

PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM -AMILASE DARI *Rhizopus oligosporus* DENGAN PENAMBAHAN POLIETILEN GLIKOL (PEG) 6000

(Skripsi)

Oleh

Syathira Assegaf



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2017**

ABSTRACT

THE INCREASE OF STABILITY α -AMYLASE ENZYME FROM *Rhizopus oligosporus* BY THE ADDITION OF POLYETHYLENE GLYCOL (PEG) 6000

By

Syathira Assegaf

α -Amylase enzyme is an enzyme that has the activity of breaking down starch molecules and glycogen. This research was aimed to increase the stability of α -amylase enzyme from *Rhizopus oligosporus* with the addition of Polyethylene glycol 6000. To achieve this goal, the production and isolation of enzymes, purification of enzymes were done, including the deposition of enzyme with ammonium sulphate (fractionation), dialysis and characterization the enzyme before and after addition of Polyethylene glycol 6000.

The results showed that the specific activity of crude extract of α -amylase enzyme was 393.137 U/mg while the specific activity of fractionation purification enzyme was 890.35 U/mg and dialysis was 1861.89 U/mg. These results suggest that specific activity is increasing with enzyme purification. The purified enzyme have optimum pH 6.5 and optimum temperature is 55°C; $K_M = 24.0 \text{ mg mL}^{-1}$ and $V_{maks} = 0.433 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ substrat; $k_i = 0.0099 \text{ min}^{-1}$; $t_{1/2} = 70 \text{ min}$ and $G_i = 104.35 \text{ kJ/mol}$. The enzyme of PEG 6000 addition of 4%, 6%, and 10% have optimum pH 6.5 and optimum temperature is 55°C, K_M and V_{maks} were shown with following data: $K_M = 22.96 \text{ mg mL}^{-1}$ and $V_{maks} = 0.448 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ substrat; $k_i = 0.0094 \text{ min}^{-1}$; $t_{1/2} = 73.7 \text{ min}$ and $G_i = 104.49 \text{ kJ/mol}$. For PEG 6000 6% $K_M = 17.46 \text{ mg mL}^{-1}$ and $V_{maks} = 0.396 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ substrat; $k_i = 0.0087 \text{ min}^{-1}$; $t_{1/2} = 79.6 \text{ min}$ and $G_i = 104.70 \text{ kJ/mol}$. For PEG 6000 10% $K_M = 15.91 \text{ mg mL}^{-1}$ and $V_{maks} = 0.385 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ substrat; $k_i = 0.0080 \text{ min}^{-1}$; $t_{1/2} = 86.6 \text{ min}$ and $G_i = 104.93 \text{ kJ/mol}$. The addition of PEG 6000 to the α -amylase enzyme from *Rhizopus oligosporus* can increase the thermal stability based on decrease the k_i value, the increase on $t_{1/2}$ and G_i .

ABSTRAK

PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM α -AMILASE DARI *Rhizopus oligosporus* DENGAN PENAMBAHAN POLIETILEN GLIKOL (PEG) 6000

Oleh

Syathira Assegaf

Enzim α -amilase merupakan enzim yang mempunyai aktivitas memecah molekul pati dan glikogen. Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan kestabilan enzim α -amilase dari *Rhizopus oligosporus* dengan penambahan Polietilen glikol 6000. Untuk mencapai tujuan tersebut, dilakukan produksi dan isolasi enzim, pemurnian enzim meliputi pengendapan enzim dengan amonium sulfat (fraksinasi) dan dialisis serta karakterisasi enzim sebelum dan sesudah penambahan Polietilen glikol 6000.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas spesifik ekstrak kasar enzim α -amilase sebesar 393,137 U/mg sedangkan aktivitas spesifik enzim hasil pemurnian fraksinasi sebesar 890,35 U/mg dan dialisis sebesar 1861,89 U/mg. Hasil ini menunjukkan bahwa aktivitas spesifik semakin meningkat dengan pemurnian enzim. Enzim hasil pemurnian mempunyai pH optimum yaitu 6,5 dan suhu optimum 55°C; $K_M = 24,0 \text{ mg mL}^{-1}$ dan $V_{maks} = 0,433 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$ substrat ; $k_i = 0,0099 \text{ menit}^{-1}$; $t_{1/2} = 70 \text{ menit}$ dan $G_i = 104,35 \text{ kJ/mol}$. Enzim hasil penambahan PEG 6000 4%, 6%, dan 10% mempunyai pH optimum yaitu 6,5 dan suhu optimum 55°C nilai K_M dan V_{maks} berturut-turut yaitu $K_M = 22,96 \text{ mg mL}^{-1}$ dan $V_{maks} = 0,448 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$ substrat; $k_i = 0,0094 \text{ menit}^{-1}$; $t_{1/2} = 73,7 \text{ menit}$ dan $G_i = 104,49 \text{ kJ/mol}$. Untuk PEG 6000 6% $K_M = 17,46 \text{ mg mL}^{-1}$ dan $V_{maks} = 0,396 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$ substrat; $k_i = 0,0087 \text{ menit}^{-1}$; $t_{1/2} = 79,6 \text{ menit}$ dan $G_i = 104,70 \text{ kJ/mol}$. Untuk PEG 6000 10% $K_M = 15,91 \text{ mg mL}^{-1}$ dan $V_{maks} = 0,385 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$ substrat; $k_i = 0,0080 \text{ menit}^{-1}$; $t_{1/2} = 86,6 \text{ menit}$ dan $G_i = 104,93 \text{ kJ/mol}$. Penambahan PEG 6000 pada enzim α -amilase dari *Rhizopus oligosporus* dapat meningkatkan stabilitas termal yang dapat dilihat dari penurunan nilai k_i , peningkatan waktu paruh dan G_i .

PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM -AMILASE DARI *Rhizopus oligosporus* DENGAN PENAMBAHAN POLIETILEN GLIKOL (PEG) 6000

Oleh

SYATHIRA ASSEGAF

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar
SARJANA SAINS

Pada

Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2017**

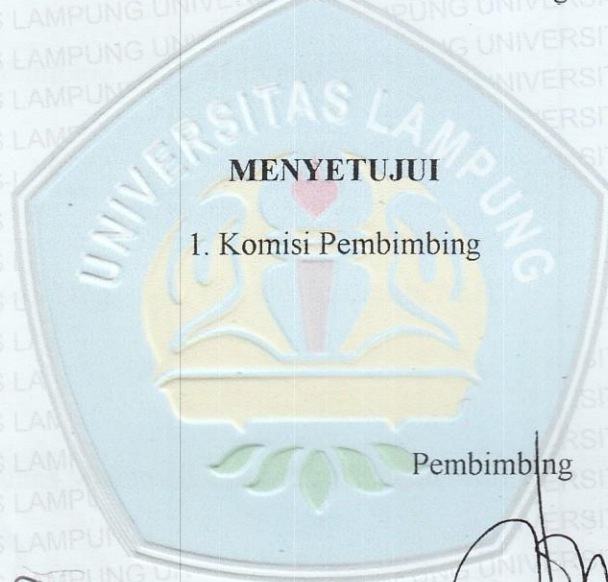
Judul Penelitian : **Peningkatan Kestabilan Enzim α -Amilase dari *Rhizopus oligosporus* dengan Penambahan Polietilen glikol (PEG) 6000**

Nama Mahasiswa : Syathira Assegaf

Nomor Pokok Mahasiswa : 1217011060

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



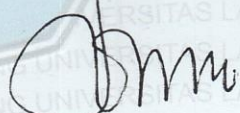
MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

Ketua Jurusan

Pembimbing

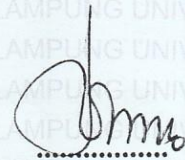

Dr. Supto Dwi Yuwono, M. T.
NIP 197407052000031001


Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S.
NIP 195609051992031001

MENGESAHKAN

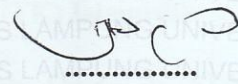
1. Tim Penguji

Ketua : **Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S.**




Penguji
Bukan Pembimbing

: **Mulyono, Ph.D.**



Penguji
Bukan Pembimbing

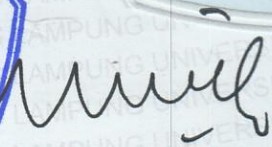
: **Dr. Nurhasanah, M.Si.**



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



(Prof. Warsito, S. Si., D.E.A., Ph. D
NIP 19710212 199512 1 001



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **09 Oktober 2017**

RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Bandar Lampung, pada tanggal 10 September 1994, sebagai anak pertama dari tiga bersaudara, putri dari bapak Ahmad Assegaf dan Mardhiah. Jenjang pendidikan diawali dari Taman Kanak-kanak (TK) Islamiyah Bandar Lampung, diselesaikan pada tahun 2000. Sekolah Dasar di SDS Islamiyah Bandar Lampung, diselesaikan pada tahun 2006. Sekolah Menengah Pertama di SMPN 3 Bandar Lampung diselesaikan pada tahun 2009, dan Sekolah Menengah Atas di SMAN 4 Bandar Lampung, diselesaikan pada tahun 2012. Tahun 2012, penulis terdaftar sebagai Mahasiswa Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung melalui jalur undangan dari SMAN 4 Bandar Lampung.

Penulis melakukan Praktek Kerja Lapangan dan Penelitian di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung. Sebelum melakukan Praktek Kerja Lapangan dan Penelitian, penulis melaksanakan KKN (Kuliah Kerja Nyata) di Tulang Bawang Desa Gunung Tapa Ilir selama 2 bulan. Selama menjadi mahasiswa penulis pernah menjadi asisten praktikum Biokimia untuk mahasiswa jurusan Teknik Hasil Pertanian (THP) dan jurusan Kimia angkatan 2014.

Penulis juga aktif di organisasi Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) FMIPA Unila sebagai Kader Muda Himaki (KAMI) periode 2012/2013 dan anggota Biro Kesekretariatan (Kestari) tahun 2014/2015.

MOTTO

Jadikanlah perjalanan Hidupmu Seperti Kau Berjalan Di Atas Pasir Yang Tidak Terdengar Suaranya, Namun Bekas Langkahnya Sangatlah Jelas.

(Habib Abu Bakar Bin Hasan Al-Attas Az-zabadi)

Ilmu itu bukan yang dihafal tetapi yang memberi manfaat

(Iman Syafi'i)

Learn From Yesterday, Live From Today, and Hope For Tomorrow

(Albert Einstein)

Dalam hidup, kita belajar lebih banyak dari kegagalan daripada kesuksesan,

Belajar dan Usaha adalah Kunci Kesuksesan

(Moorim School, Kai exo)

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

*Segala Puji dan Syukur kepada Allah SWT
Kupersembahkan Karya sederhanaku ini Kepada :*

*Kedua Orang tuaku,
Abi Ahmad Assegaf dan Umi Mardhiah yang telah memberikan
rasa kasih sayang, cinta, dan menjadi motivator utamaku.
Terima kasih sudah mendoakan dan selalu memberikan nasihat
serta mengarahkanku untuk menjadi lebih baik lagi.*

*Kedua adikku :
Zainab Zalfa Assegaf
Aminah Syania Assegaf*

Pembimbing Prof. Dr. Ir. Yandri, A.S, M.S.

*Keluarga besarku , teman dan sahabat yang selalu
menyemangatiku*

Guru-guru yang selalu membagi ilmunya untukku

*Almamater tercinta
Universitas Lampung*

SAN WACANA

Assalamualaikum. Wr. Wb

Alhamdulillah puji dan syukur kehadiran Allah S.W.T, serta sholawat dan salam selalu tercurah pada Nabi Muhammad Saw. Atas segala rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Peningkatan Kestabilan Enzim -amilase dari Rhizopus oligosporus dengan Penambahan Polietilen Glikol (PEG) 6000**” sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S. sebagai pembimbing 1 penelitian, yang telah memberikan ilmu pengetahuan, bimbingan, dukungan, dan arahan dalam proses penyusunan skripsi serta penelitian ini dari awal hingga akhir. Semoga Allah membalas kebaikan Bapak dengan sebaik-baiknya.
2. Mulyono, Ph.D. sebagai pembahas I skripsi, yang telah memberikan ilmu pengetahuan, bimbingan, koreksi, kritik dan saran dalam proses penyusunan skripsi ini dari awal hingga akhir. Semoga Allah membalas kebaikan bapak dengan sebaik baik-baiknya.

3. Dr. Nurhasanah, M.Si. sebagai pembahas II skripsi, yang telah memberikan ilmu pengetahuan, bimbingan, koreksi, kritik dan saran dalam proses penyusunan skripsi. Semoga Allah membalas kebaikan ibu dengan sebaik-baiknya.
4. Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, MT. Sebagai Ketua Jurusan Kimia FMIPA Unila
5. Prof. Warsito, S.Si., D.E.A., Ph.D., sebagai Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.
6. Prof. Dr. Sutopo Hadi, S.Si, M.Sc. sebagai wakil Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam dan pembimbing akademik.
7. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung atas seluruh ilmu yang diberikan.
8. Seluruh karyawan Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung Pak John selaku Laboran Biokimia, serta Pak Gani, atas seluruh bantuan yang diberikan kepada penulis.
9. Terima kasih untuk kedua orang tuaku, abi Ahmad Assegaf dan umi Mardhiah yang selalu memberikan nasihat, arahan, dan semangat selama kuliah ini serta memberikan cinta yang begitu besar dan kasih sayang yang sangat tulus. Terima kasih juga untuk kedua adikku Zalfa Assegaf dan Syania Assegaf, yang selama ini selalu memberikan keceriaan dan dukungan serta Fathan dan Zizi yang selalu membuat kesenangan di rumah. Terimah kasih untuk semua keluargaku yang selalu mendoakan dan mendukung.

10. Partner kerja laboratorium, Rizki Putriyana, Fifi Adriyanthi dan Diani.

Terima kasih sudah membantu dari awal sampai akhir penelitian.

11. Teman-teman Kimia 2012, yang selalu ada dalam setiap perkuliahan,

membantu, dan memberikan semangat. Adi, Adit, Ajeng, Ana, Arif,

Welda, Arya, Atma, Imani, Ningrum, Deby, Derry, Dewi, Dwi, Diani, Edi,

Eka, Elsa, Erlita, Fenti, Febita, Feby, Ferdinan, Fifi, Indah Wahyu, Indri,

Intan, Ismi, Jeje, Maul, Meta, Rijal, Nila, Dona, Radius, Riandra, Rifki,

Rio, Putri, Ruli, Ruwai, Aisyah, Sofian, Kamto, Dela, Imah, Susi, Tazkia,

Debo, Tiara, Tri, Ulfa, Wiwin, Yepi, Yunsi, dan Ubay. Semoga kalian

semua di mudahkan dalam karir, usaha, dan semua cita-cita dapat tercapai.

Terima kasih teman-teman Kimia 2012.

12. Adik-adik Biokimia 2013 yang selalu membantu selama di Laboratorium.

Fika, Mia, Sinta, Nia, Atun, Maya, Ezra, Monik, Vina, Tyas, Melia, Riyan,

Shelta, dan Yuni.

13. Mba Putri Amalia yang selalu banyak membantu dan memberikan ilmu

nya. Terima kasih mba Putri, semoga selalu sukses dalam karir dan

usahanya.

14. Sahabat ku. Sinta, Ria, Vani serta teman-teman KKN Tulang Bawang

yang selalu memberikan dukungan. Rita, Sisil, Uswatun, Vita, Rendi dan

Rio, terima kasih semuanya.

Bandar Lampung, Oktober 2017

Penulis

Syathira Assegaf

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR	vi
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Tujuan Penelitian	3
C. Manfaat Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Enzim	5
B. Enzim -amilase	14
C. <i>Rhizopus oligosporus</i>	15
D. Isolasi dan Pemurnian Enzim	16
1) Sentrifugasi	17
2) Fraksinasi dengan amonium sulfat	18
3) Dialisis	19
4) Pengujian aktivitas -amilase dengan Metode Fuwa	20
5) Penentuan kadar protein dengan Metode Lowry	21
6) Pengujian aktivitas -amilase dengan Metode Mandels	22
E. Stabilitas Enzim	22
F. Kinetika Reaksi Enzim	23
G. Polietilen glikol (PEG)	24
III. METODOLOGI PENELITIAN	26
A. Tempat dan Waktu Penelitian	26
B. Alat dan Bahan	26
C. Prosedur Penelitian	27
1. Pembuatan Media Inokulum, Fermentasi, dan larutan Pereaksi	27
a. Pembuatan media inokulum dan fermentasi	27

b. Pembuatan pereaksi untuk pengukuran aktivitas enzim -amilase Metode Fuwa.....	27
c. Pembuatan pereaksi untuk pengukuran kadar protein Metode Lowry	28
d. Pembuatan pereaksi untuk pengukuran aktivitas enzim -amilase Metode mandels	28
2. Produksi Enzim -amilase.....	28
3. Isolasi dan Pemurnian Enzim -amilase	29
a. Isolasi enzim -amilase	29
b. Pemurnian Enzim -amilase	29
1. Fraksinasi dengan amonium sulfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	29
2. Dialisis	31
4. Uji aktivitas Enzim -amilase	31
a. Metode Fuwa	31
b. Metode Mandels	32
c. Penentuan kadar protein Metode Lowry	33
5. Penambahan polietilen glikol 6000.....	33
6. Karakterisasi Enzim (Sebelum dan Setelah Penambahan Polietilen glikol 6000).....	33
a. Penentuan pH dan suhu optimum.....	33
1. Penentuan pH optimum.....	33
2. Penentuan suhu optimum.....	34
b. Penentuan data kinetika enzim (K_M dan V_{maks}).....	34
c. Uji stabilitas termal enzim.....	34
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	37
A. Produksi dan Isolasi enzim -amilase.....	37
B. Pemurnian enzim -amilase.....	38
1. Pengendapan dengan amonium sulfat.....	38
2. Dialisis	40
C. Karakterisasi enzim hasil pemurnian dan penambahan PEG 6000	41
1. Penentuan pH optimum enzim hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan PEG 6000.....	41
2. Penentuan suhu optimum enzim hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan PEG 6000.....	42
3. Penentuan K_M dan V_{maks} enzim hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan PEG 6000.....	43
4. Stabilitas termal enzim hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan PEG 6000.....	45
5. Perubahan konstanta laju inaktivasi (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan energi akibat denaturasi (G_i) enzim hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan PEG 6000.....	46
a. Konstanta laju inaktivasi dan waktu paruh	47
b. Perubahan energi akibat denaturasi (G_i)	47

V. SIMPULAN DAN SARAN	48
A. Simpulan	48
B. Saran.....	49

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Pemurnian enzim α -amilase dari <i>Rhizopus oligosporus</i>	40
2. Perubahan konstanta laju inaktivasi (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan energi akibat denaturasi (G_d) enzim hasil pemurnian dan sesudah penambahan PEG 6000	46
3. Hubungan antara tingkat kejenuhan amonium sulfat (0-90%) dengan aktivitas spesifik enzim amilase	54
4. Hubungan antara tingkat kejenuhan amonium sulfat (0-80%) dengan aktivitas spesifik enzim amilase	54
5. Hubungan antara pH dengan aktivitas unit enzim hasil pemurnian dan penambahan PEG 6000	55
6. Hubungan antara pH dengan aktivitas sisa enzim hasil pemurnian dan penambahan PEG 6000	55
7. Hubungan antara suhu dengan aktivitas unit enzim hasil pemurnian dan penambahan PEG 6000	56
8. Hubungan antara suhu dengan aktivitas sisa enzim hasil pemurnian dan penambahan PEG 6000	56
9. Data untuk penentuan K_M dan V_{maks} enzim hasil pemurnian berdasarkan persamaan <i>Lineweaver-Burk</i>	57
10. Data untuk penentuan K_M dan V_{maks} enzim hasil penambahan PEG 6000 4%, 6%, dan 10% berdasarkan persamaan <i>Lineweaver-Burk</i>	57
11. Hubungan aktivitas unit enzim hasil pemurnian dan penambahan PEG 6000 pada stabilitas termal	58
12. Hubungan aktivitas sisa enzim hasil pemurnian dan penambahan PEG 6000 pada stabilitas termal	58

13. Penentuan k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim hasil pemurnian pada suhu 55°C	59
14. Penentuan k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim hasil penambahan PEG 6000 4% pada suhu 55°C	59
15. Penentuan k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim hasil penambahan PEG 6000 6% pada suhu 55°C	59
16. Penentuan k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim hasil penambahan PEG 6000 10% pada suhu 55°C	60
17. Absorbansi glukosa pada berbagai konsentrasi untuk penentuan kurva standar glukosa	63
18. Absorbansi serum albumin sapi (BSA) pada berbagai konsentrasi untuk penentuan kurva standar protein	64

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Hubungan aktivitas enzim dengan suhu	8
2. Hubungan kecepatan reaksi dengan pH	9
3. Hubungan laju reaksi dengan konsentrasi enzim.....	9
4. Teori gembok kunci	12
5. Teori Induksi	13
6. Proses pengendapan protein.....	19
7. Proses pemisahan protein dengan dialisis.....	20
8. Skema proses fraksinasi dengan amonium sulfat	30
9. Diagram alir penelitian.....	36
10. Hubungan antara kejenuhan amonium sulfat (0-90%) dengan aktivitas spesifik enzim -amilase dari <i>Rhizopus oligosporus</i>	39
11. Hubungan antara kejenuhan amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan (0-30%) dan (30-80%) dengan aktivitas spesifik enzim -amilase dari <i>Rhizopus oligosporus</i>	39
12. pH optimum enzim hasil pemurnian dan penambahan PEG 6000 dengan konsentrasi 4%, 6%, dan 10%	41
13. Suhu optimum enzim hasil pemurnian dan penambahan PEG 6000 dengan konsentrasi 4%, 6%, dan 10%	42
14. Grafik <i>Lineweaver- Burk</i> enzim hasil pemurnian dan penambahan PEG 6000 dengan konsentrasi 4%, 6%, dan 10%.....	44

15. Grafik stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan penambahan PEG 6000 dengan konsentrasi 4%, 6%, dan 10%	45
16. Hubungan $\ln(E_i/E_0)$ enzim hasil pemurnian dan penambahan PEG 6000 untuk penentuan nilai k_i , $t_{1/2}$, dan G_i	61
17. Kurva standar Glukosa	63
18. Kurva standar Serum Albumin	64

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Pemanfaatan enzim sebagai biokatalisator dalam bidang industri telah berkembang pesat. Enzim telah banyak digunakan dalam bidang industri pangan, minuman, farmasi, kosmetik dan industri kimia lainnya. Pemanfaatan enzim dalam bidang industri harus memperhatikan faktor penting yang sangat mempengaruhi efisiensi dan efektivitas kerja enzim yang digunakan. Faktor yang mempengaruhi reaksi enzim antara lain konsentrasi enzim, suhu, pH, dan spesifitas enzim (Black, 2005).

Enzim merupakan protein yang berfungsi sebagai biokatalis dalam sel hidup. Enzim terdiri dari dua jenis yaitu intraseluler (di dalam sel) dan ekstraseluler (di luar sel). Enzim yang dihasilkan secara ekstraseluler memiliki kelebihan dibandingkan dengan enzim yang dihasilkan secara intraseluler, yaitu enzim ini dapat diperoleh dalam keadaan murni dengan cara pemisahan dan pemurnian yang tidak begitu rumit. Mikroorganisme memproduksi enzim untuk memecah substansi di dalam sel, salah satunya adalah amilase. Salah satu mikroorganisme yang menghasilkan enzim adalah jamur. Kemampuan jamur untuk menguraikan bermacam substrat yaitu untuk mengetahui jenis-jenis enzim yang dihasilkan

untuk dikembangkan pada skala industri. Saat ini penggunaan enzim pada skala industri di Indonesia semakin meningkat (Black, 2005).

Enzim amilase merupakan kelompok enzim yang sangat dibutuhkan dalam bidang industri, diantaranya industri tekstil, hidrolisis pati, bir, roti, sirup, pemanis buatan, etanol, dan detergen. Enzim ini bernilai komersial, maka perlu ditemukan sumber-sumber yang cukup banyak sebagai penghasil enzim amilase sesuai dengan karakteristik enzim amilase yang dibutuhkan. Enzim -amilase merupakan kelompok enzim yang mempunyai kemampuan untuk memutuskan ikatan glikosida yang terdapat pada amilum. Hasil hidrolisisnya berupa molekul-molekul yang lebih kecil seperti glukosa, maltosa dan dekstrin (Sutiamiharja, 2008).

Salah satu jamur yang dapat menghasilkan enzim -amilase adalah *Rhizopus oligosporus*. Enzim tersebut dihasilkan untuk memecah senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana, sehingga dapat diserap oleh sel dan dapat digunakan untuk pertumbuhan (Crueger dan Crueger, 1990).

Stabilitas enzim dapat diartikan sebagai kestabilan enzim selama penyimpanan dan penggunaan enzim tersebut, serta kestabilan terhadap senyawa yang bersifat merusak seperti pelarut tertentu (asam atau basa) oleh pengaruh suhu dan pH ekstrim (Wiseman, 1978).

Stabilitas enzim dipengaruhi oleh banyak faktor seperti suhu, pH, pelarut, kofaktor, dan adanya surfaktan (Eijnsink *et al.*, 2005). Kestabilan enzim sangat dipengaruhi oleh struktur dari enzim itu sendiri. Adanya gangguan pada struktur

enzim akan menyebabkan gangguan pada aktivitas dan kestabilan enzim (Ahern dan Klivanov, 1987).

Polietilen glikol (PEG) merupakan polimer dari etilen oksida dan dibuat menjadi bermacam-macam panjang rantainya. Polietilen glikol yang memiliki berat molekul rata-rata 200, 400, dan 600 berupa cairan bening tidak berwarna dan yang mempunyai berat molekul rata-rata lebih dari 1000 berupa lilin putih, padat dan kepadatannya bertambah dengan bertambahnya berat molekul. Macam-macam kombinasi dari polietilen glikol bisa digabung dengan cara melebur dengan memakai dua jenis atau lebih untuk memperoleh konsistensi basis yang diinginkan, dan sifat khasnya (Ansel, 1989).

B. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Untuk memperoleh enzim α -amilase dari *Rhizopus oligosporus* dengan tingkat kemurnian yang tinggi.
2. Memperoleh enzim α -amilase dari *Rhizopus oligosporus* dengan kestabilan yang tinggi melalui penambahan Polietilen glikol 6000.

\

C. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah :

1. Memberikan informasi tentang cara memurnikan enzim.
2. Memberikan informasi mengenai pengaruh penambahan Polietilen glikol 6000 terhadap stabilitas enzim α -amilase dari *Rhizopus oligosporus*.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Enzim

Enzim adalah sekelompok protein yang berperan sebagai pengkatalis dalam reaksi-reaksi biologis. Enzim dapat juga didefinisikan sebagai biokatalisator yang dihasilkan oleh jaringan yang berfungsi meningkatkan laju reaksi dalam jaringan itu sendiri. Semua enzim yang diketahui hingga kini hampir seluruhnya adalah protein. Berat molekul enzim pun sangat beraneka ragam, meliputi rentang yang sangat luas (Suhtanry dan Rubianty, 1985). Enzim digolongkan menurut reaksi yang diikutinya, sedangkan masing-masing enzim diberi nama menurut nama substratnya, misalnya urease, arginase dan lain-lain. Di samping itu ada pula beberapa enzim yang dikenal dengan nama lama misalnya pepsin, tripsin dan lain-lain.

Enzim dibagi dalam enam golongan (Poedjiadi, 1994):

1. Oksidoreduktase
2. Transferase
3. Hidrolase
4. Liase
5. Isomerase
6. Ligase

Dalam mempelajari mengenai enzim, dikenal beberapa istilah diantaranya holoenzim, apoenzim, kofaktor, gugus prostetik, koenzim, dan substrat. Apoenzim adalah suatu enzim yang seluruhnya terdiri dari protein, sedangkan holoenzim adalah enzim yang mengandung gugus protein dan gugus non protein. Gugus yang bukan protein dikenal dengan istilah kofaktor. Pada kofaktor ada yang terikat kuat pada protein dan sukar terurai dalam larutan yang disebut gugus prostetik dan adapula yang tidak terikat kuat pada protein sehingga mudah terurai yang disebut koenzim. Baik gugus prostetik maupun koenzim, keduanya merupakan bagian yang memungkinkan enzim bekerja pada substrat. Substrat merupakan zat-zat yang diubah atau direaksikan oleh enzim (Poedjiadi, 1994).

Enzim meningkatkan laju sehingga terbentuk kesetimbangan kimia antara produk dan pereaksi. Dalam keadaan fisiologi yang normal, suatu enzim tidak mempengaruhi jumlah produk dan pereaksi yang sebenarnya dicapai tanpa kehadiran enzim. Jadi, jika keadaan kesetimbangan tidak menguntungkan bagi pembentukan senyawa, enzim tidak dapat mengubahnya (Salisbury dan Ross, 1995).

Secara singkat, sifat-sifat dari enzim antara lain (Dwidjoseputro, 1992) :

1. Berfungsi sebagai biokatalisator
2. Merupakan suatu protein
3. Bersifat khusus atau spesifik
4. Merupakan suatu koloid
5. Tidak tahan panas

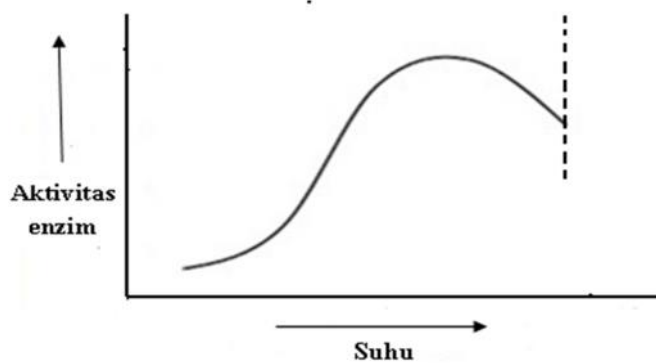
Fungsi enzim sebagai katalis untuk reaksi kimia dapat terjadi baik didalam maupun diluar sel. Suatu enzim bekerja secara khas terhadap suatu substrat tertentu. Suatu enzim dapat bekerja 10 kali lebih cepat dibandingkan laju reaksi tanpa katalis. Enzim bekerja sebagai katalis dengan cara menurunkan energi aktivasi, sehingga laju reaksi meningkat (Poedjiadi, 1994). Enzim-enzim hingga kini diketahui berupa molekul-molekul besar yang berat molekulnya ribuan. Karena enzim tersebut dilarutkan dalam air, maka akan menjadi suatu koloid. Beberapa enzim, diketahui memiliki kemampuan untuk mengubah substrat menjadi hasil akhir dan sebaliknya, yaitu mengubah kembali hasil akhir menjadi substrat jika kondisi lingkungan berubah. Contohnya adalah enzim-enzim dari golongan protease dan urase serta beberapa jenis enzim lainnya (Dwidjoseputro, 1992).

Suatu enzim hanya dapat bekerja spesifik pada suatu substrat untuk suatu perubahan tertentu. Misalnya, sukrase akan menguraikan rafinosa menjadi melibiosa dan fruktosa, sedangkan oleh emulsin, rafinosa tersebut akan terurai menjadi sukrosa dan galaktosa (Salisbury dan Ross, 1995). Seperti halnya katalisator, enzim juga dipengaruhi oleh temperatur. Hanya saja enzim ini tidak tahan panas seperti katalisator lainnya. Kebanyakan enzim akan menjadi non aktif pada suhu 50°C (Poedjiadi, 1994). Apabila suhu terlalu tinggi, struktur tiga dimensi enzim akan rusak, sehingga substrat tidak lagi dapat terikat dengannya. Dengan demikian enzim tersebut tidak akan dapat menjalankan fungsinya lagi sebagai biokatalisator (Salisbury dan Ross, 1995).

1. Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi fungsi enzim diantaranya adalah (Dwidjoseputro, 1992) :

1) Suhu

Enzim dapat mempercepat terjadinya reaksi kimia pada suatu sel hidup. Dalam batas-batas suhu tertentu, kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim akan meningkat seiring dengan naiknya suhu. Reaksi yang paling cepat terjadi pada suhu optimum (Rodwell, 1987). Suhu yang terlalu tinggi akan menyebabkan enzim terdenaturasi (Poedjiadi, 1994). Pada suhu 0°C, enzim menjadi tidak aktif dan dapat kembali aktif pada suhu normal (Lay dan Sugyo, 1992). Hubungan antara aktivitas enzim dengan suhu ditunjukkan dalam Gambar 1.

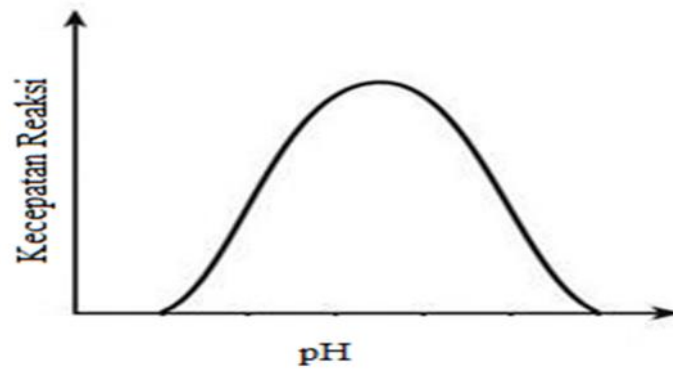


Gambar 1. Hubungan aktivitas enzim dengan suhu (Rodwell, 1987).

2) pH

Enzim pada umumnya bersifat amfolitik, yang berarti enzim mempunyai konstanta disosiasi pada gugus asam maupun gugus basanya, terutama gugus terminal karboksil dan gugus terminal amino. Perubahan

kereaktifan enzim diperkirakan merupakan akibat dari perubahan pH lingkungan (Winarno, 1986). Hubungan kecepatan reaksi dengan pH ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Hubungan kecepatan reaksi dengan pH (Winarno, 1986).

3) Konsentrasi enzim

Semakin tinggi konsentrasi enzim maka kecepatan reaksi akan meningkat hingga batas konsentrasi tertentu. Namun, hasil hidrolisis substrat akan konstan dengan naiknya konsentrasi enzim. Hal ini disebabkan penambahan enzim sudah tidak efektif lagi (Reed, 1975). Hubungan antara laju reaksi enzim dengan konsentrasi enzim ditunjukkan dalam Gambar 3.



Gambar 3. Hubungan laju reaksi dengan konsentrasi enzim (Reed, 1975).

4) Konsentrasi substrat

Kecepatan reaksi enzimatik pada umumnya tergantung pada konsentrasi substrat. Kecepatan reaksi akan meningkat apabila konsentrasi substrat meningkat. Peningkatan kecepatan reaksi ini akan semakin kecil hingga tercapai suatu titik batas yang pada akhirnya penambahan konsentrasi substrat hanya akan sedikit meningkatkan kecepatan reaksi (Lehninger, 1982).

5) Aktivator dan Inhibitor

Beberapa enzim memerlukan aktivator dalam reaksi katalisisnya. Aktivator adalah senyawa atau ion yang dapat meningkatkan kecepatan reaksi enzimatik. Komponen kimia yang membentuk enzim disebut juga kofaktor. Kofaktor tersebut dapat berupa ion-ion anorganik seperti Zn, Fe, Ca, Mn, Cu, Mg atau dapat pula sebagai molekul organik kompleks yang disebut koenzim (Martoharsono, 1997).

Inhibisi atau hambatan reaksi enzim adalah penurunan kecepatan reaksi enzimatik akibat adanya suatu senyawa kimia tertentu dalam larutan enzim substrat. Molekul atau ion yang dapat menghambat reaksi tersebut dinamakan inhibitor (Poedjiadi, 1994). Pada umumnya cara kerja inhibitor adalah dengan menyerang sisi aktif enzim sehingga enzim tidak dapat lagi berikatan dengan substrat sehingga fungsi katalitiknya terganggu (Winarno, 1986).

6) Pelarut organik

Penggunaan pelarut dalam reaksi enzimatik memberikan keuntungan antara lain ialah kelarutan substrat-organik dan enzim lebih tinggi dibandingkan dengan air serta meningkatkan kestabilan enzim dengan pelarut (Kwon dan Rhee, 1986).

Banyak enzim berfungsi optimal dalam batas-batas suhu antara 25-37°C. Akibat dari pH terhadap suatu reaksi enzim menjadi rumit oleh beberapa faktor yang dapat saling bersaing. Laju reaksi berkurang di kedua sisi pH optimum untuk setiap kombinasi dari tiga alasan yang mungkin (Page, 1989) :

- 1) Protein enzim dapat mengalami denaturasi akibat pH ekstrim tinggi atau rendah.
- 2) Protein enzim dapat memerlukan gugus-gugus asam amino yang terionisasi pada rantai samping yang mungkin aktif hanya pada suatu keadaan ionisasi
- 3) Substrat dapat diperoleh atau kehilangan proton dan reaktif dalam hanya satu bentuk muatan.

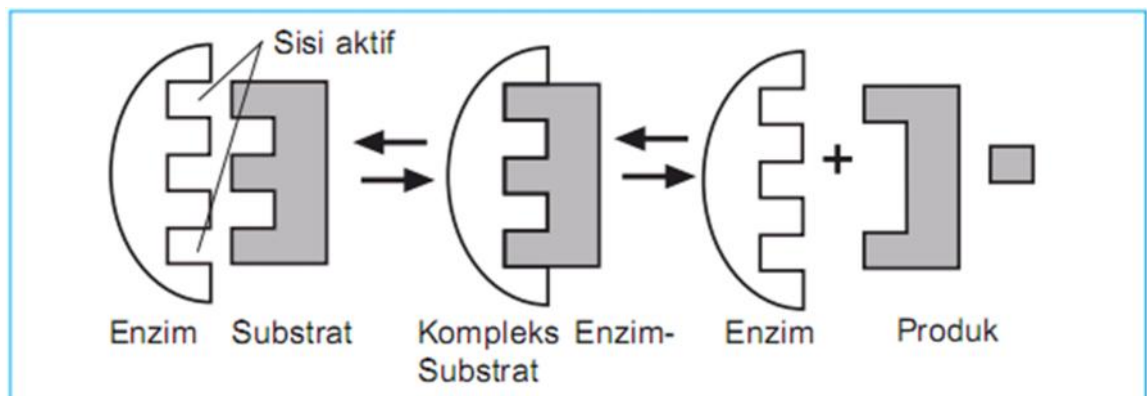
Kelebihan enzim sebagai katalis antara lain (Suhtanry dan Rubianty, 1985) :

1. Mempunyai tenaga katalitik yang jauh lebih besar
2. Spesifikasi pada substrat sangat besar sekali
3. Mempercepat reaksi tanpa produksi samping
4. Berjalan pada suhu temperatur normal
5. Bekerja dengan urutan reaksi tertentu
6. Reaksi menyimpan dan menghasilkan reaksi kimia lain.

2. Cara kerja enzim

a. Teori gembok kunci

Sisi aktif enzim mempunyai bentuk tertentu yang hanya sesuai untuk satu jenis substrat saja. Substrat sesuai dengan sisi aktif seperti gembok kunci dengan anak kuncinya. Hal itu menyebabkan enzim bekerja secara spesifik. Jika enzim mengalami denaturasi (rusak) karena panas, bentuk sisi aktif berubah sehingga substrat tidak sesuai lagi. Perubahan pH juga mempunyai pengaruh yang sama (Waluyo, 2006).

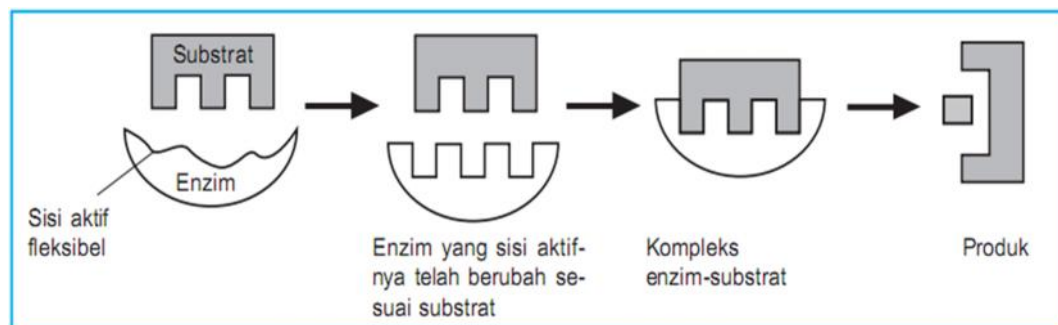


Gambar 4. Teori gembok kunci (Waluyo, 2006).

b. Teori cocok terinduksi

Sisi aktif enzim lebih fleksibel dalam menyesuaikan struktur substrat. Ikatan antara enzim dan substrat dapat berubah menyesuaikan dengan substrat (Waluyo, 2006). Molekul enzim mempunyai sisi aktif tempat menempelnya substrat sehingga terbentuklah molekul kompleks enzim substrat. Pengikatan substrat menginduksi penyesuaian pada enzim sehingga meningkatkan kecocokan antara keduanya dan mendorong

molekul kompleks enzim-enzim substrat ada dalam kondisi yang lebih reaktif. Saat substrat masuk ke dalam sisi aktif enzim, bentuk sisi aktif akan termodifikasi melingkupinya dan membentuk kompleks. Saat produk sudah lepas dari kompleks, enzim berubah menjadi tidak aktif lagi dan menjadi bentuk yang lepas. Substrat lain pun kemudian kembali bereaksi dengan enzim tersebut.



Gambar 5. Teori Induksi (Waluyo, 2006).

B. Enzim Amilase

Enzim amilase merupakan enzim yang mempunyai aktivitas memecah molekul pati dan glikogen (Judoamidjojo *et al.*, 1989). Menurut Winarno (1986), enzim amilase dapat dikelompokkan menjadi tiga golongan enzim yaitu :

1. α -amilase (α -1,4 glukon – 4 – glukonhidrolase), yang memecah pati secara acak dari tengah atau dari bagian dalam molekul disebut endoamilase.
2. β -amilase (β -1,4 glukon maltohidrolase), yang menghidrolisis unit-unit gula dari ujung molekul pati disebut eksoamilase.
3. Glukoamilase, yang dapat memisahkan glukosa dari terminal gula non-pereduksi substrat pati.

1. α -Amilase

Enzim α -Amilase menghidrolisis ikatan α -1,4 glikosidik amilosa, amilopektin dan glikogen. Enzim ini bersifat sebagai endoamilase, yaitu enzim yang memecah pati secara acak dari tengah atau bagian dalam molekul. Berat molekul α -amilase rata-rata \pm 50 KD. Enzim ini mempunyai rantai peptida tunggal pada gugusan proteinnya dan setiap molekul mengandung satu gram atom Ca. Adanya kalsium yang berikatan dengan molekul protein enzim, membuat enzim α -amilase bersifat relatif tahan terhadap suhu, pH, dan senyawa seperti urea (Suhartono, 1989).

Hidrolisis amilosa oleh α -amilase terjadi melalui dua tahap, pertama adalah degradasi menjadi dekstrin yang terjadi secara acak. Degradasi ini terjadi sangat cepat diikuti dengan menurunnya viskositas dengan cepat. Tahap kedua relative sangat lambat dengan pembentukan glukosa dan maltosa sebagai hasil akhir (Suhartono, 1989).

Aktivitas α -amilase dapat diukur berdasarkan penurunan kadar pati yang larut, kadar dekstrin yang terbentuk, dan pengukuran viskositas atau jumlah gula pereduksi yang terbentuk (Judoamidjojo *et al.*, 1989). Pati bereaksi secara kimiawi dengan iodium, reaksi ini terlihat sebagai warna biru-kehitaman. Warna ini terjadi bila molekul iodium masuk ke dalam bagian yang kosong pada molekul zat pati (amilosa) yang berbentuk spiral. Bila zat pati ini telah diuraikan menjadi maltosa atau glukosa, warna biru tidak terjadi karena tidak adanya bentuk spiral (Lay dan Sugyo, 1992). Aktivitas enzim α -amilase

ditentukan dengan mengukur penurunan kadar pati yang larut dengan menggunakan substrat jenuh. Kejenuhan pati berpengaruh terhadap laju reaksi enzimatik. Apabila larutan pati terlalu jenuh maka enzim sulit terdifusi ke dalam larutan sehingga kerja enzim akan terhambat (Winarno, 1986).

2. β -Amilase

β -Amilase (β -1,4 glukon malthohidrolase), memecah pati dari luar molekul dan menghasilkan unit-unit maltosa dari ujung non pereduksi pada rantai polisakarida. Bila tiba pada ikatan α -1,6 glukosida seperti yang dijumpai pada amilopektin atau glikogen, aktivitas enzim ini akan terhenti. Enzim ini bekerja pada ikatan α -1,4 glukosida dan memiliki pH optimum antara 5-6 (Winarno, 1986).

3. Glukoamilase

Glukoamilase (α -1,4-D-glukan glukohidrolase) memecah ikatan α -1,4 dalam amilose, amilopektin, dan glikogen dari ujung gula non pereduksi. Enzim ini dapat juga menghidrolisis ikatan α -1,6 dan α -1,3, meskipun pemecahan ikatan tersebut sangat lambat. pH optimum enzim ini adalah 4-5 (Judoamidjojo *et al.*, 1989).

C. Rhizopus oligosporus

Salah satu jamur yang mempunyai enzim amilase adalah *Rhizopus oligosporus*. Enzim tersebut dihasilkan untuk memecah senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana, sehingga dapat diserap oleh sel dan dapat digunakan untuk

pertumbuhan. Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim, yaitu substrat, nilai pH, dan suhu. Adanya substrat tertentu di dalam medium produksi dapat memicu mikroorganisme untuk mengeluarkan metabolit selnya (Pujoyuwono *et al.*, 1997).

Rhizopus oligosporus mempunyai koloni abu-abu kecoklatan dengan tinggi 1 mm atau lebih. Sporangiofor tunggal atau dalam kelompok dengan dinding halus atau agak sedikit kasar, dengan panjang lebih dari 1000 mikro meter dan diameter 10-18 mikro meter. Sporangia globosa yang pada saat masak berwarna hitam kecoklatan, dengan diameter 100-180 mikro meter (Cochrane, 1958). Klamidospora banyak, tunggal atau rangkaian pendek, tidak berwarna, dengan berisi granula, terbentuk pada hifa, sporangiofor dan sporangia. Bentuk klamidospora globosa, elip atau silindris dengan ukuran 7-30 mikro meter atau 12-45 mikro meter x 7-35 mikro meter (Wipradnyadewi, 2005).

Beberapa manfaat dari *Rhizopus oligosporus* antara lain meliputi aktivitas enzimatisnya, kemampuan menghasilkan antibiotik alami yang secara khusus dapat melawan bakteri gram positif, biosintesa vitamin-vitamin B, kebutuhannya akan senyawa sumber karbon dan nitrogen, perkecambahan spora, dan penetrasi miselia jamur tempe ke dalam jaringan biji kedelai (Wipradnyadewi, 2005).

D. Isolasi dan Pemurnian Enzim

Enzim dapat diisolasi secara ekstraseluler dan intraseluler. Enzim ekstraseluler merupakan enzim yang bekerja di luar sel, sedangkan enzim intraseluler merupakan enzim yang bekerja di dalam sel. Untuk memproduksi enzim dalam

jumlah besar dan mempunyai aktivitas yang tinggi, perlu diperhatikan faktor-faktor penting seperti kondisi pertumbuhan, cara isolasi, serta jenis substrat yang digunakan. Kondisi pertumbuhan yang menunjang produksi enzim secara maksimal adalah pH, suhu inkubasi, waktu inkubasi, dan komposisi media pertumbuhan harus mengandung sumber energi, sumber karbon, sumber nitrogen dan mineral. Enzim dapat diperoleh dengan mengisolasi dari sumbernya. Enzim yang telah diisolasi ini dapat dimanfaatkan lebih lanjut dalam bidang industri maupun kesehatan (Scopes, 1982).

Pemurnian enzim bertujuan untuk memisahkan enzim yang dikehendaki dari enzim lain yang tidak diinginkan. Ada tiga strategi yang harus diperhatikan dalam pemurnian enzim: 1) kualitas, perlu tindakan untuk mempertahankan aktivitas enzim dengan mengurangi proteolisis dan denaturasi, 2) kuantitas, perlu diperhatikan jumlah pemakaian akhir protein murni, dan 3) ekonomis, perlu dipertimbangkan biaya apabila diterapkan dalam skala laboratorium maupun industri. Pemurnian enzim umumnya dilakukan dalam beberapa tahapan yaitu: fraksinasi dengan garam atau pelarut organik, sentrifugasi, dialisis, dan pemisahan dengan kromatografi kolom (Scopes, 1982). Adapun langkah-langkah pemurnian enzim sebagai berikut:

1. Sentrifugasi

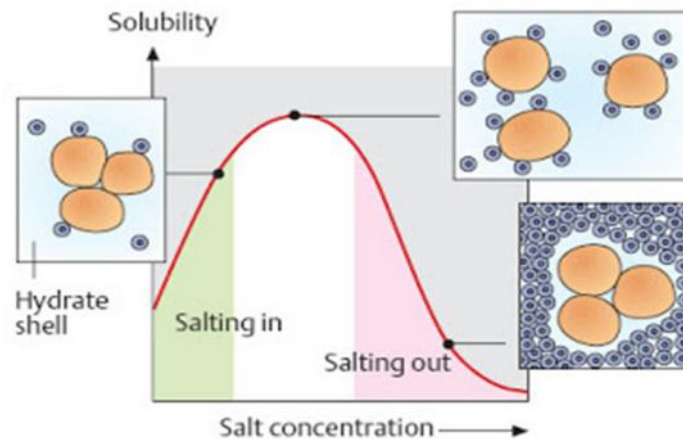
Untuk memisahkan endapan dari suatu suspensi dipakai teknik yang dikenal sebagai sentrifugasi. Alat ini dapat digunakan untuk memisahkan enzim dari sel pada enzim yang dihasilkan secara ekstraseluler. Teknik ini sering digunakan dalam isolasi enzim, karena mudah dan lebih baik pemisahannya

daripada proses penyaringan. Metode sentrifugasi merupakan cara pemisahan enzim dari partikel-partikel lain yang tidak dikehendaki. Semakin kecil partikel, kecepatan sentrifugasi yang diperlukan semakin besar. Pemisahan dilakukan sentrifugasi pada kecepatan dan gaya berat tertentu sehingga sel-sel mikroorganisme mengendap dan supernatant merupakan cairan yang berisi enzim (Scopes, 1982). Dasar pemisahan secara sentrifugasi yaitu:

- 1) Perbedaan antara fasa cair dan padat
 - 2) Ukuran partikel,
 - 3) Berat jenis partikel,
 - 4) Berat jenis bahan cair/larutan,
 - 5) Jari-jari sentrifus.
2. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat

Sebagian besar enzim berada dalam bentuk cairan sel sebagai protein terlarut. Kelarutan enzim tersebut merupakan interaksi polar dengan pelarut dan gaya tolak-menolak antara molekul yang bermuatan sama (Scopes, 1982). Pada konsentrasi rendah, ion-ion akan melingkupi molekul protein dan mencegah bersatunya molekul-molekul protein tersebut (*salting in*), sehingga protein melarut (Suhartono, 1989). Semakin tinggi konsentrasi garam, maka kelarutan protein enzim akan semakin rendah (kelarutan protein enzim dalam air lebih rendah daripada kelarutan garam dalam air) yang dikenal dengan istilah *salting out*). Garam yang sering digunakan untuk mengendapkan protein dan enzim adalah amonium sulfat. Kelebihan amonium sulfat dibandingkan garam-garam yang lain yaitu mempunyai kelarutan yang tinggi,

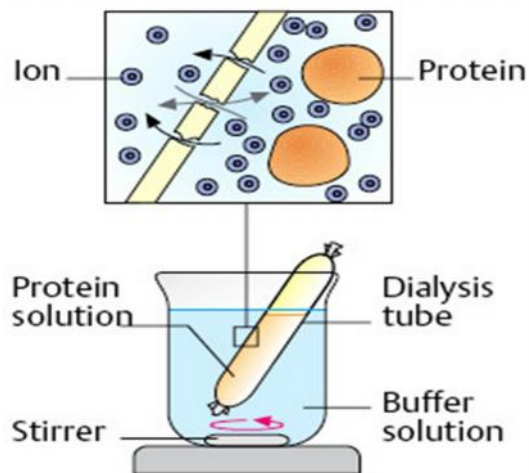
tidak mempengaruhi aktivitas enzim, mempunyai daya pengendap yang efektif, mempunyai efek penstabil terhadap kebanyakan enzim, dapat digunakan pada berbagai pH, dan harganya murah (Scopes, 1982).



Gambar 6. Proses pengendapan protein (Koolman dan Rohm, 2005)

3. Dialisis

Pemurnian enzim tidak menghendaki adanya kelebihan garam, oleh karena itu garam yang tersisa dari proses pengendapan dipisahkan dengan cara dialisis. Dialisis merupakan metode yang paling dikenal untuk menghilangkan molekul pengganggu, seperti garam atau ion-ion lain yang berukuran kecil (Gambar 7).



Gambar 7. Proses pemisahan protein dengan dialisis (Koolman dan Rohm, 2005)

Dialisis merupakan metode yang biasa digunakan untuk memisahkan garam dari larutan protein. Proses yang terjadi karena adanya perbedaan tekanan osmosis antara cairan yang ada di dalam membran dan yang di luar. Prosesnya, molekul protein atau enzim yang berukuran besar akan tertahan dalam kantung dialisis sedangkan molekul-molekul kecil seperti garam anorganik akan keluar melalui pori-pori membran. Keluarnya molekul menyebabkan distribusi ion-ion yang ada di dalam dan di luar kantong dialisis tidak seimbang. Untuk memperkecil pengaruh ini digunakan larutan buffer dengan konsentrasi rendah di luar kantong dialisis. Membran yang digunakan adalah selofan (Lehninger, 1982).

4. Pengujian aktivitas α -amilase dengan Metode Fuwa

Aktivitas α -amilase ditentukan dengan Metode Fuwa (Fuwa, 1954), yaitu berdasarkan pengurangan jumlah pati yang terdeteksi dengan penambahan iodine. Uji Fuwa merupakan uji yang paling spesifik untuk mengidentifikasi aktivitas enzim amilase karena waktu reaksi yang singkat yaitu 10 menit

inkubasi dimana pati sebagai substratnya. Semakin kecil absorbansi sampel maka semakin baik aktivitas dari enzim tersebut.

5. Penentuan kadar protein dengan Metode Lowry

Metode Lowry bekerja pada kondisi alkali dan ion tembaga (II) akan membentuk kompleks dengan protein. Pada saat reagen *folin-ciocalteau* ditambahkan, maka akan mengikat protein. Ikatan ini secara perlahan akan mereduksi reagen folin menjadi heteromolibdenum dan merubah warna dari kuning menjadi biru.

Prinsip kerja Metode Lowry :

- 1) Berdasarkan reaksi biuret
- 2) Ion tembaga Cu^{2+} membentuk suatu kompleks dengan ikatan peptida yang mereduksi Cu^{2+} menjadi Cu
- 3) Bereaksi dengan senyawa folin menghasilkan senyawa kompleks berwarna biru
- 4) Intensitas warna yang terbentuk tergantung pada jumlah senyawa asam aromatik seperti tirosin dan triptofan

Metode ini relatif sederhana dan dapat diandalkan serta biayanya relatif murah. Namun, metode ini mempunyai kelemahan yaitu sensitif terhadap perubahan pH dan konsentrasi protein yang rendah. Untuk, mengatasinya adalah dengan cara menggunakan volume sampel yang sangat kecil sehingga tidak mempengaruhi reaksi (Lowry *et al.*, 1951).

6. Pengujian aktivitas α -amilase dengan Metode Mandels

Pengujian aktivitas α -amilase dilakukan dengan Metode Mandels (Mandels *et al.*, 1976), yaitu berdasarkan pembentukan produk glukosa dimana karboksimetil amilase sebagai substratnya. Semakin tinggi absorbansi sampel semakin baik aktivitasnya.

E. Stabilitas Enzim

Stabilitas enzim diartikan kestabilan aktivitas enzim selama penyimpanan dan penggunaan enzim tersebut, serta kestabilan terhadap pengaruh suhu dan pH yang ekstrim. Ada dua cara yang dapat ditempuh untuk mendapatkan enzim yang mempunyai stabilitas tinggi yaitu menggunakan enzim yang memiliki stabilitas ekstrim alami dan mengusahakan peningkatan stabilitas enzim yang secara alami tidak/kurang stabil (Junita, 2002).

1. Stabilitas termal enzim

Pada suhu yang terlalu rendah kemantapan enzim tinggi, tetapi aktivitasnya rendah, Sedangkan pada suhu yang terlalu tinggi aktivitas enzim tinggi, tetapi kemantapannya rendah. Kenaikan suhu enzim akan mempengaruhi kecepatan laju reaksi hingga batas tertentu dan dapat menyebabkan denaturasi protein. Daerah suhu saat kemantapan dan aktivitas enzim cukup besar disebut suhu optimum enzim (Wirahadikusumah, 1989).

2. Stabilitas pH enzim

Stabilitas enzim dipengaruhi oleh banyak faktor seperti suhu, pH, pelarut, kofaktor dan kehadiran surfaktan (Eijsink *et al.*, 2005). Dari faktor-faktor tersebut pH memegang peranan penting. Perubahan keaktifan pH pada lingkungan dapat disebabkan oleh terjadinya perubahan ionisasi enzim, substrat atau kompleks enzim-substrat. Enzim menunjukkan aktivitas maksimum pada kisaran pH optimum enzim dengan stabilitas yang tinggi (Winarno, 1986).

Pada reaksi enzimatik, sebagian besar enzim akan kehilangan aktivitas katalitiknya secara cepat dan *irreversible* pada pH yang jauh dari rentang pH optimumnya. Inaktivasi ini terjadi karena *unfolding* molekul protein akibat perubahan kesetimbangan elektrostatis dan ikatan hidrogen (Kazan *et al.*, 1997).

F. Kinetika Reaksi Enzim

Kinetika reaksi enzim adalah suatu cabang enzimologi yang membahas faktor-faktor yang mempengaruhi kecepatan reaksi enzimatik. Parameter dalam kinetika reaksi enzim adalah konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}). Salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah konsentrasi substrat. Konsentrasi substrat dapat divariasikan untuk mengetahui suatu reaksi enzim, yaitu bagaimana tahap-tahap terjadinya pengikatan substrat oleh enzim, maupun pelepasan produknya (Suhartono, 1989).

Setiap enzim memiliki sifat dan karakteristik yang spesifik seperti yang ditunjukkan pada sifat spesifisitas interaksi enzim terhadap substrat yang dinyatakan dengan nilai tetapan Michaelis-Menten (K_M). Nilai K_M didefinisikan sebagai konsentrasi substrat tertentu pada saat enzim mencapai kecepatan setengah kecepatan maksimum. Setiap enzim memiliki nilai K_M dan V_{maks} dengan substrat spesifik pada suhu dan pH tertentu (Kamelia *et al.*, 2005). Nilai K_M yang kecil menunjukkan bahwa kompleks enzim-substrat sangat baik dengan afinitas tinggi terhadap substrat, sedangkan nilai K_M suatu enzim besar maka enzim tersebut memiliki afinitas rendah terhadap substrat (Page, 1989).

G. Polietilen glikol (PEG)

Polietilen glikol (PEG) adalah polimer yang banyak digunakan dalam industri pangan, kosmetik dan farmasi. PEG mempunyai kelarutan yang baik dalam air dan kesamaan secara struktur kimia karena adanya gugus hidroksil primer pada ujung rantai polieter yang mengandung oksietilen ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$). PEG mempunyai sifat stabil, mudah larut dalam air hangat, tidak beracun, non-korosif, tidak berbau, tidak berwarna, memiliki titik lebur yang sangat tinggi (580°F), tersebar merata, higroskopik (mudah menguap) dan juga dapat mengikat pigmen. PEG berupa putih seperti lilin yang menyerupai paraffin. Berupa bentuk padat dalam pada suhu kamar, mencair pada suhu 104°F , memiliki berat molekul rata-rata 1000 (Yang *et al.*, 1996).

Semakin besar nilai berat molekul PEG maka akan semakin padat PEG tersebut dan sebaliknya. PEG berdasarkan berat molekulnya dibagi menjadi : PEG 200, 400, 600, 1000, 1500, 1540, 3350, 4000, 6000, 8000 dan diatas 100.000 sampai

dengan 300.000. PEG dengan berat molekul dibawah 1000 berupa cairan jernih tidak berwarna, PEG dengan berat molekul 1000-1500 berupa semi padat. PEG 3000-20.000 berupa padatan semi kristalin, diatas 100.000 berupa resin pada suhu kamar. Jadi PEG semakin meningkat kekerasannya dengan bertambah besarnya berat molekul (Leuner dan Dressman, 2000). Umumnya PEG dengan bobot molekul 1500-20000 yang digunakan untuk pembuatan dispersi padat. Sedangkan Untuk PEG dibawah 1500 digunakan dalam dispersi cair (Weller, 2003). Pada penelitian ini menggunakan PEG dengan berat molekul 6000.

Polietilen glikol atau PEG $[\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}]$ teraktivasi merupakan reagen yang banyak digunakan sebagai zat pemodifikasi enzim. PEG teraktivasi mengandung gugus reaktif yang dapat dihubungkan langsung dengan gugus fungsi dalam enzim (Yang *et al.*, 1996). Berdasarkan struktur enzim, residu lisin yang berada di permukaan memiliki kemungkinan paling besar untuk bereaksi dengan zat pemodifikasi. Gugus amino dari lisin merupakan gugus yang paling banyak dilibatkan, karena gugus ini paling melimpah dan paling mudah didekati dari rantai samping asam amino suatu enzim, ikatan molekul PEG teraktivasi dengan asam amino pada permukaan enzim dapat menyebabkan enzim kurang fleksibel dalam larutan air, sehingga dapat menurunkan kemungkinan *unfolding* pada struktur enzim dan peningkatan stabilitas enzim (Janecek, 1993).

III. METODELOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan Desember 2016 - Mei 2017 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, Laboratorium Instrumentasi Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Adapun alat-alat yang digunakan dalam pengujian sampel meliputi tabung reaksi, tabung sentrifuga, gelas ukur, labu Erlenmeyer, pembakar spiritus, jarum ose, sumbat, kertas saring, spatula, pipet tetes, mikropipet Eppendorff, autoklaf model S-90N, *Shaker Inkubator*, *Waterbath*, neraca analitik, rak tabung reaksi, *Laminar Air Flow* CURMA model 9005-FL, lemari pendingin, stopwath, botol film, termometer, spektrofotometer UV-VIS Carry Win UV 32.

Sedangkan bahan-bahan yang digunakan dalam pengujian sampel meliputi medium PDA, *Yeast extract* 0,2%, Pepton 0,2%, pati 0,1%, urea 0,03%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,02%, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,03%, KCl 0,03%, KH_2PO_4 0,2% dan $(NH_4)_2SO_4$ 0,14%, akuades, HCL 1 N, buffer fosfat, amilum, iodin, kantong

selofan, DNS (dinitrosalisilic acid), pereaksi A (Na_2CO_3 dan NaOH), pereaksi B ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan Na/K-tartrat), pereaksi C dan pereaksi D (reagen folin ciocelteau), dan Polietilen glikol 6000. Jamur penghasil enzim α -amilase adalah *Rhizopus oligosporus* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi dan Teknologi Bioproses Jurusan Teknik Kimia, Institut Teknologi Bandung.

C. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan Media Inokulum, Fermentasi, dan Larutan Pereaksi

a. Pembuatan media inokulum dan fermentasi

Komposisi yang digunakan pada pembuatan media inokulum dan fermentasi yaitu *Yeast extract* 0,2%, Pepton 0,2%, pati 0,1%, urea 0,03%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,03%, KCl 0,03%, KH_2PO_4 0,2% dan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,14%. Semua bahan tersebut dicampurkan dengan akuades dalam labu erlenmeyer 250 mL. Setelah media dibuat, media tersebut di sterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan pada tekanan 1 atm selama 15 menit.

b. Pembuatan pereaksi untuk pengukuran aktivitas enzim α -amilase Metode Fuwa

1. Pereaksi iodin

Dimasukkan 2 gram KI dalam labu takar 100 mL dan dilarutkan dalam 10 mL akuades, ditambahkan 0,2 gram I_2 , kemudian ditambahkan akuades hingga tanda batas.

2. Larutan pati

Sebanyak 0,1 gram pati dilarutkan dalam 100 mL akuades kemudian dipanaskan hingga larut.

c. Pembuatan pereaksi untuk pengukuran kadar protein Metode Lowry

Pereaksi A : 2 gram Na_2CO_3 dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 N

Pereaksi B : 5 mL larutan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 % ditambahkan ke dalam 5 mL larutan Na/K-tartrat 1%

Pereaksi C : 2 mL pereaksi B ditambahkan dengan 100 mL pereaksi A

Pereaksi D : Reagen *folin ciocelteau* diencerkan dengan akuades 1:1

Larutan standar : Larutan BSA (Bovine Serum Albumin) dengan kadar 0-20,20-40, 40-60, 60-80, 80-100, 100-120, 120-140 ppm.

d. Pembuatan pereaksi untuk pengukuran aktivitas enzim α -amilase Metode Mandels (Mandels *et al.*, 1976)

Ke dalam labu ukur 100 ml, dimasukkan 1% DNS (dinitrosalisilic acid),

1% NaOH, 1 mL Na(K) tartarat 40%, 0,2% fenol, dan 0,05% Na_2SO_3 ,

kemudian dilarutkan dalam 100 mL akuades hingga tanda batas.

2. Produksi Enzim α -Amilase

Sebanyak 3 ose *Rhizopus oligosporus* dari media agar miring dipindahkan ke dalam media inokulum secara aseptis di dalam *Laminar Air Flow* lalu dikocok dalam *shaker inkubator* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 32°C selama 24 jam. Selanjutnya 10 mL media inokulum dipindahkan ke dalam

1 L media fermentasi dan dikocok dengan *Shaker Inkubator* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 32°C selama 72 jam.

3. Isolasi dan Pemurnian Enzim -Amilase

a. Isolasi enzim -amilase

Media fermentasi berisi *Rhizopus oligosporus* yang telah dikocok menggunakan *Shaker Inkubator* pada suhu 32-38°C selama 72 jam akan dipisahkan enzim dari komponen sel lainnya menggunakan metode sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit. Sentrifugasi digunakan untuk memisahkan filtrat dengan padatan. Sentrifugasi dilakukan pada suhu rendah (di bawah suhu kamar) untuk menjaga kehilangan aktivitas enzim (Suhartono, 1989). Filtrat yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim yang selanjutnya dilakukan uji aktivitas enzim amilase dengan Metode Fuwa serta pengukuran kadar protein dengan Metode Lowry.

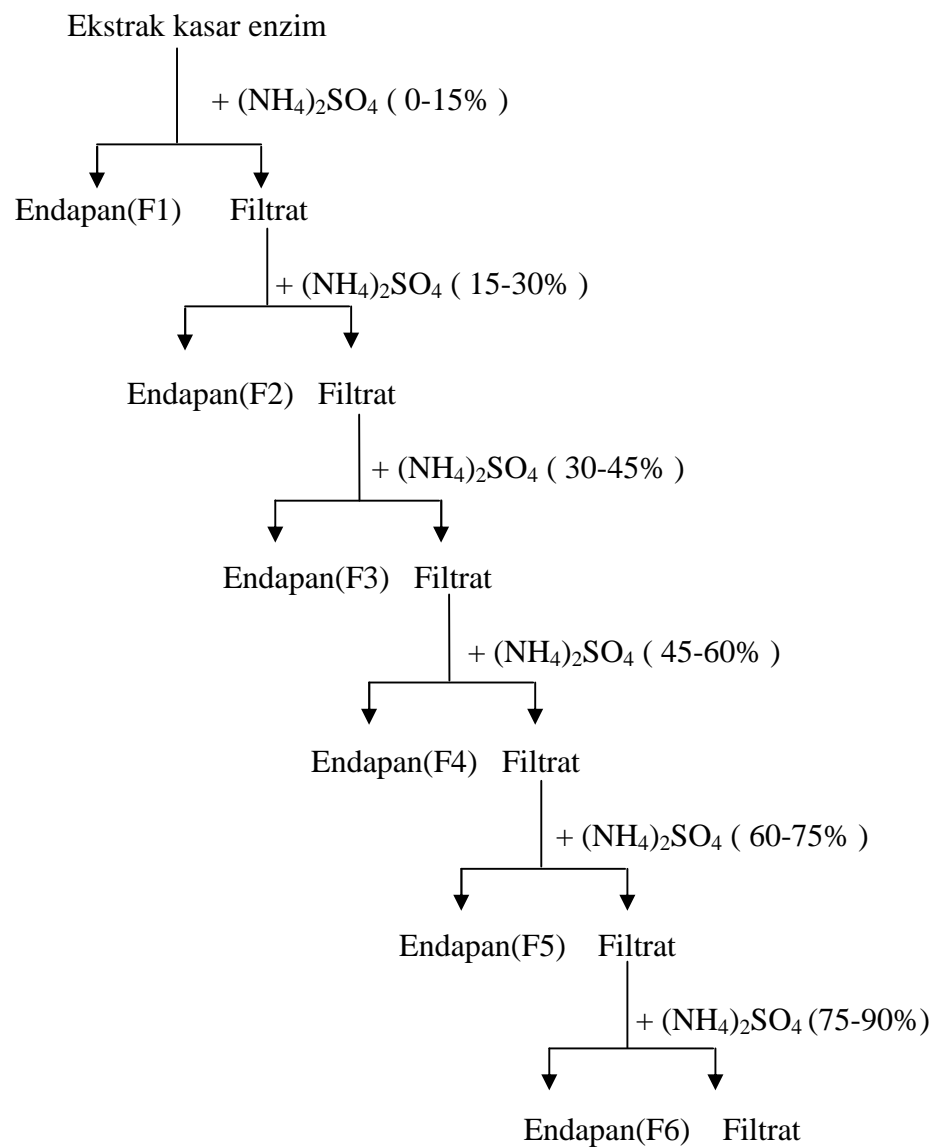
b. Pemurnian enzim -amilase

1. Fraksinasi dengan amonium sulfat [(NH₄)₂SO₄]

Ekstrak kasar enzim yang diperoleh diendapkan dengan garam amonium sulfat pada berbagai derajat kejenuhan yaitu (0-15)%; (15-30)%; (30-45)%; (45-60)%; (60-75)%; dan (75-90)%.

Sejumlah ekstrak kasar enzim yang diperoleh ditambahkan garam amonium sulfat secara perlahan sambil diaduk dengan magnetik stirrer. Endapan

protein enzim yang didapatkan pada tiap fraksi kejenuhan amonium sulfat dipisahkan dari filtratnya dengan sentrifugasi dingin pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Kemudian endapan yang diperoleh dilarutkan dengan bufer fosfat 0,1 M pH 5 dan diuji aktivitasnya dengan Metode Fuwa, serta diukur kadar proteinnya dengan Metode Lowry. Selanjutnya, filtrat yang didapat dari fraksi 0-15% digunakan untuk diendapkan kembali dengan fraksi kejenuhan 15-30% dengan prosedur yang sama.



Gambar 8. Skema proses fraksinasi dengan amonium sulfat

2. Dialisis

Endapan enzim yang telah dilarutkan dari tiap fraksi amonium sulfat dengan aktivitas spesifik yang tinggi dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis dengan bufer fosfat 0,01 M pH 5 selama 24 jam pada suhu dingin (Pohl, 1990). Selama dialisis, dilakukan pergantian bufer selama 4-6 jam agar konsentrasi ion-ion di dalam kantong dialisis dapat dikurangi. Proses ini dilakukan secara kontinyu sampai ion-ion di dalam kantong dialisis dapat diabaikan. Untuk mengetahui bahwa sudah tidak ada lagi ion-ion garam dalam kantong, maka diuji dengan menambahkan larutan $\text{Ba}(\text{OH})_2$ atau BaCl_2 , bila masih ada ion sulfat dalam kantong, maka akan terbentuk endapan putih BaSO_4 . Semakin banyak endapan yang terbentuk, maka semakin banyak ion sulfat yang ada dalam kantong. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas dengan Metode Fuwa, serta diukur kadar proteinnya dengan Metode Lowry.

4. Uji aktivitas Enzim -Amilase

a. Metode Fuwa

Aktivitas -amilase ditentukan dengan Metode Fuwa (Fuwa, 1954), yaitu berdasarkan pengurangan jumlah pati yang terdeteksi dengan penambahan iodin. Uji Fuwa merupakan uji yang paling spesifik untuk mengidentifikasi aktivitas enzim amilase karena waktu reaksi yang singkat yaitu 10 menit inkubasi dimana pati sebagai substratnya. Semakin kecil absorbansi sampel maka semakin baik aktivitas dari enzim tersebut.

Sebanyak 0,25 mL enzim ditambahkan 0,25 mL larutan pati 0,1% dicampur lalu diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit. Kemudian ditambahkan 0,25 mL HCl 1 N dan ditambahkan 0,25 mL pereaksi iodin dan 4 mL akuades kedalam campuran reaksi. Setelah campuran diaduk rata, diukur serapannya menggunakan spektrofotometri UV-VIS pada 600 nm. Kontrol dibuat dengan cara yang sama hanya menggunakan 0,25 mL enzim yang sudah diinaktifkan (0,25 mL enzim ditambah 0,25 mL HCl 1 N lalu diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit, tambahkan 0,25 mL larutan pati dan ditambah 0,25 mL pereaksi iodin). Penentuan aktivitas enzim α -amilase dengan menggunakan Metode Fuwa ini dilakukan pada tahap isolasi, pemurnian dan karakterisasi enzim.

b. Uji aktivitas enzim α -amilase Metode Mandels (Mandels *et al.*, 1976)

Metode ini didasarkan pada glukosa yang terbentuk (Mandels *et al.*, 1976). Sebanyak 0,25 mL enzim ditambahkan 0,25 mL larutan pati 0,5% dalam bufer fosfat pH 5 dicampur lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 60°C. Kemudian ditambahkan 1 mL pereaksi DNS dan dididihkan selama 10 menit pada penangas air. Setelah dingin, serapannya diukur menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada 510 nm. Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan dengan menggunakan kurva standar glukosa. Penentuan aktivitas enzim α -amilase dengan menggunakan Metode Mandels ini dilakukan pada tahap penentuan K_M dan V_{maks} .

c. Penentuan kadar protein Metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951)

Sebanyak 0,1 mL enzim ditambahkan 0,9 mL akuades lalu direaksikan dengan 5 mL pereaksi C dan diaduk rata. Kemudian dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruang. Setelah itu ditambahkan dengan cepat 0,5 mL pereaksi D dan diaduk dengan sempurna, didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Untuk kontrol, 0,1 mL enzim diganti dengan 0,1 mL akuades, selanjutnya perlakuannya sama seperti sampel. Serapannya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 750 nm. Untuk menentukan konsentrasi protein enzim digunakan kurva standar BSA (Bovine Serum Albumin). Penentuan kadar protein enzim α -amilase dengan menggunakan Metode Lowry ini dilakukan pada tahap isolasi dan pemurnian enzim.

5. Penambahan Polietilen glikol (PEG) 6000

Larutan Polietilen glikol 6000 dengan perbedaan konsentrasi 4% ; 6% ; dan 10% masing-masing ditambahkan kepada enzim hasil pemurnian dengan perbandingan 1:1.

6. Karakterisasi enzim (sebelum dan setelah penambahan PEG 6000)

Karakterisasi enzim α -amilase sebelum dan setelah penambahan PEG 6000 meliputi :

a. Penentuan pH dan suhu optimum

1) Penentuan pH optimum

Untuk mengetahui pH optimum enzim sebelum dan sesudah

penambahan PEG 6000 digunakan bufer fosfat 0,05 M dengan variasi pH sebagai berikut : 5 ; 5,5 ; 6 ; 6,5 ; 7 ; 7,5 dan 8. Suhu dijaga tetap pada 60°C, kemudian dilanjutkan dengan pengukuran aktivitas enzim dengan Metode Fuwa.

2) Penentuan suhu optimum

Untuk mengetahui suhu optimum kerja enzim dilakukan dengan variasi suhu yaitu 45 ; 50 ; 55 ; 60 ; 65 ; 70 dan 75°C, pH tetap dijaga pada pH optimum. Selanjutnya diukur aktivitas enzim dengan Metode Fuwa.

b. Penentuan data kinetika enzim (nilai K_M dan V_{maks})

Konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) enzim sebelum dan setelah penambahan PEG 6000 ditentukan dari kurva Lineweaver-Burk. Kurva Lineweaver-Burk dibuat dengan menguji aktivitas enzim amilase dengan variasi konsentrasi substrat 0,25 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 dan 1,25% dalam bufer fosfat pH 6,5 dan suhu 55°C selama 60 menit. Selanjutnya diukur aktivitas enzim dengan Metode Mandels.

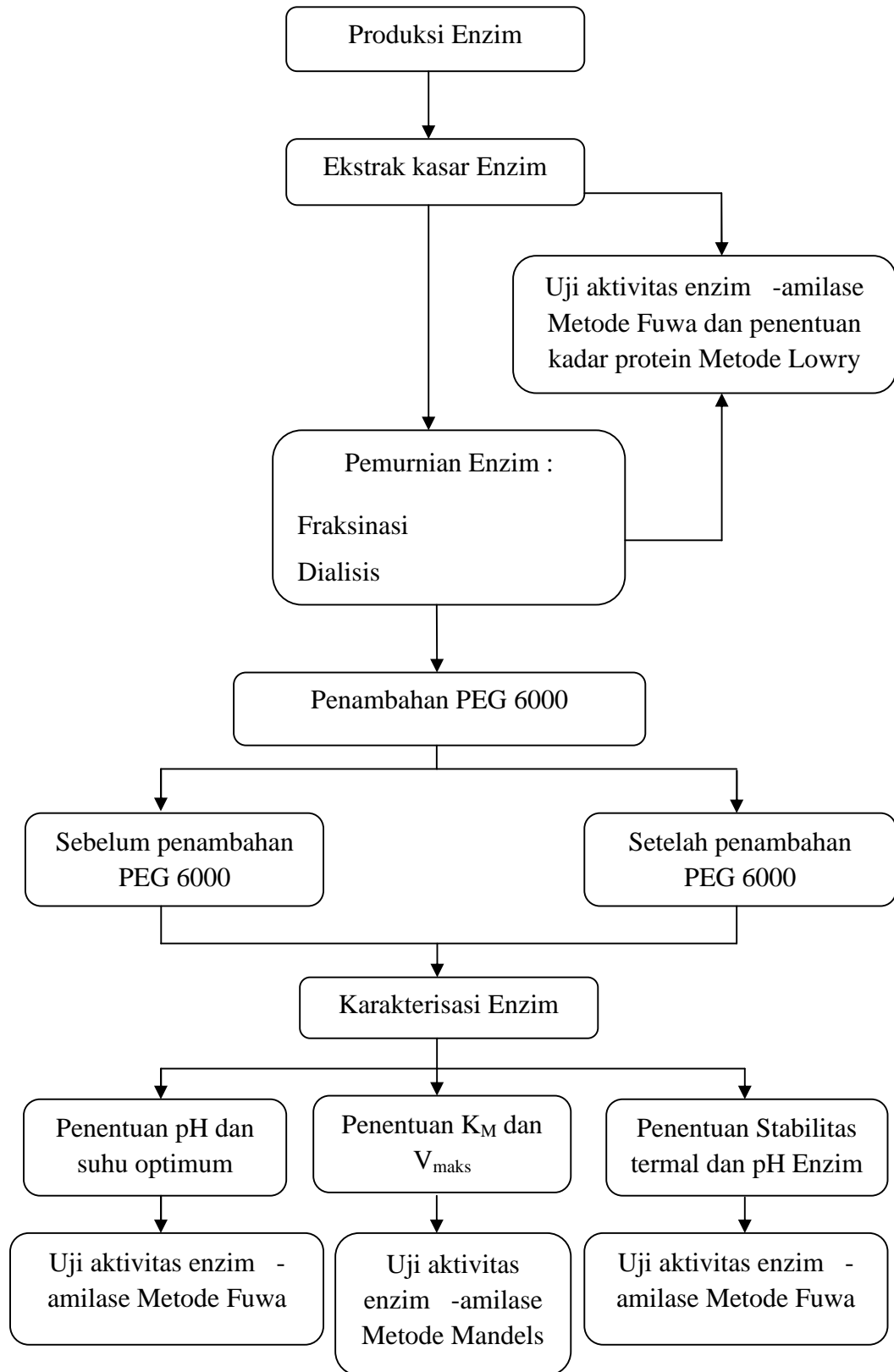
c. Uji stabilitas termal dan stabilitas pH enzim

Penentuan stabilitas termal enzim dilakukan dengan mengukur aktivitas sisa enzim setelah diinkubasi selama periode waktu 60 menit pada suhu 55°C dan pH 6,5. Dengan cara mengukur aktivitas enzim setelah proses pemanasan setiap interval waktu 10 menit.

Aktivitas awal enzim (tanpa proses pemanasan) diberi nilai 100%.

$$\text{aktivitas sisa} = \frac{\text{Aktivitas enzim setelah perlakuan}}{(\text{Aktivitas enzim awal tanpa perlakuan})} \times 100\%$$

Secara keseluruhan, penelitian ini terangkum dalam diagram alir yang ditunjukkan dalam Gambar 9.



Gambar 9. Diagram alir penelitian

V.SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Dari hasil penelitian ini dapat diambil kesimpulan yaitu sebagai berikut :

1. Enzim hasil pemurnian dan enzim hasil penambahan PEG 6000 4%, 6%, dan 10% memiliki pH optimum 6,5 dan suhu optimum 55°C serta mengalami penurunan nilai k_i , mengalami kenaikan waktu paruh ($t_{1/2}$), dan kenaikan nilai G_i .
2. Enzim hasil pemurnian memiliki nilai K_M sebesar 24,0 mg mL⁻¹ dan V_{maks} sebesar 0,433 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ menit⁻¹ substrat, nilai k_i sebesar 0,0099 menit⁻¹, nilai $t_{1/2}$ sebesar 70 menit dan nilai $G_i = 104,35$ kJ/mol.
3. Enzim hasil penambahan PEG 6000 4%, 6% dan 10% memiliki nilai K_M dan V_{maks} berturut-turut yaitu sebesar $K_M = 22,96$ mg mL⁻¹ dan $V_{maks} = 0,448$ $\mu\text{mol mL}^{-1}$ menit⁻¹ substrat, $K_M = 17,46$ mg mL⁻¹ dan $V_{maks} = 0,396$ $\mu\text{mol mL}^{-1}$ menit⁻¹ substrat dan $K_M = 15,91$ mg mL⁻¹ dan $V_{maks} = 0,385$ $\mu\text{mol mL}^{-1}$ menit⁻¹ substrat.
4. Nilai k_i , waktu paruh dan G_i pada enzim hasil penambahan PEG 6000 4%, 6%, dan 10% berturut-turut yaitu sebesar $k_i = 0,0094$ menit⁻¹, $0,0087$ menit⁻¹, dan $0,0080$ menit⁻¹; nilai $t_{1/2}$ berturut-turut yaitu sebesar 73,7 menit, 79,6 menit

dan 86,6 menit ; serta nilai G_i berturut-turut yaitu sebesar 104,49 kJ/mol, 104,70 kJ/mol dan 104,93 kJ/mol.

5. Enzim yang memiliki stabilitas paling tinggi yaitu pada enzim hasil penambahan PEG 6000 10% serta pada hubungan $\ln(E_i/E_0)$ enzim hasil pemurnian dan penambahan PEG 6000 nilai k_i mengalami penurunan karena semakin tinggi konsentrasi maka nilai k_i semakin menurun.

B. Saran

Dari hasil penelitian yang diperoleh, maka disarankan untuk lebih mempelajari pemurnian enzim, tidak hanya pengendapan dengan amonium sulfat dan dialisis serta dalam penentuan pH dan suhu optimum bisa dilakukan dengan rentang pH dan suhu yang lebih luas.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahern, T.J. dan A.M. Klivanov. 1987. Why do enzyme irreversibly inactive at high temperature. Biotec 1. *Microbial Genetic Engineering and Enzyme Technology*. Gustav Fischer. Stuttgart. New York.
- Ansel,H.C., 1989. Pengantar Bentuk sediaan Farmasi. Edisi 4. UI Press. Jakarta. Halaman 96,147.
- Black, J. G. 2005. *Microbiology Principles And Explorations*. John Wiley and Sons, Inc. United States America.
- Cochrane, V. W. 1958. Physiology of fungi. New York:John Wiley and Sons Inc. Hal. 21-24.
- Crueger dan Crueger. 1990. *Biotechnology A Text Book of Industrial Mikrobiology*. 2nd edition. Sinaver Associates Inc. Sunderland.
- Dwidjoseputro, 1992. *Dasar-dasar mikrobiologi*. Hal 100-101. Djambatan. Surabaya.
- Eijnsink, G.H., Sirgit, G. Torben, V. Bertus van de Burg. 2005. *Directed Evolution of Enzyme Stability. Biomolecular Engineering. Elsevier Science Inc*. New York. 23:21-30.
- Fuwa, H. 1954. *A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylase as the substrate. J. Biochem.* Tokyo. 41, 583-603.
- Janecek, S. 1993. Strategies for Obtaining Stabel Enzymes. *Process Biochem.* 28:4 35-445

- Judoamidjojo, R.M., Gumbira, S.E. dan Hartoto, L. 1989. *Biokonversi*. Depdikbud Dirjen Dikti. PAU Bioteknologi IPB. Bogor.
- Junita, 2002. *Mempelajari Stabilitas Termal Enzim Protease dari Bacillus stearothermophilus Dalam Pelarut Heksana, Toluena, dan Benzena. (Skripsi)*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Kamelia,R, Muliawati S, Dessy N. 2005. *Isolasi dan karakterisasi protease intraseluler termostabil dari Bakteri Bacillus stearothermophilus*. Seminar Nasional MIPA. Departemen Kimia. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Kazan, D., H. Ertan dan A. Erarslan. 1997. *Stabilization of Escherichia coli Penicillin G Acylase againsts thermal Inactivation by cross-linking with dextran dialdehyde polymers*. Applied. Microbiol Biotechnol. **48**:191197.
- Koolman J, Rohm KH. *Color atlas of Biochemistry*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 2005. Terjemahan Indonesia oleh Dr.rer.physiol Septelia Inawati Winandi,dr. Jakarta: Hipokrates. 1995;286-88
- Kuswanto, Kapti Rahayu dan Slamet Sudarmaji. 1989. *Mikrobiologi Pangan*. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Yogyakarta : Universitas Gajah Mada.
- Kwon, D.Y. dan Rhee, J.S. 1986. *A Simple and Rapid Colometric Method for Determination of Free Fatty Acid for Lipase Assay*. J.A.O.C.S. **63**. 69-92.
- Lay, Bibiana W. dan Hastowo, Sugyo, 1992. *Mikrobiologi*, Rajawali Press. Jakarta.
- Lehninger, A.L. 1982. *Dasar-dasar Biokimia*. Jilid 1. Diterjemahkan oleh Maggy Thenawidjaya. Erlangga. Jakarta. 369 halaman.
- Leuner, C and Dressman, J., 2000. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersion, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **50**, 47-60.
- Lowry, O.H.,Rosebrough, N.J., Farr, A.L., dan Randall, R.J. 1951. *Protein Mesurement With The Folin Phenol reagent*. *J. Biol. Chem.* 193-265.

- Mandels, M. 1985. Applications of cellulases. *Biochemical Society Transactions*. **13**: 414-416.
- Mandels, M., A. Raymond, R. Charles. 1976. *Measurement of saccharifying cellulose*. *Biotechnology and Bioengineering*. John Wiley & Sons Inc.
- Martoharsono, S. 1997. *Biokimia*. UGM Press. Yogyakarta. 91.
- Murashima, K., Nishimura, T., Nkamura, Y., Koga, J., Moriya, T., Sumida, N., Yaguchi, T. dan Kono, T. 2002. *Purification and characterization of new endo-1,4- β -glucanases from Rhizopus orizae*. *Enzyme Microb. Technol.* **30**: 319-326.
- Page, D.S. 1989. *Prinsip-Prinsip Biokimia*. Erlangga. Jakarta. 465 halaman.
- Poedjiadi, A. 1994. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta. UI-Press. 155, 158-160.
- Pohl, T. 1990. *Concentration of Protein Removal of Salute dalam M.P. Deutscher, Methods of Enzymology. Guide to Protein Purification*. 182. Academic Press. New York.
- Pujoyuwono, M.D., N. Trinovia, D.S. Richana, Damardjati dan U. Murdiyanto. 1997. *Karakterisasi enzim amilase dari beberapa strain bakteri indegenous Indonesia. Prosiding Seminar Teknologi Pangan*. Balai Penelitian Bioteknologi Pangan. Bogor.
- Reed, G. 1975. *Enzymes in Food Processing*. Academic Press. New York. 212.
- Rodwell, V.W. 1987. *Harper's Review of Biochemistry*. EGC Kedokteran. Jakarta.
- Salisbury, F.B. dan Ross, C.W. 1995. *Fisiologi Tumbuhan Jilid 2*. ITB Press. Bandung.
- Scopes, R.K. 1982. *Protein Purification*. Springer Verlag. New York.

- Suhartono, M.T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Dirjen DIKTI, PAU Bioteknologi IPB. Bogor. 322 halaman.
- Suhtanry dan Rubianty, 1985. *Kimia Pangan*. Badan Kerja Sama Perguruan Negeri Indonesia Bagian Timur. Makassar.
- Sutiamiharja N, 2008. *Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Amilase Termofilik dari Sumber Air Panas Gurukinayan Karo Sumatera Utara*. USU Repository. Sumatera Utara.
- Waluyo, L., 2006. *Mikrobiologi Umum*. UMM Press. Malang.
- Weller, P.J., 2003. *Handbook of Pharmaceutical Excipient*, 4th ed., The American Pharmaceutical Ass., Washington DC, 568-570.
- Winarno, F.G., 1986. *Kimia Pangan dan Gizi*, Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Wipradnyadewi PAS. 2005. Isolasi dan identifikasi *Rhizopus oligosporus* pada beberapa inokulum tempe. [http://ejournal.unud.ac.id/abstrak/naskah%20publikasi%20\(ari%20sandhi\).doc](http://ejournal.unud.ac.id/abstrak/naskah%20publikasi%20(ari%20sandhi).doc). Tanggal akses 19 September 2009.
- Wirahadikusuma, M. 1989. *Biokimia Protein, Enzim, dan Asam Nukleat*. Institut Teknologi Bandung. Bandung. 91 halaman.
- Wiseman, A. 1978. *Hand Book of Enzyme Biotechnology*. Ellis Harwood Limited.
- Yang, Z., D. Michael, A. Robert, X.Y. Fang and J.R. Alan. 1996. Polyethylene Glycol-Induced Stabilization of Subtilisin. *Enzyme Microb. Technol.* 18:82-89.