

**PENGARUH MODIFIKASI KIMIA MENGGUNAKAN
ASAM GLIOKSILAT TERHADAP STABILITAS ENZIM α -AMILASE
DARI *Aspergillus fumigatus***

(Skripsi)

Oleh

DWI NOVIANI



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

ABSTRAK

PENGARUH MODIFIKASI KIMIA MENGGUNAKAN ASAM GLIOKSILAT TERHADAP STABILITAS ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus fumigatus*

Oleh

Dwi Noviani

Enzim α -amilase merupakan enzim ekstraseluler yang mampu memotong ikatan 1,4- α -D-glikosidik antar monomer glukosa pada rantai linier amilosa. Enzim α -amilase memiliki aplikasi paling luas dalam berbagai bidang industri. Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan stabilitas enzim α -amilase dari *A. fumigatus* dengan modifikasi kimia menggunakan asam glioksilat. Enzim α -amilase diisolasi menggunakan sentrifugasi dan dimurnikan menggunakan fraksinasi dengan amonium sulfat dan dialisis. Enzim hasil pemurnian dimodifikasi dengan asam glioksilat. Aktivitas enzim α -amilase dilakukan dengan metode Fuwa dan metode Mandels. Kadar protein ditentukan dengan metode Lowry. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas spesifik enzim hasil pemurnian sebesar 1.037,42 U/mg meningkat 18 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim yang mempunyai aktivitas spesifik 58,31 U/mg. Enzim hasil pemurnian mempunyai pH optimum 5,0 dengan suhu optimum 55°C; $K_M = 11,55 \text{ mg/mL}^{-1}$ substrat, $V_{maks} = 10,76 \mu\text{mol mL}^{-1}\text{menit}^{-1}$ dan uji stabilitas termal enzim selama 100 menit pada suhu 60°C memiliki aktivitas sisa sebesar 9,34% dengan $k_i = 0,018 \text{ menit}^{-1}$; $t_{1/2} = 38,50$ menit; dan $\Delta G_i = 104,331 \text{ kJ/mol}^{-1}$. Enzim hasil modifikasi kimia menggunakan asam glioksilat dengan konsentrasi 1,5; 2,0; dan 2,5 mg/mL optimum pada pH 5,5 dan suhu 55°C serta memiliki nilai K_M berturut-turut sebesar 16,74; 16,28; dan 14,67 mg/mL⁻¹ substrat, nilai V_{maks} berturut-turut sebesar 9,32; 7,92; dan 7,07 $\mu\text{mol mL}^{-1}\text{menit}^{-1}$ serta uji stabilitas termal enzim selama 100 menit pada suhu 60°C memiliki aktivitas sisa berturut-turut sebesar 28,59; 35,93; dan 39,23% serta memiliki nilai $k_i = 0,0105$; 0,0096; dan 0,0088 menit^{-1} , nilai $t_{1/2} = 66,00$; 72,19; dan 78,75 menit, dan nilai $\Delta G_i = 105,799$; 106,076; dan 106,297 kJ/mol^{-1} . Enzim hasil modifikasi kimia dengan asam glioksilat memiliki kestabilan termal yang tinggi, hal ini dibuktikan dengan peningkatan waktu paruh sebesar 1,08-2,05 kali lipat dibandingkan dengan enzim murni.

Kata kunci: α -amilase, *A. fumigatus*, modifikasi kimia, asam glioksilat.

ABSTRACT

EFFECTS CHEMICAL MODIFICATION USING GLYOXYLIC ACID ON THE STABILITY OF α -AMYLASE FROM *Aspergillus fumigatus*

By

Dwi Noviani

α -Amylase is an extracellular enzyme that may breakdown 1,4-D-glycosidic bonds between glucose monomers in amylose linear chains. The α -amylase enzyme is widely used in a variety of industrial areas. The purpose of this study was to enhance the stability of the α -amylase enzyme from *A. fumigatus* by chemical modification using glyoxylic acid. The α -amylase enzyme was isolated by centrifugation and purified by ammonium sulfate fractionation and dialysis. The purified enzyme was modified with glyoxylic acid. α -Amylase activity was tested using the Fuwa method and Mandels method. Protein content was determined by the Lowry method. The results showed that the specific activity of the purified enzyme, 1,037.42 U/mg, increased 18 times over the crude extract of the enzyme, which had a specific activity of 58.31 U/mg. The purified enzyme has an optimum pH of 5.0 with an optimum temperature of 55°C; $K_M = 11.55 \text{ mg/mL}^{-1}$ substrate, $V_{\max} = 10.76 \text{ mole/mL}^{-1}$ and the thermal stability test at 60°C for 100 minutes yielded a residual activity of 9.34% with $k_i = 0.018 \text{ minutes}^{-1}$, $t_{1/2} = 38.50 \text{ minutes}$, and $\Delta G_i = 104.331 \text{ kJ/mol}^{-1}$. Chemical modification enzyme using glyoxylic acid with a concentration of 1.5; 2.0; and 2.5 mg/mL optimum pH at 5.5 and temperature 55°C and has a K_M value of 16.74; 16.28; and 14.67 mg/mL^{-1} substrate, V_{\max} value are 9.32; 7.92; and 7.07 mole/mL^{-1} and the thermal stability test at 60°C for 100 minutes yielded residual activity of 28.59, 35.93, and 39.23%, with $k_i = 0.0105, 0.0096, \text{ and } 0.0088 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2} = 66.00, 72.19, \text{ and } 78.75 \text{ minutes}$, and $\Delta G_i = 105.799, 106.076, \text{ and } 106.297 \text{ kJ/mole}^{-1}$. Enzymes that have been chemically modified with glyoxylic acid show great thermal stability, as indicated by a 1.08-2.05-fold increase in half-life when compared to purified enzymes.

Keywords: α -amylase, *A. fumigatus*, chemical modification, glyoxylic acid.

**PENGARUH MODIFIKASI KIMIA MENGGUNAKAN
ASAM GLIOKSILAT TERHADAP STABILITAS ENZIM α -AMILASE
DARI *Aspergillus fumigatus***

Oleh

DWI NOVIANI

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 : **PENGARUH MODIFIKASI KIMIA MENGGUNAKAN
ASAM GLIOKSILAT TERHADAP STABILITAS ENZIM
 α -AMILASE DARI *Aspergillus fumigatus***

Nama Mahasiswa : **Dwi Noviani**

Nomor Pokok Mahasiswa : **1817011053**

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

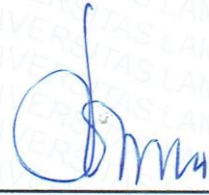
2. **Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung**

Mulyono, Ph.D.
NIP 19740611 200003 1 002

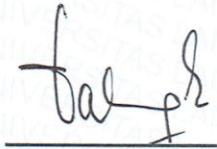
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

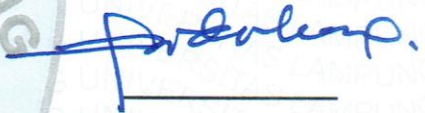
Ketua : Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S.



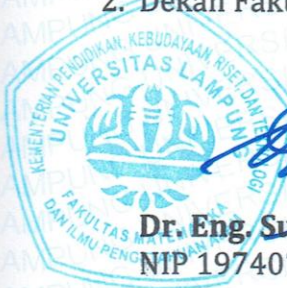
Sekretaris : Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S.



Anggota : Dr. Hardoko Insan Qudus, M.S.



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 05 Desember 2022

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Dwi Noviani
Nomor Pokok Mahasiswa : 1817011053
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya dan sesungguhnya, bahwa skripsi saya berjudul **“Pengaruh Modifikasi Kimia Menggunakan Asam Glioksilat terhadap Stabilitas Enzim α -Amilase dari *Aspergillus fumigatus*”** adalah 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, 5 Desember 2022

Pembuat Pernyataan



Dwi Noviani

NPM 1817011053

RIWAYAT HIDUP

Penulis bernama lengkap Dwi Noviani dilahirkan di Bandar Lampung, pada tanggal 23 November 1999. Anak kedua dari tiga bersaudara, putri dari Bapak Kusnadi dan Ibu Saiyah. Penulis mengawali jenjang Pendidikan dari Pendidikan Sekolah Dasar di SDN 3 Rajabasa Jaya yang diselesaikan pada tahun 2012. Kemudian melanjutkan pendidikan Sekolah Menengah Pertama di SMP Negeri 20 Bandar Lampung diselesaikan pada tahun 2015, dan melanjutkan pendidikan Sekolah Menengah Atas di SMA Negeri 13 Bandar Lampung diselesaikan pada tahun 2018. Pada tahun 2018, penulis diterima sebagai Mahasiswa Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung melalui jalur PMPAP (Penerimaan Mahasiswa Perluasan Akses Pendidikan) yang diselesaikan pada tahun 2022.

Selama di perguruan tinggi, penulis pernah bergabung dalam organisasi kemahasiswaan, sebagai Kader Muda Himpunan Mahasiswa Kimia (KAMI) periode 2018, dan kemudian menjadi anggota Biro Usaha Mandiri Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) pada periode 2019 dan 2020. Penulis melaksanakan KKN (Kuliah Kerja Nyata) pada bulan Februari-Maret 2021 di Desa Karang Sari, Kecamatan Jati Agung, Kabupaten Lampung Selatan. Pada tahun 2021, penulis menyelesaikan PKL (Praktik Kerja Lapangan) di Laboratorium Biokimia, Universitas Lampung dengan judul “Penentuan Kondisi Optimum *Aspergillus Fumigatus* Menghasilkan Enzim Selulase Pada Media Tongkol Jagung”. Penulis juga pernah menjadi asisten Praktikum Biokimia 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”

Kepersembahkan goresan tinta dalam karya kecil ini sebagai tanda cinta, kasih sayang, hormat dan baktiku terhadap kedua malaikat dalam hidupku :

Ibu dan Bapakku tercinta

Yang telah menjadi sumber kekuatan dan semangat bagiku, keringat yang selalu menjadi saksi dan perjuangannya untukku. Bapak dan Ibu, lewat karya ini ananda ingin berterimakasih atas segala cinta, kesabaran, pengorbanan, dukungan, kasih sayang, ketulusan serta doa yang tak pernah lelah dalam hidupnya selalu mendoakanku. Untuk tetehku tercinta (**Nadia Nisa**) dan Adikku tercinta (**Tri Nandorio S.**), yang telah memberikan dukungan, semangat dan keceriaan kepada penulis dalam menyelesaikan karya ini.

Rasa hormat saya kepada:

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

Bapak Ibu Dosen Jurusan Kimia atas dedikasi dan Ilmu yang telah diberikan kepadaku selama menempuh pendidikan dikampus.

Keluarga besarku dan teman-teman yang senantiasa memberikan semangat dan bantuan untukku, selalu mengajarkan tentag arti berbagi, cinta dan kebersamaan.

Serta

Almamaterku Tercinta

MOTTO

“Barang siapa keluar untuk mencari sebuah ilmu, maka ia berada di jalan Allah hingga ia kembali”.

[HR Tirmidzi]

“Kalau ingin melakukan perubahan, jangan takut terhadap kenyataan, asalkan kau yakin di jalan yang benar, maka lanjutkanlah”.

[Gus Dur]

“Gagal hanya terjadi jika kita menyerah”.

[Bacharuddin Jusuf Habibie]



“Look, you have to make mistake. That’s how you learn and that’s how the world works”.

[Naomi Campbell]

SANWACANA

Puji syukur penulis ucapkan kepada Allah SWT karena atas nikmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Pengaruh Modifikasi Kimia Menggunakan Asam Glioksilat terhadap Stabilitas Enzim α -Amilase dari *Aspergillus fumigatus*”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana sains di Universitas Lampung.

Dalam penulisan skripsi ini tidak lepas dari kesulitan dan rintangan, namun itu semua dapat penulis lalui berkat rahmat dan ridho Allah SWT serta bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini, dengan rasa hormat dan tulus dari hati yang paling dalam, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Orang tuaku tercinta, Bapak dan Ibu dengan penuh cinta dan kasih sayang yang selalu mendoakan, menyemangati, berkorban, memberikan nasihat, memberikan kekuatan, mendengarkan keluh kesah, serta mendukung keberhasilan yang sangat berharga bagi penulis. Semoga Allah SWT senantiasa melindungi, serta memberikan kesehatan, dan rezeki kepada Bapak dan Ibu.
2. Teteuku tersayang Nadia Nisa dan Adikku Tri Nando Rio S. yang selalu memberi dukungan, bantuan, dan semangat kepada penulis. Semoga Allah SWT senantiasa melindungi, serta memberikan kesehatan, dan rezeki kepada Tete dan Adik.
3. Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S. selaku pembimbing I yang telah meluangkan waktu, tenaga, pikiran, kesabaran, memberikan ilmu, nasihat, arahan, bantuan, motivasi, dan saran kepada penulis selama penelitian sampai selesainya skripsi ini. Semoga Allah SWT membalas segala kebaikan Bapak.
4. Ibu Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S. selaku pembimbing II yang telah sabar membimbing, mengoreksi, memberikan arahan, dan saran dalam menyelesaikan skripsi ini. Semoga Allah SWT membalas segala kebaikan Ibu.

5. Bapak Dr. Hardoko Insan Qudus, M.S. selaku pembahas yang telah memberikan kemudahan, arahan, masukan, kritik, dan saran yang membangun dalam menyelesaikan skripsi ini. Semoga Allah SWT senantiasa membalas kebaikan Bapak.
6. Ibu Dra. Aspita Laila, M.S. selaku pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan, nasihat, motivasi, dan saran selama perkuliahan kepada penulis. Semoga Allah SWT senantiasa membalas kebaikan Ibu.
7. Bapak Mulyono, Ph.D. selaku ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.
8. Bapak Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T. selaku dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.
9. Bapak dan Ibu dosen Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung yang telah mendidik serta memberikan ilmu, saran, dan motivasi kepada penulis selama menjadi mahasiswa.
10. Seluruh karyawan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung atas waktu serta pelayanan yang telah diberikan dalam proses perkuliahan.
11. Sepupu dan keluarga besarku baik dari Bapak maupun Ibu. Terima kasih atas doa, dukungan, dan seluruh bantuannya selama ini.
12. Partner penelitianku PY'18 yaitu Eka Candra Wati, Lily Nur Safitri, dan Lupia Widya Astuti. Terima kasih atas kerja sama, motivasi, kekompakan, dan saling menyemangati dari awal memasuki Laboratorium Biokimia walaupun banyak kesulitan dan cobaan namun tetap berjuang bersama sampai selesainya penelitian ini. Semoga kedepannya selalu sukses dan diberikan kesehatan oleh Allah SWT.
13. Kakak tingkat seperbimbinganku yaitu Kak Hendri Ropingi, S.Si., Terima kasih telah membimbing, mengoreksi, menguji, meluangkan banyak waktu, pikiran, tenaga, kesabaran, memberikan ilmu, kritik, saran, semangat, dan bantuan lainnya selama penulis melakukan penelitian.
14. Kakak Tingkat seperbimbinganku Mba Ezra Rheinsky Tiarsa, S.Si. M.Si., Mba Najma Firdausi, S.Si., Mba Noura Lydia Utami, S.Si., Mba Mega

Yestikasari, S.Si, Mba Ella dan Mba Mahyal. Yang telah mengajari penelitian, memberikan arahan, motivasi, saran, dan semangat kepada penulis.

15. Adik Tingkat seperbimbingan yaitu Virginia Nuh Reza, Diah Indah, Ayu Ranja dan Neng Wiwit atas doa, dukungan, semangat, keceriaan, dan semangat kepada penulis.
16. Sahabat-sahabat kecilku yaitu Ani Puspita dan Santika. Terima kasih telah mendoakan, memberikan keceriaan, dukungan, pengertian, dan semangat kepada penulis.
17. Sahabat-sahabat SMP-ku yaitu Lely Liya Lita, Yani Khoirot, Sasi Andayani, Miftahul Jannah, dan Rani Amylia. Terima kasih telah mendoakan, memberikan keceriaan, dukungan, pengertian, dan semangat kepada penulis.
18. Sahabat-sahabat SMA-ku yaitu Cintia Ayu aryani, Nonni Yuvikha, Siti Alawiyah, Putri Sopiani, dan Leni Sulistia. Terima kasih telah mendoakan, memberikan keceriaan, dukungan, pengertian, dan semangat kepada penulis.
19. Sahabat-sahabat kuliahku yaitu Annisa Larasati, Antin Sri Prihatin, dan Annida Rezani. Terima kasih sudah menjadi tempat berkeluh kesah, memberikan semangat, memberi saran, motivasi, kebahagiaan, pengertian, serta mendoakan penulis.
20. Teman-teman di Laboratorium Biokimia yaitu Aulia Siti Pradina, Nurmayana Putri, Salsabila, Vezhia Sheiscatamya, Salsabilla Bethari, Aprilia Fransiska, Olivia Novianti, Nafisah Nasution, M. Raifar Gunawan, M. Ridho Fajriansyah, Risna Milenia, dan Cipta Oktaviani. Terima kasih atas kerja sama, keceriaan, saling menyemangati, dan berbagi keluh kesah selama penelitian berlangsung.
21. Kakak-kakak dan adik-adik di Laboratorium Biokimia. Terima kasih atas kerja sama, keceriaan, saling menyemangati, dan berbagi keluh kesah selama penelitian berlangsung.
22. Teman-teman kelas A Kimia 2018. dan Seluruh mahasiswa Jurusan Kimia angkatan 2018 atas bantuan, kenangan, dan kebersamaannya selama perkuliahan ini.
23. Kakak tingkat dan Adik tingkat telah menambah pertemanan dan memberikan pengalaman kepada penulis.

24. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang secara tulus memberikan bantuan kepada penulis.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Oleh karna itu, penulis memohon maaf atas segala kekurangan tersebut dan berharap skripsi ini dapat bermanfaat bagi siapapun yang membaca.

Bandar Lampung, 5 Desember 2022

Penulis

Dwi Noviani

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	iii
DAFTAR GAMBAR	v
DAFTAR LAMPIRAN	vi
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian.....	4
1.3. Manfaat Penelitian.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Enzim.....	5
2.1.1. Klasifikasi Enzim.....	6
2.1.2. Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim	7
2.1.3. Teori Mekanisme Reaksi Enzim	9
2.2. Enzim Amilase.....	10
2.3. <i>A. fumigatus</i>	13
2.4. Isolasi dan Pemurnian Enzim	14
2.4.1. Sentrifugasi	15
2.4.2. Fraksinasi Menggunakan Amonium Sulfat [(NH ₄) ₂ SO ₄]	15
2.4.3. Dialisis	16
2.5. Pengujian Aktivitas α -Amilase dengan Metode Fuwa	17
2.6. Pengujian Aktivitas α -Amilase dengan Metode Mandels	17
2.7. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry	17
2.8. Kinetika Reaksi Enzim	18
2.9. Stabilitas Enzim	19
2.10. Modifikasi Kimia.....	21
2.11. Asam Glioksilat	22
III. METODE PENELITIAN	24
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian	24
3.2. Alat dan Bahan.....	24
3.3. Prosedur Kerja	25
3.3.1. Pemiakan Isolat <i>A. fumigatus</i>	25
3.3.2. Pembuatan Media Inokulum dan Fermentasi, Inokulasi <i>A.fumigatus</i> dan Produksi Enzim α -Amilase	25
3.3.3. Isolasi Enzim α -Amilase.....	26
3.3.4. Pemurnian Enzim α -Amilase.....	27
3.3.5. Uji Aktivitas dan Kadar Protein Enzim α -Amilase	28
3.3.6. Penentuan Kadar Protein Metode Lowry	30
3.3.7. Modifikasi Kimia Enzim α -Amilase dengan Asam Glioksilat ..	31
3.3.8. Karakterisasi Enzim α -Amilase	31

3.3.9. Penentuan Waktu Paruh ($t_{1/2}$), Konstanta Laju Inaktivasi (k_i), dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i)	32
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	34
4.1. Produksi dan Isolasi Enzim α -Amilase	34
4.2. Pemurnian Enzim α -Amilase	35
4.2.1. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	35
4.2.2. Dialisis	37
4.3. Modifikasi Kimia Enzim α -Amilase Hasil Pemurnian Menggunakan Asam Glioksilat serta Karakterisasi Enzim Hasil Pemurnian dan Hasil Modifikasi	38
4.3.1. Penentuan pH Optimum Enzim Hasil Pemurnian dan Hasil Modifikasi.....	38
4.3.2. Penentuan Suhu Optimum Enzim Hasil Pemurnian dan Hasil Modifikasi.....	40
4.3.3. Penentuan K_M dan V_{maks} Enzim Hasil Pemurnian dan Hasil Modifikasi	41
4.3.4. Pengaruh Modifikasi terhadap Stabilitas Termal	43
4.4. Konstanta Laju Inaktivasi Termal (k_i), Waktu paruh ($t_{1/2}$) dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i)	44
4.4.1. Waktu Paruh ($t_{1/2}$) dan Konstanta Laju Inaktivasi Termal (k_i) ...	46
4.4.2. Perubahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i).....	46
V. KESIMPULAN DAN SARAN	49
5.1. Simpulan.....	49
5.2. Saran	50
DAFTAR PUSTAKA	51
LAMPIRAN	56

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Pemurnian enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	37
2. Nilai K_M dan V_{maks} enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi.....	42
3. Nilai k_i , ($t_{1/2}$), dan (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi asam glioksilat	45
4. Hubungan antara berbagai tingkat kejenuhan amonium sulfat (0-100%) dengan aktivitas unit enzim α -amilase.....	57
5. Hubungan antara kejenuhan amonium sulfat (0-85%) dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase.	57
6. Hubungan antara pH dengan aktivitas unit enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi asam glioksilat.	58
7. Hubungan antara pH dengan aktivitas sisa (%) enzim amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi asam glioksilat.	58
8. Hubungan antara suhu dengan aktivitas unit enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi asam glioksilat.	59
9. Hubungan antara suhu dengan aktivitas sisa (%) enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi asan glioksilat.....	59
10. Data untuk penentuan nilai K_M dan V_{maks} enzim α -amilase hasil pemurnian berdasarkan persamaan Lineweaver-Burk.	60
11. Data untuk penentuan K_M dan V_{maks} enzim α -amilase hasil modifikasi berdasarkan persamaan Lineweaver-Burk.	60
12. Hubungan antara aktivitas unit enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi asam glioksilat.	61
13. Hubungan antara aktivitas sisa (%) enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi asam glioksilat.	61
14. Data $\ln (E_i/E_0)$ untuk penentuan k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim α -amilase hasil pemurnian.....	62
15. Data $\ln (E_i/E_0)$ untuk penentuan k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim α -amilase hasil modifikasi asam glioksilat 1,5 mg/mL.....	62

16. Data $\ln (E_i/E_0)$ untuk penentuan k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim α -amilase hasil modifikasi asam glioksilat 2,0 mg/mL..... 63
17. Data $\ln (E_i/E_0)$ untuk penentuan k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim α -amilase hasil modifikasi asam glioksilat 2,5 mg/mL..... 63
18. Absorbansi glukosa pada berbagai konsentrasi untuk menentukan kurva standar glukosa. 68
19. Absorbansi BSA pada berbagai konsentrasi. 70

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Hubungan antara aktivitas enzim dengan suhu.....	7
2. Hubungan kecepatan reaksi dengan pH.....	8
3. Hubungan antara laju reaksi dengan konsentrasi enzim.....	9
4. Teori kunci gembok dan teori induksi.....	10
5. Struktur α -amilase.....	12
6. Pemurnian enzim metode dialisis.....	17
7. Diagram Lineweaver-Burk.....	19
8. Reaksi antara asam glioksilat dengan lisin.....	23
9. Skema fraksinasi dengan amonium sulfat.....	27
10. Diagram alir penelitian.....	33
11. Hubungan antara tingkat kejenuhan amonium sulfat (%) dengan aktivitas spesifik (U/mg) enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	35
12. Hubungan antara kejenuhan amonium sulfat (0-20) dan (20-85)% dengan aktivitas spesifik (U/mg) enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	36
13. Hubungan antara aktivitas sisa (%) enzim α -amilase dengan variasi pH enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi asam glioksilat.....	39
14. Hubungan antara aktivitas sisa (%) enzim α -amilase dengan variasi suhu enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi asam glioksilat.....	40
15. Grafik Lineweaver-Burk enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi asam glioksilat.....	41
16. Grafik stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi asam glioksilat.....	43
17. Grafik Ln (E_i/E_0) enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi untuk penentuan k_i , waktu paruh, dan ΔG_i	45
18. Kurva standar glukosa.....	68
19. Kurva standar BSA.....	70

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Aktivitas enzim α -amilase pada pengendapan dengan menggunakan garam amonium sulfat.....	57
2. Aktivitas enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi kimia pada variasi pH.	58
3. Aktivitas enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi kimia pada variasi suhu.....	59
4. Penentuan nilai K_M dan V_{maks} enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi asam glioksilat.....	60
5. Stabilitas termal enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi asam glioksilat.	61
6. Data penentuan konstanta laju inaktivasi termal enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi asam glioksilat.	62
7. Perhitungan ΔG_i dan $t_{1/2}$ enzim α -amilase hasil pemurnian.....	64
8. Perhitungan ΔG_i dan $t_{1/2}$ enzim α -amilase hasil modifikasi dengan asam glioksilat 1,5 mg/mL.....	65
9. Perhitungan ΔG_i dan $t_{1/2}$ enzim α -amilase hasil modifikasi dengan asam glioksilat 2,0 mg/mL.....	66
10. Perhitungan ΔG_i dan $t_{1/2}$ enzim α -amilase hasil modifikasi dengan asam glioksilat 2,5 mg/mL.....	67
11. Kurva standar glukosa.....	68
12. Persamaan untuk menghitung aktivitas unit enzim α -amilase metode Mendels.....	69
13. Kurva standar BSA	70
14. Persamaan untuk menghitung kadar protein enzim α -amilase metode Lowry.....	71

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Protein yang diproduksi serta digunakan oleh sel hidup untuk mengkatalisis reaksi kimia dengan tingkat spesififikasi dan peningkatan laju reaksi yang tinggi dikenal sebagai enzim (Richana, 2002). Enzim merupakan biokatalis yang dapat mengurangi dampak pencemaran dan pemborosan energi karena reaksinya tidak membutuhkan energi tinggi, bersifat spesifik, dan tidak beracun (Yuneta dan Putra, 2010). Hingga kini lebih dari 2000 enzim telah diisolasi, namun hanya 14 enzim yang telah diproduksi secara komersial. Kebanyakan dari enzim yang telah diproduksi secara komersial adalah enzim hidrolase seperti amilase, protease, pektinase, dan selulase (Bhat, 2000). Beberapa pengamatan yang telah dilakukan membuktikan bahwa penggunaan enzim semakin meningkat dari tahun ke tahun mencapai 10-15% (Mufarikha dkk., 2014).

Enzim α -amilase merupakan enzim ekstraseluler yang mampu memotong ikatan 1,4- α -D-glikosidik antar monomer glukosa pada rantai linier amilosa. Enzim ini dikategorikan sebagai endoenzim karena pemotongan pati dilakukan secara acak dari dalam (Pandey *et al.*, 2002). Enzim yang dihasilkan secara ekstraseluler memiliki kelebihan dibandingkan dengan enzim yang dihasilkan secara intraseluler, yaitu enzim yang dapat diperoleh dalam keadaan murni dengan cara pemisahan dan pemurnian yang tidak rumit. Aktivitas enzim α -amilase dapat diukur berdasarkan penurunan kadar pati yang larut atau jumlah gula pereduksi yang terbentuk. Enzim α -amilase memiliki aplikasi paling luas dalam berbagai bidang industri seperti industri pembuatan dan fermentasi bir untuk konversi pati menjadi gula terfermentasi. Pada industri tekstil, amilase digunakan untuk merancang tekstil, kemudian pada industri deterjen, amilase tercampur dengan enzim protease dan lipase sebagai pencuci noda pakaian. Dalam industri

makanan digunakan untuk pembuatan sirup manis, untuk meningkatkan konten diastase tepung, untuk modifikasi makanan bayi, dan menghilangkan pati dalam produksi *jelly* (Ariandi, 2016). Pengujian aktivitas enzim α -amilase dilakukan untuk mengetahui kemampuan hidrolisis enzim α -amilase sebelum akhirnya digunakan dalam skala besar di industri sehingga banyak diteliti dalam beberapa tahun belakangan (Wirajana dkk., 2018). Aktivitas enzim ini dipengaruhi oleh keberadaan kofaktor kalsium sehingga disebut juga sebagai metalloenzim. Meskipun dapat memutus ikatan α -1,4 glikosidik, α -amilase tidak bisa memutus ikatan α -1,6 glikosidik (Multri dkk., 2019).

Mikroorganisme yang banyak digunakan untuk menghasilkan α -amilase adalah jamur dan bakteri. Jamur banyak digunakan sebagai penghasil α -amilase karena mempunyai kelebihan di antaranya α -amilase yang dihasilkan dari jamur lebih stabil jika dibandingkan dengan α -amilase yang dihasilkan dari bakteri sehingga lebih menguntungkan jika digunakan untuk kepentingan industri (Ramasamy *et al.*, 2011). Salah satu jamur yang dapat menghasilkan enzim α -amilase yaitu *Aspergillus*. Jamur *Aspergillus* merupakan salah satu mikroorganisme eukariotik dengan tingkat biologisnya yang lebih tinggi dibandingkan dengan bakteri (Kumala dan Widayari, 2006). Salah satu spesies dari *Aspergillus* yaitu *Aspergillus fumigatus*. *A. fumigatus* koloni muncul sebagai filamen putih kemudian berubah warna hijau tua atau hijau gelap dengan pinggiran putih dan permukaan bawah koloni berwarna kekuningan sampai cokelat. Koloni *A. fumigatus* yang tumbuh berwarna hijau kebiruan, diameter 1-2 cm, permukaan koloni seperti beludru (*velvety*) (Akan *et al.*, 2002).

Stabilitas enzim dapat diartikan sebagai kestabilan aktivitas enzim selama penyimpanan dan penggunaan enzim, juga kestabilan terhadap senyawa yang bersifat merusak seperti pelarut tertentu (asam atau basa), oleh pengaruh suhu dan kondisi-kondisi nonfisiologis yang lain. Umumnya enzim tidak stabil pada kondisi suhu yang tinggi dan pH yang ekstrim (Goddette *et al.*, 1993), kondisi ini digunakan pada industri yang biasanya memerlukan enzim termostabil, yaitu enzim yang bekerja pada pH optimum dengan rentang suhu 60°C-123°C (Vielle and Zeikus, 1996). Oleh karena itu dilakukan peningkatan kestabilan enzim untuk

memperoleh aktivitas yang tinggi pada suhu ekstrim. Terdapat dua cara yang dapat dilakukan untuk mendapatkan enzim yang mempunyai stabilitas tinggi, yaitu menggunakan enzim yang memiliki stabilitas ekstrim alami dan mengusahakan peningkatan stabilitas enzim yang secara alami atau kurang stabil, salah satu caranya adalah dengan memodifikasi enzim menggunakan zat kimia tertentu (Kazan *et al.*, 1997).

Modifikasi kimia adalah salah satu metode yang digunakan untuk meningkatkan stabilitas enzim yang larut dalam air. Keuntungan yang didapat dengan metode ini dibandingkan dengan metode amobilisasi enzim adalah: (1) Interaksi antara enzim dengan substrat tidak terhalangi oleh adanya matriks yang tidak larut, sehingga penurunan aktivitas enzim dapat ditekan. (2) Pada proses amobil, mekanisme kerja enzim yang digunakan dalam bidang klinik selama interaksi dengan reseptor atau komponen lain dari membran seluler, kemungkinan berubah karena keberadaan matriks pendukung (Janecek, 1993). Modifikasi dengan asam glioksilat menurut Melik-Nubarov *et al.*, (1987) melaporkan hidrofilisasi α -kimotripsin menggunakan asam glioksilat dengan reduktor NaBH_4 , dapat meningkatkan kestabilan enzim tersebut secara nyata.

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan modifikasi kimia enzim α -amilase dari bakteri *Bacillus subtilis* ITBCCB148 menggunakan beberapa senyawa kimia, di antaranya dimetiladipimidat (Apriyanti, 2010), sitrakonat anhidrida (Sundari, 2011), dan asam glioksilat (Anggraini, 2011). Pada penelitian Rini (2020), telah dilakukan modifikasi asam glioksilat enzim α -amilase dari *A. fumigatus*. Dari hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa enzim dengan modifikasi asam glioksilat meningkat kestabilannya 1,7 kali dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Enzim hasil pemurnian optimum pada pH 5,5 dan suhu 60°C. Terjadi peningkatan waktu paruh dan ΔG_i serta penurunan nilai k_i enzim α -amilase hasil modifikasi dengan variasi konsentrasi 0,5; 1,0; dan 1,5 mg/mL dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian.

Pada penelitian ini dilakukan isolasi, pemurnian dan modifikasi kimia enzim α -amilase yang diperoleh dari *A. fumigatus* menggunakan senyawa asam glioksilat

dengan variasi konsentrasi yang berbeda dan diharapkan akan diperoleh peningkatan stabilitas enzim setelah dimodifikasi yang lebih baik dari penelitian sebelumnya.

1.2. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Memperoleh enzim α -amilase dari *A. fumigatus* dengan aktivitas dan tingkat kemurnian yang tinggi.
- b. Meningkatkan kestabilan enzim α -amilase dari *A. fumigatus* melalui modifikasi kimia dengan menggunakan asam glioksilat.

1.3. Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Memberikan informasi mengenai teknik isolasi dan pemurnian enzim α -amilase dari *A. fumigatus*.
- b. Memberikan informasi dan pengetahuan mengenai cara meningkatkan stabilitas enzim α -amilase dari *A. fumigatus*.
- c. Memberikan informasi mengenai pengaruh modifikasi kimia asam glioksilat terhadap stabilitas enzim α -amilase dari *A. fumigatus*.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Enzim

Enzim adalah protein yang khusus disintesis oleh makhluk hidup untuk mengkatalis reaksi yang berlangsung di dalamnya. Kata enzim berasal dari “*enzyme*” yang berarti dalam ragi (*yeast*), mulai dipakai semenjak tahun 1877. Sebelum itu telah dikenal diastase, pepsin dan emulsin yang masing-masing adalah senyawa organik yang dihidrolisis dari pati, protein dan glikosida (Martoharsono, 2006).

Pada tahun 1806 Louis Pasteur mendapatkan bahwa cairan anggur bergula dapat mengalami perubahan menjadi alkohol dan CO₂ oleh karena adanya ragi yang tumbuh di dalamnya. Oleh karena itu Pasteur memastikan bahwa yang menyebabkan peristiwa fermentasi itu adalah suatu zat yang dikeluarkan oleh ragi. Zat itu berhubungan erat dengan kehidupan jasad tersebut (Martoharsono, 2006).

Sebagai katalis, enzim dapat meningkatkan kecepatan reaksi dengan cara menyediakan suatu jalur reaksi yang baru membentuk keadaan transisinya yang memiliki energi bebas yang lebih rendah sehingga lebih mudah dicapai dari pada reaksi tanpa katalis. Enzim dapat mempercepat reaksi 10³ sampai 10⁸ kali lebih cepat dari pada tanpa menggunakan katalis. Enzim dapat mengkatalis reaksi antara 100-1000 reaksi per detik (Wiseman, 1975). Enzim merupakan protein globular yang tersusun dari rantai polipeptida yang berlipat secara kompak. Pelipatan ini membentuk konformasi yang stabil karena ditunjang oleh berbagai ikatan seperti ikatan hidrogen yang terdapat di antara gugus samping residu asam amino rantai samping yang berdekatan, ikatan elektrostatik di antara gugus samping yang berlawanan, interaksi hidrofobik dari gugus samping asam amino non polar, dan ikatan kovalen berupa ikatan disulfida (Stryer *et al.*, 2002).

2.1.1. Klasifikasi Enzim

Klasifikasi enzim dapat dibedakan sebagai berikut:

- a) Menurut Wirahadikusumah (1997), dilihat dari fungsinya enzim dapat dibedakan menjadi enam kelas dan setiap kelasnya mempunyai beberapa subkelas. Dalam tiap subkelas, nama resmi dan nomor klasifikasi dari tiap enzim melukiskan reaksi yang dikatalisis berdasarkan IUPAC yaitu sebagai berikut:
- 1) Oksidoreduktase, mengkatalisis reaksi oksidasi-reduksi. Contoh : NAD oksido reduktase (CEIUB); Alkohol dehidrogenase (Trivial)
 - 2) Transferase, mengkatalisis perpindahan gugus molekul dari suatu molekul ke molekul yang lain, seperti gugus amino, karbonil, metal, asil, glikosil atau fosforil. Contoh : Glukosa-6-transferase (CEIUB); Glukokinase (trivial)
 - 3) Hidrolase, berperan dalam reaksi hidrolisis. Contoh : α -1-4-glukan 4-glukanohidrolase (CEIUB); α -amilase (trivial)
 - 4) Liase, mengkatalisis reaksi adisi atau pemecahan ikatan rangkap dua. Contoh: 2-Asam oksalokarboksi-liase (CEIUB); piruvat dekarboksilase (trivial)
 - 5) Isomerase, mengkatalisis reaksi isomerisasi. Contoh: Alanina rasemase (CEIUB); alanina rasemase (trivial)
 - 6) Ligase, mengkatalisis pembentukan ikatan dengan bantuan pemecahan ikatan dalam ATP. Contoh: Karbondioksida ligase (CEIUB); piruvat karboksilase (trivial)
- b) Menurut Lehninger (1982), 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.

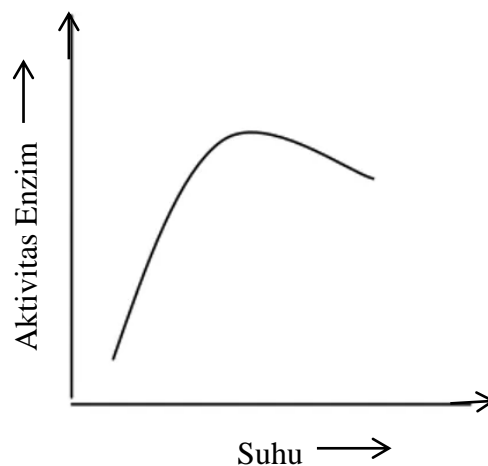
- c) Berdasarkan tempat bekerjanya enzim dibedakan menjadi dua, yaitu:
- 1) Endoenzim, disebut juga enzim intraseluler, yaitu enzim yang bekerja di dalam sel.
 - 2) Eksoenzim, disebut juga enzim ekstraseluler, yaitu enzim yang bekerja di luar sel.

2.1.2. Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim

Beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim sebagai berikut:

a. Suhu

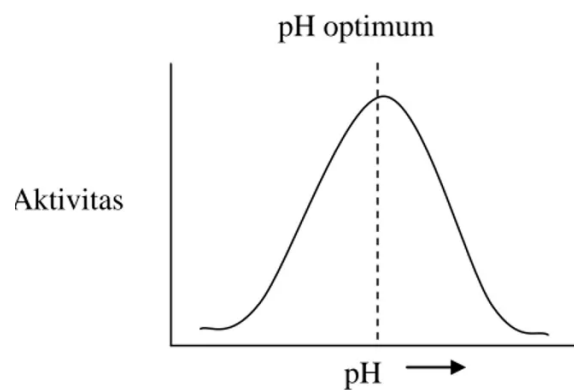
Enzim mempercepat terjadinya reaksi kimia pada suatu sel hidup. Dalam batas-batas suhu tertentu, kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim akan naik bila suhunya naik. Reaksi yang paling cepat terjadi pada suhu optimum (Rodwell, 1987). Suhu yang terlalu tinggi akan menyebabkan enzim terdenaturasi (Poedjiadi,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



Gambar 1. Hubungan antara aktivitas enzim dengan suhu (Poedjiadi, 1994).

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



Gambar 2. Hubungan kecepatan reaksi dengan pH (Page, 1997).

c. Konsentrasi substrat

Jika konsentrasi substrat diturunkan dan konsentrasi enzim tetap, maka laju reaksi menjadi lambat sehingga kompleks enzim-substrat yang terbentuk menjadi sedikit. Hal ini karena tidak semua enzim dapat diikat oleh substrat. Jika konsentrasi substrat dinaikkan dan kadar enzim tetap, maka laju reaksi akan naik sampai kondisi konstan, yaitu ketika semua substrat sudah diikat oleh enzim (Poedjiadi, 1994).

d. Konsentrasi enzim

Konsentrasi enzim secara langsung mempengaruhi laju reaksi enzimatik sehingga dengan bertambahnya konsentrasi enzim maka laju reaksi meningkat (Poedjiadi, 1994). Laju reaksi tersebut meningkat secara linier selama konsentrasi enzim jauh lebih sedikit daripada konsentrasi substrat (Page, 1989). Hubungan antara laju reaksi enzim dengan konsentrasi enzim ditunjukkan pada Gambar 3.



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

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

Molekul atau ion yang dapat menghambat reaksi atau kerja enzim dinamakan inhibitor. Hambatan yang dilakukan oleh inhibitor dapat berupa hambatan tidak *reversibel* atau hambatan *reversibel*. Hambatan tidak *reversibel* pada umumnya disebabkan oleh terjadinya proses destruksi atau modifikasi sebuah gugus fungsi atau lebih yang terdapat pada molekul enzim.

2.1.3. Teori Mekanisme Reaksi Enzim

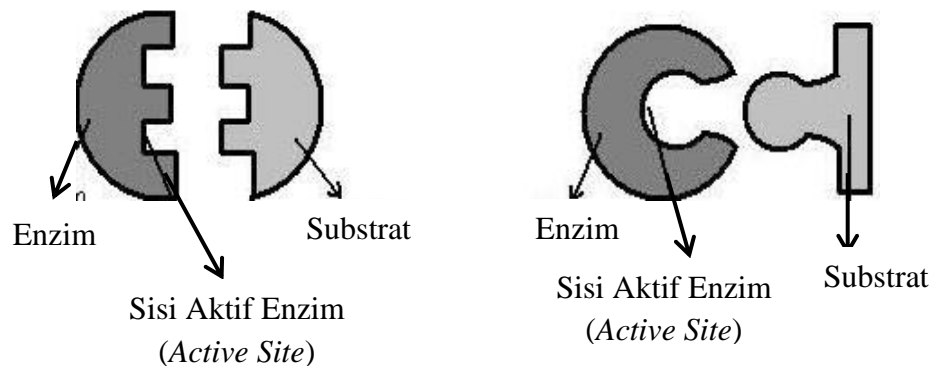
Menurut Shahib (2005) ada dua teori pembentukan kompleks enzim substrat yaitu teori *lock and key* dan teori *induced-fit* yang dapat dilihat pada Gambar 4.

a) Teori *lock and key* (gembok dan kunci)

Substrat yang spesifik akan terikat pada daerah spesifik di molekul enzim yang disebut sisi aktif. Substrat mempunyai daerah polar dan non polar pada sisi aktif yang baik bentuk maupun muatannya merupakan pasangan substrat. Hal ini terjadi karena adanya rantai peptida yang mengandung rantai residu yang menuntun substrat untuk berinteraksi dengan residu katalitik. Ketika katalisis berlangsung, produk masih terikat pada molekul enzim. Kemudian produk akan bebas dari sisi aktif dengan terbebasnya enzim.

b) Teori *induced-fit* (ketepatan induksi)

Menurut Shahib (2005), teori ini menerangkan bahwa enzim bersifat fleksibel. Sebelumnya bentuk sisi aktif enzim tidak sesuai dengan bentuk substrat, tetapi setelah substrat menempel pada sisi aktif, maka enzim akan terinduksi dan menyesuaikan dengan bentuk substrat. Teori *lock and key* dan teori *induced-fit* dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Teori kunci gembok dan teori induksi (Shahib, 2005).

2.2. Enzim Amilase

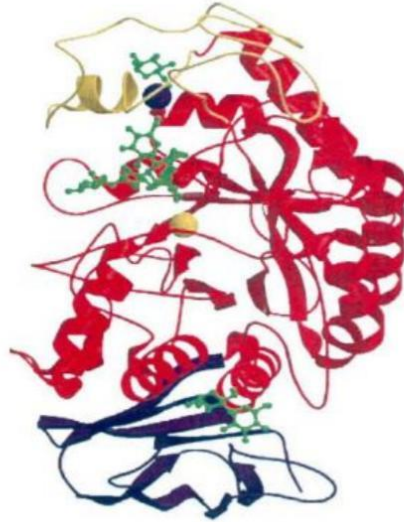
Amilase (alfa, beta, glucoamilase) merupakan enzim yang penting dalam bidang pangan dan bioteknologi. Amilase mengacu pada sekelompok enzim katalis yang berfungsi untuk menghidrolisis gula dan pati. Amilase mencerna karbohidrat (polisakarida) menjadi unit-unit disakarida yang lebih kecil dan mengubahnya

menjadi monosakarida seperti glukosa. Amilase dapat diperoleh dari berbagai sumber seperti tanaman, binatang dan mikroorganisme. Enzim pada umumnya diproduksi oleh mikroorganisme melalui proses fermentasi. Amilase yang berasal dari mikroorganisme banyak digunakan dalam industri, hal ini dikarenakan mikroorganisme periode pertumbuhannya pendek. Amilase pertama kali yang diproduksi adalah amilase yang berasal dari fungi pada tahun 1894 (Oliveira, 2004). Enzim amilase dapat dikelompokkan menjadi tiga golongan enzim yaitu:

1. α -amilase

Enzim α -amilase memiliki nama kimiawi, yaitu *endo-1,4- α -D-glucan glucohydrolase*. Enzim α -amilase merupakan enzim ekstraseluler yang mampu memotong ikatan 1,4- α -D-glikosidik antar monomer glukosa pada rantai linier amilosa. Enzim ini dikategorikan sebagai endoenzim karena pemotongan pati dilakukan secara acak dari dalam (Pandey *et al.*, 2002). Enzim α -amilase disusun oleh protein. Protein yang tersusun dalam enzim terdiri dari 3 domain, yaitu domain A, B, dan C sesuai Gambar 5. Domain A yang ditandai dengan warna merah merupakan domain terbesar berbentuk seperti super struktur barrel (β/α)₈. Domain B yang ditandai dengan warna kuning. Domain B menempel dengan domain A karena ikatan disulfida serta berada di antara domain A dan C. Domain C yang ditandai dengan warna biru memiliki struktur lembaran β yang terhubung dengan domain A karena adanya rantai polipeptida sederhana. Sisi aktif enzim yang ditandai dengan warna hijau merupakan rantai panjang, terletak di bagian akhir gugus karboksil domain A dan B. Enzim juga dilengkapi dengan ion kalsium yang ditandai dengan bola biru dan ion klorida yang ditandai dengan bola kuning. Ion kalsium berperan sebagai stabilisator dan *activator allosteric* (Souza and Magalhães, 2010). Beberapa enzim memiliki lebih dari satu bagian aktif untuk mengikat substrat supaya enzim dapat mengikat substrat lain ketika sudah terikat dengan suatu substrat tertentu. Sifat enzim inilah yang disebut sebagai *allosteric* (Shuler and Kargi, 2002). Enzim α -amilase bersifat *calcium*

metalloenzymes sehingga tidak dapat berfungsi tanpa adanya ion kalsium (Stein *et al.*, 1964). Struktur α -amilase dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Struktur α -amilase (Souza *and* Magalhaes, 2010).

2. Enzim β -amilase

Enzim β -amilase disebut juga *alfa-1,4-glukanmaltot hidrolase* E.C. 3.2.1.2. bekerja pada ikatan alfa-1,4-glikosida dengan menginversi konfigurasi posisi atom C(1) atau C nomor 1 molekul glukosa dari alfa menjadi beta. Enzim ini memutus ikatan amilosa maupun amilopektin dari luar molekul dan menghasilkan unit-unit maltosa dari ujung non-pereduksi pada rantai polisakarida. Bila tiba pada ikatan alfa-1,6 glikosida aktivitas enzim ini akan berhenti. Enzim beta-amilase banyak ditemukan pada tanaman tingkat tinggi, seperti gandum, ubi, dan kacang kedelai. Selain itu, beta-amilase juga dapat ditemui pada beberapa mikroorganisme, antara lain *Pseudomonas sp*, *Bacillus sp*, *Streptococcus sp*, dan *Clostridium thermosulfurigenes* (Biogen, 2008).

3. Glukoamilase

Dikenal dengan nama lain *alfa-1,4- glukan glukohidro-lase* atau E.C 3.2.1.3. Enzim ini menghidrolisis ikatan glukosida alfa-1,4, tetapi hasilnya beta-glukosa yang mempunyai konfigurasi berlawanan dengan hasil hidrolisis oleh enzim alfa-amilase. Selain itu, enzim ini dapat pula menghidrolisis ikatan

glikosida alfa-1,6 dan alfa-1,3 tetapi dengan laju yang lebih lambat dibandingkan dengan hidrolisis ikatan glikosida α -1,4 (Biogen, 2008).

2.3. *A. fumigatus*

Aspergillus merupakan genus yang terdapat dimana-mana dan hampir dapat tumbuh pada semua substrat. Fungi ini akan tumbuh pada buah busuk, sayuran, biji-bijian, roti, dan bahan pangan lainnya. Beberapa spesies merupakan fungi yang patogen, misalnya yang dapat menyebabkan penyakit Aspergilosis, dan di antaranya bersifat saprofit sebagaimana banyak ditemukan pada bahan pangan (Makfoeld, 1993). Beberapa spesies yang kerap menyebabkan penyakit yaitu *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* (Sutanto dkk., 2013). *Aspergillus* akan terlihat dengan warna hijau, kuning, oranye, hitam atau coklat. Secara keseluruhan merupakan warna dari konidianya. Hifa bersekat dan bercabang. Pada ujung hifa, bagian yang tegak membesar merupakan konidiofornya, di dalamnya terdapat konidia-konidia. Suatu batang pendek dibagian pendukung konidiofor kadang berkembang membulat disebut sterigmata, dan dapat tumbuh memanjang. *Aspergillus* dicirikan hifa bersekat dengan inti yang banyak, sehingga termasuk kelas *Ascomycetes*. Ciri khasnya yaitu terbentuknya konidia, sedangkan yang membedakan spesiesnya adalah warna (Makfoeld, 1993).

Klasifikasi *A. fumigatus*

Kingdom	: Fungi
Filum	: Ascomycota
Kelas	: Eurotiomycetes
Ordo	: Eurotiales
Famili	: Trichomaceae
Genus	: <i>Aspergillus</i>
Spesies	: <i>A. fumigatus</i> (Soesanto, 2013).

Morfologi jamur *A. fumigatus* memiliki konidia atas bentuk kolumnar (manjang) dan konidiana berbentuk bulat, berwarna hijau sampai hijau kotor. Vesikel berbentuk piala. Konidiofor berdinding halus, umumnya berwarna hijau (Makfoeld, 1993).

A. fumigatus koloni muncul sebagai filamen putih kemudian berubah warna hijau tua atau hijau gelap dengan pinggiran putih dan permukaan bawah koloni berwarna kekuningan sampai coklat. Koloni *A. fumigatus* yang tumbuh berwarna hijau kebiruan, diameter 1-2 cm, permukaan koloni seperti beludru (*velvety*) (Akan *et al.*, 2002).

A. fumigatus termasuk jamur oportunistik yang dapat menginfeksi salah satu atau semua dari organ tubuh manusia. Konidia jamur ini seringkali ditemukan di udara. Parasit endogen ini umumnya dapat menimbulkan penyakit pada manusia dengan sistem kekebalan yang terganggu. Spesies keluarga *Eurotiaceae* genus khas *Aspergillus* ini memiliki morfologi tertentu yang dapat diidentifikasi secara mikroskopik dan makroskopik. Pada umumnya, antar *Aspergillus sp.* dapat dibedakan satu dengan yang lain dari warna dan bentuk konidiana (Mehrotra *and* Aneja, 1990).

Jamur berfilamen ini dapat secara jelas diamati dengan mikroskop dengan mewarnai konidia jamur menggunakan larutan *lactophenol cotton blue* yang sebelumnya telah ditetesi alkohol 70% ke dalamnya (Henrici, 1948)., (Clark *and* Clark, 2007). Oleh karena itu, seringkali penampang mikroskopik *A. fumigatus* berwarna kebiruan.

2.4. Isolasi dan Pemurnian Enzim

Enzim α -amilase merupakan enzim ekstraseluler yang mampu memotong ikatan. Enzim ekstraseluler merupakan enzim yang diproduksi di dalam sel namun bekerja di luar sel, sehingga mudah diisolasi dan dipisahkan dari pengotor lain

serta tidak banyak bercampur dengan bahan-bahan sel lain (Pelczar *and* Chan, 1986). Berikut metode-metode pemurnian enzim:

2.4.1. Sentrifugasi

Sentrifugasi merupakan metode yang dapat digunakan untuk memisahkan enzim ekstraseluler dari sisa-sisa sel. Sentrifugasi akan menghasilkan enzim terlarut dalam bentuk filtrat yang jernih dan sisa-sisa sel lain serta pengotor dalam bentuk endapan yang terikat kuat pada dasar tabung. Sel-sel mikroba biasanya mengalami sedimentasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit (Scopes, 1982). Proses sentrifugasi dilakukan pada suhu dingin 2-4°C untuk mencegah denaturasi enzim karena proses tersebut akan melepaskan panas (Suhartono, 1989).

2.4.2. Fraksinasi Menggunakan Amonium Sulfat [(NH₄)₂SO₄]

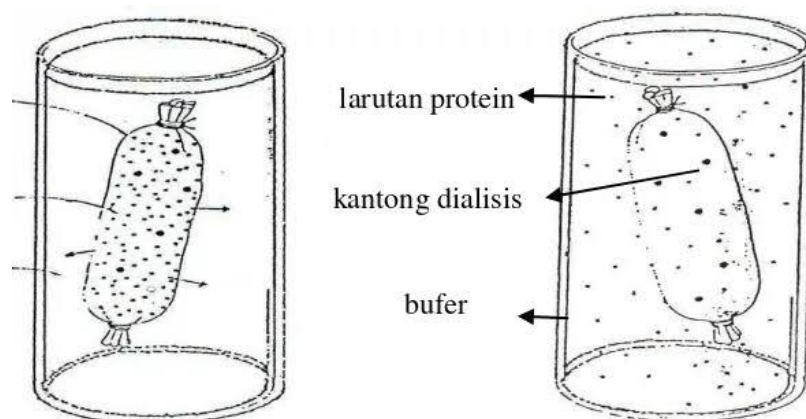
Metode fraksinasi enzim yang paling banyak dipakai adalah fraksinasi dengan menggunakan garam amonium sulfat (Palmer, 1991). Prinsip pengendapan dengan amonium sulfat berdasarkan pada kelarutan protein yang merupakan interaksi antara gugus polar dengan molekul air, interaksi ionik protein dengan garam dan daya tolak-menolak protein yang bermuatan sama. Kelarutan protein pada pH dan suhu tertentu akan meningkat saat konsentrasi garam meningkat sampai pada konsentrasi tertentu (*salting in*). Selanjutnya, pada penambahan garam dengan konsentrasi tertentu, kelarutan protein akan menurun (*salting out*), karena molekul air yang berikatan dengan ion-ion garam semakin banyak sehingga terjadi penarikan selubung air yang mengelilingi permukaan protein. Peristiwa pengendapan dengan garam amonium sulfat mengakibatkan protein saling berinteraksi, beragregasi dan kemudian mengendap (Scopes, 1994). Ikatan hidrogen antara protein dengan air menstabilkan protein dalam larutan, namun di samping itu, terbentuk pula interaksi antara yang bersifat nonpolar antara sesama molekul protein. Interaksi ini membentuk suatu daerah non-polar tunggal yang memaksa air keluar dan membentuk suatu lingkaran yang hidrofobik (Palmer, 1991).

Yang diendapkan dengan metode ini akan terpisah dari protein lain yang tertinggal dalam larutan. Konsentrasi garam ditingkatkan bertahap dengan tujuan mendapatkan endapan protein yang diinginkan dan membuang endapan protein yang tidak diinginkan. Kemudian endapan tersebut dilarutkan kembali dan sisa garam dihilangkan dengan dialisis, maka sampai di sini didapatkan ekstrak enzim kasar (Scopes, 1994).

2.4.3. 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).

Untuk memperkecil pengaruh ini digunakan larutan buffer dengan konsentrasi rendah di luar kantung dialisis (Lehninger, 1982). Setelah tercapai keseimbangan, larutan di luar kantung dialisis diganti dengan larutan yang baru agar konsentrasi ion-ion di dalam kantung dialisis dapat dikurangi. Proses ini dapat dilakukan secara terus menerus sampai ion-ion di dalam kantung dialisis dapat diabaikan (Boyer, 1993). Difusi zat terlarut bergantung pada suhu dan viskositas larutan. Meskipun suhu tinggi dapat meningkatkan laju difusi, namun sebagian besar protein dan enzim stabil pada suhu 4-8°C sehingga dialisis harus dilakukan di dalam ruang dingin (Pohl, 1990). Pemurnian enzim metode dialisis dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Pemurnian enzim metode dialisis (Stryrer *et al.*, 1995).

2.5. Pengujian Aktivitas 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 Fuwa merupakan 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).

2.6. Pengujian Aktivitas α -Amilase dengan Metode Mandels

Pengujian aktivitas α -amilase dilakukan dengan metode Mandels (Mandels *et al.*, 1976), yaitu berdasarkan pembentukan glukosa dari substrat pati oleh enzim 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.

2.7. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

Penentuan kadar protein bertujuan untuk mengetahui bahwa protein enzim masih terdapat pada setiap fraksi pemurnian (tidak hilang dalam proses pemurnian)

dengan aktivitas yang baik. Salah satu metode yang digunakan untuk menentukan kadar protein adalah metode Lowry. Metode ini bekerja pada kondisi alkali dan ion tembaga (II) yang akan membentuk kompleks dengan protein. Ketika reagen *folin-ciocelteau* ditambahkan, maka reagen akan mengikat protein. Ikatan ini secara perlahan akan mereduksi reagen *folin* menjadi heteromolibdenum dan mengubah warna 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, triptofan, dan sistein akan bereaksi dengan reagen *folin-ciocelteau*. Reagen ini bereaksi menghasilkan produk yang tidak stabil yang tereduksi secara lambat menjadi *molybdenum* atau *tungsteen blue*. Protein akan menghasilkan intensitas warna yang berbeda tergantung pada kandungan triptofan dan tirosinnya. Metode ini relatif sederhana dan dapat diandalkan serta biayanya *relative* murah. Namun, kekurangan dari metode ini adalah sensitif terhadap perubahan pH dan konsentrasi protein yang rendah. Untuk mengatasi hal tersebut dapat dilakukan dengan menggunakan volume sampel dalam jumlah kecil sehingga tidak mempengaruhi reaksi (Lowry *et al.*, 1951).

2.8. Kinetika Reaksi Enzim

Parameter dalam kinetika reaksi enzim adalah konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}). Berdasarkan postulat Michaelis dan Menten pada suatu reaksi enzimatik terdiri dari beberapa fase yaitu pembentukan kompleks enzim substrat (ES), dengan E adalah enzim dan S adalah substrat, modifikasi dari substrat membentuk produk (P) yang masih terikat dengan enzim (EP), dan pelepasan produk dari molekul enzim (Shahib, 2005). Setiap enzim memiliki sifat dan karakteristik yang spesifik seperti yang ditunjukkan pada sifat spesifisitas interaksi enzim terhadap substrat yang dinyatakan dengan nilai tetapan Michaelis-Menten (K_M). Nilai K_M didefinisikan sebagai konsentrasi substrat tertentu pada saat enzim mencapai kecepatan setengah kecepatan maksimum. Setiap enzim memiliki nilai K_M dan V_{maks} yang khas dengan substrat spesifik pada

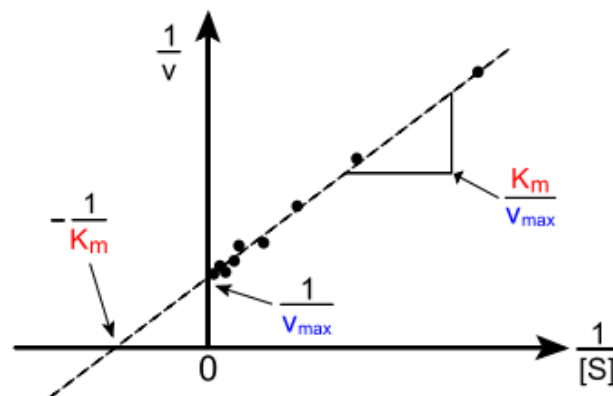
suhu dan pH tertentu (Kamelia dkk., 2005). Nilai K_M yang kecil menunjukkan bahwa kompleks enzim-substrat sangat mantap dengan afinitas tinggi terhadap substrat, sedangkan jika nilai K_M suatu enzim besar maka enzim tersebut memiliki afinitas rendah terhadap substrat (Page, 1997).

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 Gambar 7 (Page, 1997). Berikut merupakan persamaan Michaelis-Menten yang ditunjukkan pada persamaan 1 dan persamaan Lineweaver-Burk ditunjukkan pada persamaan 3.

$$V_0 = \frac{V_{maks} [S]}{K_M + [S]} \quad (1)$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{maks} [S]} \quad (2)$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{maks} [S]} + \frac{1}{V_{maks}} \quad (3)$$



Gambar 7. Diagram Lineweaver-Burk (Suhartono dkk., 1992).

2.9. Stabilitas Enzim

Menurut (Kazan *et al.*, 1997), stabilitas enzim dapat diartikan sebagai kestabilan aktivitas enzim selama penyimpanan dan penggunaan enzim tersebut, serta

kestabilan terhadap senyawa yang bersifat merusak seperti pelarut tertentu (asam atau basa), oleh pengaruh suhu dan kondisi-kondisi nonfisiologis lainnya.

Terdapat dua cara yang dapat dilakukan untuk mendapatkan enzim yang mempunyai stabilitas tinggi, yaitu menggunakan enzim yang memiliki stabilitas ekstrim alami dan mengusahakan peningkatan stabilitas enzim yang secara alami tidak atau kurang stabil, salah satunya adalah dengan cara memodifikasi enzim menggunakan zat kimia tertentu. Faktor-faktor yang mempengaruhi kestabilan enzim, di antaranya:

1. Stabilitas termal enzim

Enzim merupakan makromolekul yang peka terhadap lingkungannya. Dengan demikian harus ditangani dengan sangat hati-hati agar sifat-sifatnya dapat dipertahankan, kecuali enzim termostabil yang dapat aktif pada suhu tinggi. Semakin tinggi temperatur maka akan terjadi perubahan struktur enzim yang diikuti oleh hilangnya aktivitas katalitik dari enzim tersebut. Di Indonesia, temperatur optimum bagi proses enzimatik dilakukan pada temperatur kamar. Hampir semua enzim memiliki aktivitas optimum pada temperatur sekitar 30° C dan denaturasi dimulai pada temperatur 45° C (Winarno, 1989).

Pada suhu yang terlalu rendah maka kemantapan enzim tinggi, tetapi aktivitasnya rendah. Pada suhu yang terlalu tinggi aktivitas enzim tinggi, tetapi kemantapannya rendah. Kenaikan suhu enzim akan mempengaruhi laju reaksi, namun hanya sampai batas tertentu dan dapat menyebabkan terjadinya denaturasi protein. Daerah suhu saat kemantapan dan aktivitas enzim cukup besar disebut suhu optimum (Wirahadikusumah, 2001). Proses inaktivasi enzim pada suhu tinggi berlangsung dalam dua tahap, yaitu:

- a. Adanya pembukaan parsial struktur sekunder, tersier, dan kuartener molekul enzim.
- b. Perubahan struktur primer enzim karena adanya kerusakan asam amino tertentu oleh panas (Ahern *and* Klibanov, 1987).

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. Diperkirakan perubahan keaktifan pH lingkungan disebabkan terjadinya perubahan ionisasi enzim, substrat atau kompleks enzim-substrat. Enzim menunjukkan aktivitas maksimum pada kisaran pH optimum enzim dengan stabilitas yang tinggi (Winarno, 1986).

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

2.10. Modifikasi Kimia

Modifikasi kimia adalah salah satu metode yang dapat digunakan untuk meningkatkan stabilitas enzim yang larut dalam air. Keuntungan yang didapat dengan metode ini dibandingkan dengan metode amobilisasi enzim adalah: (1) Interaksi antara enzim dengan substrat tidak terhalangi oleh adanya matriks yang tidak larut, sehingga penurunan aktivitas enzim dapat ditekan. (2) Pada proses amobilisasi, mekanisme kerja enzim yang digunakan dalam bidang klinik selama interaksi dengan reseptor atau komponen lain dari membran seluler, kemungkinan berubah karena keberadaan matriks pendukung (Janecek, 1993).

Mozhaev *et al.*, (1990), menyarankan modifikasi kimia enzim dengan senyawa berbobot molekul rendah merupakan metode paling sederhana yang dapat dilakukan. Proses modifikasi dilakukan dengan cara menginkubasi larutan enzim dengan larutan pemodifikasi, jika perlu enzim yang telah termodifikasi dipisahkan dari campuran dengan cara dialisis atau kromatografi kolom penyaringan molekul. Berdasarkan struktur enzim, gugus fungsi yang kemungkinannya paling besar bereaksi dengan zat pemodifikasi adalah gugus fungsi yang terletak pada

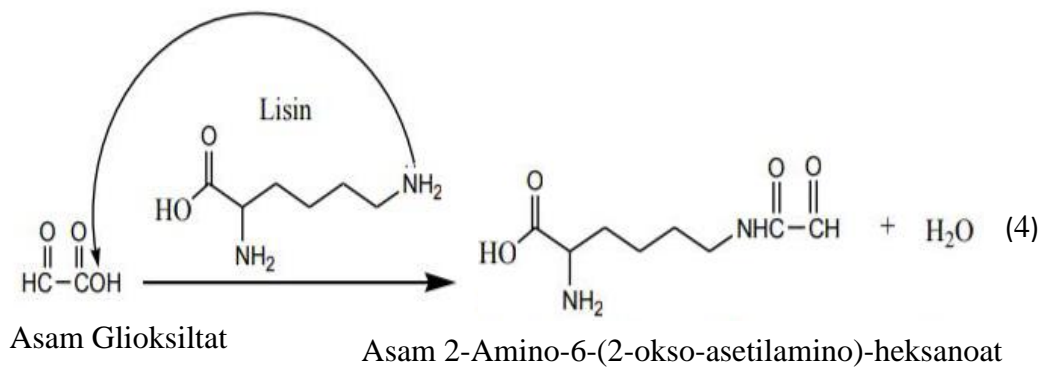
permukaan. Sedangkan gugus α -amino dari lisin merupakan gugus yang paling banyak dilibatkan, karena gugus ini paling melimpah dan paling mudah didekati dari rantai samping asam amino suatu enzim (Janecek, 1993).

Cara untuk mendapatkan enzim hasil modifikasi kimia dengan ikatan kovalen yang stabil menurut Mozhaev *et al.*, (1990), adalah: (1) Modifikasi dengan pereaksi bifungsional (ikatan silang dari gugus fungsi pada permukaan). (2) Modifikasi dengan pereaksi nonpolar (peningkatan interaksi hidrofobik). (3) Penambahan gugus bermuatan atau gugus polar baru (penambahan ikatan hidrogen atau ionik). (4) Hidrofilisasi permukaan protein (mencegah terjadinya kontak antara gugus hidrofobik dengan air yang tidak disukai).

2.11. Asam Glioksilat

Asam glioksilat atau asam oksoasetat adalah senyawa organik dengan rumus kimia $C_2H_2O_3$. Senyawa ini mengandung gugus aldehid dan asam karboksilat. Ester alkil asam glioksilat disebut ester alkil asam glioksilat. Senyawa ini dihasilkan oleh oksidasi organik asam glioksilat atau ozonolisis asam maleat. Asam glioksilat adalah cairan dengan titik leleh $-93^\circ C$ dan titik didih $111^\circ C$. Tersedia secara komersil sebagai monohidrat atau larutan dalam cairan (Holms, 1987).

Modifikasi dengan asam glioksilat menurut Melik-Nubarov *et al.*, (1987) melaporkan hidrofilisasi α -kimotripsin menggunakan asam glioksilat dengan reduktor $NaBH_4$, dapat meningkatkan kestabilan enzim tersebut secara nyata. Modifikasi dilakukan pada pH 8,4 sehingga gugus amina primer pada rantai samping lisin di permukaan enzim dengan mudah bereaksi dengan asam glioksilat. Reaksi antara asam glioksilat dengan lisin dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Reaksi antara asam glioksilat dengan lisin (Mozhaev *and* Martinek, 1984).

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

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, Gedong Meneng, Kec. Rajabasa, Kota Bandar Lampung, Lampung 35141.

3.2. Alat dan Bahan

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

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain PDA (*Potato Dextrose Agar*) (Himedia), KH_2PO_4 (Merck), HCl 1N (Merck), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 (Merck), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , CoCl_2 , KI (Merck), I_2 , Na_2CO_3 , NaOH 0,1N (Merck), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Na/K-tartrat, *folin ciocelteau* (Merck), NaBH_4 (Sigma), H_3BO_3 , Asam Glioksilat (Merck), K_2HPO_4 (Merck), BSA (*Bovine Serum Albumin*), DNS (*dinitrosalicylic acid*) (Himedia), pepton (Himedia), urea, akuades, pati jagung, kantong selofan, kapas sumbat, kasa, kertas, karet, aluminium foil, alkohol 70%, tisu, kertas saring, dan es batu.

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 Kerja

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 pengembangbiakan jamur pada media cair tanpa terjadinya produksi enzim α -amilase. Sedangkan media fermentasi digunakan sebagai medium pertumbuhan dan pengembangbiakan disertai produksi enzim α -amilase. Media inokulum yang digunakan terdiri dari 5 gram KH_2PO_4 , 3,5 gram $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,75 gram $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.875 gram pepton, 0,75 gram urea, 0,75 gram CaCl_2 , 0,0125 gram $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0035 gram $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

0,005 gram CoCl_2 , dan 1,875 gram pati jagung. Kemudian semua bahan dilarutkan dalam akuades 100 mL dalam labu Erlenmeyer 250 mL dan distrerilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C , tekanan 1 atm selama 15 menit (Yandri *et al.*, 2022).

b) Inokulasi *A. fumigatus*

Pindahkan *A. fumigatus* (dari dalam tabung reaksi 3 kali jarum ose) dari agar miring kedalam 100 mL media inokulum secara aseptis lalu dikocok dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam sedangkan media fermentasi tetap didalam LAF (*Laminar Air Flow*).

c) Produksi enzim α -amilase

Produksi enzim α -amilase dilakukan dengan memindahkan media inokulum sebanyak 2% dari jumlah media fermentasi ke dalam media fermentasi secara aseptis lalu di homogenkan menggunakan *shaker inkubator* dengan kecepatan 150 rpm selama 112 jam (Yandri *et al.*, 2022).

3.3.3. Isolasi Enzim α -Amilase

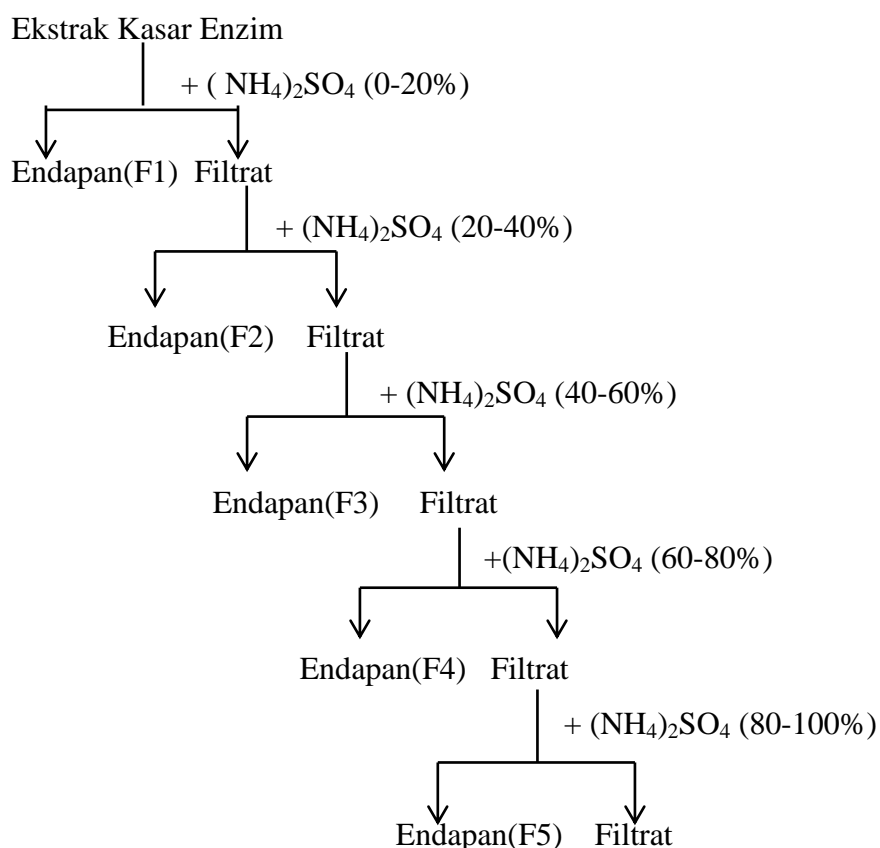
Isolasi enzim α -amilase dilakukan dengan metode sentrifugasi. Prinsipnya berdasarkan kecepatan sedimentasi dengan cara pemusingan. Sentrifugasi digunakan untuk memisahkan enzim ekstraseluler dari sisa-sisa sel. Sentrifugasi dilakukan pada suhu rendah (di bawah suhu kamar) hal ini dilakukan untuk menjaga kehilangan aktivitas enzim (Suhartono dkk., 1992). Untuk memisahkan enzim dengan komponen sel lainnya digunakan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit, kemudian saring dengan menggunakan kertas saring. Masukkan filtrat ke dalam botol sampel. Filtrat yang didapat merupakan ekstrak kasar enzim yang selanjutnya dapat diuji aktivitasnya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dengan metode Fuwa dan mengukur kadar protein dengan metode Lowry (Yandri *et al.*, 2022).

3.3.4. Pemurnian Enzim α -Amilase

Setelah enzim α -amilase diisolasi, selanjutnya enzim tersebut dimurnikan menggunakan metode fraksinasi dengan menggunakan amonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan dialisis.

a) Fraksinasi dengan amonium sulfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$

Ekstrak kasar enzim yang diperoleh dimurnikan dengan cara fraksinasi menggunakan garam amonium sulfat pada berbagai derajat kejenuhan yaitu (0-20%); (20-40%); (40-60%); (60-80%); dan (80-100%) untuk mengetahui pada fraksi mana enzim α -amilase terendapkan. Skema fraksinasi dengan amonium sulfat ditunjukkan dalam Gambar 9



Gambar 9. Skema fraksinasi dengan amonium sulfat.

Ekstrak kasar enzim ditambahkan dengan garam amonium sulfat secara perlahan sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. 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. 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% (Yandri *et al.*, 2022).

b) Dialisis

Enzim hasil fraksinasi dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis 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 dan Kadar Protein Enzim α -Amilase

A. Pengujian aktivitas enzim α -amilase 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. Kemudian ditambahkan 0,2 gram I_2 dan akuades hingga tanda batas miniskus.

b) Larutan pati: 0,1 gram pati dilarutkan dalam akuades 100 mL dan dipanaskan hingga larut.

- c) Larutan HCl 1 N: 12 N HCl pekat diencerkan menjadi 1 N. Sebanyak 8,3 mL HCl pekat dimasukkan dalam labu ukur 100 mL. Tambahkan akuades hingga batas miniskus.

B. Pengujian aktivitas enzim α -amilase metode Fuwa

Aktivitas α -amilase ditentukan dengan metode iodine (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 iodine 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 diinaktivasi menggunakan HCl.

C. Pengujian aktivitas enzim α -amilase metode Mandels

1. Pembuatan pereaksi uji aktivitas enzim α -amilase dengan metode Mandels
Dalam labu takar 100 mL, tambahkan 1 gram DNS (*Dinitrosalicylic Acid*), selanjutnya ditambahkan 1 gram NaOH lalu dikocok hingga larut, lalu 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 batas tera (Mandels *et al.*, 1976).
2. Uji aktivitas enzim α -amilase metode Mandels
Metode ini digunakan untuk melihat adanya glukosa yang terbentuk. Sebanyak 0,25 mL enzim dan 0,25 mL larutan pati dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian diinkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit dalam penangas air. Setelah itu, tambahkan DNS (*dinitrosalicylic acid*) sebanyak 1 mL. Didihkan selama 10 menit kemudian didinginkan. Selanjutnya, ditambahkan akuades sebanyak 1,5 mL ke dalam tabung

reaksi. Uji menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 510 nm (Mandels *et al.*, 1976).

3.3.6. Penentuan Kadar Protein Metode Lowry

a. Pembuatan pereaksi untuk penentuan kadar protein metode Lowry

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

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

b. 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. Kemudian direaksikan dengan 5 mL pereaksi C, dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruang. Setelah itu, ditambahkan dengan cepat 0,5 mL pereaksi D dan diaduk dengan sempurna, didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Untuk kontrol 0,1 mL enzim diganti dengan 0,1 mL akuades. Selanjutnya, lakukan perlakuan yang sama seperti sampel. Serapannya diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 750 nm. Untuk menentukan kadar protein enzim digunakan kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumin*) dan perhitungan metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

3.3.7. Modifikasi Kimia Enzim α -Amilase dengan Asam Glioksilat

Prosedur ini merupakan modifikasi kimia enzim α -amilase dengan asam glioksilat yang dilaporkan oleh Melik-Nubarrov *et al.*, (1987) dalam menstabilkan α -amilase kimotripsin. Sebanyak 10 mL enzim α -amilase (mengandung 0,4 $\mu\text{mol/mL}$) dicampur dengan 0,5% amilum dalam buffer fosfat-borat (100 mM K_2HPO_4 dan 500 mM H_3BO_3) pH 8,4 ditambahkan dengan 10 μmol asam glioksilat dan 8 μmol NaBH_4 , reaksi ini dilakukan pada suhu 4°C selama 30 menit. Penambahan reagen asam glioksilat dilakukan dengan variasi konsentrasi 1,5; 2,0; dan 2,5 mg/mL.

3.3.8. Karakterisasi Enzim α -Amilase

1. Penentuan pH optimum

Untuk mengetahui pH optimum enzim sebelum dan sesudah modifikasi kimia, digunakan buffer fosfat 0,05 M dengan variasi pH sebagai berikut: 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; dan 8,0. Suhunya dijaga agar tetap 60°C , dilanjutkan dengan pengukuran aktivitas enzim metode Mandels.

2. Penentuan suhu optimum

Untuk mengetahui suhu optimum kerja enzim dilakukan dengan memvariasikan suhu yaitu 45, 50, 55, 60, 65, dan 70°C selama 30 menit pada pH optimum. Selanjutnya aktivitas enzim diukur dengan metode Mandels.

3. 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 pH dan suhu optimum selama 30 menit. Selanjutnya data aktivitas enzim dengan konsentrasi substrat diplotkan ke dalam kurva Lineweaver-Burk untuk penentuan K_M dan V_{maks} .

4. Uji stabilitas termal enzim

Uji stabilitas termal enzim sebelum dan sesudah modifikasi 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).

$$\text{Aktivitas sisa} = \frac{\text{Aktivitas enzim setelah perlakuan}}{\text{Aktivitas enzim awal (tanpa perlakuan)}} \times 100\% \quad (5)$$

3.3.9. 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:

$$\ln (E_i/E_0) = -k_i t_{1/2} \quad (6)$$

Adapun penentuan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan enzim setelah modifikasi, diturunkan dari persamaan 6:

$$\Delta G_i = -RT \ln (k_i h/k_B T) \quad (7)$$

Keterangan :

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

T = suhu absolut (K)

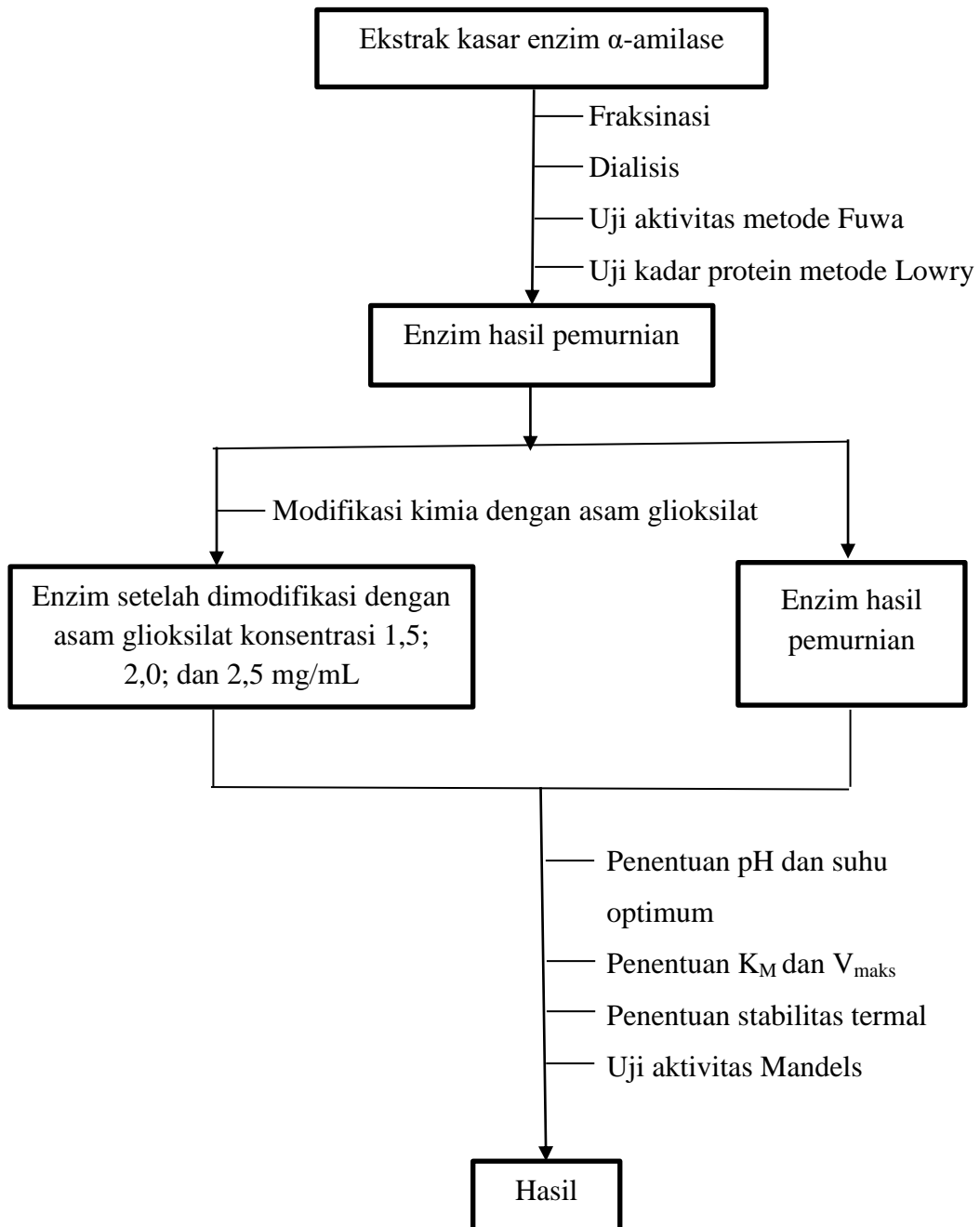
k_i = konstanta laju inaktivasi termal

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 10.



Gambar 10. Diagram alir penelitian.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

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

1. Enzim hasil pemurnian meningkat kemurniannya sebanyak 18 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim dengan aktivitas spesifik sebesar 1037,42 U/mg.
2. Enzim hasil pemurnian mempunyai pH optimum 5,0; suhu optimum 55°C; $K_M = 11,55 \text{ mg/mL}^{-1}$ substrat, $V_{maks} = 10,76 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1}\text{menit}^{-1}$ dan uji stabilitas termal enzim α -amilase hasil pemurnian pada suhu 60°C selama 100 menit memiliki aktivitas sisa sebesar 9,34% dengan nilai $k_i = 0,018 \text{ menit}^{-1}$; $t_{1/2} = 38,50 \text{ menit}$; dan $\Delta G_i = 104,331 \text{ kJ/mol}^{-1}$.
3. Enzim hasil modifikasi kimia menggunakan asam glioksilat dengan konsentrasi 1,5; 2,0; dan 2,5 mg/mL optimum pada pH 5,5 dan suhu 55°C serta memiliki nilai K_M berturut-turut sebesar 16,74; 16,28; dan 14,67 mg/mL^{-1} substrat serta nilai V_{maks} berturut-turut sebesar 9,32; 7,92; dan 7,07 $\text{ } \mu\text{mol mL}^{-1}\text{menit}^{-1}$.
4. Uji stabilitas termal enzim hasil modifikasi kimia menggunakan asam glioksilat dengan konsentrasi 1,5; 2,0; dan 2,5 mg/mL pada suhu 60°C selama 100 menit memiliki aktivitas sisa berturut-turut sebesar 28,59; 35,93; dan 39,23% serta memiliki nilai $k_i = 0,0105$; 0,0096; dan 0,0088 menit^{-1} , nilai $t_{1/2} = 66,00$; 72,19; dan 78,75 menit, dan nilai $\Delta G_i = 105,799$; 106,076; dan 106,297 kJ/mol^{-1} .
5. Enzim hasil modifikasi kimia dengan asam glioksilat memiliki kestabilan termal yang tinggi, hal ini dibuktikan dengan peningkatan waktu paruh sebesar 1,08-2,05 kali lipat dibandingkan dengan enzim murni.

5.2. Saran

Dari pembahasan, maka disarankan untuk melakukan modifikasi menggunakan asam glioksilat dengan variasi konsentrasi yang lebih tinggi agar menghasilkan kestabilan enzim yang lebih besar dibandingkan dengan enzim pemurnian hingga mencapai variasi konsentrasi maksimum serta penentuan pH dan suhu optimum dapat dilakukan dengan rentang yang lebih luas.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahern, T. J. and Klivanov, A. M. 1987. *Why Do Enzyme Irreversibly Inactive at High Temperature. Biotec 1. Microbial Genetic Engineering and Enzyme Technology.* Gustav Fischer. Stuttgart. New York.
- Akan, M., Hazroğlu, R., Ilhan, Z., Sareyyınoğlu, B. and Tunca, R. 2002. A Case of *Aspergillosis* in a broiler breeder flock. *Avian. Dis.* **46** (2): 497–501.
- Anggraini, N. 2011. Peningkatan Kestabilan Enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 Dengan Modifikasi Kimia Menggunakan Asam Glioksilat. *Skripsi.* Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Apriyanti. 2010. Peningkatan Kestabilan Enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 Dengan Modifikasi Kimia Menggunakan Dimetiladipimidat. *Skripsi.* Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Ariandi, M. 2016. Pengenalan enzim amilase (α -amylase) dan reaksi enzimatisnya menghidrolisis amilosa pati menjadi glukosa. *J. Dinamika.* **7**(1): 74-82.
- Bhat, M. K. 2000. Cellulases and related enzymes. *Biotech. Adv.* **18**: 355-383.
- Biogen. 2008. Amilase. Tersedia dalam http://biogen.litbang.deptan.go.id/terbitan/agrobio/abstrak/agrobio_vol. Diakses tanggal 13 Maret 2022.
- Boyer, R. F. 1993. *Modern Experimental Biochemistry.* Benjamin Cumming Publishing Company. California.
- Clark, R. E. and Clark, R. E. 2007. Reconsidering research on learning from media. *Rev. Educ. Res.* **53** (4): 445–459.
- Eijsink, G. H., Sirgit, G., Torben, V. and Bertus, V. 2005. Directed evolution of enzyme stability. biomolecular engineering. *Elsevier Sci. Inc.* New York. **23**: 21-30.
- 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.
- Goddetee, D. W., Terri, C., Beth, F. L., Maria, L., Jonathan, R. M., Christian, P., Robert, B. R., Shioh, S. Y. and Wilson, C. R. 1993. Strategy and implementation of a system for protein engineering. *J. Biotechnol.* **28**: 41-54.

- Henrici, A. T. 1948. *The Biology of Bacteria*. D.C.Heath and Company, Houghton Mifflin. United States.
- Holms, W. H. 1987. Flux control via citric acid silk and glyoxylate by pass in *Escherichia coli*. *Biochem. Soc.* **54**: 17-31.
- Janecek, S. 1993. Strategies for obtaining stable enzymes. *Process Biochem.* **28**: 435-445.
- Kamelia, R., Muliawati, S. dan Dessy N. 2005. Isolasi dan karakterisasi protease intraseluler termostabil dari bakteri *Bacillus stearothermophilus* RP1. *Seminar Nasional MIPA*. Departemen Kimia. Institut Pertanian Bogor. 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.
- Kumala dan Widyasari. 2006. *Mikologi Dasar Kedokteran*. Universitas Trisakti. Jakarta
- Lay, B. W. dan Sugyo, H. 1992. *Mikrobiologi*. Rajawali Pers. Jakarta. 107-112.
- Lehninger, A. L. 1982. *Biochemistry*. Academic Press. New York.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** (1): 265–275.
- Makfoeld, D. 1993. *Mikotoksin Pangan*. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Mandels, M., Andreotti, R. and Roche, C. 1976. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotech and Bioeng. Symp.* No.6. John Wiley and Sons Inc. New York.
- Martoharsono, S. 1984. *Biokimia*. UGM Press. Yogyakarta.
- Martoharsono, S. 2006. *Biokimia 1*. UGM University Press. Yogyakarta.
- Mehrotra, R. S. and Aneja, K. R. 1990. *An Introduction to Mycology*. Wiley Eastern Limited. Wiley. New York.
- Melik-Nubarov, N. S., Mozheav, V. V., Siksniis, V. A. and Martinek. K. 1987. Enzyme stabilization of α -chymotrypsin by reductive alkylation with glyoxylic acid. *Biotechnology.* **9**: 725-730.
- Mozhaev, V. V. and Martinek, K. 1984. Structure-stability relationships in proteins : new approaches to stabilizing enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* **6**: 50-59.

- Mozhaev, V. V., Melik-Nubarov, N. S., Siksnis V. A. and Martinek, K. 1990. Strategy for stabilizing enzymes. Part two: increasing enzyme stability by selective chemical modification. *Biocatalyst*. **3** (173): 189-196.
- Mufarrikha, I., Roosdiana, A. dan Prasetyawan, S. 2014. Optimasi kondisi produksi pektinase dari *Aspergillus niger*. *Kimia S. J.* **2** (1): 393-399.
- Multri, H. D., Kiyat, W. E., Nacing, N. dan Dari, D. W. 2019. Pemanfaatan enzim alpha-amilase pada modifikasi pati singkong sebagai substitusi gelatin produk marshmallow utilization of alpha-amilase in *cassava starch* modification as gelatin substitution at marshmallow product. *J. Agro.* **5**(2): 220–227.
- Oliveira. 2004. Rhizobia amylase production using various starchy substances as carbon substrates. *Braz. J. Microbiol.* **38**: 208-216.
- Page, D. S. 1989. *Prinsip-Prinsip Biokimia*. Erlangga. Jakarta.
- Page, D. S. 1997. *Prinsip-Prinsip Biokimia*. Erlangga. Jakarta.
- Palmer, T. 1991. *Enzymes: Biochemistry, Biotechnology and Clinical Chemistry Second Edition (2nd ed.)*. Horwood Publishing Limited. Cambridge.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D. and Mohan, R. 2002. Review: advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **31** (2): 135-152.
- Pelczar, M. J. and Chan, E. C. S. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. UI Press. Jakarta.
- Poedjiadi, A. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. 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.
- Ramasamy, S., Benazir, J. F., Ramalingam, S. and Kumar, R. 2011. Amylase production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation using agroindustrial wastes. *Inter. J. Eng. Sci. Technol.* **3**(2): 1756-1763.
- Richana, N. 2002. Produksi dan prospek enzim xilanase dalam perkembangan bioindustri di Indonesia. *Bulletin Agrobio.* **5**: 29-36.
- Rini, S. 2020. Peningkatan Stabilitas Enzim α -amilase dari *Aspergillus fumigatus* dengan Modifikasi Kimia Menggunakan Asam Glioksilat. *Skripsi*. Universitas Lampung. Bandar Lampung.

- Rodwell, V. W. 1987. *Harper's Review of Biochemistry*. EGC Kedokteran. Jakarta.
- Scopes, R. K. 1982. *Protein Purification*. Springer Verlag. New York.
- Scopes, R. K. 1994. *Protein Purification*. Springer Verlag. New York.
- Shahib, M. N. 2005. *Biologi Molekuler Medik I*. Universitas Padjajaran Press. Bandung.
- Shuler, M. L. and Kargi, F. 2002. *Bioprocess Engineering: Basic Concepts, 2nd Ed.* Prentice Hall PTR. USA.
- Soemitro, S. Pengaruh modifikasi kimiawi selektif terhadap kestabilan α -amilase dari *Saccharomycopsis fibuligera*. *J. Bionatura*. **7**(3): 259-273.
- Soesanto, L. 2013. *Pengantar Pengendalian Hayati Penyakit Tanaman edisi kedua*. Rajawali Press. Jakarta.
- Souza, P. M. and Magalhães, P. O. 2010. Application of microbial α -amylase in industry. A review. *Braz. J. Microbiol.* **41**(4): 850–861.
- Sthal, S. 1999. *Thermophilic Microorganism: The Biological Background for Thermophily and Thermoresistance of Enzyme in Thermostability of Enzyme*. Gupta M. N editor. Spinger Verlag. New Delhi.
- Stein, E. A., Hsiu, J. and Fischer, E. H. 1964. Alpha-amylases as calcium-metalloenzymes. I. Preparation of calcium-free apoamylases by chelation and electro dialysis. *Biochemistry*. **3**: 56–61.
- Stryer, L., Tymoczko, J. L., and Berg, J. M. 1995. *Biochemistry, Fifth Edition*. WH Freeman. New York.
- Stryer, L., Tymoczko J. L. and Berg, J. M. 2002. *Biochemistry, Fifth Edition*. WH Freeman. New York.
- Suhartono, M. T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. PAU IPB. Bogor.
- Suhartono, M. T., Suswanto A. dan Widjaja H. 1992. *Diktat Struktur dan Biokimia Protein PA*. IPB. Bogor.
- Sundari, E. S. 2011. Peningkatan Kestabilan Enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dengan Modifikasi Kimia Menggunakan SitratkonatAnhidrida. *Skripsi*. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Sutanto, I., Suhariah, I., Pudji, K. S., dan Saleha, S. 2013. *Buku Ajar Parasitologi Kedokteran, edisi ke 4*. FKUI. Jakarta

- Vieille, C. and Zeikus, J. G. 1996. Thermozyms: Identifying molecular determinant of protein structural and functional stability. *Tibtech*. **14** (6): 183-189.
- Virdianingsih, R. 2002. Mempelajari Stabilitas Termal dari *Bacillus pumilus* dalam Pelarut Heksana, Toluena, dan Benzena. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Winarno, F. G. 1986. *Enzim Pangan dan Gizi*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Winarno, F. G. 1989. *Kimia Pangan dan Gizi*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Wirahadikusumah, M. 1997. *Biokimia: Protein, Enzim dan Asam Nukleat*. ITB Press. Bandung.
- Wirahadikusumah, M. 2001. *Biokimia: Protein, Enzim dan Asam Nukleat*. ITB Press. Bandung.
- Wirajana, I. N., Pratiwi, Y. H. dan Ratnayani, O. 2018. Perbandingan metode uji gula pereduksi dalam penentuan aktivitas L-Arabinofuranosidase dengan substrat janur kelapa (*Cocos nucifera*). *J. Kimia*. **1**(1): 134-139.
- Wiseman, A. 1975. *Enzyme Biotechnology*. John Willey and Sons Inc. New York.
- Yandri, A. S. dan Suhartati, T. 2018. *Peningkatan Kestabilan Enzim*. AURA. Bandar Lampung.
- Yandri, A. S., Ropingi, H., Suhartati, T., Hendri, J., Irawan, B. and Hadi, S. 2022. The Effect of zeolit/chitosan hybrid matrix for thermal-stabilization enhancement on the immobilization of *A. fumigatus* α -amylase. *Emerg. Sci. J.* **6** (3): 505-518.
- Yandri, Y., Nurmala, N., Suhartati, T., Satria, H. and Hadi, S. 2022. The stability increase of α -amylase enzyme from *Aspergillus fumigatus* using dimethyladipimidate. *Phys. Sci. Rev.* 1-10. doi.org/10.1515/psr-2021-0138.
- Yuneta, R. dan Putra, S.R. 2010. Pengaruh Suhu pada Lipase dari Bakteri *Bacillus subtilis*. *Prosiding Kimia FMIPA*. Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Surabaya.