemanfaatannya dalam pengolahan pangan minim energi, alami, dan berkualitas tinggi. Oleh karena itu, α -amilase psikrofilik dapat dipertimbangkan sebagai enzim utama dalam berbagai aplikasi pangan modern sebagai upaya mewujudkan bioteknologi ramah lingkungan.

KESIMPULAN

α -amilase yang berasal dari bakteri psikrofilik memiliki struktur unik yaitu sangat fleksibel dan memiliki interaksi intramolekul lemah. Karakteristik ini menyebabkan α -amilase psikrofilik mampu beradaptasi pada suhu rendah. Enzim yang berkualitas tinggi dapat diperoleh melalui berbagai tahapan produksi yang dilakukan secara terpadu, meliputi isolasi bakteri psikrofilik, fermentasi pada suhu rendah, dan pemurnian secara bertahap. Kemampuan α -amilase beradaptasi pada suhu rendah memberi keuntungan dalam industri pengolahan pangan karena tidak memerlukan pemanasan, sehingga lebih hemat energi. Oleh karena itu, pemanfaatan α -amilase psikrofilik bisa menjadi solusi untuk mewujudkan industri pangan yang ramah lingkungan.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Liu Y, Zhang N, Ma J, Zhou Y, Wei Q, Tian C, Fang Y, Zhong R, Chen G, Zhang S. Advances in cold-adapted enzymes derived from microorganisms. *Front. Microbiol.* 2023;14(1152847). doi: 10.3389/fmicb.2023.1152847. doi:10.3389/fmicb.2023.1152847.
- [2] Abo-Khmer AM, Ibrahim SA, Faten AM, Abd-El-Rahman, AM, Lamiaa AA. A promising microbial α -amylase production and purification: industrial potential and bioactivities. *Microbial Cell Factories.* 2023;22(141): 1-27.

- <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02139-6>.
- [3] Samanta A, Jana SC. Optimization of cold active amylase production by mesophilic *Bacillus cereus* RGUJS2023 under submerged fermentation. *Journal of Environmental Biology*. 2024;45(1):15-24. <http://doi.org/10.22438/jeb/45/1/MRN-5167>.
- [4] Qian YF, Jia YY, Jing X, Sheng PY. A mini-review on cold-adapted enzymes from psychrotrophic microorganisms in foods: Benefits and challenges. *Current Research in Biotechnology*. 2023;6 (100162): 1-12. DOI:10.1016/j.crbiot.2023.100162.
- [5] Sarmiento F, Bernbaum E, Brown J, Lennon J, Feary S. Managing cultural features and uses. Dalam: Worboys GL, Lockwood M, Kothari A, Feary S, Pulsford I, editor. *Protected Area Governance and Management*. Canberra (AU): ANU Press. 2015. hlm. 685-714.
- [6] Siddiqui A, Aman A, Irfan H, Zohra RR, Naheed S. Biodegradation of the hydrocarbon components of the contaminated soil by various *Bacillus* species. *Int. J. Biol. Biotech*. 2019;16(4):875-879. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20203230293>.
- [7] Mehta D, Satyanarayana T. Functional genomics of the extremophilic bacteria and archaea. Di dalam: Pandey A, Negi S, Soccol CR, editor. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier. 2017. hlm: 45-78.
- [8] Huang A, Lu F, Liu F. Discrimination of psychrophilic enzymes using machine learning algorithms with amino acid composition descriptor. *Front. Microbiol*. 2023;14(1130594). doi: 10.3389/fmicb.2023.1130594.
- [9] Sočan J, Purg M, Aqvist J. 2020. Computer simulations explain the anomalous temperature dependence of enzyme catalysis. *Nature Communications*. 2020;11(2891). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16341-2>.
- [10] Nowak KM5 burning questions about cold-active enzymes. *Current Opinion in Biotechnology*. 2024;(75)102801. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2023.102801>.
- [11] Sarma J, Sengupta A, Laskar MK, Sengupta S, Tenguria S, Kumar A. Microbial adaptations in extreme environmental conditions. In A. Kumar and S. Tenguria (Eds.), *Developments in applied microbiology and biotechnology: Bacterial survival in the hostile environment*. Academic Press. 2023. pp. 193-206. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91806-0.00007-2>.
- [12] Arifeen S, Jamil J, Sarwar A, Ullah N, Nelofer R, Aziz T, Alharbi M, Alasmari F, Alshammari A, Albekari TH. Biosynthesis and Optimization of amylase from *Bacillus* sp. isolated from soil

- samples using agro industrial waste as a substrate. *Appl Ecol Environ Res.* 2024;22(4):2927-2940. DOI: http://dx.doi.org/10.15666/aeer/2204_29272940.
- [13] Wakiah N, Fadillah UF, Sudirman S, Riskawati R. Storage stability analysis of crude amylase extract from banana peel by solid state fermentation. *Jurnal Biologi Tropis.* 2025;25(3):4239-4244. <https://doi.org/10.29303/jbt.v25i3.9855>.
- [14] Shahid F, Alam SS, Arooj A, Batool H. From waste to wealth: Efficient α -amylase production using agro-waste materials: A study on *Brevibacillus* isolates. *Novel Research in Microbiology Journal.* 2025;9(3): 166-177. <https://dx.doi.org/10.17582/journal.NR MJ/2025/9.3.166.177>.
- [15] Fatoki OA, Onilude AA, Ekanola YA, Akanbi CT. Optimisation of alpha-amylase inhibitor production in solid state fermentation. *Front. Pharmacol.* 2023;14(1073754). doi: 10.3389/fphar.2023.1073754
- [16] Wahyu SD, Rahmawati W. Pengaruh suhu terhadap produksi amilase dari bakteri sebagai bahan praktikum di laboratorium teknologi rekayasa pangan. *Jurnal Pengembangan Potensi Laboratorium.* 2024;3(1):30-34. <https://doi.org/10.25047/plp.v3i1.4490>.
- [17] Baharuddin M, Alfina N, Febryanti A, Azis F, Wahyuningsih W. Karakterisasi enzim amilase isolat bakteri R2M larva kumbang sagu dari Luwu Utara. *Chimica et Natura.* 2022;10(2):81-87. <https://doi.org/10.24198/cna.v10.n2.37334>.
- [18] Kholikov A, Nazirov ML, Vokhidov K, Kachan A, Anatoli NE, Makhsumkhanov A. Enhanced production of thermostable α -amylase in *Bacillus subtilis*. *J Appl Biotechnol Rep.* 2025;12(2):1642-1651. Doi: 10.30491/jabr.2025.487018.1803.
- [19] Bendtsen MK, Nowak JS, Paiva P, López Hernández M, Ferreira P, Pedersen JS, Bekker NS, Viezzi E, Bisiak F, Brodersen DE, Pedersen LH, Zervas A, Fernandes PA, Ramos MJ, Stougaard P, Thøgersen MS, Otzen DE. Cold-active starch-degrading enzymes from a cold and alkaline greenland environment: role of Ca²⁺ ions and conformational dynamics in psychrophilicity. *Biomolecules.* 2023;15(3): 415. doi: 10.3390/biom15030415.
- [20] Rathour, Rashmi, Tyagi, Bhawna, Thakur, Indu. Production and characterization of psychrophilic α -amylase from a psychrophilic bacterium, *Shewanella* sp. ISTPL2. *Amylase.* 2020. 10.1515/amylase-2020-0001.
- [21] Wang X, Kan G, Shi C, Xie Q, Ju Y, Wang R, Qiao Y, Ren X. 2019. Purification and characterization of a novel wild-type α -amylase from Antarctic sea ice bacterium *Pseudoalteromonas* sp. M175. *Protein Expression and Purification.* 2019;164(105444).

- <https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.06.004>.
- [22] Aghajari N, Haser R, Feller G, Gerday C. 1998, Crystal structures of the psychrophilic α -amylase from *Alteromonas haloplanctis* in its native form and complexed with an inhibitor. *Protein Science*. 1998; 7:564-572. <https://doi.org/10.1002/pro.5560070304>.
- [23] Chapadgaonkar SS, Das BB, Shourie A. Harnessing the untapped potential of cold-adapted enzymes. *Industrial Biotechnology*. 2024;20(6):257-267. doi:10.1089/ind.2024.0017.
- [24] Ottoni JR, Silva TR, de Olivia VM, Passarini MRZ. Characterization of amylase produced by cold-adapted bacteria from Antarctic samples. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2020;23:1-8. doi:10.1016/j.bcab.2019.101452.
- [25] Kim JA, Kim MJ, Yim JH, Rhee JS, Han SJ. Isolation and characterization of low-temperature and high-salinity amylase from *Halomonas* sp. KS41843. *Fermentation*. 2025;11(465):1-13. doi:10.3390/fermentation11080465.
- [26] Dou S, Chi N, Zhou X, Zhang Q, Pang F, Xiu Z. Molecular cloning, expression, and biochemical characterization of a novel cold-active α -amylase from *Bacillus* sp. dsh19-1. *Extremophiles*. 2018. 22:739-749. doi:10.1007/s00792-018-1034-7.
- [27] Cavicchioli R, Charlton T, Ertan H, Omar SM, Siddiqui KS, Williams TJ. Biotechnological uses of enzymes from psychrophiles. *Microbial Biotechnology*. 2011;4(4):449-460. doi:10.1111/j.1751-7915.2011.00258.x.
- [28] Kuddus M, Roohi, Saima, Ahmad IZ. Cold-active extracellular α -amylase production from novel bacteria *Microbacterium foliorum* GA2 and *Bacillus cereus* GA6 isolated from Gangotri glacier, Western Himalaya. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2011;10:151-159. doi:10.3923/biotech.2011.246.258.
- [29] Kuddus M, Roohi, Bano N, Sheik GB, Joseph B, Hamid B, Sindhu R, and Madhavan A. 2024. Cold-active microbial enzymes and their biotechnological applications. *Microb Biotechnol*. 17(4):e14467. doi: 10.1111/1751-7915.14467.
- [30] Huang X, Brown A. Discrimination of psychrophilic enzymes using machine learning algorithms with amino acid composition descriptor. *Frontiers in Microbiology*. 2023;14(1130594). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1130594>.
- [31] Hamid B, Bashir Z, Yatoo AM, Mohiddin F, Majeed N, Bansal M, Poczai P, Almalki WH, Sayyed RZ, Shati AA. Cold-active enzymes and their potential industrial applications-a review. *Molecules*. 2022;27(5885). <https://doi.org/10.3390/molecules27185885>.
- [32] Kapoor J, Nivethitha MJ, Krupa S. 2025. Unlocking cold secrets; psychrophiles and

- their benefits in food technology. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2025;16(2):315–324.
<https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232>.
- [33] Yang G, Yao H, Mozzicafreddo M, Ballarini P, Pucciarelli S, Miceli C. Rational engineering of a cold-adapted α -amylase from the antarctic ciliate *Euplotes focardii* for simultaneous improvement of thermostability and catalytic activity. Appl Environ Microbiol. 2017;83(e00449-17).
<https://doi.org/10.1128/AEM.00449-17>.
- [34] Farooq MA, Shaukat A, Ali H, Hafiz MT, Samaira M, Shumaila M. Biosynthesis and industrial applications of α -amylase: a review. Archives of Microbiology. 2021;203:1281–1292.
<https://doi.org/10.1007/s00203-020-02128-y>.
- [35] Mahmoudnia F. Comparison of the synthesis of the alpha-amylase enzyme by the native strain *Bacillus licheniformis* in immobilized and immersed cells. Iran J. Microbiol. 2024;16(6):827-834. doi: 10.18502/ijm.v16i6.17261.
- [36] Prajapati VS, Mehta VN, Patel SK. Media formulation using statistical methodology to enhance α -amylase production for green synthesis of Au-NPs by *Bacillus subtilis* VSP4 under solid-state fermentation. Front. Bioeng. Biotechnol. 2025;13:1569902. doi: 10.3389/fbioe.2025.1569902.
- [37] Saeed S, Shakir HA, Qazi JI. Statistical optimization of amylase production from *Bacillus amyloliquefaciens* using agro-industrial waste (mango peels) under submerged fermentation by response surface methodology. J. Microbiol Methods. 2025;237:(107208). doi: 10.1016/j.mimet.2025.107208.
- [38] Soeka YS, Rahmansyah M, Sulistiani. Optimasi enzim Alpha-Amilase dari *Bacillus amyloliquefaciens* O1 yang diinduksi substrat dedak padi dan karboksimetilselulosa. Indonesian Journal of Biology. 2015;11(2).
- [39] Rizqo ZA. Pengaruh jenis sumber karbon terhadap produksi enzim amilase oleh *Bacillus subtilis*. Undergraduate Thesis, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. 2024.
- [40] Pramitasari PD, Pujiyanto S, Suprihadi A. Aktivitas Inhibitor A-Amilase Isolat Khamir Endofit Dari Tumbuhan Brotowali (*Tinospora crispa* L.). Jurnal Akademika Biologi. 2017;6(3):7-84.