

PENENTUAN KESTABILAN ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus fumigatus* DENGAN MODIFIKASI KIMIA MENGGUNAKAN SITAKONAT ANHIDRIDA

(Skripsi)

Oleh

ANNISA DILA FEBRIYANTI



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2019**

ABSTRAK

PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus fumigatus* DENGAN MODIFIKASI KIMIA MENGGUNAKAN SITRAKONAT ANHIDRIDA

Oleh

Annisa Dila Febriyanti

Enzim α -amilase merupakan enzim yang mampu untuk menghidrolisis pati dengan memutuskan ikatan α -1,4-glikosidik dan banyak digunakan pada proses industri pada pH dan suhu yang ekstrim, namun pada umumnya enzim tidak stabil pada kondisi tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan stabilitas enzim α -amilase dari *Aspergillus fumigatus* dengan modifikasi kimia menggunakan sitrakonat anhidrida. Untuk mencapai tujuan tersebut, telah dilakukan proses isolasi, pemurnian, modifikasi kimia, dan karakterisasi enzim α -amilase hasil pemurnian sebelum dan setelah modifikasi. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas spesifik enzim α -amilase hasil pemurnian sebesar 5.597,597 U/mg meningkat sebanyak 11,21 kali. Enzim hasil pemurnian mempunyai pH 5,5; suhu optimum 50 °C; $K_M = 349,267$ mg/mL substrat; $V_{maks} = 666,667$ μ mol/mL.menit. Uji stabilitas termal enzim α -amilase hasil pemurnian memiliki aktivitas sisa sebesar 5,422% dan nilai $k_i = 0,0485$ menit⁻¹; $t_{1/2} = 14,289$ menit; dan $G_i = 98,691$ kJ/mol. Enzim hasil modifikasi menggunakan sitrakonat anhidrida dengan penambahan 20 μ L memiliki pH optimum 5,5 sedangkan penambahan 30 μ L dan 40 μ L memiliki pH optimum 4,5; suhu optimum untuk ketiga penambahan adalah 55 °C; K_M berturut-turut adalah 77,915; 69,377; dan 70,169 mg/mL substrat; dan V_{maks} berturut-turut adalah 169,491; 129,87; dan 153,846 μ mol/mL.menit. Uji stabilitas termal pada enzim hasil modifikasi dengan variasi penambahan 20, 30, dan 40 μ L selama 60 menit pada suhu 60 °C memiliki aktivitas sisa berturut-turut sebesar 64,762; 86,824; dan 83,384 % dan memiliki nilai k_i berturut-turut adalah 0,0069; 0,0024; dan 0,0028menit⁻¹; $t_{1/2}$ secara berturut-turut adalah 100,435; 288,75; dan 107,798 menit; serta nilai G_i secara berturut-turut adalah 106,27; 108,855; dan 108,455 kJ/mol. Berdasarkan penurunan nilai k_i , peningkatan nilai G_i dan $t_{1/2}$, diketahui bahwa enzim hasil modifikasi kimia menggunakan sitrakonat anhidrida dapat meningkatkan stabilitas enzim α -amilase dibandingkan enzim hasil pemurnian.

Kata kunci : *Aspergillus fumigatus*, Enzim α -Amilase, Modifikasi Kimia, Sitrakonat Anhidrida

ABSTRACT

INCREASED STABILITY OF THE α -AMYLASE OBTAINED FROM *Aspergillus fumigatus* WITH CHEMICAL MODIFICATION USING CITRACONIC ANHYDRIDE

By

Annisa Dila Febriyanti

The α -amylase is an enzyme that is able to hydrolyze starch breaking the α -1,4-glycosidic bond and is widely used in industrial processes at extreme pH and temperature, but in general the enzyme is unstable under these conditions. In this study aims to increased stability of the α -amilase obtained from *Aspergillus fumigatus* with chemical modification using citraconic anhydride. The study include the isolation, purification, chemical modification, and characterization of the purified enzyme before and after modification. The results showed that the α -amylase after purification had a specify activity of 5,597.597 U/mg whose purity increased 11,21 times compared to crude extract. The purified enzyme had a pH of 5.5; optimum temperature of 50 °C; $K_M = 349.267$ mg/mL substrate; and $V_{max} = 666.667$ μ mol/mL.minute. Thermal stability test of the purified enzyme had residual activity of 5.422% and the value of $k_i = 0.0485$ minutes⁻¹; $t_{1/2} = 14.289$ minute; and $G_i = 98.691$ kJ/mol. The enzyme had been modified using cytrakonic anhydride with the addition of 20 μ L have an optimum pH of 5.5 while the addition of 30 and 40 μ L have an optimum pH of 4.5; the optimum temperature for the three additions is 55°C; respectively had $K_M = 77.915$; 69.377; and 70.169 mg/mL substrate; $V_{max} = 169.491$; 129.87; and 153.846 μ mol/mL.minutes. Thermal stability test of the modified enzyme with an additions of 20, 30, and 40 μ L respectively had residual activity 64.762; 86.824; dan 83.384 % and respectively had value of $k_i = 0.0069$; 0.0024; and 0.0028 minutes⁻¹; $t_{1/2} = 100.435$; 288.75; and 107.798 minutes; and also $G_i = 106.27$; 108.855; and 108.455 kJ/mol. Based on the decrease in k_i , increasing in G_i and $t_{1/2}$, indicate that the modified α -amylase using citraconic anhydride is more stable than the purified enzyme.

Keywords: α -Amilase, *Aspergillus fumigatus*, Chemical Modification, Citraco Anhydride

PENENTUAN KESTABILAN ENZIM -AMILASE DARI *Aspergillus fumigatus* DENGAN MODIFIKASI KIMIA MENGGUNAKAN SITAKONAT ANHIDRIDA

Oleh
ANNISA DILA FEBRIYANTI

Skripsi
Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar
SARJANA SAINS

Pada
Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Lampung



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2019**

Judul Skripsi : **PENENTUAN KESTABILAN ENZIM
 α -AMILASE DARI *Aspergillus fumigatus*
DENGAN MODIFIKASI KIMIA
MENGUNAKAN SITRAKONAT ANHIDRIDA**

Nama Mahasiswa : *Annisa Dila Fabriyanti*

No. Pokok Mahasiswa : 1517011124

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Ketua Jurusan Kimia

Pembimbing

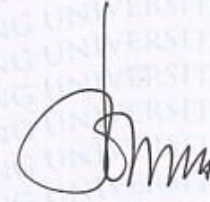
Dr. Eng. Suripto Dwi Yuwono, M.T.
NIP 19740705 200003 1 001

Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S.
NIP 19560905 199203 1 001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

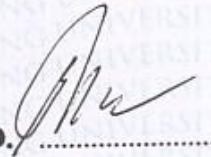
Ketua : **Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S.**



Penguji
Bukan Pembimbing : **Diky Hidayat, M.Sc.**

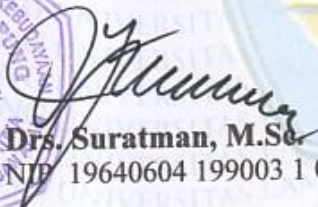


Penguji
Bukan Pembimbing : **Prof. Wasinton Simanjuntak, Ph.D.**

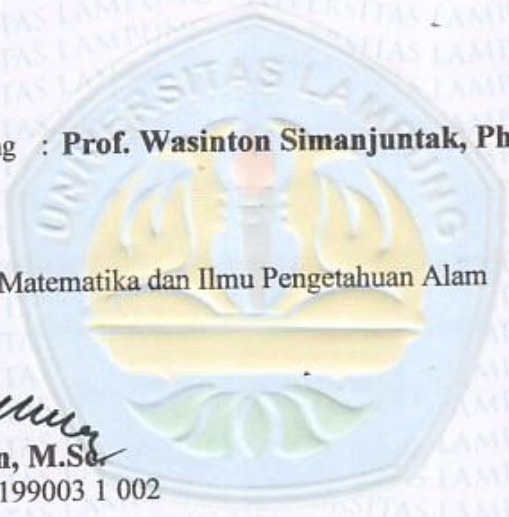


2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Drs. Suratman, M.Sc.
NID 19640604 199003 1 002



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **02 Desember 2019**



**SURAT PERNYATAAN
KEASLIAN SKRIPSI**

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Annisa Dila Febriyanti
Nomor Pokok Mahasiswa : 1517011124
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi saya yang berjudul **“Penentuan Kestabilan Enzim α -Amilase dari *Aspergillus fumigatus* dengan Modifikasi Kimia Menggunakan Sitratonat Anhidrida”** adalah benar karya saya sendiri dan saya tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi sesuai dengan kesepakatan.

Bandar Lampung, Desember 2019



Annisa Dila Febriyanti
NPM 1517011124

RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Bandar Lampung, pada tanggal 07 Februari 1998, anak pertama dari dua bersaudara, putri dari Bapak Nadi Almo dan Ibu Wiwik Erlawati. Jenjang pendidikan diawali dari Taman Kanak-kanak di TK Al-Azhar 16, Bandar Lampung pada tahun 2002 dan diselesaikan pada tahun 2003. Kemudian penulis melanjutkan pendidikan ke jenjang sekolah dasar di SD Al-Azhar 2, Bandar Lampung diselesaikan pada tahun 2009. Sekolah Menengah Pertama di SMP Negeri 14 Bandar Lampung dan diselesaikan pada tahun 2012. Sekolah Menengah Atas di SMA Global Madani dan diselesaikan pada tahun 2015. Pada tahun 2015, penulis terdaftar sebagai Mahasiswa Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung melalui jalur SBMPTN (Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri).

Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif sebagai anggota bidang BUM (Badan Usaha Mandiri) di Organisasi Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung periode 2015/2016. Selain itu, penulis juga pernah menjadi asisten praktikum Biokimia II pada tahun 2018 dan 2019.

Pada bulan Desember 2018, penulis menyelesaikan Praktik Kerja Lapangan di Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Lampung yang diberi judul “Penentuan Kondisi Optimum Enzim α -Amilase dari *Aspergillus fumigatus* Menggunakan Pati Jagung”. Pada tahun yang sama penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) pada tanggal 22 Juli-24 Agustus 2018 di Desa Cahyow Randu. Pada bulan Februari-September 2019, penulis melaksanakan penelitian di Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Lampung.

MOTTO

“Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari sesuatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain). Dan hanya kepada Tuhanmulah engkau berharap.”

(QS. Al-Insyirah,6-8)

“Orang-orang yang sukses telah belajar membuat diri mereka melakukan hal yang harus dikerjakan ketika hal itu memang harus dikerjakan, entah mereka menyukainya atau tidak.”

(Aldus Huxley)

“Dan janganlah kamu berputus asa dari rahmat Allah. Sesungguhnya tiada berputus dari rahmat Allah melainkan orang orang yang kufur”

(QS Yusuf : 87)

“Jangan menyerah walau itu sulit, jangan menangis walau itu sakit”

(No Name, 2015)

“Janganlah kamu bersikap lemah dan janganlah pula kamu bersedih hati, padahal kamulah orang-orang yang paling tinggi derajatnya jika kamu beriman”

(QS Al Imran : 139)

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Dengan Menyebut nama Allah yang Maha pengasih lagi Maha penyayang

*Dengan mengucap Alhamdulillahil'alamin dan segala Kerendahan hati
kupersembahkan karya kecilku ini kepada*

***Kedua orang tuaku, Bapak Nadi Almo dan Ibu Wiwik Erlawati
tercinta Yang telah memberikan kasih sayang, cinta sepanjang masa, dan tak
hentinya berdo'a untukku sepanjang masa***

***Adikku, Fara Dila Puteri, yang selalu memberikan doa serta dukungan dan
Seluruh keluarga besarku yang selalu mendoakan keberhasilanku***

Sahabat, Kerabat, dan Teman-teman yang telah memberikan banyak dukungan

***Dengan penuh rasa hormat kepada Pembimbing Penelitianku, Bapak Prof. Dr.
Jr. Vandri A.S., M.S. yang telah membimbingku sampai menyelesaikan
pendidikan sarjana***

***Almamater Tercinta
Universitas Lampung***

SANWACANA

Assalamualaikum Wr. Wb.

Alhamdulillah puji syukur penulis ucapkan kehadihan Allah S.W.T., serta sholawat dan salam selalu tercurah pada Nabi Besar kita, Nabi Muhammad Saw.

Atas rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi dengan judul, “ **Pengaruh Kestabilan Enzim -Amilase dari *Aspergillus fumigatus* dengan Modifikasi Kimia Menggunakan Sitrakonat Anhidrida** “.

Dalam penyelesaian skripsi ini penulis tidak luput dari bimbingan, arahan, serta bantuan dari berbagai pihak, untuk itu penulis menghanturkan terima kasih kepada:

1. Kedua Orang Tua-ku tercinta Bapak Nadi Almo dan Ibu Wiwik Erlawati, yang tidak pernah berhenti berdo'a dan memohon kepada Allah SWT demi kesuksesan penulis, yang selalu berjuang dan bekerja keras tanpa mengenal lelah sehingga penulis dapat menyelesaikan studi hingga menjadi Sarjana Sains. Terima kasih atas segala perhatian, dukungan, semangat, serta pengorbanan yang luar biasa untuk penulis. Semoga ayah dan mama selalu diberikan keberkahan dan selalu dalam lindungan Allah SWT.
2. Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S., selaku pembimbing utama yang telah banyak memberikan ilmu pengetahuan, gagasan, bimbingan, bantuan,

dukungan, arahan, saran, dan kritik kepada penulis selama penelitian hingga seleainya skripsi ini.

3. Bapak Diky Hidayat, M.Sc. dan Bapak Prof. Dr. Wasington Simanjuntak, M.Sc., Ph.D., selaku pembahas atas kesediaan memberikan arahan, koreksi, saran, dan kritik.
4. Ibu Dr. Nurhasanah, M.Si., selaku pembimbing akademik atas segala bimbingan dan motivasi yang telah di berikan kepada penulis.
5. Bapak Drs. Suratman, M.Sc., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
6. Bapak Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T., selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
7. Seluruh Dosen Universitas Lampung yang telah mendidik dan memberikan ilmu pengetahuan kepada penulis.
8. Seluruh Staf dan Karyawan Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
9. Adikku, Fara Dila Puteri, yang selalu meberikan do'a, semangat,dan dukungan kepada penulis, dan selalu menemani penulis dan kekonyolan dan lawakanmu dalam menyelsaikan skripsi ini, semoga Allah SWT selalu memberikanmu kemudahan dalam menjalani pendidikan.
10. Mbahku, Suyatmi, yang selalu memberikan semangat, do'a, motivasi, dan dorongan untuk penulis.
11. Keluarga besar "Cucu Cicit Mbah Jogo" yang selalu memberikan dukungan, semangat, do'a, dan motivasi kepada penulis.

12. *Partner* “Biokim 15 Pak Yandri”, Nurmala, S.Si., Annisa Mawaddah, S.Si., Siska Rini, S.Si. (soon), yang telah memberikan dukungan, semangat, motivasi, dan dorongan untuk segera menyelesaikan penelitian. Terima kasih untuk segala kebersamaan, keceriaan, dan ketulusan yang terjalin dalam proses penelitian yang telah kita lakukan bersama, sehingga penulis dapat mempersembahkan karya ini. Maaf untuk kesalahan penulis baik yang disengaja maupun yang tidak.
13. Sahabatku, Fitri Sunarsih dan Tri Handayani Surya Ningsih yang telah menemani dalam suka maupun duka. Terima kasih untuk ketulusan, kebersamaan, kekeluargaan, dan keceriaan yang telah kalian bagi bersama penulis. Semoga pesahabatan dan silaturahmi ini dapat selalu terjalin.
14. Rekan-rekan seperjuangan di Laboratorium Biokimia FMIPA Unila yang telah memberikan semangat, dukungan, nasihat, dan batuan kepada penulis. Terima kasih atas kebersamaan selama ini.
15. Keluarga Kimia 2015 (*Chem15try Unila*) terimakasih atas kebersamaan yang telah dilalui dalam kehidupan perkuliahan dari awal PROPTI sampai sekarang. Semoga kita semua dimudahkan dalam berkarir setelah lulus dari kimia.
16. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang secara tulus dan ikhlas memberikan dukungan, do’a, dan bantuannya kepada penulis dalam menyusun skripsi ini.

Akhir kata, penulis memohon maaf apabila skripsi ini masih kurang dari kesempurnaan. Penulis berharap semoga skripsi ini bermanfaat sebagaimana mestinya.

Bandar Lampung, Desember 2019

Annisa Dila Febriyanti

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang.....	1
B. Tujuan Penelitian.....	3
C. Manfaat Penelitian.....	3
II. TINJUAN PUSTAKA	
A. Enzim.....	5
1. Klasifikasi enzim	5
2. Faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim.....	8
B. Enzim -Amilase.....	11
C. <i>Aspergillus fumigatus</i>	12
D. Isolasi dan Pemurnian Enzim	14
1. Sentrifugasi.....	14
2. Fraksinasi dengan Ammonium sulfat.....	14
3. Dialisis	15
4. Pengujian Aktivitas Enzim dengan Metode Fuwa	15
5. Pengujian Aktivitas Enzim dengan Metode Mandels	16
6. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry.....	16
E. Stabilitas Enzim.....	17
1. Stabilitas Termal Enzim	18
2. Stabilitas pH Enzim.....	18
F. Kinetika Reaksi Enzim.....	19

G. Modifikasi Kimia.....	20
--------------------------	----

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian	23
B. Alat dan Bahan	23
C. Prosedur Penelitian	24
1. Pembuatan Media Inokulum dan Fermentasi <i>Aspergillus</i> <i>Fumigatus</i> dan Produksi Enzim -amilase.....	24
a. Pembuatan media inokulum dan fermentasi.....	24
b. Inokulasi <i>Aspergillus fumigatus</i>	24
c. Produksi Enzim -Amilase.....	25
2. Isolasi Enzim -Amilase	25
3. Pemurnian Enzim -Amilase.....	25
a. Fraksinasi dengan Ammonium sulfat.....	25
b. Dialisis.....	26
4. Pembuatan Pereaksi Uji Enzim -Amilase.....	27
a. Pembuatan Pereaksi Untuk Pengujian Aktivitas Enzim -AmilaseMetode Fuwa.....	27
b. Pembuatan Pereaksi Untuk Pengujian Aktivitas Enzim -Amilase Metode Mandels.....	28
c. Pembuatan Peraksi Untuk Pengukuran Kadar Protein Enzim -Amilase Metode Lowry.....	28
5. Uji Aktivitas Unit Enzim -Amilase dengan Metode Fuwa	28
6. Uji Aktivitas Enzim -Amilase dengan Metode Mandels.....	29
7. Penentuan kadar protein metode Lowry	29
8. Modifikasi Kimia.....	30
9. Karakterisasi Enzim Sebelum dan Sesudah Modifikasi	31
a. Penentuan pH Optimum	31
b. Penentuan Suhu Optimum.....	31
c. Penentuan Nilai K_M dan V_{maks}	31
d. Penentuan Stabilitas Termal dan Stabilitas pH Enzim	32
e. Penentuan Waktu Paruh ($t_{1/2}$), Kontanta Laju Inaktivasi (k_i), dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi (G_i).....	32

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Isolasi Enzim -Amilase	34
B. Pemurnian Enzim -Amilase	35
1. Fraksinasi enzim dengan ammonium sulfat.....	35
2. Dialisis	37

C. Karakterisasi Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Modifikasi	38
1. Penentuan pH optimum enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi.....	38
2. Penentuan suhu optimum enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi	40
3. Penentuan stabilitas enzim optimum enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi	42
4. Penentuan K_M dan V_{maks} optimum enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi	44
D. Konstanta Laju Inaktivasi Termal (k_i), Waktu Paruh ($t_{1/2}$), dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi (G_i) Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Modifikasi	47
1. Waktu paruh ($t_{1/2}$) dan konstanta laju inaktivasi termal (k_i)	48
2. Perubahan energi akibat denaturasi (G_i).....	49
V. SIMPULAN DAN SARAN	
A. Simpulan	50
B. Saran.....	51
DAFTAR PUSTAKA	52

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Pemurnian enzim α -amilase dari <i>Aspergillus fumigatus</i>	38
2. Nilai V_{maks} dan K_M enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi.....	46
3. Nilai konstanta laju inaktivasi termal (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi	48
4. Hubungan antara kejenuhan ammonium sulfat (0-100)% dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>Aspergillus fumigatus</i>	59
5. Hubungan antara kejenuhan ammonium sulfat (0-10)% dan (10-95)% dengan aktivitas spesifik α -amilase dari <i>Aspergillus fumigatus</i>	59
6. Hubungan antara pH dengan aktivitas unit enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi	60
7. Hubungan antara pH dengan aktivitas sisa enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi	60
8. Hubungan antara suhu dengan aktivitas unit enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi	61
9. Hubungan antara suhu dengan aktivitas sisa enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi	61
10. Hubungan antara aktivitas unit enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi selama inaktivasi termal 60 °C yang selanjutnya enzim diinkubasi dalam suhu optimum (enzim pemurnian pada suhu 50 °C dan enzim modifikasi pada suhu 55 °C)	62

11. Hubungan antara aktivitas sisa enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi selama inaktivasi termal 60 °C yang selanjutnya enzim diinkubasi dalam suhu optimum (enzim pemurnian pada suhu 50 °C dan enzim modifikasi pada suhu 55 °C)	62
12. Data untuk penentuan nilai K_M dan V_{maks} enzim α -amilase hasil pemurnian berdasarkan persamaan <i>Lineweaver-Burk</i>	63
13. Data untuk penentuan nilai K_M dan V_{maks} enzim α -amilase hasil modifikasi berdasarkan persamaan <i>Lineweaver-Burk</i>	63
14. Penentuan konstanta laju inaktivasi termal (k_i) enzim hasil pemurnian pada suhu 60 °C	64
15. Penentuan konstanta laju inaktivasi termal (k_i) enzim hasil modifikasi pada suhu 60 °C	64
16. Absorbansi glukosa pada berbagai konsentrasi.....	69
17. Kurva Standar BSA.....	70

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Hubungan aktivitas enzim dengan pH	8
2. Hubungan kecepatan reaksi dengan suhu.....	9
3. Hubungan antara laju reaksi dengan konsentrasi enzim	10
4. Hubungan konsentrasi substrat dengan laju reaksi enzim.....	10
5. Struktur amilosa ikatan -1,4-glikosidik.....	12
6. Struktur amilopektin pada pati	12
7. <i>Aspergillus fumigatus</i>	13
8. Diagram Lineweaver-Burk.....	19
9. Modifikasi gugus amina suatu residu lisin dalam protein oleh sitrakonat anhidrida.....	22
10. Reaksi sitrakonat anhidrida dan gugus amina.....	22
11. Skema proses pengendapan protein dengan penambahan garam ammonium sulfat.....	26
12. Diagram alir penelitian	33
13. Hubungan antara kejenuhan ammonium sulfat (0-100)% dengan aktivitas enzim spesifik enzim -amilase dari <i>Aspergillus fumigatus</i> ...	36
14. Hubungan antara kejenuhan ammonium sulfat (0-10)% dan (10-95)% dengan aktivitas enzim spesifik enzim -amilase dari <i>Aspergillus fumigatus</i>	37
15. pH optimum enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi sitrakonat anhidrida dengan penambahan 20, 30, dan 40 μ L.....	39

16. Suhu optimum enzim hasil pemurnian dan enzim modifikasi sitrakonat anhidrida dengan penambahan 20,30, dan 40 μL	41
17. Stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi sitrakonat anhidrida dengan penambahan 20,30, dan 40 μL	43
18. Grafik <i>Lineweaver-Burk</i> enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi menggunakan sitrakonat anhidrida dengan penambahan 20, 30, dan 40 μL	45
19. Grafik $\ln(E_i/E_o)$ enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi.....	47
20. Kurva Standar Glukosa	69
21. Kurva Standar BSA.....	70

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Data aktivitas enzim α -amilase pada pengendapan dengan menggunakan garam ammonium sulfat dalam berbagai konsentrasi	59
2. Hubungan antara pH dengan aktivitas unit (U/mL) dan aktivitas sisa (%) enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi	60
3. Hubungan antara suhu dengan aktivitas unit (U/mL) dan aktivitas sisa (%) enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi	61
4. Stabilitas termal enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi.....	62
5. Data penentuan nilai K_M dan V_{maks} enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi	63
6. Data penentuan konstanta laju inaktivasi termal (k_i) enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi.....	64
7. Data perhitungan G_i enzim hasil pemurnian.....	65
8. Data perhitungan G_i enzim hasil modifikasi sitrakonat anhidrida 20 μ L	66
9. Data perhitungan G_i enzim hasil modifikasi sitrakonat anhidrida 30 μ L	67
10. Data perhitungan G_i enzim hasil modifikasi sitrakonat anhidrida 40 μ L	68
11. Kurva Standar Glukosa	69
12. Kurva Standar BSA.....	70

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Enzim merupakan biokatalisator yang mampu dihasilkan oleh semua makhluk hidup untuk mengkatalisis reaksi-reaksi yang terjadi di dalam tubuh agar dapat berjalan lebih cepat. Hal ini menyebabkan banyak perusahaan tertarik untuk menggunakan enzim sebagai senyawa katalis untuk mempercepat proses produksi serta mengembangkan produk. Produksi dan perdagangan enzim didominasi oleh kelompok enzim hidrolitik seperti amilase, protease, katalase dan lipase (Kosim, 2009). Enzim α -amilase merupakan salah satu enzim yang paling banyak diminati, seperti dalam industri pengolahan makanan dan minuman, industri kertas, industri tekstil, industri detergen, bioetanol, serta pengolahan limbah cair. Kebutuhan α -amilase sendiri sangat besar, yaitu sekitar 30% dari produksi enzim dunia. Sebab itu, meskipun telah banyak diisolasi dan dikristalisasi, eksplorasi sumber α -amilase yang lebih efisien masih dibutuhkan (Mareel *et al.*, 2002).

Enzim α -amilase merupakan enzim yang dapat menghidrolisis pati menjadi monomer yang lebih sederhana (Winarno, 2002). Enzim α -amilase mampu memutuskan ikatan α -1,4-glikosidik pada bagian dalam rantai secara acak

(Kunamneni *et al.*, 2005). Enzim untuk kebutuhan produksi dapat diekstraksi dari berbagai jenis mikroorganisme, khususnya jamur. Enzim pada jamur disekresikan ke luar sel, sehingga memudahkan proses isolasi dan pemurniannya. Enzim ekstraseluler yang dihasilkan mampu untuk mendegradasi senyawa organik kompleks yang akan larut dan diserap oleh jamur (Hidayat *et al.*, 2018). Jamur dalam kelompok *Aspergillus* memiliki kemampuan fermentasi yang baik dan sekresi protein tingkat tinggi, sehingga organisme ini dapat dimanfaatkan dengan baik dalam bidang industri (Evstatieva *et al.*, 2010).

Enzim yang digunakan dalam industri haruslah stabil pada suhu dan pH yang ekstrim, namun pada kenyataannya enzim mudah terdenaturasi dan kehilangan sifat katalitiknya (Goddette *et al.*, 1993). Metode yang digunakan untuk meningkatkan stabilitas enzim umumnya ada tiga, yaitu amobilisasi, mutagenesis terarah, dan modifikasi kimia (Mozhaev *and* Martinek, 1984). Modifikasi kimia adalah metode yang paling sering digunakan dalam proses peningkatan stabilitas enzim. Hal ini karena modifikasi enzim cocok untuk enzim yang memiliki bobot molekul rendah dan salah satu metode yang cocok untuk meningkatkan stabilitas enzim yang larut dalam air (Janecek, 1993). Salah satu senyawa yang dapat digunakan untuk membentuk ikatan silang dalam molekul protein adalah senyawa bifungsional. Senyawa bifungsional mengandung dua gugus fungsional reaktif dengan rekatifitas yang setara terhadap rantai samping asam amino atau basa DNA yang sama (Wong *and* Jameson, 2012).

Metode modifikasi kimia menggunakan sitrakonat anhidrida telah dilakukan oleh Suwarso (2015) pada enzim protease dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148. Data penelitian yang diperoleh berupa peningkatan stabilitas enzim yang memiliki suhu optimum enzim hasil pemurnian 50 °C pada pH 6,5 dan pada enzim modifikasi suhu optimum 55 °C dan pH 7,0. Hasil tersebut sama dengan hasil yang dilaporkan oleh Khasanah (2017) yang telah mengisolasi enzim protease dari *Rhizopus oligosporus* yang dimodifikasi kimia dengan sitrakonat anhidrida. Sedangkan penelitian yang dilakukan Amalia (2016) telah berhasil meningkatkan stabilitas enzim selulase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 yang dimodifikasi kimia menggunakan sitrakonat anhidrida. Dalam penelitian diperoleh hasil berupa peningkatan stabilitas enzim yang memiliki pH optimum 6,0 dan suhu optimum enzim hasil pemurnian 40 °C dan pada enzim modifikasi 50 °C. Hal ini menunjukkan bahwa modifikasi kimia dapat meningkatkan kestabilan enzim terhadap suhu dan pH.

Pada penelitian ini akan dilakukan modifikasi kimia enzim α -amilase yang diisolasi dari *Aspergillus fumigatus* menggunakan sitrakonat anhidrida dan diharapkan akan diperoleh peningkatan stabilitas enzim setelah dimodifikasi seperti pada penelitian sebelumnya.

B. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memperoleh enzim α -amilase hasil isolasi dan pemurnian dari *Aspergillus fumigatus* dengan aktivitas dan tingkat kemurnian yang tinggi.

2. Meningkatkan stabilitas enzim α -amilase dari *Aspergillus fumigatus* melalui modifikasi kimia menggunakan sitrakonatan anhidrida sehingga diperoleh enzim yang memiliki tingkat kestabilan terbaik yang dapat digunakan dalam bidang industri.

C. Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memperoleh informasi tentang cara meningkatkan stabilitas enzim α -amilase dengan modifikasi kimia.
2. Memperoleh informasi mengenai stabilitas enzim α -amilase dari *Aspergillus fumigatus* melalui modifikasi kimia menggunakan sitrakonatan anhidrida.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Enzim

Enzim adalah protein yang mampu mengkatalisis reaksi-reaksi biokimia dalam sel dengan konsentrasi yang sangat rendah (Kuchel *and* Gregory, 2002). Enzim memiliki berat molekul yang beraneka ragam berkisar $10^4 - 10^7$ KDa (Dryer, 1993). Selain itu enzim mampu mempercepat reaksi $10^3 - 10^{12}$ kali lipat lebih cepat dibandingkan dengan reaksi yang tidak dikatalisis oleh katalis (Ngili, 2008). Hal ini menyebabkan enzim banyak digunakan sebagai biokatalisator dalam sel dan sifatnya sangat khas, karena enzim hanya bekerja pada substrat tertentu dan bentuk reaksi tertentu (Poedjiadi, 2006).

Keuntungan lainnya dari enzim adalah dapat bekerja pada kondisi yang ramah (*mild*), sehingga dapat menekan konsumsi energi (suhu dan tekanan tinggi).

Hal ini menyebabkan reaksi yang dikatalisis enzim menjadi lebih efisien dibandingkan dengan reaksi yang dikatalisis oleh katalisis kimia (Misset *et al.*, 1993).

1. Klasifikasi Enzim

Menurut Montgomery (1993) klasifikasi enzim dapat dibedakan sebagai berikut:

a. Berdasarkan tipe reaksi yang diketahui, enzim dibagi menjadi enam kelompok, yaitu:

1. Oksidoreduktase

Enzim oksidoreduktase adalah enzim yang dapat mengkatalisis reaksi oksidasi atau reduksi suatu bahan. Pada golongan enzim ini terdapat 2 macam enzim yang paling utama yaitu oksidase dan dehidrogenase. Oksidase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi antara substrat dengan molekul oksigen. Dehidrogenase adalah enzim yang aktif dalam pengambilan atom hidrogen dari substrat.

2. Transferase

Enzim transferase adalah enzim yang ikut serta dalam reaksi pemindahan (transfer) suatu gugus.

3. Hidrolase

Enzim hidrolase merupakan kelompok enzim yang sangat penting dalam pengolahan pangan, yaitu enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis suatu substrat atau pemecahan substrat dengan pertolongan molekul air. Enzim-enzim yang termasuk dalam golongan ini diantaranya adalah amilase, invertase, selulase dan sebagainya.

4. Liase

Enzim liase adalah enzim yang aktif dalam pemecahan ikatan karbon-karbon, karbon sulfur, dan karbon nitrogen (tidak termasuk ikatan peptida). Nama trivial lainnya adalah dekarboksilase, aldolase, sintase, sitratliase dan dehidratase.

5. Isomerase

Enzim isomerase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi perubahan konfigurasi molekul dengan cara pengaturan kembali atom-atom substrat, sehingga dihasilkan molekul baru yang merupakan isomer dari substrat atau dengan perubahan isomer posisi misalnya mengubah aldosa menjadi ketosa.

6. Ligase

Enzim ligase adalah enzim yang mengkatalisis pembentukan ikatan-ikatan tertentu, misalnya pembentukan ikatan C-C, C-O dan C-S dalam biosintesis koenzim A serta pembentukan ikatan C-N dalam sintesis glutamin.

b. Berdasarkan tempat bekerjanya enzim dibedakan menjadi dua kelompok, yaitu :

1. Endoenzim, disebut juga enzim intraseluler, yaitu enzim yang bekerja di dalam sel.
2. Eksoenzim, disebut juga enzim ekstraseluler, yaitu enzim yang bekerja di luar sel (Montgomery, 1993).

c. Berdasarkan cara terbentuknya dibedakan menjadi dua kelompok, yaitu :

1. Enzim konstitutif, yaitu enzim yang jumlahnya dipengaruhi kadar substratnya, misalnya enzim amilase.
2. Enzim adaptif, yaitu enzim yang pembentukannya dirangsang oleh adanya substrat, contohnya enzim -galaktosidase yang dihasilkan

oleh bakteri *E. Coli* yang ditumbuhkan di dalam medium yang mengandung laktosa (Lehninger, 2005).

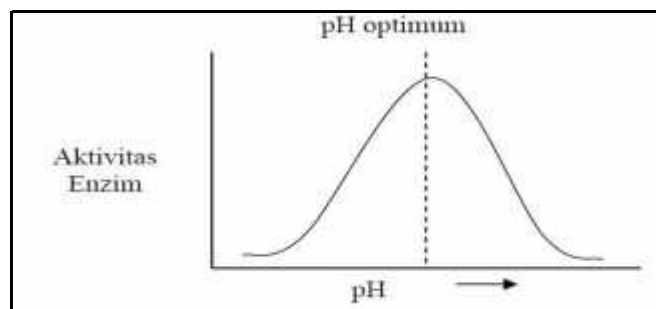
2. Faktor yang mempengaruhi kerja enzim

Kerja enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain :

a. pH

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

Perubahan kereaktifan enzim diperkirakan merupakan akibat dari perubahan pH lingkungan (Winarno, 2002). Perubahan pH dapat mempengaruhi asam amino kunci pada sisi aktif, sehingga menghalangi sisi aktif enzim membentuk kompleks dengan substratnya (Page, 1997), ditunjukkan pada Gambar 1.



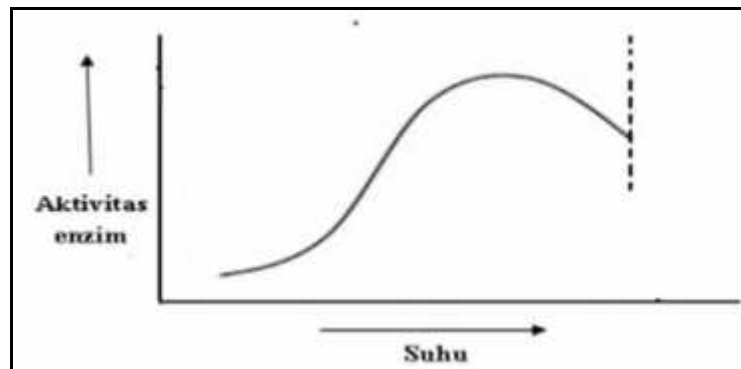
Gambar 1. Hubungan kecepatan reaksi dengan pH (Winarno, 2002).

b. Suhu

Enzim mempercepat terjadinya reaksi kimia pada suatu sel hidup. Dalam batas-batas suhu tertentu, kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim akan naik bila suhunya naik. Reaksi yang paling cepat terjadi pada suhu optimum (Rodwell, 2011). Suhu optimum merupakan suhu pada saat

enzim memiliki aktivitas maksimum. Suhu yang terlalu tinggi (jauh dari suhu optimum suatu enzim) akan menyebabkan enzim terdenaturasi.

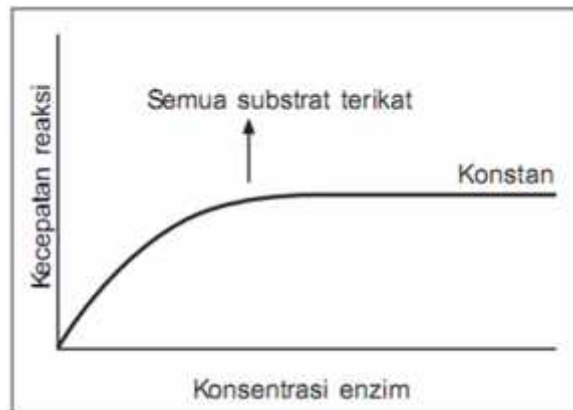
Bila enzim terdenaturasi, maka bagian aktifnya akan terganggu yang menyebabkan konsentrasi efektif enzim menjadi berkurang. Hal ini menyebabkan laju reaksi enzimatik menurun (Poedjiadi, 2006). Pada suhu 0 °C enzim menjadi tidak aktif dan dapat kembali aktif pada suhu normal (Lay dan Sugyo, 1992). Hubungan antara aktivitas enzim dengan suhu ditunjukkan dalam Gambar 2.



Gambar 2. Hubungan aktivitas enzim dengan suhu (Rodwell, 2011).

c. Konsentrasi enzim

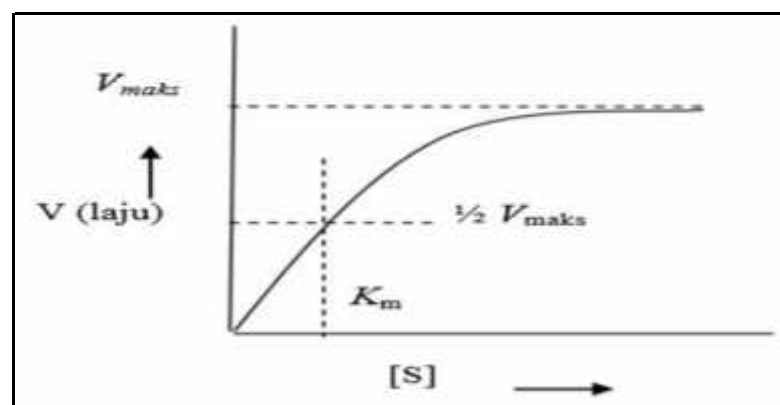
Konsentrasi enzim secara langsung mempengaruhi kecepatan reaksi enzimatik dimana kecepatan reaksi meningkat dengan bertambahnya konsentrasi enzim (Poedjiadi dan Supriyatin, 2009). Kecepatan reaksi tersebut meningkat secara linier selama konsentrasi enzim jauh lebih sedikit daripada konsentrasi substrat. Hal ini biasanya terjadi pada kondisi fisiologis (Page, 1997). Hubungan antara kecepatan reaksi enzim dengan konsentrasi enzim ditunjukkan dalam Gambar 3.



Gambar 3. Hubungan antara kecepatan reaksi dengan konsentrasi enzim (Page, 1997).

d. 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 laju reaksi (Lehninger, 1982). Hubungan antara konsentrasi substrat dengan laju reaksi enzim ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Hubungan konsentrasi substrat dengan laju reaksi enzim (Shahib, 2005).

e. Aktivator dan inhibitor

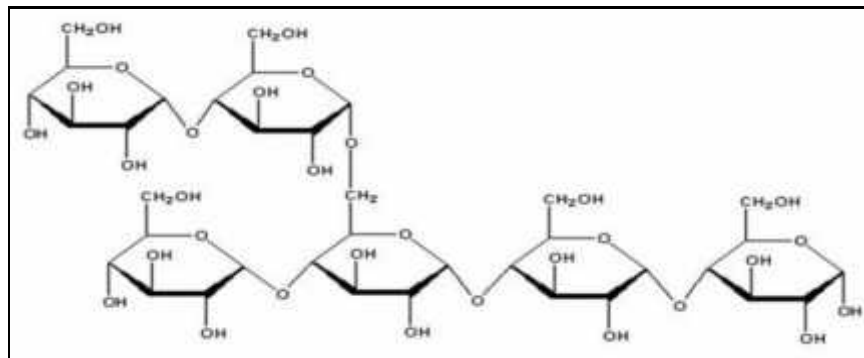
Beberapa enzim memerlukan aktivator dalam reaksi katalisnya. Aktivator adalah senyawa atau ion yang dapat meningkatkan kecepatan reaksi enzimatik. Komponen kimia yang membentuk enzim disebut juga kofaktor. Kofaktor tersebut dapat berupa ion-ion anorganik seperti Zn, Fe, Ca, Mn, Cu, Mg atau dapat pula sebagai molekul organik kompleks yang disebut koenzim (Martoharsono, 1993).

Menurut Wirahadikusumah (1977), inhibitor merupakan suatu zat kimia tertentu yang dapat menghambat aktivitas enzim. Pada umumnya cara kerja inhibitor adalah dengan menyerang sisi aktif enzim sehingga enzim tidak dapat berikatan dengan substrat dan fungsi katalitik enzim tersebut akan terganggu (Winarno, 2002).

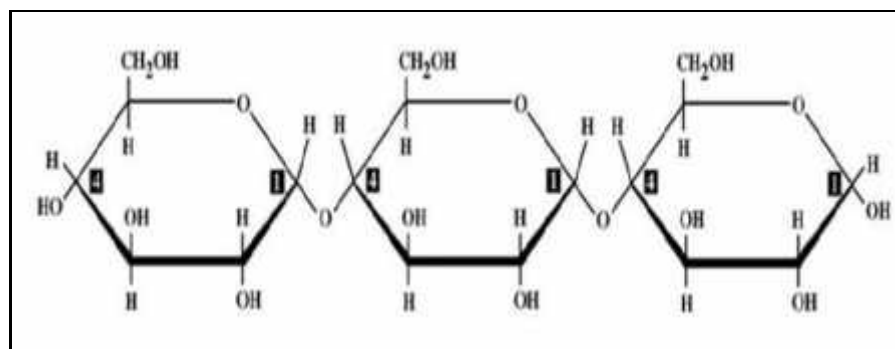
B. Enzim -Amilase

Enzim -amilase (α -1,4-D-glukan-4-glukanohidrolase, EC 3.2.1.1) berperan dalam hidrolisis amilum dengan memecah ikatan α -1,4 glikosida dan melewati ikatan α -1,6 untuk menghasilkan glukosa, maltosa dan maltodekstrin lainnya. Struktur amilosa dan amilopektin pada pati ditunjukkan pada Gambar 5 dan Gambar 6. Enzim ini banyak digunakan dalam hidrolisis pati untuk sirup dan minuman, yang umumnya diperoleh dari *Aspergillus oryzae*, *Bacillus amyloliquifaciens*, dan *B. Licheniformis* (Khoo *et al.*, 1994; Nigam *and* Singh, 1995). Disamping itu, dalam industri tekstil digunakan enzim amilase untuk menghilangkan pati dan juga digunakan sebagai aditif dalam detergen (Shaw, 2008). Enzim ini menyumbang sekitar

30% dari total produksi enzim dunia dan mempunyai aplikasi yang luas di dalam industri. Enzim α -amilase membutuhkan ion kalsium (Ca^{2+}) untuk aktivitas, integritas struktural dan untuk stabilitasnya (Bordbar *and* Omidian, 2005).



Gambar 5. Struktur amilosa ikatan α -1,4-glikosidik



Gambar 6. Struktur amilopektin pada pati (Fessenden dan Fessenden,1986).

C. *Aspergillus fumigatus*

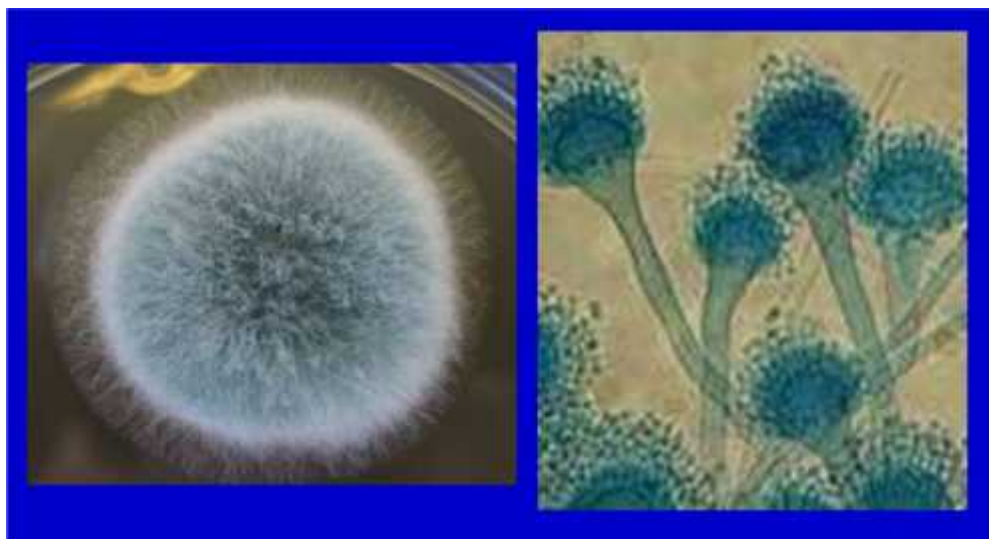
Menurut Bennett *and* Klich (1992), klasifikasi *Aspergillus fumigatus* adalah sebagai berikut:

Kerajaan : Fungi

Filum :Ascomycota

Kelas :Ascomycetes
Ordo :Eurotiales
Keluarga :Trichocomaceae
Genus : *Aspergillus*
Spesies : *Aspergillus fumigatus*

Hasil pengamatan secara makroskopis menunjukkan bahwa *Aspergillus fumigatus* memiliki ciri-ciri yaitu, memiliki koloni yang berwarna hijau tua dengan bentuk koloni granular dan kompak. Hal ini sesuai dengan Elmer *et al.* (1978) yang mengatakan, pada isolat murni dalam media SDA *Aspergillus fumigatus* memiliki koloni berwarna hijau. Jamur ini mensekresikan enzim ke luar sel sehingga memudahkan proses isolasi dan pemurniannya. Enzim ekstraseluler yang dihasilkan mampu untuk mendegradasi senyawa organik kompleks yang akan diserap oleh jamur (Hidayat *et al.*, 2018). Jamur *Aspergillus fumigatus* ditunjukkan pada Gambar 7.



Gambar 7. *Aspergillus fumigatus*

D. Isolasi dan Pemurnian Enzim

Tahapan proses pengisolasian dan pemurnian enzim adalah sebagai berikut:

1. Sentrifugasi

Sentrifugasi digunakan untuk memisahkan sel dari enzim ekstraseluler.

Hasil yang didapat dari sentrifugasi berupa supernatan dan endapan yang berada di ujung dasar tabung. Pada proses sentrifugasi sebaiknya dilakukan pada suhu 2-4 °C. Hal ini dikarenakan pada prosesnya, sentrifugasi akan menimbulkan panas yang dapat menyebabkan denaturasi pada enzim (Suhartono, 1989).

Prinsip sentrifugasi berdasarkan pada kenyataan bahwa setiap partikel yang berputar pada laju sudut yang konstan akan memperoleh gaya keluar. Besar gaya ini bergantung pada laju sudut dan radius pertukarannya.

Dalam praktiknya, alat sentrifugasi dioperasikan dengan laju rpm (Cooper, 1997; Sariningsih, 2000).

2. Fraksinasi dengan ammonium sulfat

Fraksinasi merupakan proses pengendapan secara bertahap. Pengendapan ini dapat dilakukan dengan penambahan garam seperti natrium klorida, natrium sulfat, atau ammonium sulfat. Pada umumnya garam yang sering digunakan adalah ammonium sulfat karena kebanyakan enzim tahan terhadap garam ini (tidak terdenaturasi, memiliki kelarutan yang besar, mempunyai daya pengendapan yang besar, dan mempunyai efek penstabil terhadap kebanyakan enzim). Konsentrasi garam dapat mempengaruhi

kelarutan enzim. Semakin tinggi konsentrasi garam, maka kelarutan protein enzim akan semakin rendah dalam air (Suhartono *et al.*, 2002).

3. Dialisis

Dialisis adalah suatu metode yang digunakan untuk memisahkan garam dari larutan protein enzim. Tahap awal proses dialisis ini, yaitu memasukkan larutan enzim yang telah di fraksinasi ke dalam membran (selofan). Jika kantong yang berisi larutan enzim dimasukkan ke dalam buffer, maka molekul kecil yang ada di dalam larutan enzim akan keluar melewati pori- pori membran. Hal ini disebabkan distribusi ion-ion yang ada di dalam dan di luar kantong dialisis tidak seimbang. Sedangkan molekul protein yang berukuran besar akan tetap berada dalam kantong dialisis. Untuk mencapai keseimbangan maka dapat dilakukan dengan cara mengganti larutan penyangga secara berkala sampai ion-ion dalam kantong dialisis dapat diabaikan (Lehninger, 1982).

4. Pengujian aktivitas enzim dengan metode Fuwa

Aktivitas enzim α -amilase dapat dilakukan dengan menggunakan metode Fuwa (Fuwa, 1954). Metode ini didasarkan pada pengurangan jumlah pati yang terdeteksi dengan terbentuknya warna biru akibat penambahan iodin. Warna tersebut akan menyerap cahaya monokromatis pada panjang gelombang maksimum 600 nm (Fuwa, 1954; Fessenden dan Fessenden, 1986). Keuntungan metode Fuwa yaitu lebih spesifik untuk mengidentifikasi aktivitas enzim dengan waktu reaksi yang singkat selama

10 menit inkubasi dan pati digunakan sebagai substratnya. Semakin kecil absorbansi sampel maka semakin baik aktivitas dari enzim tersebut.

5. Pengujian aktivitas amilase dengan metode Mandels

Aktivitas enzim α -amilase dapat dilakukan dengan menggunakan metode Mandels (Mandels *et al.*, 1976). Metode ini didasarkan pembentukan produk (glukosa) hasil hidrolisis substrat pati yang akan mengalami oksidasi setelah penambahan reagen DNS menghasilkan larutan berwarna merah. Warna tersebut akan menyerap cahaya monokromatis pada panjang gelombang maksimum 510 nm (Fessenden dan Fessenden, 1986). Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan menggunakan kurva standar glukosa (Mandels *et al.*, 1976). Semakin tinggi absorbansi sampel semakin baik aktivitasnya. Selain digunakan sebagai uji aktivitas enzim α -amilase metode Mandels dapat juga digunakan dalam penentuan data kinetika enzim α -amilase yaitu nilai K_M , V_{maks} , $t_{1/2}$, k_i , dan G_i (Ferialiana, 2011).

6. Penentuan kadar protein dengan metode Lowry

Kadar protein dapat ditentukan dengan menggunakan metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Metode ini didasarkan pada pembentukan kompleks Cu^{2+} dengan ikatan peptida yang akan tereduksi menjadi Cu^+ pada kondisi basa, Cu^+ dan rantai samping tirosin, triptofan, dan sistein akan bereaksi dengan reagen *folin-coiocalteu*. 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.

Metode ini relatif sederhana dan murah, serta dapat diandalkan dalam mendeteksi kadar kadar protein dalam sampel. Namun, metode ini memiliki kelemahan yaitu sensitif terhadap perubahan pH dan konsentrasi protein yang rendah. Untuk mengatasi hal tersebut dapat dilakukan dengan menggunakan volume sampel yang sangat kecil sehingga tidak mempengaruhi reaksi.

E. Stabilitas Enzim

Stabilitas enzim merupakan salah satu faktor penting dalam proses penyimpanan dan penggunaan enzim sebagai biokatalisator. Stabilitas enzim dapat diartikan sebagai kestabilan aktivitas enzim terhadap berbagai senyawa yang bersifat merusak enzim seperti pelarut tertentu (asam atau basa) dan oleh pengaruh suhu dan pH yang ekstrim (Junita, 2002). Ada dua cara yang dapat ditempuh untuk mendapatkan enzim yang mempunyai stabilitas tinggi, yaitu menggunakan enzim yang memiliki stabilitas enzim alami dan mengusahakan peningkatan stabilitas enzim yang secara alami kurang atau tidak stabil (Junita, 2002). Metode yang dapat digunakan untuk meningkatkan stabilitas enzim antara lain adalah dengan penggunaan zat adiktif, modifikasi kimia, amobilisasi, dan rekayasa protein (Illanes, 1999).

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).

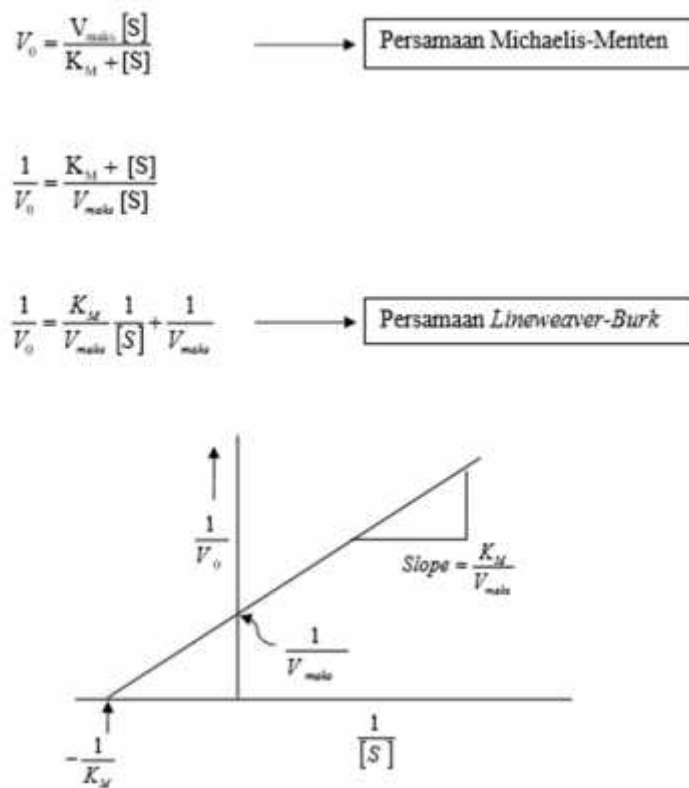
2. Stabilitas pH enzim

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, 2002).

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

Parameter dalam kinetika reaksi enzim adalah konstanta *Michaelis-Menten* (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}). K_M merupakan konstanta yang menunjukkan afinitas enzim terhadap substrat. Semakin kecil harga K_M maka interaksi enzim dan substrat semakin baik dan laju reaksi semakin cepat. Bila konsentrasi substrat cukup besar sehingga semua enzim terikat kepadanya dalam bentuk kompleks enzim-substrat, maka akan didapat laju reaksi maksimum, V_{maks} (Wirahadikusumah, 1977). Nilai K_M suatu enzim dapat dihitung dengan persamaan *Lineweaver-Burk* yang diperoleh dari persamaan *Michaelis-Menten* yang kemudian dihasilkan suatu diagram *Lineweaver-Burk* (Page, 1997) yang dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Diagram *Lineweaver-Burk* (Suhartono, 1989)

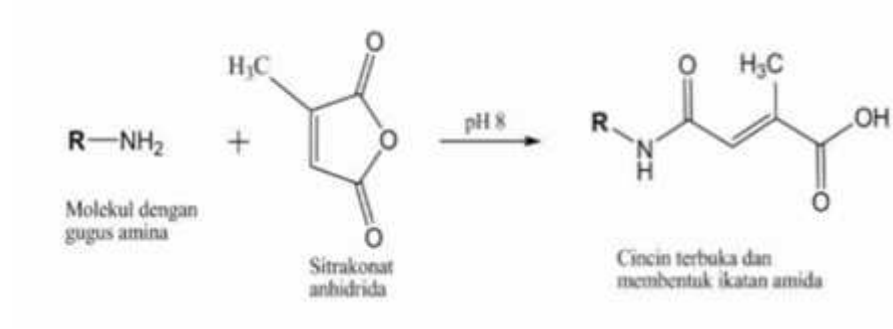
G. Modifikasi Kimia

Metode yang dapat digunakan untuk meningkatkan stabilitas enzim pada umumnya ada tiga, yaitu amobilisasi, mutagenesis terarah, dan modifikasi kimia (Mozhaev *and* Martinek, 1984). Metode peningkatan stabilitas enzim yang paling disukai adalah modifikasi enzim. Hal ini karena modifikasi enzim cocok untuk enzim yang memiliki bobot molekul rendah dan salah satu metode yang cocok untuk meningkatkan stabilitas enzim yang larut dalam air (Janecek, 1993). Dibandingkan amobilisasi enzim, modifikasi kimia tidak terjadi penghambatan massa transfer massa oleh matriks pengamobil sehingga menyebabkan terjadinya penurunan kapasitas peningkatan maupun reaktivitas enzim. Sedangkan pada mutagenesis terarah diperlukan informasi yang lengkap mengenai struktur primer dan struktur tiga dimensi enzim tersebut (Mozhaev *and* Martinek, 1984).

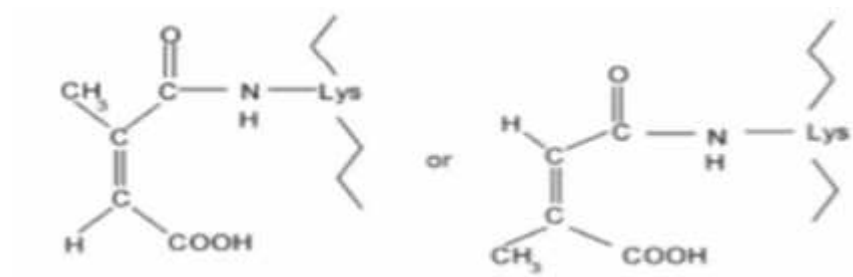
Proses modifikasi kimia dilakukan dengan cara menginkubasi larutan enzim dengan larutan pemodifikasi. Enzim yang telah termodifikasi dapat dipisahkan dari campurannya dengan cara dialisis atau kromatografi kolom penyaring molekul. Berdasarkan struktur enzim, gugus fungsi yang kemungkinannya paling besar bereaksi dengan zat pemodifikasi adalah gugus fungsi yang terletak pada permukaan. Sedangkan gugus amino dari lisin merupakan gugus paling banyak dilibatkan, karena gugus ini paling melimpah dan paling mudah didekati dari rantai samping asam amino suatu enzim (Janecek, 1993).

Menurut Mozhaev *et al.* (1984), enzim hasil modifikasi kimia dengan ikatan kovalen yang stabil dapat diperoleh dengan melakukan (1) modifikasi dengan menggunakan pereaksi biofungsional (pembentukan ikatan silang antara gugus-gugus fungsi pada permukaan protein), (2) modifikasi kimia dengan menggunakan pereaksi non polar (meningkatkan interaksi hidrofobik), (3) menambahkan gugus polar bermuatan atau polar baru (menambahkan ikatan ionik atau hidrogen), serta (4) hidrolifisasi permukaan protein (mencegah terjadinya kontak antara gugus hidrofobik dengan lingkungan berair yang tidak disukai). Hidrofilisasi permukaan protein dapat dilakukan dengan dua cara modifikasi langsung berbagai asam amino hidrofobik yang membentuk tapak-tapak hidrofobik pada permukaan enzim dengan pereaksi hidrofilik, atau hidrofilisasi terhadap asam amino yang berada dekat dengan tapak hidrofobik sehingga tapak tersebut terlindungi dari lingkungan berair (Nubarov *et al.*, 1987).

Pada penelitian yang telah dilakukan oleh Khajeh *et al.* (2004), sitrakonatanhidrida merupakan reagen spesifik yang digunakan untuk memblokir gugus amino pada residu lisin, modifikator ini menghasilkan dua produk ikatan yang dibentuk dari gugus karbonil pada struktur molekulnya. Reaksi modifikasi ini diawali dengan pembukaan cincin sitrakonatanhidrida dengan suasana basa yakni pada pH 8 dan kemudian karbonil dari sitrakonatanhidrida berikatan dengan gugus amino pada residu lisin (Khajeh *et al.*, 2004). Reaksi ditunjukkan pada Gambar 9 dan Gambar 10.



Gambar 9. Modifikasi gugus amina suatu residu lisin dalam protein oleh sitrakonat anhidrida (Khajeh *et al.*, 2004).



Gambar 10. Reaksi sitrakonat anhidrida dan gugus amina (Nubarov *et al.*, 1987).

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan pada bulan Mei – Agustus 2019 di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain alat-alat gelas, jarum ose, pembakar spritus, mikropipet *ependorff*, neraca analitik, spatula, batang pengaduk, sentrifuga, *autoclave* model S-90N, lemari pendingin, *shaker incubator (orbit environ shaker)*, *waterbath*, *laminar air flow* CURMA model 9005-FL, pH meter, termometer, *magnetic stirrer*, dan spektrofotometer *UV-Vis* Hitachi U2010.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , MgSO_4 , $\text{FeCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CoCl_2 , CaCl_2 , pati jagung, pepton, urea, akuades, larutan amilum, larutan BSA (*Bovine Serum Albumin*), Na_2CO_3 , NaOH , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, reagen *follin ciocalteau*, Na/K

tartarat, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , pereaksi iodin, HCl 1N, KI, DNS (3,5-Dinitrosalicylic acid), TNBS (2,4,6-trinitrobenzene-sulfonat acid), NaCl, NaSO_3 , fenol, ammonium sulfat, sitrkonat anhidrida, kantong selofan, dan kertas saring.

Mikroorganisme penghasil enzim α -amilase yang digunakan dalam penelitian ini adalah jamur *Aspergillus fumigatus* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Universitas Lampung.

C. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan media inokulum dan fermentasi, inokulasi *Aspergillus fumigatus* dan produksi enzim α -amilase

a. Pembuatan media inokulum dan fermentasi

Media inokulum dan fermentasi yang digunakan terdiri dari (g L^{-1}) 0,14% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2% KH_2PO_4 , 0,03% urea, 0,03% MgSO_4 , 0,0005% $\text{FeCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,00014% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0002% CoCl_2 , 0,03% CaCl_2 , 0,75% pati jagung, dan 0,075% pepton dilarutkan dalam 100 mL larutan penyangga fosfat 0,2 M pH 5,0. Media ini disterilisasi pada tekanan 1 atm dengan suhu 121°C selama kurang lebih 15 menit dalam *autoclave*.

b. Inokulasi *Aspergillus fumigatus*

Biakan *Aspergillus fumigatus* sebanyak 1-3 ose dari media agar miring dipindahkan ke dalam media inokulum secara aseptik, lalu dikocok dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 35°C selama 24 jam.

c. Produksi enzim -amilase

Media inokulum sebanyak 2% dari jumlah media fermentasi dipindahkan ke dalam media fermentasi secara aseptik, kemudian diletakkan dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 35 °C selama 96 jam.

2. Isolasi enzim -amilase

Ekstrak kasar enzim -amilase dipisahkan dari sel jamur dengan disentrifugasi dingin selama 20 menit dengan kecepatan 5000 rpm (Yandri *et al.*, 2010). Selanjutnya filtrat yang diperoleh dapat diuji aktivitasnya dengan metode Fuwa dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.

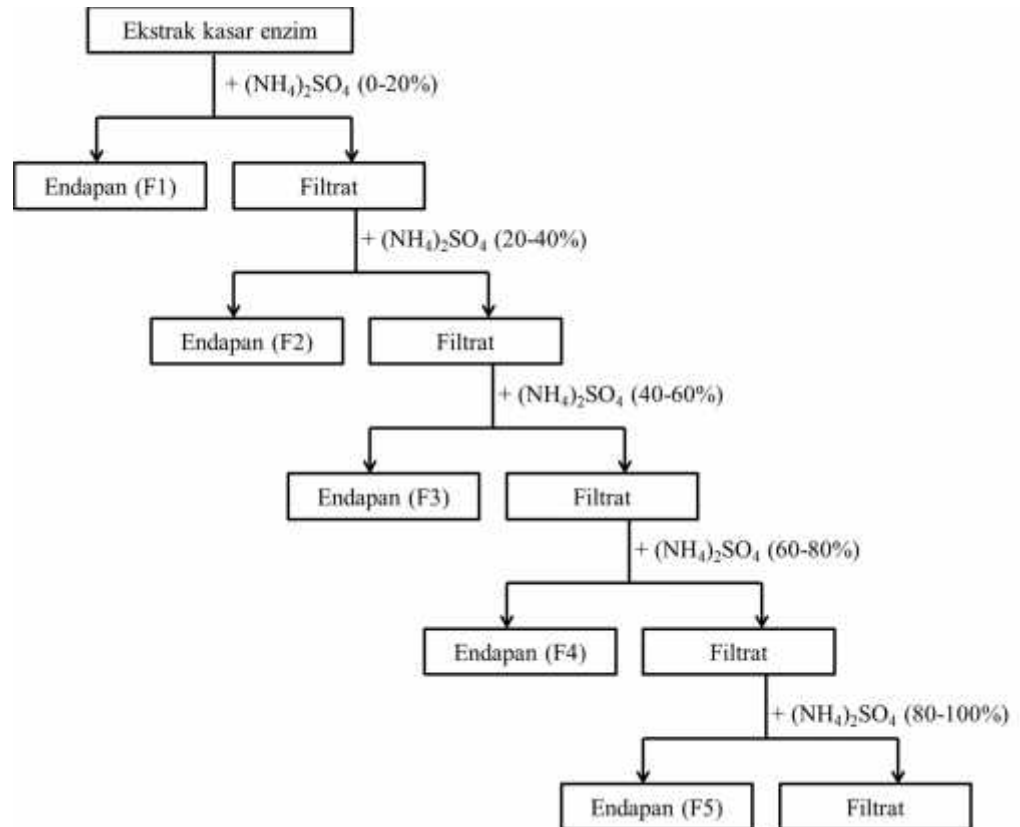
3. Pemurnian enzim -amilase

a. Fraksinasi dengan ammonium sulfat

Ekstrak kasar enzim yang telah didapatkan difraksinasi dengan menggunakan amonium sulfat pada derajat kejenuhan yaitu w/v (0 - 20)%, (20 - 40)%, (40 - 60)%, (60 - 80)%, dan (80 -100)%. Sejumlah ekstrak kasar enzim yang diperoleh ditambahkan garam ammonium sulfat yang telah dihaluskan secara perlahan sambil diaduk menggunakan *magnetic stirer* pada suhu 4 °C. Endapan protein enzim yang didapatkan pada tiap fraksi kejenuhan amonium sulfat (Gambar 11), dipisahkan dari filtratnya dengan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit.

Kemudian endapan yang diperoleh dilarutkan dengan larutan penyangga fosfat 0,1 M pH 5,0 dan diuji aktivitasnya dengan metode Fuwa dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry untuk mengetahui pada

fraksifikasi mana terdapat enzim -amilase dengan aktivitas spesifik yang tinggi. Skema proses pengendapan protein enzim dengan penambahan garam ammonium sulfat ditunjukkan pada Gambar 11.



Gambar 11. Skema proses pengendapan protein enzim dengan penambahan garam ammonium sulfat

b. Dialisis

Endapan enzim yang telah dilarutkan dari tiap fraksi amonium sulfat dengan aktivitas spesifik tertinggi dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis dengan larutan penyangga fosfat 0,01 M pH 5,0 selama 24 jam pada suhu dingin (4-5 °C) (Pohl, 1990). Selama dialisis, dilakukan pergantian buffer setiap 4-6 jam sekali agar konsentrasi ion-ion di dalam kantong dialisis dapat dikurangi. Proses ini dilakukan terus menerus hingga tidak ada amonium sulfat yang

tersisa. Pengujian adanya amonium sulfat dalam larutan penyangga fosfat dilakukan dengan menambahkan larutan BaCl_2 . Proses ini dihentikan sampai tidak terbentuk endapan putih pada saat penambahan BaCl_2 . Selanjutnya dilakukan uji aktivitas dengan metode Fuwa, serta diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.

4. Pembuatan pereaksi uji enzim -amilase

a. Pembuatan pereaksi untuk pengujian aktivitas enzim -amilase metode Fuwa

1. Pereaksi iodin

2 g KI dimasukkan dalam labu takar 100 mL dan dilarutkan dalam 10 mL akuades. Selanjutnya ditambahkan 0,2 g I_2 dan ditambahkan akuades hingga tanda miniskus.

2. Larutan pati

0,1 g pati jagung dilarutkan dalam 100 mL akuades dan dipanaskan hingga mendidih dan larut.

3. Larutan larutan penyangga fosfat

27,8 gram NaH_2PO_4 dilarutkan dalam 1000 mL akuades (Larutan stok A) pada labu takar 1000 mL dan dalam labu ukur 1000 mL, 53,65 gram $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam 1000 mL akuades (Larutan stok B).

b. Pembuatan pereaksi untuk pengujian aktivitas enzim -amilase metode Mandels

Ke dalam labu ukur 100 mL, dimasukkan 1% NaOH, 1 mL Na(K) tartrat 40%, 1% DNS (*dinitrosalisilic acid*), 0,2% fenol dan 0,05%

Na_2SO_3 kemudian dilarutkan dengan 100 mL akuades hingga tanda batas.

c. Pembuatan pereaksi untuk pengujian kadar protein dengan 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
kedalam 5 mL larutan Na/K-tartarat 1 %.

Pereaksi C : 2 mL pereaksi B + 100 mL pereaksi A

Pereaksi D : reagen *folin ciocalteau* diencerkan dengan akuades
1:1.

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

5. Uji aktivitas unit enzim -amilase dengan metode Fuwa

Metode Fuwa digunakan untuk mengetahui aktivitas enzim -amilase berdasarkan pengurangan jumlah substrat (pati). Sebanyak 0,25 mL enzim ditambahkan ke dalam 0,25 mL larutan pati 0,1% lalu diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 0,25 mL HCl 1 N dan kemudian ditambahkan 0,25 mL pereaksi iodin dan 4 mL akuades. Lalu campuran diaduk rata dan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 600 nm. Kontrol dibuat dengan cara yang sama namun, enzim diinaktivasi terlebih dahulu menggunakan HCl 1N.

6. Penentuan aktivitas enzim α -amilase menggunakan metode Mandels

Metode ini berdasarkan glukosa yang terbentuk (Mandels *et al.*, 1976).

Sebanyak 0,5 mL enzim, 0,5 mL larutan pati 0,1% dan larutan penyangga fosfat pH 6,5 dicampur lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 60°C. Kemudian ditambahkan 2 mL pereaksi DNS (*dinitrosalicylic acid*) dididihkan selama 10 menit pada penangas air dan didinginkan. Setelah dingin, campuran tersebut diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 510 nm. Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan dengan menggunakan kurva standar glukosa. Uji ini dilakukan pada tahap penentuan K_M dan V_{maks} .

7. Penentuan kadar protein metode Lowry

Metode Lowry digunakan untuk mengetahui kadar protein dalam enzim. Sebanyak 0,1 mL enzim dicampurkan dalam 0,9 mL akuades dan 5 mL pereaksi C. Campuran dikocok hingga rata dan didiamkan selama 10 menit. Selanjutnya, ditambahkan pereaksi D sebanyak 0,5 mL dan dikocok hingga rata. Larutan didiamkan selama 30 menit dan dapat diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 750 nm (Ferialiana, 2011; Lowry *et al.*, 1951). Untuk kontrol enzim diganti menggunakan akuades. Penentuan konsentrasi protein enzim digunakan kurva standar BSA (*Bovine*

Serum Albumin) yang diukur pada panjang gelombang 280 nm berdasarkan persamaan regresi linier.

8. Modifikasi Kimia

Residu lisin pada suatu enzim secara spesifik dapat dimodifikasi dengan sitrkonat anhidrida yang prosedurnya telah dilaporkan oleh Khajeh *et al.* (2004). Sebanyak 10 mL enzim hasil pemurnian dalam 10 ml larutan penyangga fosfat pH 8 ditambahkan reagen sitrkonat anhidrida sebanyak 20 μ L secara bertahap. Setiap penambahan reagen, pH larutan dijaga konstan pada pH 8 dengan menambahkan larutan NaOH 2 M, lalu diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 60 menit. Penambahan reagen sitrkonat anhidrida dilakukan dengan variasi volume sebagai berikut: 20, 30, 40 μ L dan dilakukan dengan prosedur yang sama.

9. Karakterisasi enzim sebelum dan sesudah modifikasi

a. Penentuan pH optimum

Untuk mengetahui pH optimum enzim sebelum dan sesudah dimodifikasi digunakan larutan penyangga fosfat 0,05 M dengan pH bervariasi, yaitu 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5 dan 8. Suhunya dijaga tetap pada 60°C. Kemudian dilanjutkan dengan pengukuran aktivitas enzim dengan metode Mandels.

b. Penentuan suhu optimum

Sedangkan untuk mengetahui suhu optimum, digunakan suhu yang bervariasi yaitu 45; 50; 55; 60; 65; 70; 75 dan 80°C dengan pH

optimum yang telah ditentukan. Selanjutnya dilakukan pengukuran aktivitas enzim dengan metode Mandels.

c. Penentuan nilai K_M dan V_{maks}

Konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) enzim sebelum dan sesudah modifikasi ditentukan dari kurva *Lineweaver-Burk*. Kurva *Lineweaver-Burk* dibuat dengan menguji aktivitas enzim α -amilase dengan variasi konsentrasi substrat 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 dan 1,25 % dalam larutan penyangga fosfat pH 5,5 dan suhu 50°C selama 60 menit. Selanjutnya diukur aktivitas enzim dengan metode Mandels.

d. Penentuan stabilitas termal dan stabilitas pH enzim (Yang *et al.*, 1996)

Uji kestabilan termal enzim sebelum dan sesudah modifikasi dilakukan dengan mengukur aktivitas sisa enzim setelah diinkubasi selama 0, 10, 20, 30, 40, 50 dan 60 menit pada pH dan suhu optimumnya (Virdianingsih, 2002).

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

e. Penentuan waktu paruh ($t_{1/2}$), konstanta laju inaktivasi (k_i), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i)

Penentuan nilai k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi kimia dilakukan dengan menggunakan persamaan kinetika inaktivasi orde 1:

$$\ln (E_i/E_0) = -k_i t$$

Sedangkan untuk perubahan energi akibat denaturasi (G_i) enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi kimia dilakukan dengan menggunakan persamaan :

$$G_i = -RT \ln (k_i h / k_B T)$$

Keterangan :

R = konstanta gas ($8,315 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

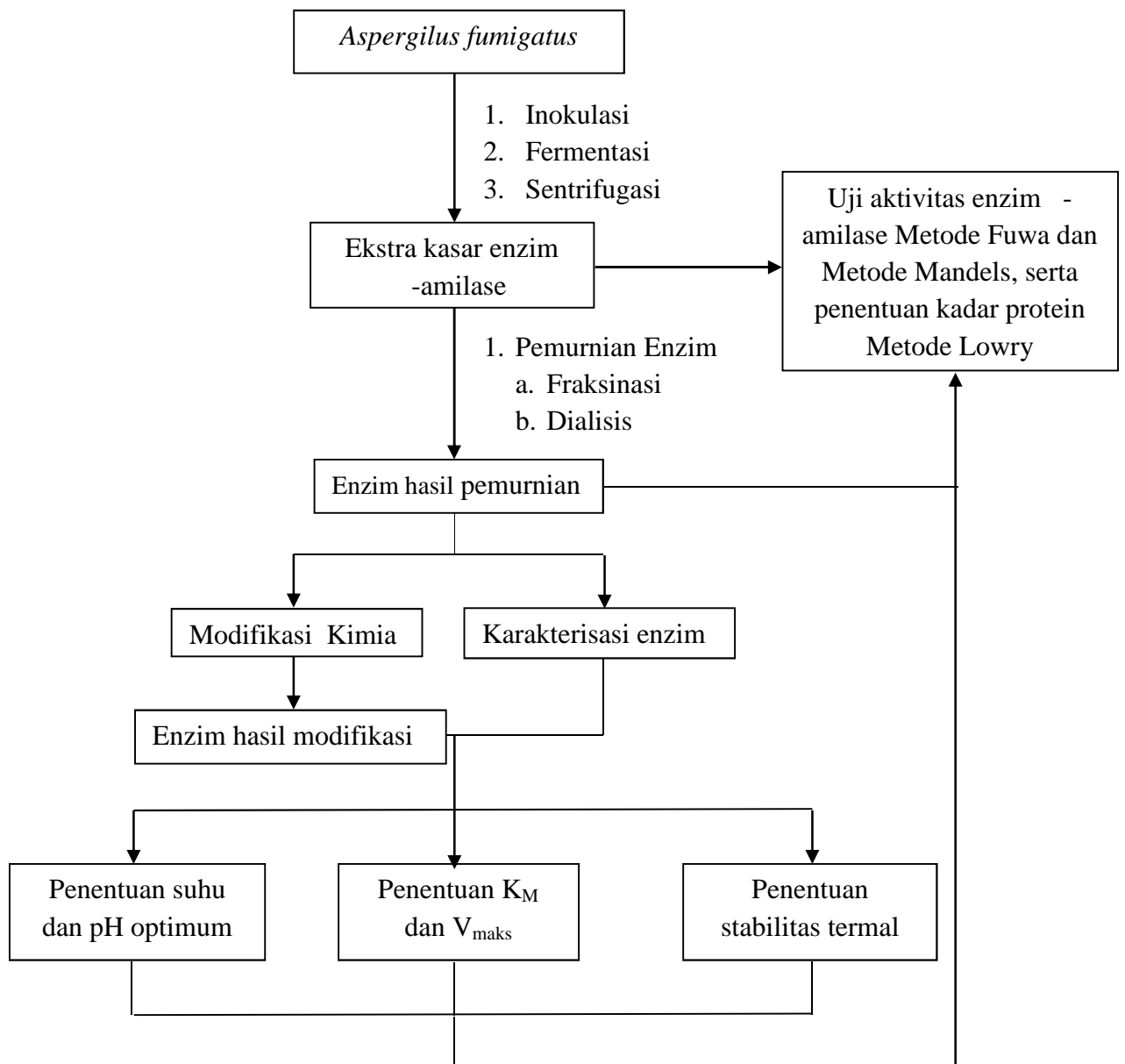
T = suhu absolut (K)

k_i = konstanta laju inaktivasi termal

h = konstanta Planck ($6,63 \times 10^{-34} \text{ J det}$)

k_B = konstanta Boltzman ($1,381 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$)

Secara keseluruhan, penelitian ini terangkum dalam diagram alir penelitian yang ditunjukkan dalam Gambar 12.



Gambar 12. Diagram alir penelitian

V. SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Dari pembahasan hasil penelitian ini dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Aktivitas spesifik enzim α -amilase hasil pemurnian sebesar 5.597,597 U/mg meningkat sebanyak 11,21 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim yang mempunyai aktivitas spesifik 499,287 U/mg.
2. Enzim hasil pemurnian mempunyai pH optimum 5,5; suhu optimum 50 °C; $K_M = 349,267$ mg/mL substrat; $V_{maks} = 666,667$ μ mol/mL.menit. Uji stabilitas termal pada suhu 60 °C selama 60 menit memiliki aktivitas sisa 5,422% dan nilai $k_i = 0,0485$ menit⁻¹; $t_{1/2} = 14,289$ menit; dan $G_i = 98,691$ kJ/mol.
3. Enzim hasil modifikasi menggunakan sitrkonat anhidrida dengan penambahan 20 μ L memiliki pH optimum 5,5 sedangkan penambahan 30 μ L dan 40 μ L memiliki pH optimum 4,5 ; suhu optimum untuk ketiga penambahan adalah 55 °C ; nilai K_M berturut-turut adalah 77,915; 69,377; dan 70,169 mg/mL substrat; nilai V_{maks} berturut-turut adalah 169,492; 129,87; dan 153,846 μ mol/mL.menit.

4. Uji stabilitas termal enzim hasil modifikasi menggunakan sitrakonat anhidrida dengan variasi penambahan 20, 30, dan 40 μL selama 60 menit pada suhu 60 $^{\circ}\text{C}$ memiliki aktivitas sisa berturut-turut sebesar 64,762; 86,824; dan 83,384 % dan memiliki nilai k_i secara berturut-turut adalah 0,0069; 0,0024; dan 0,0028 menit^{-1} ; $t_{1/2}$ secara berturut-turut adalah 100,435; 288,75 dan; 247,5 menit; serta nilai G_i secara berturut-turut adalah 105,338; 108,032; dan 107,798 kJ/mol .
5. Modifikasi kimia enzim α -amilase dari jamur *Aspergillus fumigatus* menggunakan sitrakonat anhidrida dapat menstabilkan enzim pada pH yang lebih asam dibandingkan enzim hasil pemurnian dan dapat meningkatkan suhu dan stabilitas termal enzim lebih baik dibandingkan enzim hasil pemurnian. Penurunan nilai k_i , peningkatan waktu paruh dan nilai G_i menunjukkan bahwa enzim modifikasi lebih stabil dibandingkan enzim sebelum modifikasi, sehingga dapat digunakan dalam proses industri yang membutuhkan lingkungan ekstrim.

B. Saran

Dari pembahasan hasil penelitian yang diperoleh, maka disarankan dalam proses modifikasi kimia menggunakan sitrakonat anhidrida digunakan konsentrasi yang lebih tinggi agar perbedaan antara enzim pemurnian dan enzim modifikasi dapat terlihat lebih kentara, serta mencari senyawa pemodifikasi lain untuk meningkatkan stabilitas pH enzim pada kondisi lingkungan yang lebih basa.

DAFTAR PUSTAKA

- Amalia, P. 2016. Peningkatan Kestabilan Enzim Selulase dari Bakteri Lokal *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dengan Modifikasi Kimia Menggunakan Sitrakonat Anhidrida. *Tesis*. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Bennett, J.W. and M.A. Klich. 1992. *Aspergillus fumigatus*. University of Wisconsin.http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2008/miller_melo/Classification.htm. Diakses 10 Februari 2019.
- Bordbar, K. and R.H. Omidian. 2005. Study On Interaction of α -amylase from *Bacillus subtilis* With Cetyl trimethylammonium bromide, Colloids Surf. B. *Biointerfaces*. **40**: 67-71.
- Cooper, T.G. 1997. *The Tool of Biotechnology*. John Wiley and Sons. Canada.
- Dryer, R.L. 1993. *Biokimia Jilid 1*. UGM Press. Yogyakarta. 180-181.
- Eijsink, G.H., B. Burg, G. Sirgit, and T. Vedel . 2005. Directed Evolution of Enzyme Stability. Biomolecular Engineering. *Elsevier Science Inc*. New York. 21-30.
- Elmer, W.K., G. D. Roberts, and S.E. Wright. 1978. *Practical Laboratory Mycologi 2nd Edition*. The Williams and wilkins co. United States of Amerika. 7-96.
- Evstatieva, Y., D. Nikolova, L. Getov, S. Ilieva, and V. Savov. 2010. Identification and characterization of α -amylase and endoxylanase produced by *Aspergillus* mutant strains. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. **24**(2): 613-617.
- Fessenden, R.J. dan J.S. Fessenden. 1986. *Kimia Organik Edisi Ketiga Jilid 2, Alih Bahasa: Aloysius Hadyana Pudjaatmaka, Ph.D*. Erlangga. Jakarta.

- Feraliana. 2011. Amobilisasi Enzim -Amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dengan menggunakan Karboksi Metil Sephadex C-50 (CM-Sephadex C50). *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Fuwa, H. 1954. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylase as the substrate. *Journal of Biochemistry*. 583-603.
- Goddette, D.W., T. Cristianson, B.F. Ladin, M. Lau, J.R. Mielenz, C. Paech, , R.B. Reynold, S.S. Yang, and C.R. Wilson. 1993. Strategy and Implementation of A System for Protein Engineering. *Journal of Biotechnology*. **28**: 41-54
- Hidayat, N., I. Meitiniarti, S. Setyahadi, U. Pato, E. Susanti, M.C. Padaga, A.K. Wardani, dan U. Purwandari. 2018. *Mikrobiologi Industri Penelitian*. Universitas Brawijaya Press. Malang.
- Illanes, A. 1999. *Stability of Biocatalysts*. *Electronic Journal of Biotechnology*. Universitas Catolica de Valparaiso. Chile.
- Janecek, S. 1993. Strategies for Obtaining Stabel Enzymes. *Process Biochemistry*. **28**: 435-445.
- Junita, 2002. Mempelajari Stabilitas Termal Enzim Protease dari *Bacillus stearothermophilus* Dalam Pelarut Heksana, Toluena, dan Benzena. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Kazan, D., H. Ertan, and A. Erarslan. 1997. Stabilization of *Escherichia coli* Penicillin G Acylase againsts thermal Inactivation by Cross-linking with Dextran Dialdehyde Polymers. *Application of Microbiol Biotechnol*. **48**: 191-197.
- Khajeh, K., E.H. Azadeh, and N.G. Mohsen. 2004. Chemical Modification of Lysine Residue in *Bacillus lincheniformis* -Amylase : Conversion of An Endo to Exo Type Enzyme. *Journal Of Biochemistry and Molecular Biology*. **37**: 642-647.
- Khasanah, K. 2017. Modifikasi Kimia Enzim Protease dari *Rhizopus oligosporus* Menggunakan Sitrakonat Anhidrida. *Skripsi*. Universitas Lampung. Bandar Lampung.

- Khoo, S.L., A.A. Abdullah, M. Kamaruzzaman, and N. Najimudin. 1994. Purification And Characterization of α -Amylase from *Aspergillus flavus*. *Folia Microbial. Journal Of Biochemistry and Molecular Biology*. **39**: 392-298.
- Kosim, M. dan S.R. Putra. 2009. Pengaruh Suhu Pada Protease Dari *Bacillus substilis*. ITS Press. Surabaya.
- Kuchel, P.W. and B.R. Gregory. 2002. *Biokimia, Alih Bahasa: Eva Lealajari, S.Si*. Erlangga. Jakarta.
- Kunamneni, A., K. Permaul, and S. Singh. 2005. Amylase Production in Solid State Fermentation by The Thermophilic Fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **100**(2): 168-171.
- Lay, B. W. dan H. Sugyo. 1992. *Mikrobiologi*. Rajawali Pers. Jakarta. 107-112.
- Lehninger, A.L. 1982. *Dasar-Dasar Biokimia*. Alih bahasa oleh Maggy Thenawidjaya. Erlangga. Jakarta.
- Lowry, O. H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry*. 193-265.
- Maarel, M., B.V. Veen, J. Uitdeehag, H. Leemhuis, and L. Dijkhvizen. 2002. Properties and application of starch converting enzymes α -amylase family. *Journal of Biotechnology*. **94**: 137-155.
- Mandels, M., A. Raymond, and R. Charles. 1976. *Measurement of saccharifying Cellulase. Biotech and Bioeng. Sym. No. 6*. John Willey and Sons. New York.
- Martoharsono, S. 1993. *Biokimia*. Jilid I. UGM-Press. Yogyakarta. 81-83.
- Misset, O., K.E. Jaeger, S. Ransae, B.W. Dijkstra, and M.V. Heuvel. 1993. Bacterial Lipase. *FEMs Microbiology*. **65**: 81-89.
- Montgomery, R. 1993. *Biokimia*. UGM Press. Yogyakarta. 181-182.
- Mozhaev, V. V. and K. Martinek. 1984. Structure-stability relationship in proteins: New approaches to stabilizing enzymes. *Enzyme Microbiology Technology*. **6**: 50-59

- Ngili, Y. 2008. *Mikrobiologi*. Graha Ilmu. Yogyakarta. 282-283.
- Nigam, P. and D. Singh. 1995. Enzyme and Microbial System Involved in Starch Processing Enzyme Microb. *Technology*. **17**: 570-573.
- Nubarov, N.S., V.V. Mozheav, V.A. Siksni, and K. Martinek. 1987. Enzyme Stabilization of α -Chymotrypsin by Reductive Alkylation with Glyoxylic Acid. *Biotechnology*. **9**: 725-730.
- Page, D.S. 1997. *Prinsip-Prinsip Biokimia*. Erlangga. Jakarta. 465.
- Poedjiadi, A. 2006. *Dasar-Dasar Biokimia*. UI Press. Jakarta. 155, 158-160.
- Poedjiadi, A. dan T. Supriyanti. 2009. *Dasar-Dasar Biokimia Edisi Revisi*. UI Press. Jakarta.
- Pohl, T. 1990. Concentration of protein removal of salute in M.P. Deutscher, Methods of Enzymology: Guide to Protein Purification. *Academic Press*. New York.
- Rodwell, V.W. 2011. *Harper's Review of Biochemistry*. EGC Kedokteran. Jakarta.
- Romualdo, A., Wuryanti, dan Suprihati. 2010. Uji Aktivitas Isolat L-Asparaginase dari Rimpang Temulawak Terhadap Sel Hela. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*. **13**(2): 41-45.
- Sariningsih, R. 2000. Produksi Enzim Protease Oleh *Bacillus subtilis* BAC-4. *Skripsi*. Universitas Padjajaran. Bandung.
- Shahib, M.N. 2005. *Biologi Molekuler Medik I*. Universitas Padjajaran Press. Bandung.
- Shaw. 2008. Purification And Properties of An Extracellular α -Amylase From *Thermus* sp. <http://ejournal.sinica.edu.tw/bbas/content/1995/3/bot36308.html>. Tanggal akses 17 Februari 2019.
- Soemitro, S. 2005. Pengaruh Modifikasi Kimiawi Selektif Terhadap kestabilan α -amilase dari *Saccharomycopsis fibuligera*. *Journal of Bionature*. **7** (3) : 259-273.
- Suhartono, M.T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. PAU IPB. Bogor.

- Suhartono, M.T., A. Suwanto, dan H. Widjaja. 1992. Diklat Struktur dan Biokimiawi Protein. *Penelitian Antar Universitas*. IPB. Bogor.
- Suwarso, N. 2015. Peningkatan Kestabilan Enzim Protease dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dengan Modifikasi Kimia Menggunakan Sitratkonat Anhidrida. *Tesis*. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Viridianingsih, R. 2002. Mempelajari Stabilitas Termal Enzim Protease dari *Bacillus pumilus* y1 dalam Pelarut Heksana, Toluena, dan Benzena. *Skripsi*. Institute Pertanian Bogor. Bogor.
- Wagen, E.S. 1984. Strategies for Increasing The Stability of Enzymes, in *Enzyme Engineering*. The New York Academy of Sciences. New York. 1-19.
- Winarno, F.G. 2002. *Kimia Pangan dan Gizi*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Wirahadikusumah, M. 1977. *Biokimia: Protein, Enzim dan Asam Nukleat*. ITB. Press. Bandung.
- Wong, Donna L. and D.M. Jameson. 2012. *Chemistry of Protein and Nucleic Acid Cross-Linking and Conjugation Alih Bahasa: Agus Sutarna*. NY. New York.
- Yandri, A.S. 2004. Karakterisasi dan Modifikasi Kimia α -amilase dari Bakteri Isolat Lokal *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dengan Modifikasi Kimia Menggunakan Dimetiladipimidat. *Disertasi*. Institut Teknologi Bandung. Bandung
- Yandri, A.S., S. Hadi, D. Herasari, and T. Suhartati. 2009. The effect of chemical modification on the thermal stability of protease from local isolate bacteria, *Bacillus subtilis* ITBCCB148. *Nature and Science*. **7**(2): 68-75.
- Yandri, A.S., S. Hadi, R. Rachmawati, and T. Suhartati. 2014. The Chemical Modification of Cellulase from Locale Bacteria Isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148 with Glyoxylic Acid. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. **8**(5): 3675-3680.
- Yandri, A.S. dan T. Suhartati. 2018. *Peningkatan Kestabilan Enzim*. Aura. Bandar Lampung.

- Yandri, A.S. dan P. Wulandari. 2009. Pengaruh penambahan sorbitol terhadap stabilitas termal enzim α -amilase dari *Rhizopus oryzae*. *Jurnal Sains MIPA*. **15**(2): 111-118.
- Yandri, A.S., S. Hadi, and T. Suhartati. 2010. Purification and characterization of extracellular α -amilase enzyme from locale bacteria isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148. *Journal of Scientific Research*. **39** (1): 64-74.
- Yang, Z., M. Domach, A. Robert, X. Y. Fang, and J.R. Alan. 1996. Polyethylene Glycol-Induced Stabilization of Subtilisin. *Enzyme Microbial Technology*. **18**: 82-89.