

PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus fumigatus* DENGAN PENAMBAHAN GLUTARALDEHID

(Skripsi)

Oleh

LILY NUR SAFITRI



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2022**

ABSTRAK

PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus fumigatus* DENGAN PENAMBAHAN GLUTARALDEHID

Oleh

Lily Nur Safitri

Pada penelitian ini, telah dilakukan penambahan glutaraldehid pada enzim α -amilase yang diisolasi dari *A. fumigatus*. Ekstrak kasar enzim dimurnikan dengan fraksinasi menggunakan amonium sulfat, dan dialisis. Aktivitas enzim ditentukan dengan metode Fuwa, dan metode Mandels. Kadar protein ditentukan dengan metode Lowry. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas spesifik α -amilase hasil pemurnian sebesar 520,51 U/mg, meningkat 8,93 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar yang mempunyai aktivitas spesifik sebesar 58,31 U/mg. Enzim hasil pemurnian mempunyai pH optimum 5; suhu optimum 55°C; $K_M = 10,80$ mg/mL substrat dan $V_{maks} = 10,13 \mu\text{mol/mL}^{-1}$ menit⁻¹. Uji stabilitas termal enzim hasil pemurnian pada suhu 60°C selama 100 menit memiliki aktivitas sisa 12,00% dengan nilai $k_i = 0,0228$ menit⁻¹; $t_{1/2} = 30,39$ menit dan $\Delta G_i = 103,639$ kJ/mol⁻¹. Enzim hasil penambahan glutaraldehid dengan konsentrasi 0,02; 0,04; dan 0,06% mempunyai pH optimum 6,5; suhu optimum 55°C; K_M berturut-turut sebesar = 12,85; 21,73; dan 14,54 mg/mL substrat dan nilai $V_{maks} = 7,37$; 9,85; dan $7,37 \mu\text{mol/mL}^{-1}$ menit⁻¹, nilai $k_i = 0,0082$; 0,0083; dan 0,0084 menit⁻¹; $t_{1/2} = 84,51$; 83,49; dan 82,50 menit dan $\Delta G_i = 106,491$; 106,463; dan 106,436 kJ/mol⁻¹. Terjadi peningkatan waktu paruh ($t_{1/2}$) dan ΔG_i serta penurunan nilai k_i enzim hasil penambahan glutaraldehid dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian sebesar 2,7 sampai 2,8 kali.

Kata kunci: α -amilase, stabilitas enzim, *A. fumigatus*, glutaraldehid.

ABSTRACT

STABILITY IMPROVEMENT OF α -AMYLASE ENZYME FROM *Aspergillus fumigatus* BY THE ADDITION OF GLUTARALDEHYD

By

Lily Nur Safitri

In this research, the addition of glutaraldehyde to the α -amylase enzyme isolated from *A. fumigatus* has been carried out. Enzyme crude extract was purified by fractionation using ammonium sulfate, and dialysis. Enzyme activity was determined by Fuwa method, and Mandels method. Protein content was determined by Lowry method. The results showed that the specific activity of α -amylase purified was 520.51 U/mg, an increase of 8.93 times from the crude extract which had a specific activity of 58.31 U/mg. The purified enzyme has an optimum pH of 5; optimum temperature 55°C; $K_M = 10.80$ mg/mL substrate and $V_{max} = 10.13$ mol/mL⁻¹ min⁻¹. Thermal stability test of purified enzyme at 60°C for 100 minutes had a residual activity of 12.00% with a value of $k_i = 0.0228$ min⁻¹; $t_{1/2} = 30.39$ min and $\Delta G_i = 103.639$ kJ/mol⁻¹. Enzyme resulted from the addition of glutaraldehyde with a concentration of 0.02%; 0.04%; and 0.06% have an optimum pH of 6.5; optimum temperature 55°C; $K_M = 12.85$; 21.73; and 14.54 mg/mL of substrate consecutively and the value of $V_{max} = 7.37$; 9.85; and 7.37 mol/mL⁻¹, k_i value = 0.0082; 0.0083; and 0.0084 min⁻¹; $t_{1/2} = 84.51$; 83.49; and 82.50 minutes and $\Delta G_i = 106.491$; 106.463; and 106.436 kJ/mol⁻¹. There was an increase in half-life ($t_{1/2}$) and ΔG_i as well as a decrease in the k_i value of the enzyme resulting from the addition of glutaraldehyde compared to the enzyme by 2.7 to 2.8 times.

Keywords: α -amylase, enzyme stability, *A. fumigatus*, glutaraldehyde.

PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus fumigatus* DENGAN PENAMBAHAN GLUTARALDEHID

Oleh

LILY NUR SAFITRI

Skripsi

**Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar
SARJANA SAINS**

Pada

**Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2022**

Judul Skripsi : **PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus fumigatus* DENGAN PENAMBAHAN GLUTARALDEHID**

Nama Mahasiswa : **Lily Nur Safitri**

Nomor Pokok Mahasiswa : **1817011069**

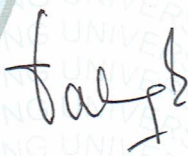
Jurusan : **Kimia**

Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**

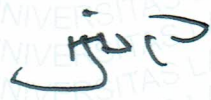


1. **Komisi Pembimbing**


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


Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S.
NIP 19540510 198803 2 001

2. **Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung**

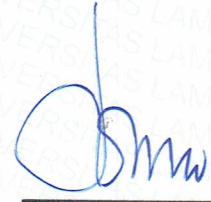

Mulyono, Ph.D.
NIP 19740611 200003 1 002

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

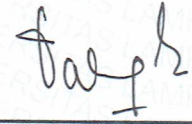
Ketua

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



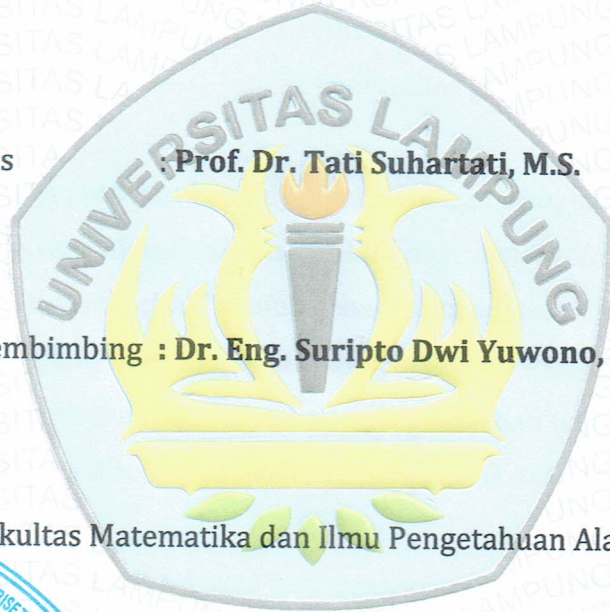

Sekretaris

: Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S.



Penguji

Bukan Pembimbing : Dr. Eng. Suripto Dwi Yuwono, M.T.



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 06 Desember 2022

LEMBAR PERNYATAAN

Yang bertanda tangan dibawah ini ;

Nama : Lily Nur Safitri
Nomor Pokok Mahasiswa : 1817011069
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya dan sesungguhnya, bahwa skripsi saya berjudul **“Peningkatan Kestabilan Enzim α -amilase dari *Aspergillus fumigatus* dengan Penambahan Glutaraldehid”** adalah benar karya saya sendiri, baik gagasan, hasil dan analisisnya. Selanjutnya saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi sepanjang nama saya disebutkan dan terdapat kesepakatan sebelum dilakukan publikasi.

Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan sadar dan sebenar-benarnya untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Bandar Lampung, Desember 2022
Yang menyatakan



Lily Nur Safitri
NPM. 1817011069

RIWAYAT HIDUP

Penulis Bernama lengkap Lily Nur Safitri dilahirkan di Bandar Lampung, pada tanggal 29 Oktober 2000. Anak pertama dari empat bersaudara, putri dari Bapak Sutarno dan Ibu Samirah.

Penulis mengawali Pendidikan Taman Kanak-Kanak di Al-Bustan pada tahun 2006 dan Sekolah Dasar di SD N 2 Way Dadi pada tahun 2012. Penulis menyelesaikan Sekolah Menengah Pertama di SMP N 21 Bandar Lampung pada tahun 2015, kemudian melanjutkan Pendidikan Sekolah Menengah Atas di SMA N 5 Bandar Lampung pada tahun 2018. Pada tahun 2018, penulis terdaftar sebagai mahasiswa Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung melalui jalur PMPAP yang diselesaikan pada tahun 2022.

Selama di perguruan tinggi, penulis pernah bergabung dalam bidang organisasi kemahasiswaan, sebagai Kader Muda Himpunan Mahasiswa Kimia (KAMI) periode 2018, dan kemudian menjadi anggota Biro Kesekretariatan periode 2019. Pada tahun 2021 Penulis melaksanakan KKN (Kuliah Kerja Nyata) selama 40 hari di Kelurahan Way Dadi Baru, Kecamatan Sukarame, Kota Bandar Lampung. Tepat ditahun yang sama, penulis melaksanakan PKL (Praktik Kerja Lapangan) di Laboratorium Biokimia, Universitas Lampung. Penulis juga pernah menjadi asisten praktikum Biokimia 2 untuk mahasiswa S1 Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung pada tahun 2022.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

“Dengan menyebut nama Allah Yang Maha Pengasih Lagi Maha Penyayang”

Kupersembahkan karya sederhana ini kepada :

Kedua orang tuaku

Yang telah menjadi orang tua terhebat, yang tak pernah berhenti memberikan kasih sayang, mendidik dengan penuh kesabaran dan cinta.

Kupersembahkan karya sederhana ini sebagai ucapan terimakasih.

**Adikku tersayang, Riska Dwi Ananta, Farid Atallah Ramadhan,
dan Nayla Alfiatuz Zahra.**

Rasa hormat saya kepada :

Prof. Dr. Ir. Yandri AS. M.S.

Bapak Ibu dosen Jurusan Kimia yang telah memberikan ilmu kepadaku selama menempuh Pendidikan di kampus.

Keluarga besarku yang selalu mendoakan dan memberikan semangat untukku.

Serta

Almamaterku Tercinta

MOTTO

Jangan menjelaskan dirimu kepada siapa pun, karena yang menyukaimu tidak butuh itu. Dan yang membencimu tidak percaya itu.

(Ali bin Abi Thalib)

Boleh jadi kamu membenci sesuatu, padahal itu baik bagimu, dan boleh jadi kamu menyukai sesuatu, padahal itu tidak baik bagimu. Allah mengetahui, sedang kamu tidak mengetahui.

(QS. Al-Baqarah : 216)

Kamu harus berhasil dulu baru bisa dihargai. Terkesan kejam, tapi dunia butuh pembuktian.

(Anonim)

SANWACANA

Puui syukur penulis ucapkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas segala limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Peningkatan Kestabilan Enzim α -amilase dari *Aspergillus fumigatus* dengan Penambahan Glutaraldehid”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.

Selama penyusunan skripsi ini, penulis telah banyak menerima masukan, arahan, bimbingan, dan bantuan dari berbagai pihak. Sehubungan dengan hal ini, penulis menyampaikan terimakasih kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri AS., M.S. selaku dosen pembimbing I atas kesediaan dan keikhlasannya memberikan bimbingan, saran, arahan, dan motivasi sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan skripsi ini dengan baik. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan kemudahan dan membalas kebaikannya.
2. Ibu Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S. selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan ilmu, nasehat, dan bimbingan kepada penulis sehingga skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik. Semoga Allah SWT membalas semua kebaikan ibu.
3. Bapak Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T. selaku Penguji, Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, dan selaku Pembimbing Akademik atas segala masukan, bantuan, nasehat, motivasi, saran, dan ilmu yang bermanfaat kepada penulis. Semoga Allah SWT membalas semua kebaikan bapak.
4. Bapak Mulyono, Ph.D. selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.

5. Bapak dan Ibu dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung atas seluruh ilmu yang telah diberikan.
6. Orang tuaku tercinta, Bapak Sutarno dan Ibu Samirah yang selalu mendoakan, menasehati, dan memberikan semangat yang tiada henti. Semoga Allah SWT memberikan kesehatan, perlindungan serta kemudahan dalam segala urusan.
7. Adikku tersayang Riska Dwi Ananta, Farid Atallah Ramadhan, dan Nayla Alfiatuz Zahra yang telah membrikan semangat dan keceriaan.
8. Keluarga besarku yang tidak dapat disebutkan satu persatu, terimakasih atas doa dan dukungannya.
9. Teman pejuangku Fauzia Sabrina, Firda Tiara Rochman, Lupia Widya Astuti, dan Mey Dhea Tami Putri yang selalu memberikan dukungan, saran, bantuan dan semangat dalam perjalanan kuliah selama ini baik suka maupun duka. Semoga Allah SWT selalu memberikan kemudahan bagi kita semua. *See you on top gurls!*
10. Rekan seperjuangan penelitian, Dwi Noviani, Eka Candra Wati, dan Lupia Widya Astuti, terimakasih atas kebersamaan, canda tawa, dan waktu yang telah kita habiskan bersama di Laboratorium. Semoga Allah SWT memudahkan segala urusan kita semua.
11. Teman-teman Laboratorium Biokimia dan Organik, April, Aulia, Cipta, Irma, Nafisah, Nurmay, Olivia, Risna, Salsa, Bethari, Vezhia, Aan, Raifar, Ridho Antin, wulan, dan yang tidak bisa disebutkan satu per satu. Terimakasih atas segala bantuannya selama penulis melakukan penelitian.
12. Kakak dan adik satu bimbingan Kak Hendri Ropingi, Mba Ezra Rheinsky Tiarsa, Kak Mega Yestika, Kak Najma Firdausi Kak Noura Lidya Utami, Virginia Nuh Reza, Ayu Ranja, Diah Indah, Neng Wiwit. Terimakasih atas segala bantuan yang telah diberikan selama ini.
13. Teman-teman kelas Mari Bersinar atas segala bantuan, canda tawa, dan semangat yang diberikan kepada penulis selama perkuliahan.

14. Teman-teman Kimia 2018 terimakasih atas kebersamaan, canda tawa, suka duka, bantuan, dan doa yang mengiri selama ini. Semoga Allah AWT selalu melindungi dan memudahkan urusan kita semua.
15. Senior dan Junior saya di Jurusan Kimia Angkatan 2015, 2016, 2017, 2019, dan 2020 atas segala kebaikan dan bantuan kepada penulis.
16. Almamaterku tercinta Universitas Lampung.
17. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu yang telah membantu penulis menyelesaikan skripsi ini.

Semoga Allah SWT membalas segala keikhlasan dan bantuan semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Penulis menyadari bahwa dalam penulisan ini masih terdapat banyak kesalahan dan kekurangan, namun penulis berharap semoga skripsi ini bermanfaat bagi pembaca.

Bandar Lampung, Desember 2022

Lily Nur Safitri

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	iii
DAFTAR GAMBAR.....	v
DAFTAR LAMPIRAN.....	vii
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian	3
1.3. Manfaat Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Enzim.....	5
2.1.1. Pembentukan Kompleks Enzim-Substrat	6
2.1.2. Klasifikasi Enzim	7
2.1.3. Sifat Katalitik Enzim	9
2.1.4. Faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim	9
2.2. Enzim Amilase	12
2.3. Glutaraldehyd	14
2.4. <i>A. fumigatus</i>	15
2.5. Isolasi dan Pemurnian Enzim α -Amilase.....	16
2.5.1. Sentrifugasi	16
2.5.2. Fraksinasi	16
2.5.3. Dialisis	17
2.6. Uji Aktivitas Enzim α -Amilase dengan Metode Fuwa	18
2.7. Uji Aktivitas Enzim α -Amilase dengan Metode Mandels	18
2.8. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry	19
2.9. Kinetika Reaksi Enzim.....	19
2.10. Stabilitas Enzim	20
2.11. Modifikasi Kimia.....	21
III. METODE PENELITIAN.....	22
3.1. Waktu dan Tempat	22
3.2. Alat dan Bahan.....	22
3.3. Prosedur Penelitian	23

3.3.1. Pembiakan Isolat <i>A. fumigatus</i>	23
3.3.2. Pembuatan Media Inokulum dan Fermentasi, Inokulasi <i>A. fumigatus</i> dan Produksi Enzim α -Amilase	23
3.3.3. Isolasi Enzim α -Amilase	24
3.3.4. Pemurnian Enzim α -Amilase	25
3.3.5. Uji Aktivitas Enzim α -Amilase dan Penentuan Kadar Protein	26
3.3.6. Penambahan Glutaraldehid	29
3.3.7. Karakterisasi Enzim α -Amilase	29
3.3.8. Penentuan Waktu Paruh ($t_{1/2}$), Konstanta Laju Inaktivasi (k_i), dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i)	30
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	32
4.1. Produksi dan Isolasi Enzim α -Amilase dari <i>A. fumigatus</i>	32
4.2. Pemurnian Enzim α -Amilase	32
4.2.1. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat	32
4.2.2. Dialisis	34
4.3. Karakterisasi Enzim α -amilase Hasil Pemurnian dan Hasil Penambahan Glutaraldehid	35
4.3.1. Penentuan pH Optimum	35
4.3.2. Penentuan Suhu Optimum	37
4.3.3. Penentuan Nilai K_M dan V_{maks} Enzim α -Amilase Hasil Pemurnian dan Hasil Penambahan Glutaraldehid	38
4.3.4. Stabilitas Termal Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Penambahan Glutaraldehid	40
4.3.5. Penentuan Konstanta Laju Inaktivasi Termal (k_i), Perubahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i), dan Waktu Paruh ($t_{1/2}$),	41
V. SIMPULAN DAN SARAN	44
5.1. Simpulan	44
5.2. Saran	45
DAFTAR PUSTAKA	46
LAMPIRAN	50

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Aktivitas enzim α -amilase dalam ekstrak kasar dan tahap pemurnian.	35
2. Nilai K_M dan V_{maks} enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil penambahan glutaraldehid.....	39
3. Nilai k_i , $t_{1/2}$ dan ΔG_i enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil penambahan glutaraldehid.....	41
4. Hubungan antara kejenuhan amonium sulfat (0-100%) dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	51
5. Hubungan antara kejenuhan amonium sulfat (0-15%) dan (15-85%) dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	51
6. Hubungan antara pH dengan aktivitas unit enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil penambahan.	52
7. Hubungan antara pH dengan aktivitas sisa enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil penambahan.	52
8. Hubungan antara suhu dengan aktivitas unit enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil penambahan.	53
9. Hubungan antara suhu dengan aktivitas sisa enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil penambahan.	53
10. Data untuk penentuan K_M dan V_{maks} enzim α -amilase hasil pemurnian berdasarkan persamaan Lineweaver-Burk.	54
11. Data untuk penentuan K_M dan V_{maks} enzim α -amilase hasil penambahan berdasarkan persamaan Lineweaver-Burk.	54
12. Hubungan waktu inkubasi dengan aktivitas unit enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil penambahan.	55
13. Hubungan waktu inkubasi dengan aktivitas sisa enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil penambahan.	55
14. Data $\ln (E_i/E_0)$ untuk penentuan k_i (konstanta laju inaktivasi termal) sisa enzim α -amilase hasil pemurnian selama inaktivasi termal 60°C	56

15. Data $\ln (E_i/E_0)$ untuk penentuan k_i (konstanta laju inaktivasi termal) sisa enzim α -amilase hasil penambahan selama inaktivasi termal 60°C	56
16. Absorbansi glukosa pada berbagai konsentrasi untuk menentukan kurva standar glukosa	61
17. Absorbansi BSA pada berbagai konsentrasi	63

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Model <i>Lock and key</i>	7
2. Model <i>induced-fit</i>	7
3. Hubungan kecepatan reaksi dengan pH	10
4. Hubungan antara aktivitas enzim dengan suhu	10
5. Hubungan antara laju reaksi dengan konsentrasi enzim	11
6. Struktur α -amilase	13
7. Struktur kimia glutaraldehid.	14
8. <i>A. fumigatus</i>	15
9. Dialisis	18
10. Diagram Lineweaver-Burk.....	20
11. Skema fraksinasi enzim dengan amonium sulfat	25
12. Diagram alir penelitian.....	31
13. Hubungan antara tingkat kejenuhan amonium sulfat pada beberapa fraksi dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	33
14. Hubungan antara tingkat kejenuhan amonium sulfat (0-15)% dan (15-85)% dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	34
15. Hubungan antara aktivitas sisa enzim α -amilase dengan variasi pH.	36
16. Hubungan antara aktivitas sisa enzim α -amilase dengan variasi suhu.....	37
17. Grafik Lineweaver-Burk enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil penambahan glutaraldehid.....	38
18. Grafik stabilitas termal enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil penambahan glutaraldehid.....	40
19. Grafik $\ln (E_i/E_0)$ enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil penambahan glutaraldehid.....	42

20. Kurva standar glukosa.....	61
21. Kurva standar BSA	63

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Aktivitas unit enzim α -amilase pada berbagai pola fraksinasi.....	51
2. Aktivitas enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil penambahan pada variasi pH.	52
3. Aktivitas enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil penambahan pada variasi suhu.	53
4. Penentuan K_M dan V_{maks} enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil penambahan.....	54
5. Penentuan stabilitas termal enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil penambahan.	55
6. Penentuan nilai k_i enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil penambahan....	56
7. Perhitungan ΔG_i dan $t_{1/2}$ enzim α -amilase hasil pemurnian.....	57
8. Perhitungan ΔG_i dan $t_{1/2}$ enzim α -amilase hasil penambahan glutaraldehid 0,02%.	58
9. Perhitungan ΔG_i dan $t_{1/2}$ enzim α -amilase hasil penambahan glutaraldehid 0,04%.	59
10. Perhitungan ΔG_i dan $t_{1/2}$ enzim α -amilase hasil penambahan glutaraldehid 0,06%.	60
11. Kurva standar glukosa.....	61
12. Persamaan untuk menghitung aktivitas unit enzim α -amilase metode Mandels.....	62
13. Kurva standar BSA	63
14. Persamaan untuk menghitung kadar protein enzim α -amilase metode Lowry.....	64

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Enzim telah diproduksi dalam skala industri besar selama dekade ini. Enzim yang dikenal secara luas penggunaannya yaitu enzim amilase, lipase, dan protease yang merupakan enzim hidrolitik pemecah senyawa makromolekul karbohidrat, lemak, dan protein (Supriyatna dkk., 2015). Enzim merupakan protein yang berfungsi sebagai katalis untuk reaksi biokimia. Suatu enzim dapat mempercepat reaksi 10^8 sampai 10^{11} kali lebih cepat daripada tanpa menggunakan katalis (Poedjadi dan Supriyanti, 2006). Enzim amilase merupakan salah satu enzim utama yang digunakan dalam industri dan sangat penting untuk bidang bioteknologi. Amilase merupakan kelas enzim industri yang terdapat sekitar 25% dari pasar enzim dunia (de Souza *and* e Magalhães, 2010).

Amilase adalah enzim yang mengkatalis dalam pemutusan ikatan α -1,4- glikosidik menghasilkan dekstrin, oligosakarida, maltosa, dan D-glukosa. Enzim amilase dapat dibedakan menjadi 2 yaitu α -amilase dan β -amilase, hal ini diklasifikasikan sesuai dengan cara memotong ikatan glikosidik. α -Amilase juga disebut dengan endoamilase. Enzim ini menghidrolisis α -1,4-glikosidik secara acak menghasilkan dekstrin, oligosakarida dan monosakarida. β -Amilase dan glukoamilase disebut dengan eksoamilase. Eksoamilase berperan dalam menghidrolisis α -1,4- glikosidik linkage hanya dari non-pereduksi ujung rantai polisakarida luar (Aiyer, 2005).

Amilase dapat diperoleh dari hewan, tumbuhan, jamur, dan bakteri. Namun, enzim dari sumber jamur dan bakteri lebih mendominasi dalam sektor industri karena mudah didapatkan. Biasanya fungi yang berada pada habitat daratan, sebagian

besar dari spesies *Aspergillus* dan hanya satu spesies *Penicillium*, yaitu *Penicillium brunneum*. Spesies *Aspergillus* menghasilkan berbagai macam enzim ekstraseluler, untuk amilase sendiri memiliki kepentingan yang signifikan dalam industri. Enzim ekstraseluler atau intraseluler dari bakteri dapat berfungsi sebagai energi dan sumber karbon. Secara komersial α -amilase terutama dihasilkan dari genus *Bacillus*, dan diperkirakan *Bacillus sp.* menghasilkan enzim sekitar 50% dari total pasar enzim global (Dehkordi and Javan, 2012).

Sejumlah besar amilase dari mikroba tersedia secara komersial dan hampir sepenuhnya menggantikan hidrolisis kimia pati dalam industri pengolahan pati. Keuntungan dalam menggunakan mikroorganisme untuk produksi amilase karena jumlah kapasitas produksi yang ekonomis dan mikroba mudah untuk menghasilkan enzim karakteristik yang diinginkan (de Souza and Magalhães, 2010). α -Amilase adalah salah satu enzim yang aplikasinya meluas di banyak sektor seperti klinis, obat-obatan, dan kimia analitik. Selain penggunaannya dalam sakarifikasi pati, enzim ini dapat diaplikasi dalam makanan, deterjen, tekstil, kertas dan penyulingan industri (Saranraj and Stella, 2013).

Umumnya enzim relatif tidak stabil, biaya isolasinya tinggi, dan hanya dapat digunakan sekali pakai. Stabilitas merupakan parameter penting, yang turut menentukan kelayakan ekonomi penerapan enzim dalam proses industri. Selain itu, enzim yang stabil dapat digunakan pada suhu tinggi, yang mungkin memiliki efek menguntungkan pada laju reaksi, kelarutan reaktan dan resiko kontaminasi mikroba (Eijsink *et al.*, 2004). Beberapa cara yang dapat dilakukan untuk meningkatkan stabilitas enzim yaitu dengan cara imobilisasi dan modifikasi kimia, rekayasa molekuler, dan penambahan bahan aditif (Haryati dkk., 2010). Modifikasi kimia dapat digunakan untuk lebih meningkatkan stabilitas enzim seperti, melalui ikatan silang kimia. Zaak *et al.*, (2017) melakukan penelitian tentang peningkatan stabilitas enzim melalui modifikasi dengan polietilenimin dan glutaraldehid. Glutaraldehid dianggap sebagai reagen yang sangat memadai untuk stabilisasi enzim.

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan pengaruh penambahan glutaraldehid terhadap stabilitas α -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148. Hasil penelitian menunjukkan bahwa enzim pemurnian dan enzim termodifikasi memiliki pH optimum yang sama, yaitu 5,5. Enzim dengan penambahan 0,03% glutaraldehid memiliki aktivitas sisa tertinggi yaitu 41% dibandingkan dengan enzim asli yang hanya 8% setelah diinkubasi selama 80 menit pada suhu 55°C (Witazora *et al.*, 2021).

Pada penelitian ini telah dilakukan penambahan glutaraldehid pada enzim α -amilase yang diisolasi dari *A. fumigatus*. Pemilihan glutaraldehid sebagai reagen karena dapat meningkatkan stabilitas enzim melalui kedua ikatan silang intra dan antar molekul dalam protein yang dimodifikasi.

1.2. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Memperoleh enzim α -amilase dari *A. fumigatus* dengan aktivitas dan kemurnian yang tinggi.
- b. Meningkatkan kestabilan enzim α -amilase dari *A. fumigatus* melalui penambahan glutaraldehid.
- c. Mengkarakterisasi enzim α -amilase sebelum dan sesudah penambahan glutaraldehid.

1.3. Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Memberikan informasi mengenai cara meningkatkan stabilitas enzim α -amilase dari *A. fumigatus*.
- b. Memberikan informasi mengenai pengaruh penambahan glutaraldehid terhadap stabilitas enzim α -amilase dari *A. fumigatus*.
- c. Memperoleh enzim α -amilase dari *A. fumigatus* dengan kestabilan yang tinggi serta dapat digunakan dalam proses industri.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Enzim

Enzim adalah protein yang khusus disintesis oleh sel hidup untuk mengkatalis reaksi yang berlangsung di dalamnya. Kata enzim berasal dari “*en zyme*” yang berarti dalam ragi (*yeast*), mulai dipakai semenjak tahun 1877. Sebelum itu telah dikenal diastase (A. Payen dan J. Persoz), pepsin (T.Schwan) dan emulsin (J.V. Liebig dan F. Wöhler) yang masing-masing adalah senyawa organik yang dihidrolisis dari pati, protein dan glikosida (Martoharsono, 2006). Enzim terbagi menjadi dua tipe yaitu enzim ekstraseluler atau eksoenzim (berfungsi di luar sel) dan enzim intraseluler atau endoenzim (berfungsi di dalam sel). Salah satu enzim ekstraseluler adalah enzim amilase yang dapat menghidrolisis pati menjadi unit-unit gula yang lebih kecil (Pelczar dkk., 1986).

Enzim adalah katalis yang meningkatkan laju reaksi kimia tanpa mengubah dirinya sendiri dalam prosesnya. Enzim sangat spesifik dan aktivitasnya dapat diatur. Semua enzim adalah protein, meskipun beberapa RNA yang aktif secara katalitik telah diidentifikasi. Tanpa adanya enzim, reaksi hampir tidak dapat berlangsung sama sekali, sedangkan dengan adanya enzim, laju reaksi dapat ditingkatkan hingga 10^7 kali lipat. Reaksi yang dikatalisis oleh enzim biasanya berlangsung dalam kondisi yang relatif ringan (suhu di bawah 100°C , tekanan atmosfer dan pH netral) (Hames *and* Hooper, 2005).

Sisi aktif enzim adalah daerah yang mengikat substrat dan mengubahnya menjadi produk. Situs aktif merupakan celah pada permukaan enzim yang membentuk lingkungan yang dominan nonpolar yang meningkatkan pengikatan substrat.

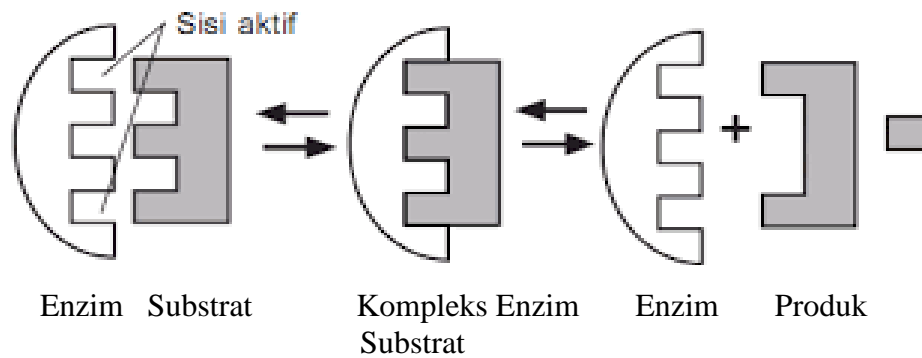
Substrat terikat di situs aktif oleh interaksi elektrostatik, ikatan hidrogen, ikatan *van der Waals*, interaksi hidrofobik, dan dalam beberapa kasus oleh ikatan kovalen reversibel. Setelah mengikat molekul substrat, dan membentuk kompleks enzim-substrat, residu katalitik aktif di dalam sisi aktif enzim bekerja pada molekul substrat untuk mengubahnya menjadi kompleks keadaan transisi dan kemudian menjadi produk, yang dilepaskan ke dalam larutan. Kemudian enzim bebas untuk mengikat molekul substrat lain dan memulai siklus katalitiknya lagi (Hames and Hooper, 2005).

2.1.1. Pembentukan Kompleks Enzim-Substrat

Sifat enzim yang spesifik diterangkan dengan dua model yaitu model gembok-kunci "*lock and key*" dan model "*induced-fit*". Kedua model tersebut menjelaskan hubungan antara substrat dengan situs aktif (bagian enzim yang berinteraksi dengan substrat) yang bersifat spesifik.

a. Model *lock and key*

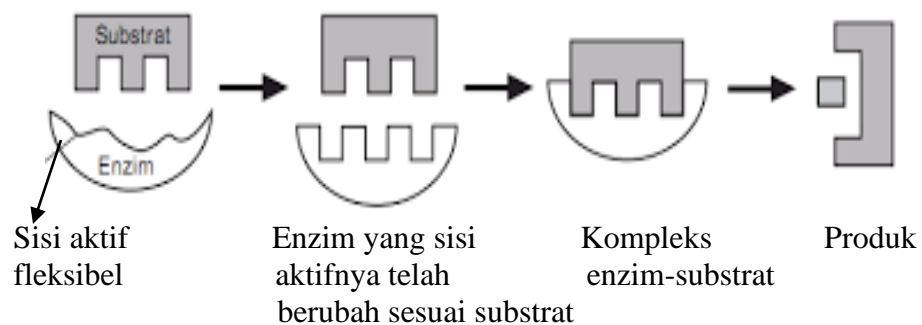
Pada model gembok-kunci, enzim berinteraksi dengan substrat membentuk kompleks enzim-substrat, seperti interaksi kunci (substrat) yang masuk ke dalam gembok (enzim). Interaksi pada kompleks enzim-substrat, menyebabkan terjadinya proses katalisis dimana residu asam amino pada situs aktif bekerja mengkonversi substrat menjadi produk dengan energi aktivasi yang rendah. Produk akan dilepaskan dan enzim dapat mengikat molekul substrat berikutnya (Sutrisno, 2017). Model *lock and key* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Model *lock and key* (Waluyo, 2006).

b. Model *induced-fit*

Pada model *induced-fit*, situs aktif enzim bersifat tidak kaku/fleksibel. Adanya substrat akan menginduksi situs aktif enzim untuk menyesuaikan dengan bentuk substrat yang ada sehingga tercipta kompleks enzim-substrat. Proses selanjutnya sama dengan model gembok-kunci (Sutrisno, 2017). Gambaran model *induced-fit* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Model *induced-fit* (Waluyo, 2006).

2.1.2. Klasifikasi Enzim

Enzim diklasifikasikan sesuai dengan aturan yang ditetapkan oleh "*Nomenclature Committee*" di lembaga "*International Union of Biochemistry* (1984). Komite tersebut mengklasifikasikan enzim ke dalam enam kelas berdasarkan spesifitas pada reaksi yang dikatalisisnya.

- a. Klasifikasi enzim menurut IUB adalah sebagai berikut:
1. Oksidoreduktase: mengkatalis reaksi oksidasi dan reduksi, yaitu pemindahan atom hidrogen atau oksigen atau elektron antar molekul. Beberapa contoh: alkohol dehidrogenase, glucose oxidase dan peroksidase.
 2. Transferase: mengkatalis reaksi pemindahan gugus dari suatu molekul donor ke molekul aseptor (metil, glikosil).
 3. Hidrolase: mengkatalis reaksi hidrolisis berbagai jenis ikatan atau sebaliknya. Hidrolase merupakan kelas enzim yang paling banyak diaplikasikan dalam teknologi enzim, meliputi esterase, glikosidase, lipase dan protease. Contoh: chymosin/rennin (proses pembuatan keju), amilase (pengolahan pati).
 4. Liase: mengkatalis reaksi eliminasi/pemindahan gugus fungsional tertentu. Contoh: aldolase, dekarboksilase, dehidratase.
 5. Isomerase: mengkatalis reaksi isomerisasi molekul. Contoh yang terkenal *glucose* isomerase mengkatalisis isomerisasi glukosa menjadi fruktosa.
 6. Ligase (disebut pula sintetase): mengkatalis pembentukan ikatan kovalen pada penggabungan bersama 2 molekul yang dikoupling dengan pemecahan ATP. Contoh: DNA ligase (Sutrisno, 2017).
- b. Menurut Lehninger (2005), klasifikasi enzim berdasarkan cara terbentuknya dibedakan menjadi dua, 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 β -galaktosidase yang dihasilkan oleh bakteri *Escherichia coli* yang ditumbuhkan di dalam medium yang mengandung laktosa.

2.1.3. Sifat Katalitik Enzim

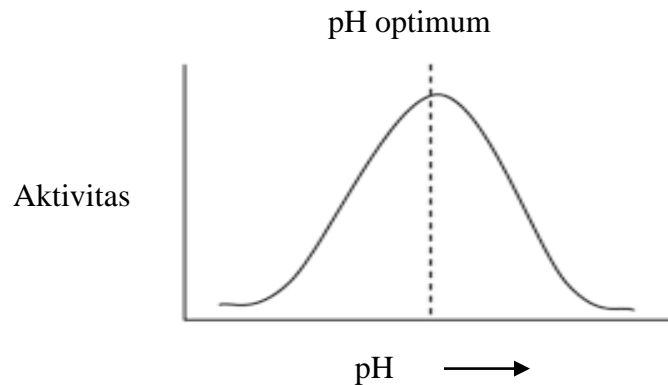
Sifat-sifat katalitik dari enzim ialah sebagai berikut:

- a. Enzim mampu meningkatkan laju reaksi pada kondisi biasa (fisiologik) dari tekanan, suhu dan pH.
- b. Enzim berfungsi sebagai selektifitas tinggi terhadap substrat (substansi yang mengalami perubahan kimia setelah bercampur dengan enzim) dan jenis reaksi yang dikatalisis.
- c. Enzim memberikan peningkatan laju reaksi yang tinggi dibanding dengan katalis biasa (Page, 1989).

2.1.4. Faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim

Berikut ini merupakan faktor-faktor yang mempengaruhi kerja enzim:

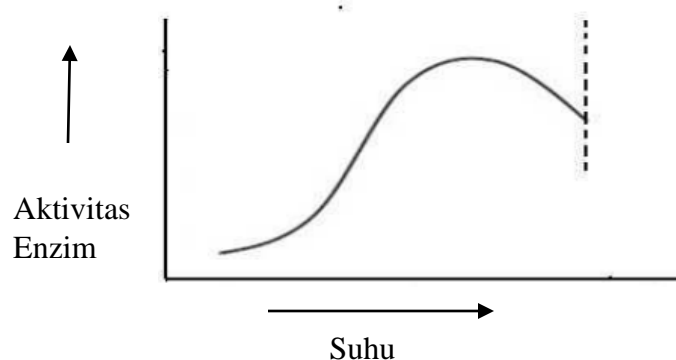
- a. pH
Potensial hidrogen (pH) merupakan salah satu faktor penting yang harus diperhatikan apabila bekerja dengan enzim, hal ini dikarenakan enzim hanya mampu bekerja pada kondisi pH tertentu saja. Suatu kondisi pH dimana enzim dapat bekerja dengan aktivitas tertinggi yang dapat dilakukannya dinamakan pH optimum. Sebaliknya pada pH tertentu enzim sama sekali tidak aktif atau bahkan rusak. Hal ini dapat dijelaskan karena diketahui bahwa enzim merupakan molekul protein, molekul protein kestabilannya dapat dipengaruhi oleh tingkat keasaman lingkungan, pada kondisi keasaman yang ekstrim molekul-molekul protein dari enzim akan rusak (Poedjiadi, 1994). Hubungan kecepatan reaksi dengan pH ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Hubungan kecepatan reaksi dengan pH (Page, 1997).

b. Suhu

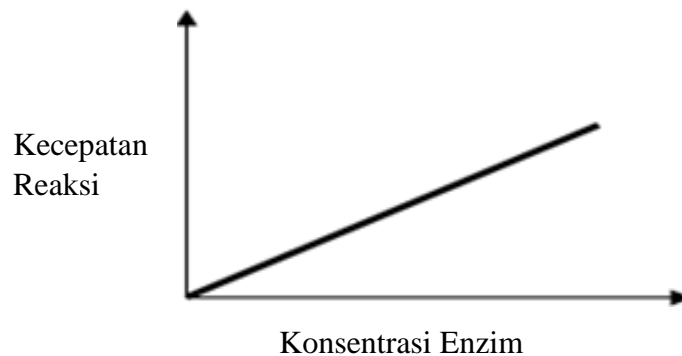
Apabila temperatur meningkat maka molekul-molekul akan memiliki energi kinetik yang semakin besar sehingga pertemuan antar molekul semakin tinggi, akibatnya kecepatan reaksi meningkat. Kecepatan reaksi akan mencapai maksimal pada suatu titik yang disebut "temperatur optimum". Di atas titik ini kecepatan reaksi akan menurun karena terjadinya proses denaturasi. Tiap enzim memiliki profil yang berbeda terhadap temperatur dan biasanya sangat ditentukan oleh organisme dimana enzim tersebut diisolasi dan diproduksi (Sutrisno, 2017). Hubungan antara aktivitas enzim dengan suhu ditunjukkan dalam Gambar 4.



Gambar 4. Hubungan antara aktivitas enzim dengan suhu (Poedjiadi, 1994).

c. Konsentrasi enzim

Semakin tinggi konsentrasi enzim maka kecepatan reaksi akan semakin meningkat hingga pada batas konsentrasi tertentu dimana hasil hidrolisis akan konstan dengan naiknya konsentrasi enzim yang disebabkan penambahan enzim sudah tidak efektif lagi (Reed, 1975). Hubungan antara laju reaksi enzim dengan konsentrasi enzim ditunjukkan dalam Gambar 5.



Gambar 5. Hubungan antara laju 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 reaksi (Lehninger, 1982).

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 dan Mg atau dapat pula sebagai molekul organik kompleks yang disebut koenzim (Martoharsono, 1984).

Menurut Wirahadikusumah, (1997) 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 sehingga fungsi katalitiknya terganggu (Winarno, 1989).

2.2. Enzim Amilase

Amilase merupakan salah satu enzim yang berperan dalam meghidrolisis pati atau amilum menjadi gula yang lebih sederhana seperti fruktosa, dekstrin, maltose dan glukosa. Hidrolisis amilum atau pati menyebabkan terjadinya perubahan warna pada medium menjadi biru setelah ditambahkan iodine atau lugol (Poedjadi, 1994).

Amilase disebut juga dengan enzim amilolitik, merupakan enzim yang bekerja sebagai katalis dalam reaksi pemecah pati (amilum) dengan melibatkan bantuan air atau disebut reaksi hidrolisis. Menurut Pudjowono, (1997) amilase merupakan enzim ekstraseluler yang diproduksi di dalam sel, kemudian dikeluarkan dari sel ke substrat disekelilingnya. Enzim-enzim ekstraseluler pada umumnya bersifat terinduksi, dan produksinya akan meningkat jika ada substrat yang sesuai di sekelilingnya.

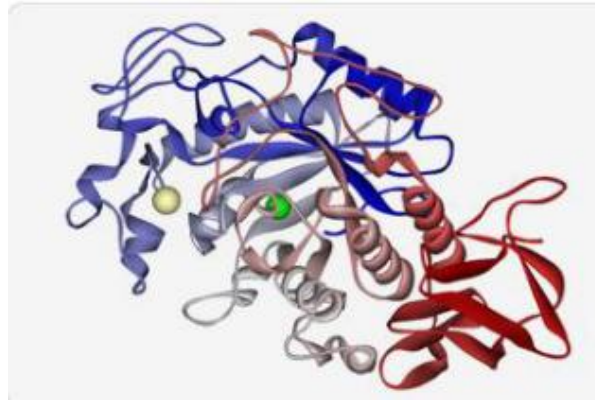
Amilase dibedakan atas tiga kelompok di antaranya:

a. α -amilase

Enzim α -amilase (EC.3.2.1.1) disebut juga dengan 1,4- α -D-glukan glukonohidrolase atau glukogenase adalah enzim yang mampu memecah molekul-molekul pati dan glikogen. α -Amilase akan memotong ikatan glikosidik α -1,4 pada molekul pati (karbohidrat) sehingga terbentuk molekul-molekul karbohidrat yang lebih pendek (Janecek, 2009).

Mekanisme kerja enzim α -amilase terdiri dari dua tahap, yaitu: tahap pertama degadasi amilosa menjadi maltosa dan maltotriosa yang terjadi secara acak. Degadasi ini terjadi sangat cepat dan diikuti dengan menurunnya viskositas

dengan cepat. Tahap kedua terjadi pembentukan glukosa dan maltosa sebagai hasil akhir dan tidak acak. Keduanya merupakan kerja enzim α -amilase pada molekul amilosa. Pada molekul amilopektin kerja α -amilase akan menghasilkan glukosa, maltosa dan satu seri α -limit dekstrin, serta oligosakarida yang terdiri dari empat atau lebih glukosa yang mengandung ikatan α -1,6-glikosidik (Winarno, 2010). Struktur α -amilase dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Struktur α -amilase (Dehkordi *and* Javan, 2012).

b. β -amilase

Enzim β -amilase (β -1,4 glukamaltohidrolase) terdapat pada berbagai hasil tanaman, tetapi tidak terdapat pada mamalia, dan mikroba. Secara murni telah dapat diisolasi dari kecambah barley, ubi jalar, dan kacang kedelai. Enzim β -amilase memecah ikatan glukosida β -1,4 pada pati dan glikogen dengan membalik konfigurasi karbon anomerik glukosa dari α menjadi β . Enzim β -amilase aktif pada pH 5,0-6,0 (Winarno, 1983).

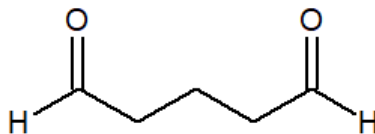
c. Enzim γ -amilase

Enzim γ -amilase mempunyai nama lain, yaitu glukam 1,4- α -glukosidase, 1,4- α -D-glukam glukohidrolase, exo-1,4- α -glukosidase, glukamilase, amiloglukosidase, lisosomal α -glukosidase. Pemutusan ikatan akhir α (1,4)

glikosida pada ujung non reduksi dari amilosa dan amilopektin, untuk menghasilkan unit glukosa. γ -amilase sangat efisien pada lingkungan yang bersifat asam dan bekerja pada pH optimum 3 (Jaka, 2012).

2.3 Glutaraldehid

Glutaraldehida adalah reagen bi-fungsional yang mempunyai kapasitas untuk berpolimerisasi. Glutaraldehid dapat bereaksi dengan bagian enzim yang berbeda, terutama melibatkan gugus amino primer protein, meskipun pada akhirnya dapat bereaksi dengan gugus lain seperti tiol, fenol, dan imidazol. Dalam kondisi asam dan netral, gugus aldehida dari glutaraldehid dapat bereaksi dengan protein melalui pembentukan basa Schiff. Dalam hal ini, serangan nukleofilik terjadi oleh gugus amino dari lisin menjadi glutaraldehid. Mekanisme glutaraldehid pada kondisi netral dan asam akan dimediasi oleh konformasi siklik hemiasetal dari kedua monomer dan polimer glutaraldehid. Hemiasetal siklik dari glutaraldehida ini bereaksi dengan substitusi nukleofilik gugus amino dari lisin dengan gugus hidroksi glutaraldehid (Barbosa *et al.*, 2014). Keunggulan glutaraldehid antara lain tidak diinaktivasi oleh bahan organik dan tidak membuat korosi untuk logam, plastik atau karet (Prawirohardjo, 2004). Struktur glutaraldehid dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Struktur kimia glutaraldehid.

2.4. *A. fumigatus*

Aspergillus merupakan fungi yang mampu hidup pada media dengan derajat keasaman dan kandungan gula yang tinggi. Jamur ini dapat menyebabkan pembusukan pada buah-buahan atau sayuran. *Aspergillus* ada yang bersifat parasit, ada pula yang bersifat saprofit. Fungi *A. fumigatus* dapat ditemukan di tanah, dan tumbuhan yang mengalami pembusukan, khususnya pada pupuk kandang dan humus (Gandi dkk., 2019). Biakan fungi *A. fumigatus* dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. *A. fumigatus*.

Klasifikasi dari *A. fumigatus* menurut Gautam and Bhadauria (2012), adalah sebagai berikut.

Kingdom : Fungi
Divisi : Ascomycota
Kelas : Eurotimycetes
Orde : Eurotiales
Family : Trichocomaceae
Genus : *Aspergillus*
Spesies : *A. fumigatus*

2.5. Isolasi dan Pemurnian Enzim α -Amilase

Isolasi enzim α -amilase dapat dilakukan dengan metode sentrifugasi. Metode sentrifugasi digunakan untuk memisahkan enzim ekstraseluler dari sisa-sisa sel. Sentrifugasi akan menghasilkan supernatan yang jernih dan endapan yang terikat kuat pada dasar tabung, yang selanjutnya dipisahkan secara normal. Sel-sel mikroba biasanya mengalami sedimentasi pada kecepatan 5000 selama 15 menit (Scopes, 1982).

2.5.1. Sentrifugasi

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. Ekstraksi enzim ekstraseluler lebih mudah dibandingkan ekstraksi enzim intraseluler, karena tidak memerlukan pemecahan sel dan enzim yang dikeluarkan dari sel mudah dipisahkan dari pengotor lain serta tidak banyak bercampur dengan bahan-bahan sel lain (Pelczar dkk., 1986). Isolasi enzim dapat dilakukan dengan metode sentrifugasi. Prinsip utama sentrifugasi adalah memisahkan substansi berdasarkan berat jenis molekul dengan cara memberikan gaya sentrifugal sehingga substansi yang lebih berat akan berada di dasar, sedangkan substansi yang lebih ringan akan terletak di atas. Teknik sentrifugasi tersebut dilakukan di dalam sebuah mesin yang bernama mesin sentrifugasi dengan kecepatan yang bervariasi, contohnya 2500 rpm (*rotation per minute*) atau 3000 rpm (Faatih, 2009).

2.5.2. Fraksinasi

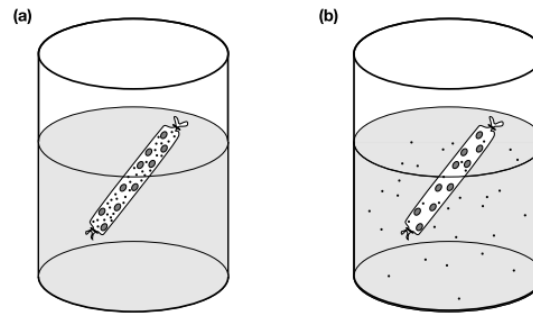
Fraksinasi adalah proses pemisahan fraksi yang terkandung dalam suatu larutan atau suspensi yang mempunyai karakteristik berbeda (Yuliasih dkk., 2007). Fraksinasi yang sering dilakukan adalah dengan senyawa elektrolit menggunakan

garam amonium sulfat, natrium klorida atau natrium sulfat (Suhartono dkk., 1992). Menurut Wirahadikusumah (2001), meningkatnya kekuatan ion akan menyebabkan kelarutan enzim semakin besar yang disebut dengan *salting in*. Jika kandungan ion semakin tinggi akan menyebabkan kelarutan enzim menurun dan mengendap yang disebut dengan *salting out*.

Amonium sulfat sering dipakai untuk mengendapkan enzim. Kelebihan amonium sulfat yaitu, kebanyakan enzim tahan terhadap garam tersebut (tidak terdenaturasi), memiliki kelarutan yang besar, mempunyai daya pengendapan yang cukup besar dan mempunyai efek penstabil terhadap kebanyakan enzim. Perlakuan penambahan amonium sulfat dilakukan dengan meningkatkan kejenuhan dari larutan enzim, dengan pembagian fraksi: (0-2)% jenuh, (20-40)% jenuh, (60-80)% jenuh, dan (80-100)% jenuh. Pengendapan ini dikenal sebagai *salting out* (Judoamijojo, 1989).

2.5.3. Dialisis

Dialisis merupakan proses yang digunakan untuk menghilangkan molekul kecil seperti garam atau larutan protein dari enzim yang didapatkan melalui tahapan sebelumnya atau tahapan pemurnian dengan garam amonium sulfat. Prinsip dialisis adalah difusi zat terlarut melalui membran semipermeabel ketika membran menjadi batas antara dua larutan yang berbeda konsentrasi. Membran bertindak seperti saringan dengan ukuran pori tertentu. Molekul dengan jari-jari molekul yang lebih besar dari ukuran pori akan tertahan seluruhnya sedangkan yang berjari-jari lebih kecil akan lolos (Scopes, 1994). Proses dialisis ditunjukkan pada Gambar 9.



Gambar 9. Dialisis (Hames *and* Hooper, 2005).

2.6. Uji Aktivitas Enzim α -Amilase dengan Metode Fuwa

Aktivitas α -amilase ditentukan dengan metode Fuwa yaitu berdasarkan pengurangan jumlah substrat pati yang terhidrolisis dan menghasilkan warna biru setelah penambahan iodin. Warna tersebut akan menyerap cahaya monokromatis pada λ_{maks} 600 nm. Uji yang paling spesifik untuk mengidentifikasi aktivitas enzim amilase karena waktu reaksi yang cukup singkat yaitu 10 menit inkubasi dan pati sebagai substrat (Fuwa, 1954).

2.7. Uji Aktivitas Enzim α -Amilase dengan Metode Mandels

Aktivitas enzim α -amilase ditentukan dengan metode Mandels (Mandels *et al.*, 1976), yaitu berdasarkan pembentukan glukosa dari substrat pati oleh enzim α -amilase yang dideteksi dengan penambahan pereaksi DNS (*Dinitrosalicylic acid*) ke dalam larutan uji serta proses pemanasan, sehingga akan dihasilkan larutan berwarna kuning hingga merah pekat. Semakin pekat warna larutan sampel dibandingkan larutan kontrol, maka semakin tinggi aktivitasnya.

2.8. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

Penentuan kadar protein enzim α -amilase menggunakan metode Lowry. Metode ini bekerja pada kondisi alkali dan ion tembaga (II) akan membentuk kompleks dengan protein. Ketika 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. Pada metode ini, pengujian kadar protein didasarkan pada pembentukan kompleks Cu^{2+} dengan ikatan peptida yang akan tereduksi menjadi Cu^+ pada kondisi basa. Cu^+ dan rantai samping tirosin, triftof an dan sistein akan bereaksi dengan reagen *folin-ciocalteau* yang akan mengikat protein. Reagen bereaksi dengan menghasilkan produk tidak stabil yang tereduksi secara lambat menjadi heteromolibdenum. Protein akan menghasilkan intensitas warna yang berbeda tergantung pada kandungan triftof an dan tirosinnya (Lowry *et al.*, 1951).

2.9. Kinetika Reaksi Enzim

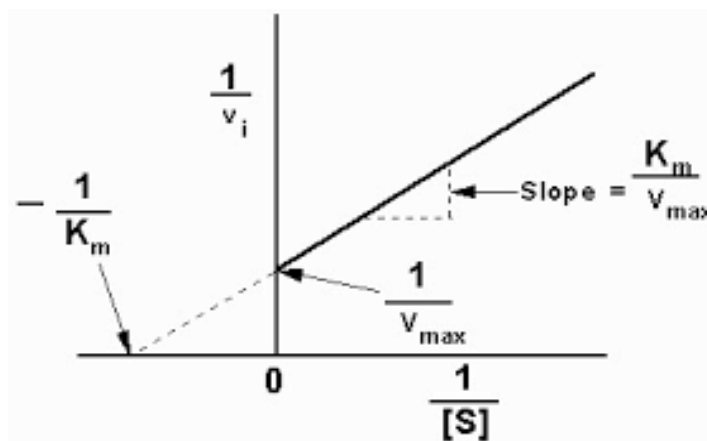
Model Michaelis–Menten menggunakan konsep katalisis enzim bahwa, enzim (E), bergabung dengan substratnya (S) untuk membentuk kompleks enzim-substrat (ES). Kompleks ES dapat berdisosiasi lagi membentuk E + S, atau dapat diproses secara kimia untuk membentuk E dan produk P. Konstanta laju k_1 , k_2 dan k_3 menggambarkan laju yang terkait dengan setiap langkah proses katalitik. Diasumsikan bahwa tidak ada laju yang signifikan untuk reaksi balik enzim dan produk (E + P) yang diubah menjadi kompleks ES. [ES] tetap konstan sampai hampir semua substrat digunakan. Diketahui bahwa kecepatan awal (V_0) pada konsentrasi substrat rendah adalah berbanding lurus dengan [S], sedangkan pada konsentrasi substrat tinggi kecepatan cenderung menuju nilai maksimum, yaitu laju menjadi tidak tergantung pada [S]. Kecepatan maksimum ini disebut V_{\max} (satuan μmol^{-1}). Kecepatan awal (V_0) adalah kecepatan yang diukur secara eksperimental sebelum lebih dari 10% substrat diubah menjadi produk untuk meminimalkan efek

reaksi reversibel, penghambatan enzim oleh produk, dan inaktivasi enzim (Hames and Hooper, 2005). Berikut ini merupakan persamaan Michaelis-Menten.

$$V_0 = \frac{V_{maks} [S]}{K_M + [S]}$$

Nilai K_M suatu enzim dapat dihitung dengan persamaan Lineweaver-Burk yang diperoleh dari persamaan Michaelis-Menten yang kemudian dihasilkan suatu diagram Lineweaver-Burk yang ditunjukkan pada Gambar 10 (Page, 1997).

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{maks}} \cdot \frac{1}{[S_0]} + \frac{1}{V_{maks}}$$



Gambar 10. Diagram Lineweaver-Burk (Suhartono dkk., 1992).

2.10. Stabilitas Enzim

Stabilitas enzim didefinisikan sebagai kestabilan aktivitas enzim selama penyimpanan dan penggunaan enzim tersebut terhadap senyawa yang bersifat merusak seperti pelarut tertentu (asam atau basa), pengaruh suhu dan kondisi-kondisi nonfisiologis lainnya (Wiseman, 1985). Stabilitas enzim dapat dilakukan dengan cara amobilisasi, modifikasi kimia, dan mutagenesis terarah (Mozhaev and Martinek, 1984).

Temperatur dan pH merupakan faktor yang mempengaruhi kestabilan enzim. Pada suhu yang terlalu rendah stabilitas enzim tinggi, namun aktivitasnya rendah, sedangkan pada suhu yang terlalu tinggi aktivitas enzim tinggi, tetapi kestabilannya rendah. Kenaikan suhu akan mempengaruhi kecepatan laju reaksi enzim, namun hanya sampai batas tertentu dan selanjutnya akan terjadi proses denaturasi protein. Daerah suhu saat stabilitas dan aktivitas enzim cukup besar disebut suhu optimum untuk enzim tersebut (Wirahadikusumah, 1997). pH sangat mempengaruhi struktur dan aktivitas biologis enzim. Interaksi ionik yang terjadi di dalam strukturnya akan menstabilkan dan memungkinkan enzim untuk mengenali dan berikatan dengan substratnya (Lehninger, 2005). Sedikit perubahan pH akan menyebabkan perubahan besar pada reaksi yang dikatalis enzim. Perubahan pH akan menyebabkan denaturasi pada protein penyusun enzim itu sendiri (Murray, 2003).

2.11. Modifikasi Kimia

Peningkatan stabilitas enzim dapat dilakukan dengan tiga cara, yaitu: amobilisasi, modifikasi kimia, dan mutagenesis terarah (Mozhaev *and* Martinek, 1984). Berdasarkan struktur enzim, gugus fungsi yang paling mungkin bereaksi dengan zat pemodifikasi terletak pada permukaan, yang merupakan grup tiol seperti, sistein dan lisin karena gugus ini paling banyak membentuk folding dan paling banyak bereaksi dengan zat pemodifikasi (Price, 1996). Modifikasi kimia dengan ikatan kovalen yang stabil dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut: (1) Modifikasi dengan menggunakan pereaksi bifungsional (pembentukan ikatan silang antara gugus- gugus fungsi pada permukaan protein), (2) Modifikasi kimia dengan menggunakan pereaksi non polar (meningkatkan interaksi hidrofobik), (3) Penambahan gugus polar bermuatan atau polar baru (menambah ikatan ionik atau hidrogen) dan (4) Hidrofilisasi permukaan protein (mencegah terjadinya kontak antara gugus hidrofobik dengan lingkungan berair yang tidak disukainya) (Mozhaev *et al.*, 1990)

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilakukan pada bulan Februari-Juli 2022 di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung yang berlokasi di Jl. Prof. Dr. Ir. Sumantri Brojonegoro No.1, Gedung Meneng, Kec. Rajabasa, Kota Bandar Lampung, Lampung 35141.

3.2. Alat dan Bahan

Adapun alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain: Spektrofotometer *UV-VIS Cary Win UV 32*, *laminar air flow* CRUMA model 9005-FL, *autoclave* model S-90N, *shaker* inkubator, *waterbath*, oven, inkubator, alat-alat gelas, jarum ose, mikropipet *Eppendroff*, neraca analitik, lemari pendingin, pembakar spiritus, sentrifuga, tabung sentrifuga, oven, pH meter, *magnetic stirrer*, botol film, dan botol plastik.

Adapun bahan-bahan yang digunakan adalah PDA (*Potato Dextrose Agar*) (Himedia), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck), KH_2PO_4 (Merck), CaCl_2 (Merck), MgSO_4 , urea, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CoCl_2 , pepton (Himedia), NaOH (Merck), glukosa, akuades, Na(K)-Tartarat, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , reagen *folin-ciocalteu* (Sigma-Aldrich), pereaksi DNS (*dinitrosalicylic acid*) (Himedia), fenol, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, HCl (Merck), Na_2CO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, BSA (*Bovine Serum Albumin*), HCL 1N, KI (Merck), I_2 , pati, akuades, glutaraldehyd (Sigma-Aldrich), kantong selofan, kapas sumbat, kasa, kertas, karet, aluminium foil, alkohol 70%, tisu, dan kertas saring.

Mikroorganisme penghasil enzim α -amilase yang digunakan pada penelitian ini adalah *A. fumigatus* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Universitas Lampung.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Pembiakan Isolat *A. fumigatus*

- a. Pembuatan media agar miring
Sebanyak 3,9 gram PDA dilarutkan dalam 100 mL akuades lalu dipanaskan. Kemudian dituangkan dalam tabung reaksi sebanyak 5 mL. Tabung reaksi ditutup dengan sumbat kapas dan disterilkan media dalam *autoclave* pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Tabung reaksi disimpan dalam posisi miring sampai media mengeras.
- b. Pembiakan *A. fumigatus*
Pembiakan dilakukan dengan diambil satu tarikan ose biakan murni *A. fumigatus* lalu ditusuk ke permukaan media agar miring. Proses dilakukan dalam *laminar air flow* yang telah disterilisasi dengan sinar *UV*. Media agar yang telah mengandung isolat diinkubasi selama beberapa hari dalam inkubator pada suhu 37°C (Yandri *et al.*, 2022).

3.3.2. Pembuatan Media Inokulum dan Fermentasi, Inokulasi *A. fumigatus* dan Produksi Enzim α -Amilase.

- a. Pembuatan media inokulum dan fermentasi
Media inokulum digunakan sebagai medium adaptasi awal pertumbuhan dan medium perkembangbiakan jamur pada media cair tanpa terjadinya produksi enzim α -amilase. Sedangkan media fermentasi digunakan sebagai medium pertumbuhan dan perkembangbiakan disertai produksi enzim α -amilase. Media

inokulum yang digunakan terdiri dari KH_2PO_4 5 gram, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,5 gram, MgSO_4 0,75 gram, pepton 1,875 gram, urea 0,75 gram, CaCl_2 0,75 gram, $\text{FeSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,0125 gram, $\text{ZnSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,0035 gram, CoCl_2 0,005 gram dan pati 1,875 gram. Kemudian semua bahan dilarutkan dalam buffer fosfat 0,05 M pH 6,5 sebanyak 100 mL dalam labu Erlenmeyer 250 mL dan disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit (Yandri *et al.*, 2022).

b. Inokulasi *A. fumigatus*

Sebanyak 3 ose *A. fumigatus* dari media agar miring dipindahkan ke dalam 50 mL media inokulum secara aseptik lalu dikocok dalam *shaker* inkubator dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam (Yandri *et al.*, 2022).

c. Produksi enzim α -amilase

Produksi enzim selulosa dilakukan dengan cara meindahkan sebanyak 2% media inokulum dari jumlah media fermentasi ke dalam media fermentasi secara aseptik lalu diletakkan pada *shaker* inkubator dengan kecepatan 125 rpm pada suhu ruang selama 112 jam (Yandri *et al.*, 2022).

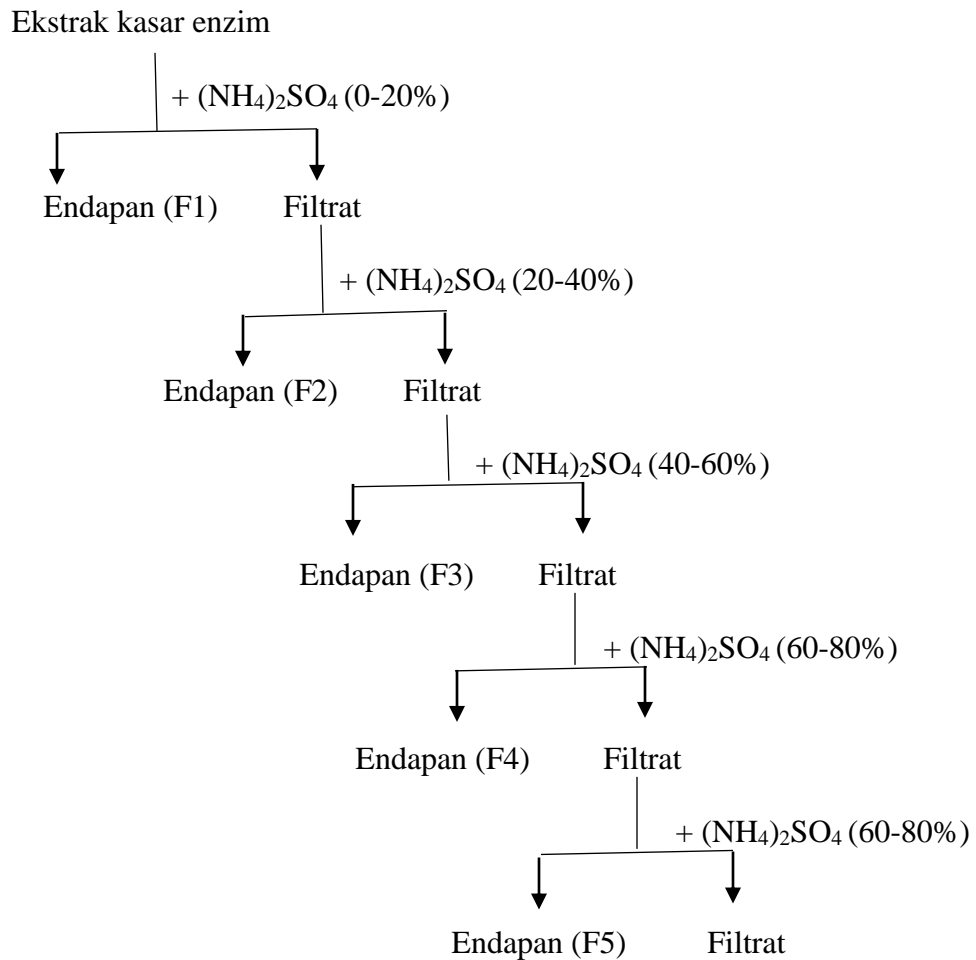
3.3.3. Isolasi Enzim α -Amilase

Isolasi enzim α -amilase dilakukan menggunakan metode sentrifugasi. Untuk memisahkan enzim dari komponen sel lainnya digunakan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Filtrat yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim (Yandri *et al.*, 2022).

3.3.4. Pemurnian Enzim α -Amilase

a. Fraksinasi menggunakan amonium sulfat

Ekstrak kasar enzim yang telah diperoleh selanjutnya diendapkan dengan menggunakan amonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pada berbagai derajat kejenuhan yaitu 0-20%; 20-40%; 40-60%; 60-80%; dan 80-100%. Skema fraksinasi dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Skema fraksinasi enzim dengan amonium sulfat.

Ekstrak kasar enzim ditambahkan garam amonium sulfat secara perlahan sambil diaduk dengan *magnetic stirer*. Endapan protein enzim yang didapatkan pada tiap fraksi kejenuhan amonium sulfat dipisahkan dari filtratnya dengan sentrifugasi

dingin pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Kemudian endapan yang diperoleh dilarutkan dengan buffer fosfat 0,025 M pH 6,5 dan diuji aktivitasnya dengan metode Fuwa serta diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry untuk mengetahui fraksi-fraksi mana yang terdapat enzim α -amilase dengan aktivitas spesifik yang tertinggi. Selanjutnya, filtrat yang didapat dari fraksi 0-20% digunakan untuk diendapkan kembali dengan fraksi kejenuhan 20-40% dengan prosedur yang sama hingga fraksi kejenuhan 80-100%.

b. Dialisis

Endapan enzim dari hasil fraksinasi kemudian dimurnikan dengan cara dialisis melalui membran semipermeabel (kantong selofan), dengan buffer fosfat 0,01 M pH 6,5 selama 24 jam pada suhu dingin. Selama proses dialisis, dilakukan pergantian buffer setiap 4-6 jam agar konsentrasi ion-ion di dalam selofan dapat dikurangi. Proses ini dilakukan secara kontinyu sampai ion-ion di dalam selofan dapat diabaikan. Untuk mengetahui bahwa sudah tidak ada lagi ion-ion garam dalam selofan, maka diuji dengan menambahkan larutan $\text{Ba}(\text{OH})_2$ atau BaCl_2 di luar selofan. Bila terbentuk endapan putih BaSO_4 di luar selofan, maka ion sulfat telah berhasil dikeluarkan dari dalam selofan. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas dengan metode Fuwa dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.

3.3.5. Uji Aktivitas Enzim α -Amilase dan Penentuan Kadar Protein

a. Metode Fuwa

1. Pembuatan pereaksi untuk pengukuran aktivitas α -amilase metode Fuwa (Fuwa, 1954).

a) Pereaksi iodin : 2 gram KI dimasukkan dalam labu takar 100 mL dan dilarutkan dalam akuades 10 mL. Selanjutnya dimasukkan 0,2 gram I_2 dan ditambahkan akuades hingga tanda batas miniskus.

- b) Larutan pati : 0,1 gram pati dilarutkan dalam akuades 100 mL dan dipanaskan hingga larut.
- c) Larutan HCl 1N : HCl pekat 12 N diencerkan menjadi 1 N. Sebanyak HCl pekat 8,3 mL dimasukkan dalam labu ukur 100 mL. Tambahkan akuades hingga batas miniskus.

2. Uji Aktivitas enzim α -amilase metode Fuwa (Fuwa, 1954).

Metode ini berdasarkan pada 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 1N dan kemudian ditambahkan 0,25 mL pereaksi iodin dan 4 mL akuades. Setelah campuran diaduk rata, serapannya diukur menggunakan spektrofotometer *UV-VIS* pada λ_{maks} 600 nm. Kontrol dibuat dengan cara yang sama hanya menggunakan 0,25 mL enzim yang telah dinaktivasi menggunakan HCl.

b. Metode Mandels

1. Pembuatan pereaksi uji aktivitas enzim α -amilase metode Mandels.

Sebanyak 1 gram DNS dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL, selanjutnya ditambahkan 1 gram NaOH lalu dikocok hingga larut, kemudian ditambahkan 0,2 gram fenol dan 0,05 gram $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ dan 0,4 gram Na (K)-tartarat, kemudian dilarutkan dengan akuades hingga tanda batas (Mandels *et al.*, 1976).

2. Uji aktivitas enzim α -amilase metode Mandels

Dengan membandingkan anatar sampel dan kontrol, larutan sampel dibuat dengan 0,25 mL enzim ditambah 0,25 larutan pati dan larutan kontrol 0,25 mL enzim, yang masing-masing diinkubasi selama 30 menit dalam *waterbath* inkubator pada suhu 60°C. Kemudian kontrol ditambah 0,25 mL larutan pati dan selanjutnya sampel dan kontrol ditambah 1 mL larutan DNS dan

dididihkan selama 10 menit pada penangas air lalu didinginkan. Selanjutnya sampel dan kontrol ditambah 1,5 mL akuades kemudian serapannya diukur menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada λ 510 nm. Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan dengan menggunakan kurva standar glukosa (Mandels *et al.*, 1976).

c. Penentuan kadar protein metode Lowry

1. Pembuatan Pereaksi untuk Penentuan Kadar Protein Metode Lowry.

Uji kadar protein α -amilase menggunakan metode Lowry diawali dengan pembuatan pereaksi.

- a. Pereaksi A : 2 gram Na_2CO_3 dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 N.
- b. Pereaksi B : 5 mL $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 %, ditambahkan ke dalam 5 mL larutan Na(K)-Tartarat 1%.
- c. Pereaksi C : 2 mL pereaksi B ditambah 100 mL pereaksi A.
- d. Pereaksi D : reagen *follin clocalteau* diencerkan dengan akuades 1:1.
- e. Larutan standar : larutan BSA (*Bovine Serum Albumin*) dengan kadar 20, 40, 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm.

2. Penentuan kadar protein enzim α -amilase metode Lowry

Kadar protein enzim ditentukan dengan metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

Sebanyak 0,1 mL larutan enzim ditambah dengan 0,9 ml akuades. Lalu direaksikan dengan 5 mL pereaksi C, dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruang. Selanjutnya, ditambahkan dengan cepat 0,5 mL pereaksi D dan diaduk dengan sempurna, didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Untuk kontrol, 0,1 mL enzim diganti dengan akuades. Selanjutnya perlakuannya sama seperti sampel. Serapannya diukur menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada λ 750

nm. Untuk menentukan kadar protein enzim digunakan kurva standar BSA dan perhitungan metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

3.3.6. Penambahan Glutaraldehyd

Sebanyak 10 mL glutaraldehyd dengan konsentrasi 0,02%; 0,04%; dan 0,06% masing-masing ditambahkan 10 mL enzim hasil pemurnian, menghasilkan campuran modifikasi enzim-glutaraldehyd 0,02% (GA 0,02%), enzim-glutaraldehyd 0,04% (GA 0,04%) dan enzim-glutaraldehyd 0,06% (GA 0,06%). Campuran diaduk dengan perbandingan 1:1 menggunakan *magnetic stirrer* selama 1 jam. Selanjutnya enzim hasil penambahan glutaraldehyd akan dikarakterisasi dengan beberapa tahapan (Witazora *et al.*, 2021).

3.3.7. Karakterisasi Enzim α -Amilase

a. Penentuan pH optimum

Penentuan pH optimum enzim sebelum dan sesudah termodifikasi digunakan buffer fosfat 0,05 M dengan pH 5; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; dan 8 selama 30 menit. Suhnya dijaga tetap 60°C, kemudian aktivitas enzim diukur dengan metode Mandels.

b. Penentuan suhu optimum

Untuk mengetahui suhu optimum kerja enzim dilakukan dengan memvariasikan suhu yaitu 4,5; 50; 55; 60; 65 dan 70 °C selama 30 menit pada pH optimum. Selanjutnya aktivitas enzim diukur dengan metode Mandels.

c. Penentuan K_M dan V_{maks}

Konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) enzim α -amilase ditentukan dengan memvariasikan konsentrasi substrat 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1% dalam buffer fosfat pada suhu dan pH optimumnya. Selanjutnya data

aktivitas enzim dengan konsentrasi substrat diplotkan ke dalam kurva Lineweaver-Burk untuk penentuan K_M dan V_{maks} .

d. Uji stabilitas termal enzim

Uji stabilitas termal enzim sebelum dan sesudah penambahan dilakukan dengan mengukur aktivitas sisa enzim setelah diinkubasi selama 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 dan 100 menit pada pH dan suhu optimumnya (Virdianingsih, 2002).

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

3.3.8. 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 dilakukan dengan menggunakan persamaan kinetika inaktivasi orde 1 (Kazan *et al.*, 1997) dengan persamaan:

$$\ln (E_i/E_0) = -k_i t_{1/2}$$

Adapun penentuan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan enzim modifikasi diturunkan dari persamaan:

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

Keterangan :

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

T = suhu absolut (K)

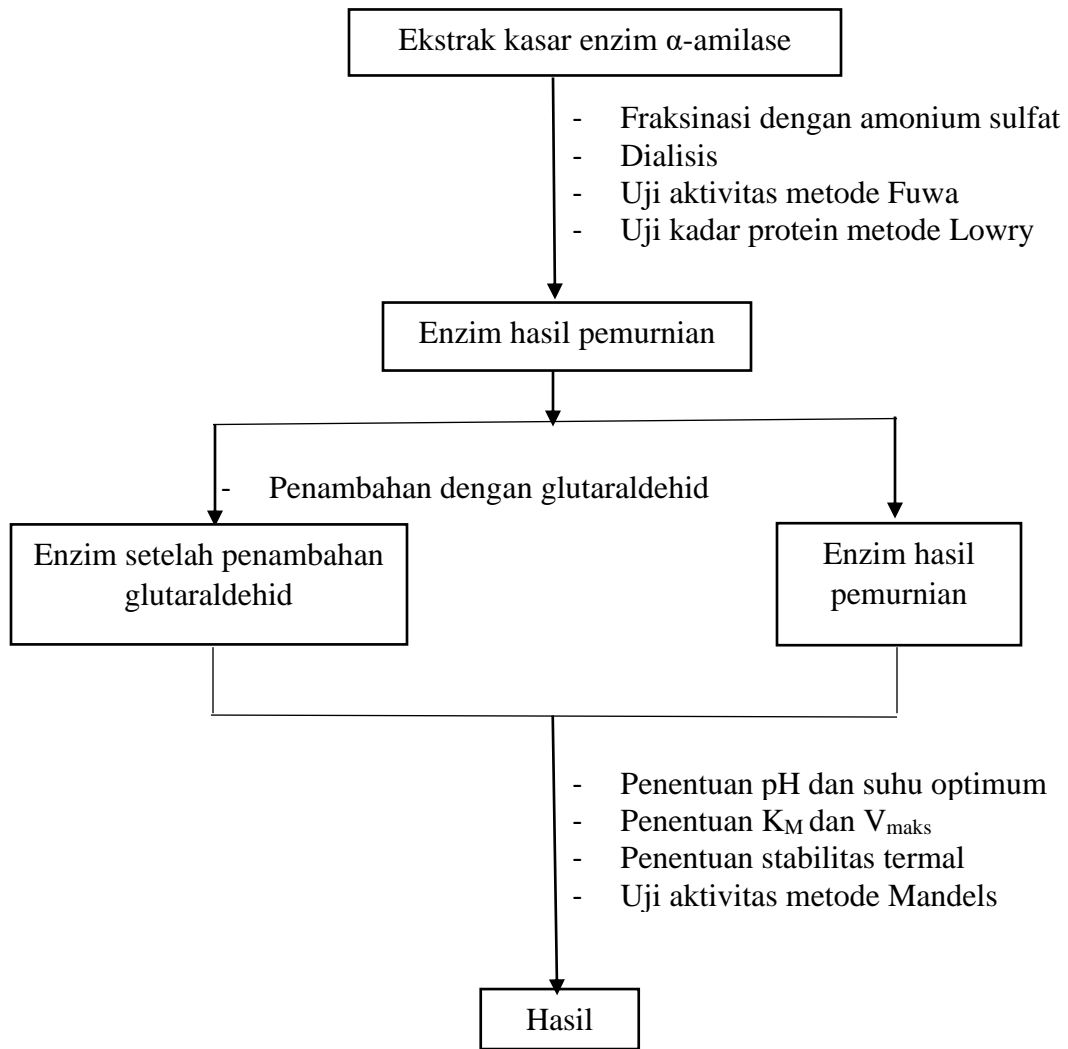
k_i = konstanta laju inaktivasi termal

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

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

(Kazan *et al.*, 1997).

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



Gambar 12. Diagram alir penelitian.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

Berdasarkan pembahasan dari hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Enzim α -amilase hasil pemurnian meningkat kemurniannya sebanyak 8,93 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim dengan aktivitas spesifik sebesar 520,51 U/mg.
2. Enzim hasil pemurnian mempunyai pH optimum 5; suhu optimum 55°C; $K_M = 10,80$ mg/mL substrat dan $V_{maks} = 10,13 \mu\text{mol/mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$. Uji stabilitas termal enzim enzim α -amilase hasil pemurnian pada suhu 60°C selama 100 menit memiliki aktivitas sisa sebesar 12% dengan nilai $k_i = 0,0228 \text{ menit}^{-1}$; $t_{1/2} = 30,39$ menit dan $\Delta G_i = 103,639 \text{ kJ/mol}^{-1}$.
3. Enzim hasil penambahan glutaraldehid dengan konsentrasi 0,02; 0,04; dan 0,06% mempunyai pH optimum 6,5; suhu optimum 55°C; K_M berturut-turut sebesar = 12,85; 21,73; dan 14,54 mg/mL substrat dan nilai V_{maks} berturut-turut = 7,37; 9,85; dan $7,35 \mu\text{mol/mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$.
4. Uji stabilitas termal enzim enzim α -amilase hasil penambahan glutaraldehid dengan konsentrasi 0,02; 0,04; dan 0,06% pada suhu 60°C selama 100 menit memiliki aktivitas sisa berturut-turut sebesar 43, 42, dan 42% dengan nilai $k_i = 0,0082$; 0,0083; dan 0,0084 menit^{-1} ; $t_{1/2} = 84,51$; 83,49; dan 82,50 menit dan $\Delta G_i = 106,491$; 106,463; dan 106,436 kJ/mol^{-1} .
5. Hasil penentuan k_i , $t_{1/2}$ dan ΔG_i menunjukkan peningkatan stabilitas termal enzim hasil penambahan sebesar 2,7 sampai 2,8 kali dibanding enzim hasil pemurnian dengan stabilitas terbaik pada penambahan glutaraldehid 0,02%.

5.2. Saran

Dari hasil penelitian yang telah diperoleh, maka disarankan untuk menggunakan konsentrasi yang lain untuk mengetahui stabilitas enzim dengan glutaraldehid dan untuk menggunakan zat aditif lain selain glutaraldehid, karena zat aditif berupa poliol dapat berpengaruh untuk meningkatkan stabilitas enzim.

DAFTAR PUSTAKA

- Aiyer, P. V. 2005. Amylases and Their Applications. *Afr. J. Biotechnol.* **4** (13), pp. 1525-1529.
- Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., Rodrigues, R. C. and Fernandez-Lafuente, R. 2014. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *RSC Advances.* **4** (4): 1583–1600.
- de Souza, P. M. and Magalhães, P. de O. 2010. Application of microbial α -amylase in industry-a review. *Braz. J. Microbiol.* **41** (4): 850–861.
- Dehkordi, M. M. and Javan, A. F. 2012. Application of alpha-amylase in biotechnology. *J. Biol. Today's World.* **1** (1): 39–50.
- Eijsink, V. G. H., Bjørk, A., Gåseidnes, S., Sirevåg, R., Synstad, B., Burg, B. Van Den. and Vriend, G. 2004. Rational engineering of enzyme stability. *J. Biotech.* **113** (1–3). 105–120.
- Faatih, M. 2009. Isolasi dan digesti DNA kromosom. *J. Penelitian Sains dan Teknologi.* **20** (1): 61–67.
- Fuwa, H. 1954. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. *J. Biochem.* **41** (5): 583-603.
- Gandi, N. I. P. G., Getas, I. W. and Jannah, M. 2019. Studi jamur *Aspergillus fumigatus* penyebab aspergillosis di pasar Cakranegara kota Mataram dengan media pertumbuhan potato dextrose agar (PDA). *J. Analis Medika Bio Sains.* **6** (1): 1–9.
- Gautam, A. K. and Bhadauria, R. 2012. Characterization of *Aspergillus* species associated with commercially stored triphala powder. *Afr. J. Biotechnol.* **11** (104): 16814–16823.
- Hames, B. D. and Hooper, N. 2000. *Biochemistry. The Instant Notes.* Springer-Verlag. Hongkong.
- Hames, B. D. and Hooper, N. 2005. *Biochemistry. Ed Ke-3.* In Taylor and Francis Group. New York.

- Haryati, T., Marbun, P. dan Purwadaria, T. 2010. Preservasi xilanase *Bacillus pumilus* PU4-2 dengan teknik imobilisasi pada pollard dan penambahan kation. *J. Ilmu Ternak dan Veteriner*. **15** (1): 63–71.
- Jaka, K. 2012. Isolasi dan Uji Aktivitas Enzim Amilase dari Bakteri Termofilik pada Sumber Air Panas Desa Pincara Kecamatan Masamba Kabupaten Luwu Utara. *Skripsi*. UIN Allaudin Makasar. Makasar.
- Janecek, S. 2009. Amylolytic enzymes-focus on the alpha-amylases from archaea and plants. *Nova Biotechnol*. **9** (1): 5-25.
- Judoamidjojo, R. M. 1989. *Biokonversi*. Depdikbud Didjen Pendidikan Tinggi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB. Bogor.
- Kazan, D., Ertan, H. and Erarslan, A. 1997. Stabilization of *Escherichia coli* penicillin G acylase against thermal inactivation by cross-linking with dextran dialdehyde polymers. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **48**: 191-197.
- Lehninger, A. L. 1982. *Dasar-Dasar Biokimia*. Erlangga. Jakarta.
- Lehninger, A. L. 2005. *Dasar-Dasar Biokimia*. Erlangga. Jakarta.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Far, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. **193** (1): 265-275.
- Mandels, M., Andreotti, R. and Roche, C. 1976. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotech and Bioeng. Symp*. No. 6. New York: John Wiley and Sons Inc.
- Martoharsono, S. 1984. *Biokimia Jilid 1*. UGM Press. Yogyakarta.
- Martoharsono, S. 2006. *Biokimia 1*. UGM University Press. Yogyakarta.
- Mozhaev, V. V. and Martinek, K. 1984. Structure-stability relationship in proteins: New approaches to stabilizing enzymes. *Enzyme Microb. Technol*. **6** : 50- 59.
- Mozhaev, V. V., Melik-Nubarov, N. S., Siksniis, V. and Martinek, K. 1990. Strategy for stabilizing enzymes. Part two: Increasing enzyme stability by selective chemical modification. *Biocatalysis*. **3**: 189-196.
- Murray, R.K. 2003. *Biokimia Harper*. Edisi 25. Kedokteran. EGC. Jakarta.
- Page, D. S. 1989. *Prinsip-Prinsip Biokimia*. Erlangga. Jakarta.
- Page, D. S. 1997. *Prinsip-Prinsip Biokimia*. Erlangga. Jakarta.

- Pelczar, M. J., Supriyanti dan Chan E.C.S. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. UI Press. Jakarta.
- Poedjiadi, A. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. UI Press. Jakarta.
- Poedjiadi, A. dan Supriyanti, F. T. 2006. *Dasar-dasar Biokimia Edisi Revisi*. UI-Press. Jakarta.
- Pudjowono, M. 1997. *Karakter Enzim Amilase dari Beberapa Strain Bakteri Indigenous Indonesia*. Prosiding Seminar Teknologi Pangan. Bogor.
- Prawirohardjo, S. 2004 *Panduan Pencegahan Infeksi untuk Fasilitas Pelayanan Kesehatan dengan Sumber Daya Terbatas Cetakan Kedua*. Yayasan Bina Pustaka. Jakarta.
- Price, N. C. 1996. *Protein LABFAX*. Academic Press. UK.
- Reed, G. 1975. *Enzymes in Food Processing*. Academic Press. New York. 212.
- Saranraj, P. and Stella, D. 2013. Fungi amylase-A review. *Int. J. Microbiol. Res.* **4** (2): 203-211.
- Saropah, D. A., Jannah, A. dan Maunatin, A. 2012. Kinetika reaksi enzimatik ekstrak kasar enzim selulase bakteri selulolitik hasil isolasi dari bekatul. *J. of chem.* **2** (1): 35-45.
- Scopes, R. K. 1982. *Protein Purification*. Springer Verlag. New York.
- Scopes, R. K. 1994. *Protein Purification: Principles and Practice 3rd ed.* Springer-Verlag. New York.
- Selvarajan, E., Mohanasrinivasan, V., Subathra Devi, C. and George Priya, D.C. 2015. Immobilization of β -galactosidase from *Lactobacillus plantarum* HF571129 on ZnO nanoparticles: characterization and lactose hydrolysis. *Bioproc. Biosyst. Eng.* **38** (9): 1655-1669.
- Suhartono, M. T., Suswanto A. dan Widjaja H. 1992. *Diktat Struktur dan Biokimia Protein PA*. IPB. Bogor.
- Supriyatna, A., Amalia, D., Jauhari, A. A. dan Holydaziah, D. 2015. Aktivitas enzim amilase, lipase, dan protease dari larva. *Jurnal Istek.* **IX** (2): 18–32.
- Sutrisno, A. 2017. *Teknologi Enzim*. UB Press. Malang.

- Suwarso, N., AS, Yandri. dan Hadi, S. 2017. Peningkatan kestabilan enzim protease dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dengan modifikasi kimia menggunakan sitrakonat anhidrida. *J. Analis Kesehatan*, **5** (1), 475-482.
- Virdianingsih, R. 2002. Mempelajari Stabilitas Termal Enzim Protease dari *Bacillus pumilus* y1 dalam Pelarut Heksana, Toluena, dan Benzena. *Skripsi*. Institute Pertanian Bogor. Bogor.
- Waluyo, J. 2006. *Biologi Dasar*. Universitas Jember Press. Jember.
- Winarno, F. G. 1983. *Enzim Pangan*. Gramedia. Jakarta.
- Winarno, F. G. 1989. *Enzim Pangan dan Gizi*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Winarno, F. G. 2010. *Enzim Pangan*. M-Brio Press. Bogor.
- Wirahadikusumah. 1997. *Biokimia: Protein, Enzim dan Asam Nukleat*. ITB. Press. Bandung.
- Wirahadikusumah, M. 2001. *Biokimia: Protein, Enzim dan Asam Nukleat*. ITB Press. Bandung.
- Wiseman, A. S. 1985. *Handbook of Enzymes Biotechnology*, 2nd ed. Ellies Harwood Lim Chicester.
- Witazora, Y., Yandri, Suhartati, T., Satria, H. and Hadi, S. 2021. Effect of glutaraldehyde addition on the stability of the α -amylase from *Bacillus subtilis* ITBCCB148. *J. Phys. Conference Series*. **1751** (1). 1-9.
- Yandri, Y., Ropingi, H., Suhartati, T., Hendri, J., Irawan, B. and Hadi, S. 2022. The effect of zeolite/chitosan hybrid matrix for thermal-stabilization enhancement on the immobilization of *Aspergillus fumigatus* α -amylase. *Emerg. Sci. J.* **6** (3): 505-518.
- Yang, Z., Michael, D., Robert, A., Fang, X. Y. and Alan, J. R. 1996. Polyethylene glycol-induced stabilization of subtilisi. *Enzyme Microb. Technol.* **18**: 82-89.
- Yuliasih, I., Irawadi, T. T., Sailah, I., Pranamuda, H., Setyowati, K. dan Sunart, T. C. 2007. Pengaruh proses fraksinasi pati sagu terhadap karakteristik fraksi amilosanya. *J. Teknologi Industri Pertanian*. **17** (1): 29–36.
- Zaak, H., Fernandez-lopez, L., Otero, C., Sassi, M. and Fernandez, L. R. 2017. Enzyme and microbial technology improved stability of immobilized lipases via modification with polyethylenimine and glutaraldehyde. *Enzyme Microb. Technol.* **106**: 67–74.