

**PENGARUH MODIFIKASI KIMIA MENGGUNAKAN SITRAKONAT
ANHIDRIDA TERHADAP STABILITAS ENZIM α -AMILASE
DARI *Aspergillus fumigatus***

(Skripsi)

Oleh

LUPIA WIDYA ASTUTI



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

ABSTRAK

PENGARUH MODIFIKASI KIMIA MENGGUNAKAN SITRAKONAT ANHIDRIDA TERHADAP STABILITAS ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus fumigatus*

Oleh

Lupia Widya Astuti

Kestabilan enzim dalam industri merupakan faktor penting, karena enzim umumnya tidak stabil pada pH dan suhu ekstrim. Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan stabilitas enzim α -amilase dari *A. fumigatus* dengan modifikasi kimia menggunakan sitrakonatan anhidrida. Proses penelitian dilakukan melalui tahapan berikut: produksi enzim, isolasi, pemurnian, modifikasi kimia dan karakterisasi. Aktivitas enzim ditentukan dengan metode Fuwa dan Mandels serta kadar protein dengan metode Lowry. Hasil penelitian menunjukkan enzim hasil pemurnian mempunyai pH optimum 5; suhu optimum 50°C; $K_M = 3,01$ mg/mL substrat; $V_{maks} = 35,46$ μ mol/mL.menit, dan uji stabilitas termal pada suhu 60°C selama 100 menit menunjukkan nilai $k_i = 0,0179$ menit⁻¹; $t_{1/2} = 38,72$ menit; dan $\Delta G_i = 104,26$ kJ/mol. Enzim hasil modifikasi menggunakan sitrakonatan anhidrida 40 μ L memiliki pH optimum 6 sedangkan 50 μ L dan 60 μ L memiliki pH optimum 5,5 dengan suhu optimum ketiga penambahan tersebut adalah 60°C; nilai K_M berturut-turut adalah 4,57; 5,03; dan 5,22 mg/mL substrat; nilai V_{maks} adalah 27,70; 25,77; dan 25,71 μ mol/mL menit. Uji stabilitas termal enzim hasil modifikasi menggunakan sitrakonatan anhidrida 40, 50, dan 60 μ L pada suhu 60°C selama 100 menit secara berturut-turut memiliki nilai k_i sebesar 0,0027; 0,0023; dan 0,0021 menit⁻¹; $t_{1/2}$ sebesar 256,67; 301,30; dan 330,00 menit; dan nilai ΔG_i sebesar 109,584; 110,028; dan 110,279 kJ/mol. Modifikasi kimia enzim α -amilase dari jamur *A. fumigatus* menggunakan sitrakonatan anhidrida dapat meningkatkan stabilitas termal sebesar 6,6-8,5 kali. Hal ini dibuktikan dengan penurunan nilai k_i dan peningkatan nilai $t_{1/2}$ dan ΔG_i .

Kata kunci: α -amilase, *Aspergillus fumigatus*, modifikasi kimia, sitrakonatan anhidrida

ABSTRACT

EFFECTS CHEMICAL MODIFICATION USING CITRACONIC ANHYDRIDE ON THE STABILITY OF α -AMYLASE FROM *Aspergillus fumigatus*

By

Lupia Widya Astuti

The stability of enzymes for industrial usage is important because enzymes are generally unstable at high pH and temperatures. This work aims to improve the stability of the α -amylase enzyme from *A. fumigatus* by chemical modification using citraconic anhydride. The following phases were followed in the research process: enzyme production, isolation, purification, chemical modification, and characterization. The enzyme activity was then evaluated using the Fuwa and Mandels methods, and the protein content was assessed using the Lowry method. The enzyme activity was then evaluated using the Fuwa and Mandels methods, and the protein content was assessed using the Lowry method. The results showed that the native enzymes had an optimum pH of 5; optimum temperature 50°C; $K_M = 3.01$ mg/mL substrate; $V_{max} = 35.46$ $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$, $k_i = 0.0179$ min^{-1} ; $t_{1/2} = 38.72$ min; dan $\Delta G_i = 104.26$ kJ/mole. The modified enzyme using citraconic anhydride 40 μL has an optimum pH of 6 while 50 μL and 60 μL has an optimum pH of 5.5 and the optimum temperature of three concentrations is 60°C; $K_M = 4.57$, 5.03, and 5.22 mg/mL substrate; $V_{max} = 27.70$, 25.77, and 25.71 $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$, respectively. The modified enzyme thermal stability test with citraconic anhydride 40, 50, and 60 μL at 60°C for 100 minutes yielded k_i values of 0.0027, 0.0023, and 0.0021 min^{-1} , $t_{1/2}$ values of 256.67, 301.30, and 330.00 min, and ΔG_i values of 109.58, 110.03, and 110.28 kJ/mole. Chemical modification of the α -amylase enzyme from the fungus *A. fumigatus* with citraconic anhydride can increase thermal stability by 6.6-8.5 times. This is seen by a decrease in the value of k_i and increasing the values of $t_{1/2}$ and ΔG_i .

Keywords: α -amylase, *Aspergillus fumigatus*, chemical modification, citraconic anhydride

**PENGARUH MODIFIKASI KIMIA MENGGUNAKAN SITRAKONAT
ANHIDRIDA TERHADAP STABILITAS ENZIM α -AMILASE
DARI *Aspergillus fumigatus***

Oleh

LUPIA WIDYA ASTUTI

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS**

Pada

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



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

Judul Skripsi

: **PENGARUH MODIFIKASI KIMIA MENGGUNAKAN
SITRAKONAT ANHIDRIDA TERHADAP STABILITAS
ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus fumigatus***

Nama Mahasiswa

: **Lupia Widya Astuti**

Nomor Pokok Mahasiswa : **1817011066**

Jurusan

: **Kimia**

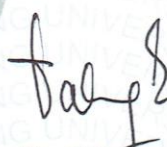
Fakultas

: **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

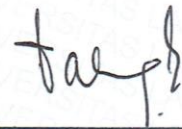
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

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



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



Anggota : Dr. Yuli Ambarwati, S.Si., M.Si.



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

SURAT PERNYATAAN

Yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Lupia Widya Astuti
Nomor Pokok Mahasiswa : 1817011066
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul **“Pengaruh Modifikasi Kimia Menggunakan Sitrakonat Anhidrida terhadap Stabilitas Enzim α -Amilase dari *Aspergillus fumigatus*”** adalah benar karya saya sendiri, baik gagasan, hasil, dan analisisnya. Saya tidak keberatan jika data dalam skripsi ini digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi sesuai dengan kesepakatan sebelum dilakukan publikasi.

Bandar Lampung, 6 Desember 2022

Yang menyatakan



Lupia Widya Astuti
NPM 1817011066

RIWAYAT HIDUP

Penulis bernama lengkap Lupia Widya Astuti dilahirkan di Bandar Lampung, pada tanggal 02 Agustus 2000. Anak kedua dari 3 bersaudara, putri dari Bapak Iswanto dan Ibu Lailatun Sururiah. Jenjang pendidikan diawali dari Taman Kanak-kanak di TK Kuntum Khoiruumah, Bandar Lampung pada tahun 2006. Penulis melanjutkan pendidikan ke jenjang sekolah dasar di SD Negeri 04 Sumberrejo, Bandar Lampung diselesaikan pada tahun 2012. Sekolah Menengah Pertama di SMP Negeri 14 Bandar Lampung dan diselesaikan pada tahun 2015 dan Sekolah Menengah Atas di SMK Negeri 8 Bandar Lampung Jurusan Kimia Analisis dan diselesaikan pada tahun 2018.

Penulis diterima di Jurusan S1 Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung melalui jalur SBMPTN (Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri) pada tahun 2018. Selama menjadi mahasiswa, penulis pernah mengikuti kegiatan organisasi sebagai Kader Muda Himpunan Mahasiswa Kimia (KAMI) periode 2018 dan menjadi anggota bidang Sosial dan Masyarakat Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) FMIPA Universitas Lampung periode 2019. Penulis menjadi anggota muda di Unit Kegiatan Mahasiswa Penelitian tahun 2020, kemudian sebagai anggota Departemen Riset dan Penalaran periode 2021/2022. Penulis juga pernah menjadi asisten Praktikum Biokimia untuk mahasiswa S1 Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung pada tahun 2022.

Penulis menyelesaikan Praktik Kerja Lapangan di Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Lampung dengan judul “Penentuan Kondisi Optimum *Aspergillus fumigatus* Menghasilkan Enzim Selulase pada Media Eceng Gondok (*Eichhornia crassipes*)” pada bulan Desember 2021. Penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) pada bulan Februari-Maret 2021.

MOTTO

“Hidup itu adalah seni menggambar tanpa penghapus”

(John W. Gardner)

“Jika kamu ingin hidup bahagia terikatlah pada tujuan, bukan orang atau benda”

(Albert Einstein)

“To fall in love with yourself is the first secret to happiness”

(Robert Morley)

“Boleh jadi kamu membenci sesuatu, padahal ia amat baik bagimu, boleh jadi (pula) kamu menyukai sesuatu padahal ia amat buruk bagimu. Allah mengetahui, sedang kamu tidak mengetahui”

(Q.S. Al-Baqarah: 216)

“Janganlah engkau mengucapkan perkataan yang engkau sendiri tak suka mendengarnya jika orang lain mengucapkannya padamu”

(Ali bin Abi Thalib)

“Jangan menjelaskan dirimu kepada siapapun, karena yang menyukaimu tidak butuh itu, dan yang membencimu tidak percaya itu”

(Ali bin Abi Thalib)

“Take the risk, and you’ll thank yourself later”

PERSEMBAHAN

*Dengan mengucap Alhamdulillahirobbil'alamin kepada Allah Subhanahu
Wa Ta'alla atas limpahan rahmat dan karunia- Nya, shalawat serta
salam semoga selalu tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW yang
senantiasa diharapkan syafaatnya di hari akhir.*

Kupersembahkan goresan tinta dalam karya sederhana ini sebagai wujud cinta,
kasih sayang, hormat dan baktiku terhadap kedua malaikat dalam hidupku:

Bapak dan Ibuku tercinta

Yang telah menjadi sumber kekuatan dan bagiku. Melalui karya ini ananda ingin
berterimakasih atas segala cinta, kasih sayang, kesabaran, pengorbanan,
dukungan, motivasi serta ketulusan yang tak pernah lelah mendo'akan hidupku.
Untuk kakakku Nurjanah dan adikku Vivi Aidah Yahya yang telah memberikan
do'a, dukungan serta selalu menjadi penyemangatku dalam menyelesaikan karya
ini.

Rasa hormat saya kepada :

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

Bapak Ibu Dosen Jurusan Kimia FMIPA Unila yang telah membimbing,
mendidik, memberikan banyak ilmu dan pengalamannya kepada ananda selama
menempuh pendidikan di kampus.

keluarga besarku dan rekan-rekan yang selalu memberikan semangat, bantuan,
mengajarkan tentang arti berbagi, cinta dan kebersamaan.

Serta

*Almamaterku Tercinta
Universitas Lampung*

SANWACANA

Alhamdulillah puji syukur penulis ucapkan kepada Allah SWT atas segala rahmat, karunia, dan keridhoan-Nya penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul, “**Pengaruh Modifikasi Kimia Menggunakan Sitrakonat Anhidrida terhadap Stabilitas Enzim α -Amilase dari *Aspergillus fumigatus***”. Sholawat serta salam tak lupa juga penulis hanturkan kepada junjungan kita Nabi besar Muhammad SAW, keluarga, sahabat, dan seluruh umatnya yang senantiasa taat mengamalkan ajaran dan sunnahnya. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.

Penulis mengucapkan rasa terima kasih dan ketulusan hati diiringi doa kepada:

1. Kedua Orang Tua-ku tercinta Bapak Iswanto dan Ibu Lailatun Sururiah, yang tidak pernah berhenti berdoa dan memohon kepada Allah SWT demi kesuksesan penulis, yang selalu berjuang dan bekerja keras tanpa mengenal lelah. Terima kasih atas segala perhatian, kasih sayang, kesabaran, dan dukungan serta semangat yang luar biasa untuk penulis. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya serta selalu diberi kesehatan dan perlindungan serta kemudahan dalam segala urusan.
2. Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S. selaku pembimbing I yang telah banyak memberikan ilmu pengetahuan, gagasan, bimbingan, bantuan, dukungan, arahan, saran, dan kritik kepada penulis selama penelitian hingga selesainya skripsi ini. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan kemudahan dan membalas kebaikan Bapak.
3. Ibu Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S. selaku pembimbing II yang telah sabar membimbing, memberikan arahan, saran, dan kritik dalam menyelesaikan

skripsi ini. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan kemudahan dan membalas kebaikan Ibu.

4. Ibu Dr. Yuli Ambarwati S.Si., M.Si. selaku pembahas atas kesediaan memberikan arahan, koreksi, saran, dan kritik yang bermanfaat kepada penulis. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan kemudahan dan membalas kebaikan Ibu.
5. Bapak Syaiful Bahri, S.Si., M.Si. selaku pembimbing akademik atas segala bimbingan, nasihat, serta motivasi yang telah di berikan kepada penulis. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan kemudahan dan membalas kebaikan Bapak.
6. Bapak Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
7. Bapak Mulyono, S.Si., M.Si., Ph.D. selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
8. Bapak dan Ibu dosen Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung yang telah memberikan ilmu, pengalaman, dan motivasi selama perkuliahan. Semoga Allah senantiasa membalasnya.
9. Bapak Ibu Guru dari SD, SMP, dan SMA yang telah banyak memberikan ilmu pengetahuan, pendidikan akhlak serta pengalaman kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan pendidikan ini.
10. Kedua Saudariku, Nurjanah dan Vivi Aidah Yahya yang selalu memberikan doa, semangat, dan dukungan. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya serta selalu diberi kesehatan dan perlindungan serta kemudahan dalam segala urusan.
11. Partner penelitianku PY'18 yaitu Eka Candra Wati, Dwi Noviani dan Lily Nur Safitri yang telah memberikan dukungan, semangat, motivasi, dan dorongan untuk segera menyelesaikan penelitian. Terima kasih untuk segala kebersamaan dan keceriaan yang terjalin dalam proses penelitian yang telah kita lakukan bersama. Semoga Allah SWT memberikan perlindungan dan melancarkan segala urusan kalian.

12. Teman pejuangku Fauzia Sabrina, Firda Tiara Rochman, Mey Dhea Tami Putri dan Lily Nur Safitri. Terima kasih untuk kebersamaan, bantuan, semangat dan motivasi yang telah kalian bagi bersama penulis. Semoga Allah SWT memberikan perlindungan dan melancarkan segala urusan kalian.
13. Sahabat-sahabat SMP dan SMK. Terima kasih telah mendoakan, memberikan keceriaan, dukungan, dan semangat kepada penulis.
14. Senior-senior terbaikku yaitu Mba Ezra Rheinsky Tiarsa, S.Si., M.Si. dan kak Hendri Ropingi S.Si. terima kasih telah membimbing, menguji, meluangkan banyak waktu, memberi ilmu, kritik, saran dan bantuan lainnya selama penulis melakukan penelitian.
15. Kakak dan adik tingkat seperbimbingan, terima kasih atas segala arahan, bantuan, saran dan dukungannya selama ini.
16. Teman-teman kelas B, teman-teman seperjuangan di Laboratorium Biokimia FMIPA Unila yang telah memberikan semangat, dukungan, nasihat, dan bantuan kepada penulis. Terima kasih atas kebersamaan selama ini.
17. Seluruh mahasiswa Jurusan Kimia angkatan 2018, terima kasih atas kebersamaan yang telah dilalui dalam kehidupan perkuliahan. Semoga kita semua dimudahkan dalam berkarir serta segala urusan.
18. Terakhir, terimakasih untuk diriku yang tetap bertahan di titik ini hingga skripsi ini terselesaikan dan semangat untuk tugas berikutnya.

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

Bandar Lampung, 6 Desember 2022
Penulis,

Lupia Widya Astuti
NPM 1817011066

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	iii
DAFTAR GAMBAR.....	v
DAFTAR LAMPIRAN	vi
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian	3
1.3. Manfaat Penelitian	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Enzim	4
2.1.1. Faktor yang Mempengaruhi Reaksi Enzim.....	4
2.1.2. Teori Mekanisme Kerja Enzim	6
2.2. Kinetika Reaksi Enzim.....	7
2.3. Stabilitas Enzim	8
2.4. Enzim Amilase	9
2.5. <i>A. fumigatus</i>	11
2.6. Isolasi dan Pemurnian Enzim	12
2.6.1. Sentrifugasi	13
2.6.2. Fraksinasi	13
2.6.3. Dialisis	14
2.7. Uji Aktivitas Enzim α -Amilase	15
2.8. Penentuan Kadar Protein Metode Lowry	16
2.9. Modifikasi Kimia	17
2.10. Sitratkonat Anhidrida	18
III. METODE PENELITIAN.....	20
3.1. Waktu dan Tempat	20
3.2. Alat dan Bahan	20
3.3. Prosedur Penelitian	21
3.3.1. Pembiakan Isolat <i>A. fumigatus</i>	21
3.3.2. Pembuatan Media Inokulum dan Fermentasi, Inokulasi <i>A. fumigatus</i> dan Produksi Enzim α -Amilase	21

3.3.3. Isolasi Enzim α -Amilase	22
3.3.4. Pemurnian Enzim α -Amilase	23
3.3.5. Uji Aktivitas Enzim α -Amilase dan Penentuan Kadar Protein.....	24
3.3.6. Modifikasi Kimia Enzim α -Amilase Menggunakan Sitratkonat Anhidrida.....	27
3.3.7. Karakterisasi Enzim α -Amilase.....	27
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	30
4.1. Produksi dan Isolasi Enzim α -Amilase dari <i>A. fumigatus</i>	30
4.2. Pemurnian Enzim α -Amilase	31
4.2.1. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat	31
4.2.2. Dialisis	34
4.3. Karakterisasi Enzim α -Amilase Hasil Pemurnian dan Hasil Modifikasi Sitratkonat Anhidrida	35
4.3.1. Penentuan pH Optimum α -Amilase Hasil Pemurnian dan Hasil Modifikasi	36
4.3.2. Penentuan Suhu Optimum α -Amilase Hasil Pemurnian dan Hasil Modifikasi	38
4.3.3. Penentuan Nilai K_M dan V_{maks} α -Amilase Hasil Pemurnian dan Hasil Modifikasi.....	40
4.3.4. Penentuan Stabilitas Termal α -Amilase Hasil Pemurnian dan Hasil Modifikasi	42
4.3.5. Penentuan Konstanta Laju Inaktivasi Termal (k_i), Waktu Paruh ($t_{1/2}$), dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i)	44
V. SIMPULAN DAN SARAN.....	47
5.1. Simpulan	47
5.2. Saran	48
DAFTAR PUSTAKA.....	49
LAMPIRAN	54

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 modifikasi sitrakonat anhidrida	41
3. Nilai k_i , $t_{1/2}$, dan ΔG_i enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi sitrakonat anhidrida	45
4. Hubungan antara kejenuhan amonium sulfat pada beberapa fraksi dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	55
5. Hubungan antara kejenuhan amonium sulfat (0-20)% dan (20-90)% dengan aktivitas spesifik α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	55
6. Hubungan antara pH dengan aktivitas unit (U/mL) enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi sitrakonat anhidrida	56
7. Hubungan antara pH dengan aktivitas sisa (%) enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi sitrakonat anhidrida	56
8. Hubungan antara suhu dengan aktivitas unit (U/mL) enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi sitrakonat anhidrida	57
9. Hubungan antara suhu dengan aktivitas sisa (%) enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi sitrakonat anhidrida	57
10. Data untuk penentuan nilai K_M dan V_{maks} enzim α -amilase hasil pemurnian berdasarkan persamaan Lineweaver-Burk	58
11. Data untuk penentuan nilai K_M dan V_{maks} enzim α -amilase hasil modifikasi sitrakonat anhidrida berdasarkan persamaan Lineweaver-Burk	58
12. Hubungan antara waktu inkubasi dengan aktivitas unit (U/mL) enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi sitrakonat anhidrida	59
13. Hubungan antara waktu inkubasi dengan aktivitas sisa (%) enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi sitrakonat anhidrida.....	59
14. Data $\ln (E_i/E_0)$ untuk penentuan konstanta laju inaktivasi termal (k_i) enzim α -amilase hasil pemurnian pada suhu 50°C	60

15. Data $\ln (E_i/E_0)$ untuk penentuan konstanta laju inaktivasi termal (k_i) enzim α -amilase hasil modifikasi sitrakonat anhidrida pada suhu 60°C	60
16. Absorbansi glukosa pada berbagai konsentrasi	65
17. Absorbansi BSA pada berbagai konsentrasi untuk menentukan kurva standar BSA	67

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Model pengikatan enzim-substrat (a) <i>lock and key</i> dan (b) <i>induced fit</i>	7
2. Diagram Lineweaver-Burk.....	8
3. Struktur enzim α -amilase dari <i>B. amyloliquefaciens</i>	10
4. <i>A. fumigatus</i>	11
5. Dialisis.....	15
6. Modifikasi menggunakan sitrakonat anhidrida	19
7. Skema fraksinasi dengan amonium sulfat	23
8. Diagram alir penelitian.....	29
9. Hubungan antara tingkat kejenuhan amonium sulfat pada beberapa fraksi dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	32
10. Hubungan antara tingkat kejenuhan amonium sulfat (0-20) dan (20-90)% dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	33
11. Hubungan antara aktivitas sisa enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi dengan variasi pH	36
12. Hubungan antara aktivitas sisa enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi dengan variasi suhu	38
13. Grafik Lineweaver-Burk enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi sitrakonat anhidrida 40, 50, dan 60 μ L	41
14. Stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi sitrakonat anhidrida 40, 50, dan 60 μ L	43
15. Grafik $\ln(E_i/E_0)$ enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi sitrakonat anhidrida 40,50, dan 60 μ L	44
16. Kurva standar glukosa.....	65
17. Kurva standar BSA	67

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Aktivitas enzim α -amilase pada berbagai pola fraksinasi menggunakan garam amonium sulfat	55
2. Aktivitas enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi sitrakonat anhidrida pada variasi pH	56
3. Aktivitas enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi sitrakonat anhidrida pada variasi suhu	57
4. Penentuan K_M dan V_{maks} enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi sitrakonat anhidrida	58
5. Penentuan stabilitas termal enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi sitrakonat anhidrida	59
6. Penentuan konstanta laju inaktivasi termal (k_i) enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi sitrakonat anhidrida	60
7. Perhitungan ΔG_i dan $t_{1/2}$ enzim α -amilase hasil pemurnian	61
8. Perhitungan ΔG_i dan $t_{1/2}$ enzim hasil modifikasi sitrakonat anhidrida 40 μL	62
9. Perhitungan ΔG_i dan $t_{1/2}$ enzim hasil modifikasi sitrakonat anhidrida 50 μL	63
10. Perhitungan ΔG_i dan $t_{1/2}$ enzim hasil modifikasi sitrakonat anhidrida 60 μL	64
11. Kurva standar glukosa	65
12. Persamaan untuk menghitung aktivitas unit enzim α -amilase metode Mandels	66
13. Kurva standar BSA	67
14. Persamaan untuk menghitung kadar protein dengan metode Lowry	68

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Enzim digunakan pada sektor industri untuk memproduksi berbagai produk yang ekonomis. *Grand View Research* (2020) memperkirakan pasar global enzim untuk industri senilai 5,6 miliar dolar AS selama tahun 2020 di tengah krisis COVID-19, hal ini menunjukkan permintaan enzim industri yang tidak terputus selama pandemi di sektor industri makanan, minuman, tekstil, pakan, biofuel, dan deterjen. Enzim yang digunakan dalam industri makanan dan minuman memiliki pengaruh yang menguntungkan di negara berkembang (Li *et al.*, 2012). Enzim yang digunakan pada sektor farmasi memiliki permintaan yang lebih banyak daripada yang digunakan di industri makanan dan minuman di negara maju, pada tahun 2019 pasar enzim secara global diperkirakan mencapai 10 miliar USD dan akan terus meningkat hingga mencapai 14,7 miliar USD pada tahun 2025 untuk rekayasa enzim dan *green chemistry* (Markets and Markets, 2020).

Industri berbasis enzim semakin penting karena proses yang aman, biaya pemurnian rendah, hasil tinggi, proses yang efisien, dan sifat ramah lingkungan (Ejaz *et al.*, 2021). Salah satu enzim penting yang digunakan dalam industri adalah amilase. Amilase memiliki aplikasi dalam sejumlah besar proses industri seperti makanan, fermentasi dan industri farmasi. Media sintetis yang digunakan untuk produksi amilase sedikit lebih mahal sehingga banyak penelitian yang dilakukan untuk mengurangi biaya produksi amilase. Enzim yang diproduksi oleh mikroba saat ini banyak digunakan dalam proses industri karena biayanya yang rendah, produktivitas yang tinggi, ramah lingkungan, dan ketersediaan yang besar (Burhan *et al.*, 2003; Khalid-Bin-Ferdaus *et al.*, 2018; Mishra and Behera, 2010).

Beberapa mikroorganisme dari lingkungan khusus seperti tanah salin dapat digunakan untuk mencapai tujuan produksi enzim amilase yang tinggi. Beberapa jenis amilase dapat digunakan untuk menghemat energi melalui pengembangan enzim, serta metode rekayasa protein dapat diterapkan untuk menghasilkan enzim dengan stabilitas yang tinggi. Enzim α -amilase dapat diproduksi secara ekstraseluler (Far *et al.*, 2020). Berbagai organisme, termasuk mikroorganisme seperti bakteri air (Tarhriz *et al.*, 2011). Jamur, *actinomyces*, tumbuhan, dan hewan, dapat menghasilkan α -amilase (Abou-Elela *et al.*, 2009; Sundarram and Murthy, 2014).

Menurut Rafiee and Rezaee (2021), umumnya enzim sebagai biokatalis mempunyai sifat tidak stabil terhadap lingkungan di berbagai kondisi seperti suhu tinggi, pH ekstrem, dan dalam berbagai pelarut (Pothiraj *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2018). Stabilitas enzim sebagai biokatalis perlu ditingkatkan. Beberapa metode telah digunakan untuk mencapai amilase yang stabil, seperti meningkatkan stabilitas enzim melalui rekayasa protein, amobilisasi enzim dan penambahan aditif (Dey *et al.*, 2016; Far *et al.*, 2020). Modifikasi kimia adalah cara yang ampuh dan efektif untuk meningkatkan fungsi biokatalis tersebut (Gunnoo and Madder, 2016; Verdasco-Martín *et al.*, 2016). Modifikasi kimia untuk mencapai stabilitas enzim masih banyak diminati meskipun banyak teknik yang lebih modern dalam rekayasa genetika dan protein, karena relatif sederhana dan biaya murah.

Penelitian Yandri *et al.*, (2012), melakukan modifikasi kimia menggunakan sitrakonat anhidrida terbukti dapat meningkatkan stabilitas termal enzim α -amilase dari bakteri *Bacillus subtilis* ITBCCB148. Hasil penelitian lainnya yang dilaporkan oleh Amalia, (2016) memperoleh hasil yang sama yaitu modifikasi kimia menggunakan sitrakonat anhidrida berhasil meningkatkan stabilitas enzim selulase dari bakteri *Bacillus subtilis* ITBCCB148. Modifikasi kimia menggunakan sitrakonat anhidrida telah dilakukan oleh Febriyanti, (2019) pada enzim α -amilase dari *A. fumigatus*. Enzim hasil pemurnian mempunyai pH 5,5

dan suhu optimum 50°C. Enzim hasil modifikasi dengan penambahan 20 µL sitrkonat anhidrida memiliki pH optimum 5,5 sedangkan penambahan 30 µL dan 40 µL sitrkonat anhidrida memiliki pH optimum 4,5 dengan suhu optimum 55°C untuk ketiga penambahan tersebut. Terjadi peningkatan waktu paruh dan ΔG_i serta penurunan nilai k_i enzim α -amilase hasil modifikasi dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Hal ini menunjukkan bahwa enzim hasil modifikasi kimia dapat meningkatkan stabilitas enzim terhadap pH dan suhu.

Pada penelitian ini dilakukan isolasi, pemurnian dan modifikasi kimia enzim α -amilase dari *A. fumigatus* menggunakan senyawa sitrkonat anhidrida 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 menggunakan sitrkonat anhidrida.

1.3. Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Memberikan informasi tentang enzim α -amilase hasil pemurnian dari *A. fumigatus*.
- b. Memberikan informasi tentang pengaruh modifikasi kimia menggunakan sitrkonat anhidrida terhadap stabilitas enzim α -amilase dari *A. fumigatus*.
- c. Memperoleh enzim α -amilase dari *A. fumigatus* dengan kestabilan yang tinggi sehingga dapat digunakan untuk produksi dalam proses industri.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Enzim

Enzim merupakan protein yang berperan sebagai katalis dalam proses biokimia. Enzim sangat diperlukan dalam industri, sehingga kebutuhan enzim semakin pesat setiap harinya, sesuai dengan kemajuan industri yang mengaplikasikan enzim, teknologi fermentasi, dan rekayasa genetika. Kinerja enzim dalam mempercepat reaksi sebesar 10^8 sampai dengan 10^{11} kali lebih cepat dibandingkan jika tanpa enzim. Pengolahan limbah-limbah organik tidak harus dilakukan dengan cara mengaplikasikan enzim saja, tetapi sebaiknya untuk mempercepat proses, maka pada limbah organik tersebut terkandung mikroorganisme indigenusnya (Kartika dan Ibrahim, 2021).

2.1.1. Faktor yang Mempengaruhi Reaksi Enzim

Laju reaksi yang dikatalisis enzim dipengaruhi oleh Murray *et al.*, (1999):

a) Suhu

Suhu rendah yang mendekati titik beku biasanya tidak merusak enzim. Pada suhu dimana enzim masih aktif, kenaikan suhu sebanyak 10°C yang menyebabkan keaktifan menjadi 2 kali lebih besar sehingga akan meningkatkan laju reaksi sampai titik yang melebihi hambatan energi untuk merusak interaksi nonkovalen yang mempertahankan struktur tiga dimensi enzim, yang kemudian akan menguraikan rantai polipeptida enzim dan akhirnya mengalami denaturasi, disertai hilangnya kemampuan katalitik

enzim. Enzim akan bekerja dengan baik pada suhu optimum. Di dalam tubuh manusia enzim akan bekerja optimum pada suhu sekitar 37°C.

b) Konsentrasi Ion Hidrogen (pH)

Aktivitas enzim sangat tergantung terhadap pH, oleh karena itu terdapat komponen asam dan basa dalam protein penyusun enzim. Sebagian besar enzim intrasel memperlihatkan aktivitas optimal pada nilai pH antara 5 dan 9. Hubungan aktivitas dengan konsentrasi ion hidrogen mencerminkan keseimbangan antara denaturasi enzim pada pH tinggi atau rendah.

c) Konsentrasi Substrat

Peningkatan konsentrasi substrat akan meningkatkan kecepatan awal untuk suatu enzim tipikal, hingga tercapai nilai maksimal, jika peningkatan lebih lanjut, konsentrasi substrat tidak meningkatkan kecepatan awal, enzim dikatakan “jenuh” oleh substrat.

d) Konsentrasi Enzim

Kecepatan reaksi enzim berbanding lurus dengan konsentrasi enzim. Makin besar jumlah enzim makin cepat reaksinya. Konsentrasi enzim tidak mempengaruhi harga K_{eq} (suatu rasio berbagai konstanta laju reaksi), dapat dihitung dari konsentrasi substrat dan produk pada keseimbangan.

e) Inhibitor

Inhibitor dapat bersifat reversibel maupun irreversibel, inhibitor reversibel akan membentuk suatu kompleks dinamik yang dapat terlepas dari enzimnya, sedangkan inhibitor yang irreversibel akan memodifikasi enzim secara kimiawi. Modifikasi ini umumnya melibatkan pembentukan atau pemutusan ikatan kovalen dengan residu aminoasil yang esensial untuk mengikat substrat, katalisis atau mempertahankan konformasi fungsional enzim. Suatu enzim yang telah terikat oleh inhibitor irreversibel (misalkan atom logam berat atau reagen pengasil) biasanya tidak dapat kembali ke bentuk semula.

2.1.2. Teori Mekanisme Kerja Enzim

Enzim mampu mempercepat reaksi dengan cara membentuk suatu keadaan transisi terstabilisasi melalui pembentukan enzim kompleks enzim substrat yang memiliki aktivitas lebih rendah. Energi aktivasi adalah energi yang tertinggi yang harus dicapai agar suatu reaksi dapat terjadi. Energi aktivasi jika lebih rendah maka lebih banyak molekul yang dapat mencapainya sehingga reaksi dapat berjalan lebih cepat.

Terdapat dua teori mengenai mekanisme kerja enzim, yaitu *lock and key* dan *induced fit*.

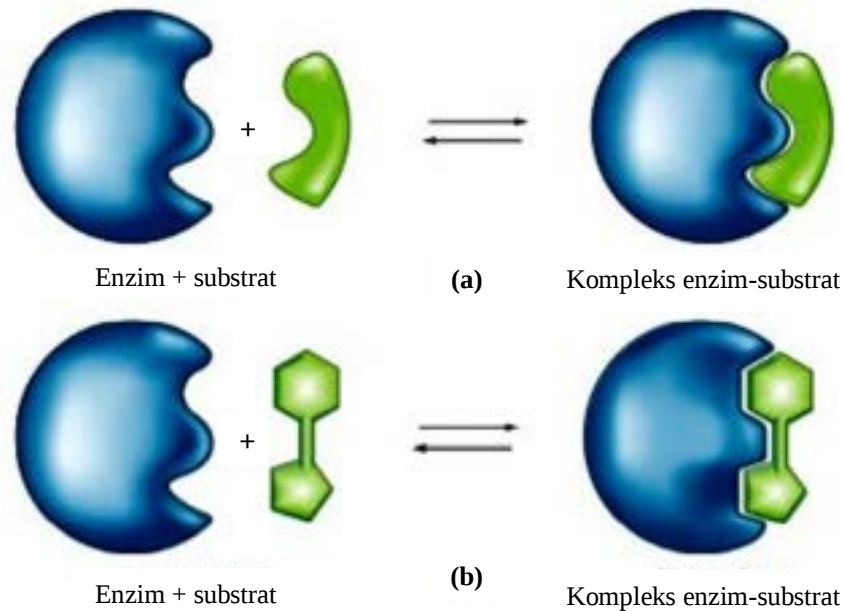
a. Model *Lock and Key*

Model ini diajukan oleh Emil Fischer pada tahun 1894. Pengikatan enzim-substrat menurut model ini diasumsikan bahwa sisi aktif enzim mempunyai struktur yang kaku yang tepat sekali bentuk dan distribusi muatannya dengan substrat. Masuknya substrat ke sisi aktif enzim dianalogikan seperti masuknya kunci pada gemboknya.

b. Model *Induced Fit*

Daniel E. Koshland Jr mengusulkan model yang lebih mutakhir untuk cara interaksi enzim dan substrat. Model ini diajukan pada tahun 1958 yang dinamakan model *induced fit*. Pada model ini sisi aktif enzim adalah ‘kantong’ yang tidak kaku yang dapat dimasuki oleh substrat yang tepat. Sisi aktif enzim adalah kantong fleksibel yang dapat memperkirakan bentuk substrat. Ketika substrat memasuki sisi aktif enzim, sisi aktif mencocokkan dengan bentuk substrat. Pengikatan enzim-substrat terjadi karena bentuk sisi aktif enzim menyesuaikan dengan bentuk substrat menghasilkan pengikatan enzim-substrat yang sempurna cocok “*fit*”. Agar terjadi interaksi enzim-substrat, permukaan enzim dan substrat harus “saling mengisi” (*complementary*), sehingga membutuhkan kecocokan yang khusus yang menentukan apakah sebuah enzim akan berikatan dengan sebuah substrat tertentu dan melakukan reaksi kimia (Azhar, 2016).

Model pengikatan enzim-substrat *lock and key* dan *induced fit* ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Model pengikatan enzim-substrat (a) *lock and key* dan (b) *induced fit* (Azhar, 2016).

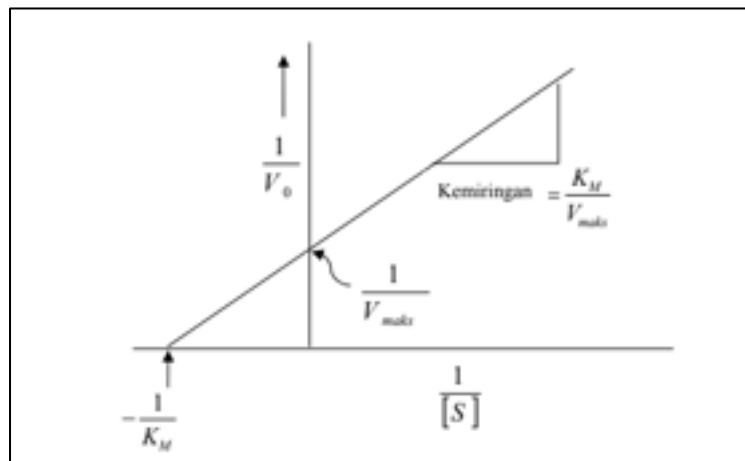
2.2. Kinetika Reaksi Enzim

Kinetika enzim merupakan salah satu cabang ilmu enzimologi yang membahas faktor-faktor yang mempengaruhi laju reaksi. Konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) merupakan parameter dalam kinetika reaksi enzim. Nilai K_M dapat diartikan sebagai konsentrasi substrat tertentu pada saat enzim mencapai kecepatan setengah dari kecepatan maksimumnya. Nilai K_M dan V_{maks} untuk setiap enzim bervariasi dan sangat khas dengan substrat tertentu pada suhu dan pH tertentu (Kamelia dkk., 2005). Persamaan Michaelis-Menten dan diagram Lineweaver-Burk ditunjukkan pada Gambar 2.

$$V_0 = \frac{V_{maks} [S]}{K_M + [S]} \longrightarrow \boxed{\text{Persamaan Michaelis-Menten}}$$

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

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{maks}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}} \longrightarrow \boxed{\text{Persamaan Lineweaver-Burk}}$$



Gambar 2. Diagram Lineweaver-Burk (Lehninger, 2005).

2.3. Stabilitas Enzim

Stabilitas enzim dapat diartikan sebagai kestabilan aktivitas enzim selama penyimpanan dan penggunaan enzim tersebut, serta kestabilan terhadap berbagai senyawa yang bersifat merusak enzim seperti pelarut tertentu (asam atau basa) dan pengaruh suhu dan pH yang ekstrim atau kondisi-kondisi non fisiologis lainnya, untuk meningkatkan stabilitas enzim agar tetap tinggi, yaitu menggunakan enzim yang memiliki stabilitas enzim alami dan mengusahakan peningkatan stabilitas enzim yang secara alami tidak atau kurang stabil (Kazan *et al.*, 1997).

Berikut faktor-faktor yang dapat mempengaruhi kestabilan enzim :

a. Pengaruh Suhu

Suhu yang terlalu rendah memiliki kemantapan enzim tinggi, tetapi aktivitasnya rendah. Aktivitas enzim tinggi pada suhu yang terlalu tinggi, tetapi kemantapannya rendah. Suhu enzim yang meningkat akan mempengaruhi kecepatan 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 untuk enzim tersebut (Wirahadikusumah, 2001).

b. Pengaruh pH

Semua reaksi enzim dipengaruhi oleh pH medium tempat reaksi terjadi. Stabilitas enzim dipengaruhi oleh banyak faktor seperti suhu, pH, pelarut, kofaktor dan kehadiran surfaktan. Pengaruh pH memegang peranan penting dari faktor-faktor tersebut. 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. Pada reaksi enzimatik yang jauh dari rentang pH optimum menyebabkan sebagian besar enzim kehilangan aktivitas katalitiknya secara cepat dan irreversibel. Inaktivasi ini terjadi karena *unfolding* molekul protein sebagai hasil dari perubahan kesetimbangan elektrostatik dan ikatan hidrogen (Kazan *et al.*, 1997).

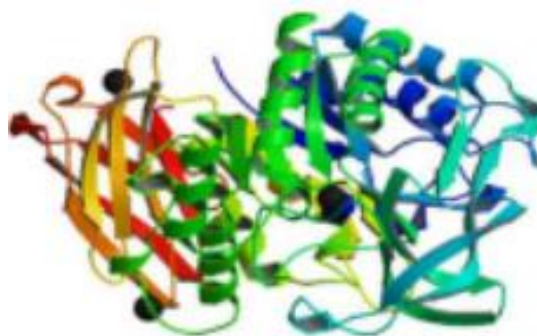
2.4. Enzim Amilase

Amilase adalah yang menghidrolisis ikatan glikosidik yang ada dalam molekul pati untuk menghasilkan dekstrin dan oligosakarida. Dalam pati, ikatan α -1,4-glikosidik dihidrolisis oleh amilase, yang dikenal sebagai hidrolase glikosida. Amilase pertama diisolasi pada tahun 1833 oleh Anselme Payen. Amilase terdapat dua jenis yaitu, ekso-amilase dan endo-amilase. Ekso-amilase menghidrolisis ujung pati yang tidak mereduksi. Endo-amilase menghidrolisis ikatan glikosidik

dalam molekul pati (Kamon *et al.*, 2015). Dalam bioteknologi, amilase merupakan enzim penting, terutama diperoleh dari mikroba dan memiliki banyak aplikasi industri (Farooq *et al.*, 2021). Amilase dikategorikan menjadi tiga sub tipe α -amilase, β -amilase, dan γ -amilase (Far *et al.*, 2020).

a. α -amilase

Enzim α -amilase (EC 3.2.1.1) yang memiliki nama ilmiah yaitu α -1,4-glukan-4-glukanohidrolase. Enzim ini dapat disekresikan oleh hewan, tumbuhan, dan mikroorganisme. Substrat α -amilase adalah pati. Suhu dan kondisi lain sangat mempengaruhi aktivitas enzim. Enzim α -amilase bekerja secara optimal pada pH 7,0 serta memiliki struktur tiga dimensi yang membantunya mengikat substrat dan membuatnya sangat spesifik dalam aktivitasnya. Enzim α -amilase terdiri dari rantai oligosakarida tunggal yang mengandung 512 asam amino (Offen *et al.*, 2015). Struktur enzim α -amilase ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Struktur enzim α -amilase dari *B. amyloliquefaciens* (Paul *et al.*, 2021).

b. β -amilase

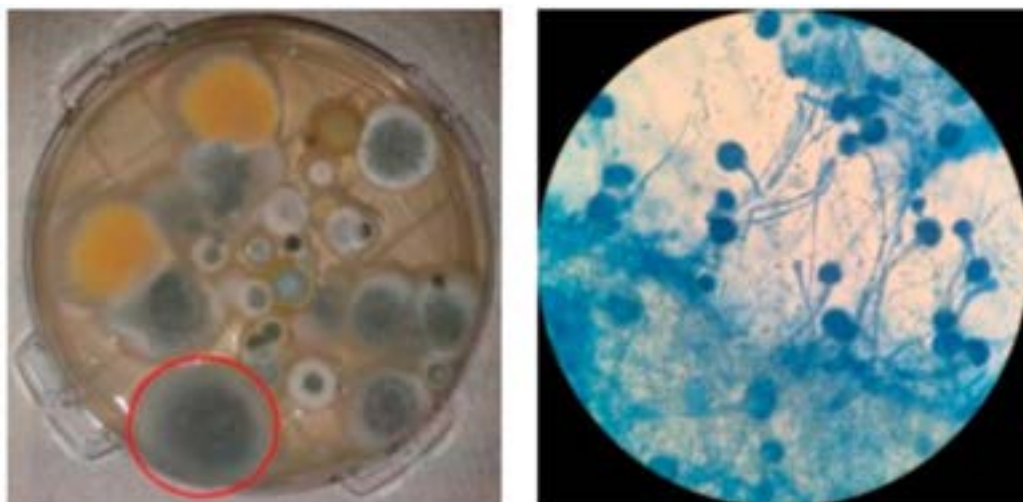
Enzim β -amilase (EC 3.2.1.2.) berperan dalam menghidrolisis ikatan α -1,4-glikosidik yang tidak mereduksi. Enzim ini tidak dapat menghidrolisis cabang-cabang yang ada dalam amilopektin atau glikogen. β -amilase aktif secara optimal pada kisaran pH 4,0-5,5. Biji tanaman, buah-buahan, dan kentang merupakan sumber utama β -amilase (Das and Kayastha, 2019).

c. γ -amilase

Enzim γ -amilase (EC 3.2.1.3) memiliki fungsi utama yang tidak seperti amilase lain yaitu untuk menghidrolisis ikatan α -1,6-glikosidik, amilosa dan amilopektin non-pereduksi ikatan α -1,4-glikosidik sehingga menghasilkan glukosa. Lingkungan asam paling efektif untuk enzim γ -amilase berfungsi dengan baik, karena memiliki pH optimum 3 (Farooq *et al.*, 2021).

2.5. *A. fumigatus*

A. fumigatus adalah jamur saprotrofik di mana-mana yang memainkan peran penting dalam mendaur ulang karbon dan nitrogen di bumi tetapi juga dapat menjadi patogen paru-paru yang mematikan. *A. fumigatus* juga termasuk jamur trimorfik dengan miselium vegetatif yang berkontribusi terhadap pembusukan bahan organik di tanah, konidia aseksual yang berperan atas penyebaran spesies melalui udara dan askospora dorman. Dinding sel *A. fumigatus* memiliki fungsi yang memungkinkan jamur untuk bertahan hidup di bawah lingkungan antagonis tetapi juga berperan penting dalam interaksi dengan sistem kekebalan mamalia. *A. fumigatus* tumbuh optimal pada suhu 37 °C (berkisar antara 15–55 °C) tetapi dapat bertahan hidup pada suhu 70 °C (Fang and Latgé, 2018). Jamur *A. fumigatus* ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. *A. fumigatus* (Gonçalves *et al.*, 2020).

Menurut Fang *and* Latgé (2018), klasifikasi dari *A. fumigatus* adalah:

Kingdom	: Fungi
Divisi	: Ascomycota
Kelas	: Eurotiomycetes
Orde	: Eurotiales
Family	: Aspergillaceae
Genus	: <i>Aspergillus</i>
Spesies	: <i>Aspergillus fumigatus</i>

Media PDA (*Potato Dextrose Agar*) biasanya digunakan untuk mengidentifikasi jamur jenis *Aspergillus* ini, karena jamur ini mampu hidup pada media dengan derajat keasamaan rendah dan kandungan gula yang tinggi. Media PDA ini merupakan salah satu media kultur yang paling umum dalam mendukung pertumbuhan pada berbagai jamur. *A. fumigatus* ditandai dengan koloni jamur yang berwarna hijau jamur berwarna hijau tua dengan pinggiran berwarna putih, diameter jamur sekitar 2-3 cm dan berbentuk bulat dengan tepian koloni rata serta permukaan halus, tekstur dari jamur tersebut seperti beludru (Gandi dkk., 2019).

2.6. Isolasi dan Pemurnian Enzim

Isolasi merupakan cara untuk memisahkan suatu zat dari campurannya, sehingga diperoleh zat yang murni. Menurut Duff *and* William (1996), enzim dapat diisolasi secara intraseluler dan ekstraseluler. Enzim intraseluler langsung digunakan di dalam sel dan sering ditemukan pada bagian membran dari sebuah organel sel, sedangkan enzim ekstraseluler dilepas dari sel ke lingkungan untuk menghidrolisis polimer di lingkungan (Maier *et al.*, 2000). Adapun enzim α -amilase merupakan enzim ekstraseluler yang dapat dikeluarkan dari sel. Enzim ini dikeluarkan dari sel, sehingga mudah untuk diisolasi dan dipisahkan dari pengotor lain serta tidak banyak bercampur dengan bahan-bahan sel lain (Pelczar dan Chan, 2007).

Faktor yang harus diperhatikan dalam pemurnian enzim yaitu faktor kualitas, kuantitas dan ekonomis.

- Faktor kualitas yaitu perlu tindakan untuk mempertahankan aktivitas protein dengan cara mengurangi proteolisis dan denaturasi.
- Faktor kuantitas yaitu pemakaian akhir dari protein murni akan menentukan kualitas enzim yang diperlukan.
- Faktor ekonomis merupakan kunci penting bila akan dipakai dalam industri atau diterapkan dalam skala laboratorium.

Proses pengisolasian dan pemurnian enzim berlangsung beberapa tahapan, yaitu:

2.6.1. Sentrifugasi

Metode sentrifugasi termasuk metode pemisahan berdasarkan berat molekul. Ekstrak kasar enzim pada metode sentrifugasi akan terpisah dari dinding sel. Pemisahan terbagi menjadi dua yaitu supernatan yang memiliki berat molekul rendah dan pelet merupakan sel bakteri dengan berat molekul lebih berat sehingga akan mengendap pada saat proses sentrifugasi. Proses sentrifugasi dilakukan pada suhu 2-4°C. Suhu dingin pada proses sentrifugasi bertujuan agar protein dalam enzim tidak mengalami denaturasi akibat suhu tinggi (Nababan dkk., 2019). Sel-sel mikroba biasanya mengalami sedimentasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit (Walsh and Headon, 1994).

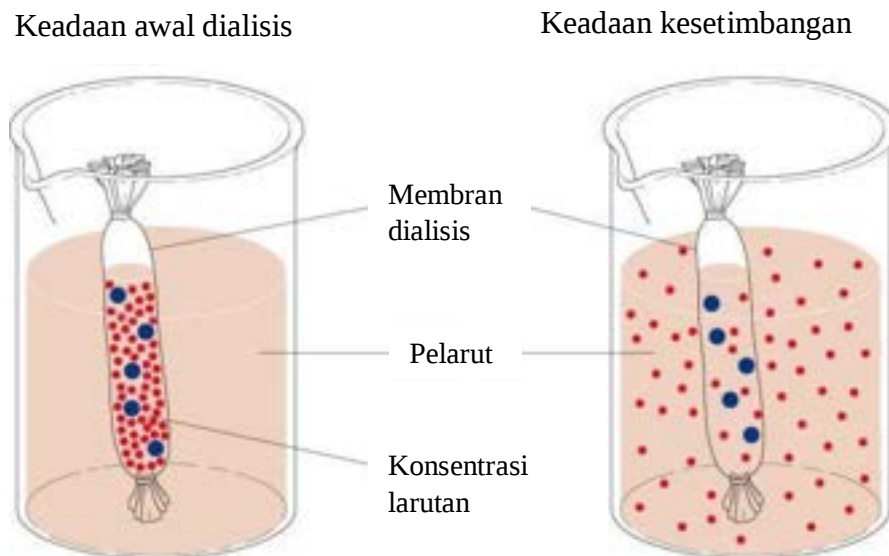
2.6.2. Fraksinasi

Fraksinasi (purifikasi parsial) merupakan proses pengendapan secara bertahap. Metode yang sering dilakukan dalam proses pemekatan enzim adalah dengan menambahkan garam ke dalam larutan enzim, seperti garam natrium klorida, garam natrium sulfat maupun garam amonium sulfat. Prinsip pemekatan dengan garam berdasarkan pada kelarutan protein yang berinteraksi polar dengan molekul air, interaksi ionik protein dengan garam, dan daya tolak menolak protein yang

bermuatan sama. 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* (Wirahadikusumah, 2001). Molekul air yang berikatan dengan garam-garam semakin banyak yang menyebabkan penarikan selubung air yang mengelilingi permukaan protein. Peristiwa ini menyebabkan protein saling berinteraksi, beragregasi kemudian mengendap. Amonium sulfat merupakan garam yang paling sering digunakan untuk mengendapkan protein karena memiliki daya larut tinggi di dalam air, relatif tidak mahal, dan kestabilan protein di dalam larutan amonium sulfat.

2.6.3. Dialisis

Proses dialisis berlangsung selama 24 jam pada suhu rendah dengan penggantian buffer setiap 4-6 jam. Pergantian buffer dilakukan untuk menghindari ketidakstabilan distribusi molekul garam dan ion-ion yang ada di dalam dan luar kantong selofan, sedangkan proses dialisis dilakukan pada suhu dingin untuk mencegah terjadinya kerusakan protein enzim yang dimurnikan, karena sebagian besar protein dan enzim stabil pada suhu rendah. Prinsip dialisis adalah difusi, yaitu terjadinya perpindahan zat terlarut dari larutan berkonsentrasi tinggi ke larutan berkonsentrasi yang rendah. Konsentrasi buffer di luar membran selofan lebih rendah daripada konsentrasi buffer di dalam membran selofan sehingga amonium sulfat dapat berdifusi ke luar membran selofan dan terpisah dari enzim. Pada tahap dialisis juga terjadi proses pemisahan molekul berdasarkan ukuran melalui pori membran selofan. Pori ini memungkinkan molekul kecil, seperti pelarut, garam, dan metabolit kecil untuk berdifusi melintasi membran, sedangkan molekul yang lebih besar, seperti enzim akan tertahan di dalam membran selofan (Sinatari, 2013). Dialisis dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Dialisis (Voet and Voet, 2004).

2.7. Uji Aktivitas Enzim α -Amilase

a. Metode Fuwa

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).

Iodin (I_2) terperangkap dalam rantai spiral substrat (amilosa) menghasilkan larutan berwarna biru pada kontrol. Enzim sejak awal sudah diinaktivasi oleh HCl sehingga substrat tetap utuh karena tidak dihidrolisis oleh enzim, maka larutan akan tetap berwarna biru. Enzim pada sampel akan mengikat substrat membentuk kompleks enzim-substrat. Kompleks tersebut akan bereaksi dengan larutan iodin membentuk larutan berwarna kuning yang dapat diukur

secara spektrofotometri. Substrat yang semakin banyak dihidrolisis oleh enzim, maka warna larutan akan semakin kuning bening, hal ini dikarenakan substrat pati yang berikatan dengan iodine dan enzim semakin berkurang dan berubah menjadi produk, yaitu glukosa. Enzim juga melepas ikatan spiral antara iodine dan substrat sehingga warna menjadi kuning bening (Fuwa, 1954).

b. Metode Mandels

Metode Mandels didasarkan pada pembentukan produk (glukosa) hasil hidrolisis substrat pati yang akan mengalami oksidasi setelah penambahan reagen DNS menghasilkan larutan berwarna merah (Mandels *et al.*, 1976). Warna tersebut akan menyerap cahaya monokromatis pada λ_{maks} 510 nm. Kurva standar glukosa digunakan untuk menentukan kadar glukosa yang terbentuk.

2.8. Penentuan Kadar Protein Metode Lowry

Penentuan kadar protein bertujuan untuk mengetahui bahwa protein enzim masih terdapat pada tiap fraksi pemurnian (tidak hilang dalam proses pemurnian) dengan aktivitas yang atau tetap baik. Metode yang dapat digunakan untuk menentukan kadar protein adalah metode Lowry. Pengujian kadar protein dengan metode Lowry 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-ciocalteu*. Reaksi ini secara perlahan akan mereduksi reagen tersebut menjadi heteromolibdenum menghasilkan warna hijau-kebiruan yang akan menyerap cahaya monokromatis pada λ_{maks} 750 nm. Intensitas warna yang dihasilkan tergantung pada kandungan triptofan dan tirosin (Lowry *et al.*, 1951).

2.9. Modifikasi Kimia

Modifikasi kimia adalah salah satu metode yang dapat digunakan untuk meningkatkan stabilitas enzim yang larut dalam air (Yandri *et al.*, 2012).

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

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 penyingkapan molekul. Berdasarkan struktur enzim, gugus fungsi yang kemungkinannya bereaksi dengan zat pemodifikasi adalah gugus fungsi yang terletak pada permukaan, sementara 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:

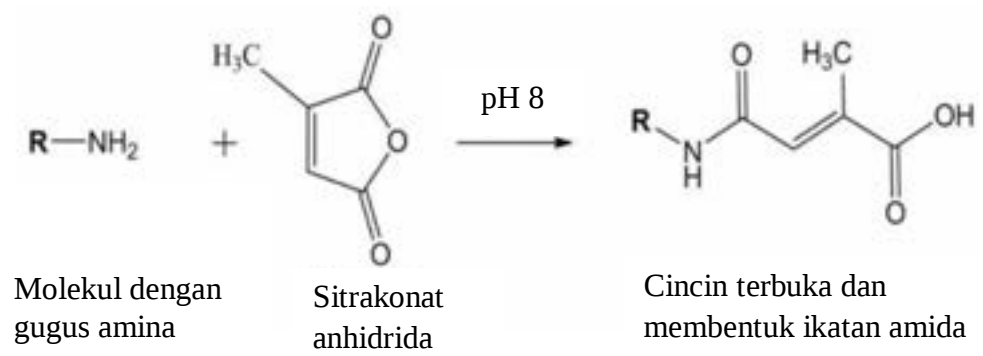
1. Modifikasi dengan pereaksi bifungsional (ikatan silang dari gugus fungsi pada permukaan).
2. Modifikasi dengan pereaksi nonpolar (peningkatan interaksi hidrofobik).
3. Penambahan gugus bermuatan atau gugus polar baru (penambahan ikatan hidrogen atau ionik).
4. Hidrofilisasi permukaan protein (mencegah terjadinya kontak antara gugus hidrofobik dengan air yang tidak disukai).

Penggunaan modifikasi kimia untuk mencapai stabilitas enzim masih banyak diminati meskipun banyak teknik yang lebih modern dalam rekayasa genetika dan protein, karena relatif sederhana, penggunaan yang tidak terbatas, dan biaya murah. Hidrolisis pati di industri tetap mahal karena waktu, upaya dan energi yang dibutuhkan untuk gelatinisasi dan pendinginan sebelum sakarifikasi molekul pati. Amilase stabil dalam kondisi alkali relevan dalam industri kertas, tekstil dan deterjen. Asilasi menggunakan sitrakonat anhidrida menyebabkan turunan enzim yang lebih basa dan termostabil dari amilase sakarifikasi pati dari *A. carbonarius*. Meskipun kedua proses (sitrakonilasi dan maleilasi) meningkatkan stabilitas amilase sakarifikasi, sitrakonilasi memiliki efek yang lebih jelas terbukti dari studi termoinaktivasi pada suhu tinggi (Nwagu *et al.*, 2020).

2.10. Sitrakonat Anhidrida

Sitrakonat anhidrida merupakan reagen spesifik yang digunakan untuk memblokir gugus amino pada residu lisin. Modifikasi kimia menggunakan sitrakonat anhidrida secara khusus mampu memodifikasi struktur lisin pada permukaan enzim (Yandri *et al.*, 2012). Sitrakonat anhidrida juga disebut 2-metil maleat anhidrida ($C_5H_4O_3$) karena struktur kimianya adalah anhidrida siklik dari asam karboksilat alifatik yang dapat digunakan untuk modifikasi enzim untuk mencapai stabilisasi enzim.

Reaksi modifikasi ini diawali dengan pembukaan cincin sitrakonat anhidrida dengan suasana basa yakni pada pH 8 dan kemudian gugus karbonil dari sitrakonat anhidrida berikatan dengan gugus amino pada residu lisin (Khajeh *et al.*, 2004). Reaksi yang terjadi antara sitrakonat dengan gugus amina suatu protein ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Modifikasi menggunakan sitrakonat anhidrida (Khajeh *et al.*, 2004).

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

3.2. Alat dan Bahan

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

Bahan-bahan yang digunakan adalah pati jagung, 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, Na(K)-Tartarat, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , reagen *folin-ciocalteu* (Sigma-Aldrich), pereaksi DNS (*dinitrosalisilic acid*) (Himedia), fenol, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, HCl (Merck), KI (Merck), I_2 , Na_2CO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, BSA (*Bovine Serum Albumin*), sitrkonat anhidrida (Merck), akuades, 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 Penelitian

3.3.1. Pembiakan Isolat *A. fumigatus*

- a. Pembuatan media agar miring
Sebanyak 3,9 gram PDA dan 0,1 gram pati jagung dilarutkan dalam 100 mL akuades lalu dipanaskan, lalu 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 *incubator* 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. Media fermentasi digunakan sebagai medium pertumbuhan dan perkembangbiakan disertai produksi enzim. Media inokulum dibuat dengan cara menimbang bahan-bahan yang terdiri dari KH_2PO_4 5 gram, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,5 gram, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,75 gram, pepton 1,875 gram, urea 0,75 gram,

CaCl₂ 0,75 gram, FeSO₄.7H₂O 0,0125 gram, ZnSO₄.7H₂O 0,0035 gram, CoCl₂ 0,005 gram dan pati jagung 1,875 gram, selanjutnya semua bahan dilarutkan dalam 250 mL buffer fosfat 0,05 M pH 6,5 dalam labu Erlenmeyer 500 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 biakan *A. fumigatus* dari media agar miring dipindahkan ke dalam media inokulum secara aseptis, lalu dikocok dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 125 rpm pada suhu 32°C selama 24 jam (Yandri *et al.*, 2022).

c. Produksi enzim α -amilase

Produksi enzim α -amilase dilakukan dengan cara memindahkan sebanyak 2% media inokulum dari volume media fermentasi ke dalam media fermentasi secara aseptis lalu diletakkan pada *shaker incubator* 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. Prinsip sentrifugasi berdasarkan kecepatan sedimentasi dengan cara pemutaran.

Sentrifugasi digunakan untuk memisahkan enzim ekstraseluler dari sisa-sisa sel.

Sentrifugasi dilakukan pada suhu rendah (di bawah suhu kamar) untuk menjaga kehilangan aktivitas enzim (Suhartono, 1992). Enzim dapat dipisahkan dari

komponen sel lainnya dengan menggunakan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Filtrat yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim

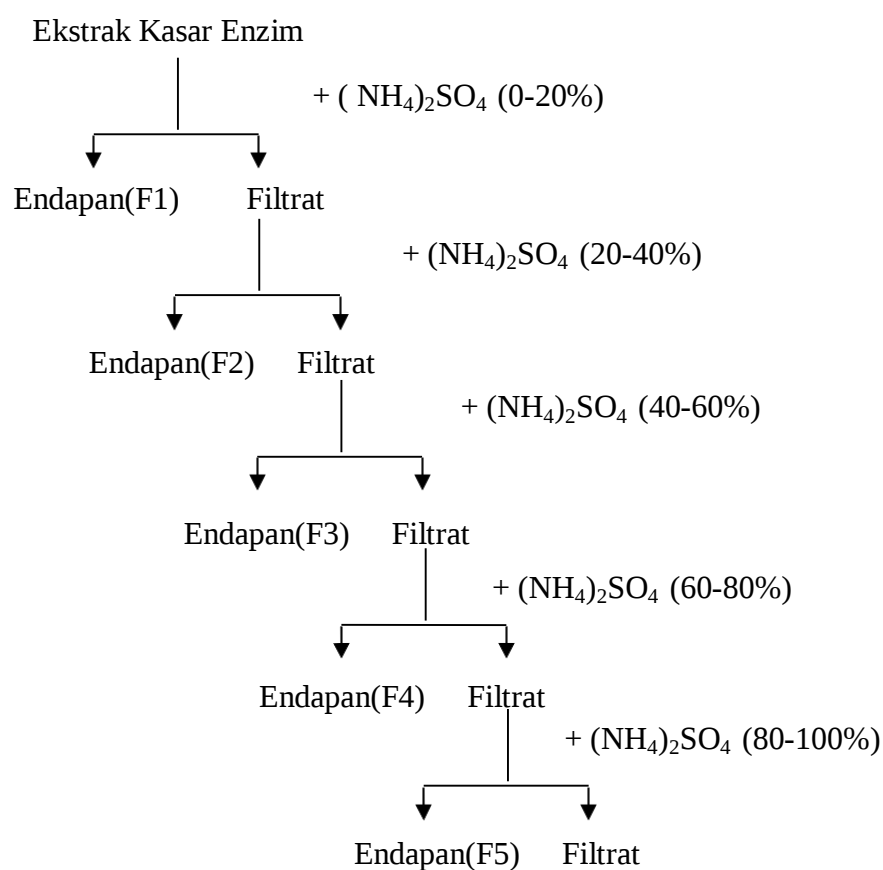
(Yandri *et al.*, 2022). Tahap selanjutnya akan dilakukan pengujian aktivitas

dengan Spektrofotometer UV-Vis metode Fuwa dan diukur kadar protein dengan metode Lowry.

3.3.4. Pemurnian Enzim α -Amilase

a. Fraksinasi menggunakan amonium sulfat

Ekstrak kasar enzim yang diperoleh selanjutnya dimurnikan dengan cara fraksinasi menggunakan garam 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 dengan amonuium sulfat dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Skema fraksinasi dengan amonium sulfat.

Ekstrak kasar enzim ditambahkan 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. Endapan yang diperoleh selanjutnya 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 aktifitas spesifik yang tertinggi. 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

Endapan enzim dari hasil fraksinasi kemudian dimurnikan dengan cara dialisis melalui membran semipermeabel (kantong selofan) menggunakan 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. Endapan putih BaSO_4 bila terbentuk di luar selofan, maka ion sulfat telah berhasil dikeluarkan dari dalam selofan. Tahap 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: KI sebanyak 2 gram dimasukkan dalam labu takar 100 mL dan dilarutkan dalam akuades 10 mL, lalu 0,2 gram I_2 dimasukkan dan ditambahkan akuades hingga tanda batas miniskus.
 - b) Larutan pati: pati 0,1 gram dilarutkan dalam akuades 100 mL dan

dipanaskan hingga larut.

- c) Larutan HCl 1N: 12N HCl pekat diencerkan menjadi 1N dengan memasukkan sebanyak 8,3 mL HCl pekat dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades hingga batas miniskus.

2. 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. Campuran yang telah 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.

b. Metode Mandels

1. Pembuatan Pereaksi untuk Pengukuran Aktivitas α -Amilase metode Mandels
Sebanyak DNS (*dinitrosalicylic acid*) 1%, NaOH 1%, fenol 0,2%, Na₂SO₃ 0,05%, Na(K)tartarat 40% dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Kemudian dilarutkan dengan akuades hingga tanda batas (Mandels *et al.*, 1976).

2. Pengujian Aktivitas Enzim α -Amilase Metode Mandels

Metode ini berdasarkan glukosa yang terbentuk (Mandels *et al.*, 1976). Sebanyak 0,25 mL enzim dan 0,25 mL larutan pati 0,1% dicampur lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 60°C, selanjutnya ditambahkan 1 mL pereaksi DNS dan dididihkan selama 10 menit pada penangas air. Larutan dibiarkan hingga suhu ruang dan ditambahkan 1,5 mL akuades, lalu serapan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} 510 nm.

c. Penentuan Kadar Protein Metode Lowry

1. Pembuatan Pereaksi untuk Penentuan Kadar Protein Metode Lowry

Uji kadar protein α -amilase dengan 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 5 mL larutan Na(K)-Tartarat 1%.
3. Pereaksi C : 2 mL pereaksi B ditambah 100 mL pereaksi A.
4. Pereaksi D : reagen *folin ciocalteu* diencerkan dengan akuades 1:1.
5. Larutan standar : larutan BSA (*Bovine Serum Albumin*) dengan kadar 0, 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. Pereaksi D sebanyak 0,5 mL selanjutnya ditambahkan dengan cepat dan diaduk dengan sempurna, didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang. 0,1 mL enzim diganti dengan akuades untuk kontrol, lalu perlakuannya sama seperti sampel. Serapannya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} 750 nm. Kadar protein enzim dapat ditentukan menggunakan kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumin*) dan perhitungan metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

3.3.6. Modifikasi Kimia Enzim α -Amilase Menggunakan Sitratonat Anhidrida

Residu lisin pada suatu enzim secara spesifik dapat dimodifikasi menggunakan reagen sitratonat anhidrida. Sebanyak 10 mL enzim hasil pemurnian dalam 10 mL larutan buffer fosfat pH 8 ditambahkan 40 μ L reagen sitratonat anhidrida secara bertahap, lalu diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 60 menit. Penambahan reagen sitratonat anhidrida dilakukan dengan variasi volume sebagai berikut : 40, 50, dan 60 μ L yang dilakukan dengan prosedur sama (Khajeh *et al.*, 2004).

3.3.7. Karakterisasi Enzim α -Amilase

a. Penentuan pH optimum

Penentuan pH optimum enzim sebelum dan sesudah dimodifikasi menggunakan larutan penyangga fosfat 0,05 M dengan pH yang bervariasi, yaitu 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5 dan 8. Suhu dijaga tetap pada 60°C, kemudian aktivitas enzim diukur dengan metode Mandels.

b. Penentuan suhu optimum

Penentuan suhu optimum enzim sebelum dan sesudah modifikasi, dilakukan dengan memvariasikan suhu yaitu 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 dan 80°C selama 30 menit pada pH optimum, lalu dilanjutkan dengan pengukuran aktivitas enzim dengan metode Mandels.

c. Penentuan nilai K_M dan V_{maks}

Konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) enzim sebelum dan sesudah modifikasi ditentukan dengan memvariasikan konsentrasi substrat 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1% dengan suhu dan pH optimum yang telah ditentukan selama 30 menit, selanjutnya data aktivitas enzim dengan konsentrasi substrat diplotkan ke dalam kurva Lineweaver-Burk untuk penentuan K_M dan V_{maks} .

d. Penentuan stabilitas termal dan stabilitas pH 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).

$$\text{Aktivitas sisa} = \frac{\text{Aktivitas enzim pada } t_i}{\text{Aktivitas enzim pada } t_0} \times 100\%$$

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

Penentuan nilai konstanta laju inaktivasi termal (k_i) dan $t_{1/2}$ didasarkan pada persamaan laju reaksi inaktivasi (k_i) orde satu antara aktivitas sisa enzim pada t_0 ($[E]_0$) dan aktivitas sisa enzim pada t_i ($[E]_i$), yaitu:

$$\ln = \frac{[E]_i}{[E]_0} - k_i t_{1/2}$$

Penentuan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim murni dan enzim modifikasi, diturunkan dari persamaan termodinamika (Kazan *et al.*, 1997):

$$\Delta G_i = -RT \ln \frac{k_i \cdot h}{k_b \cdot T}$$

Keterangan:

R : Konstanta gas ideal ($8,315 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

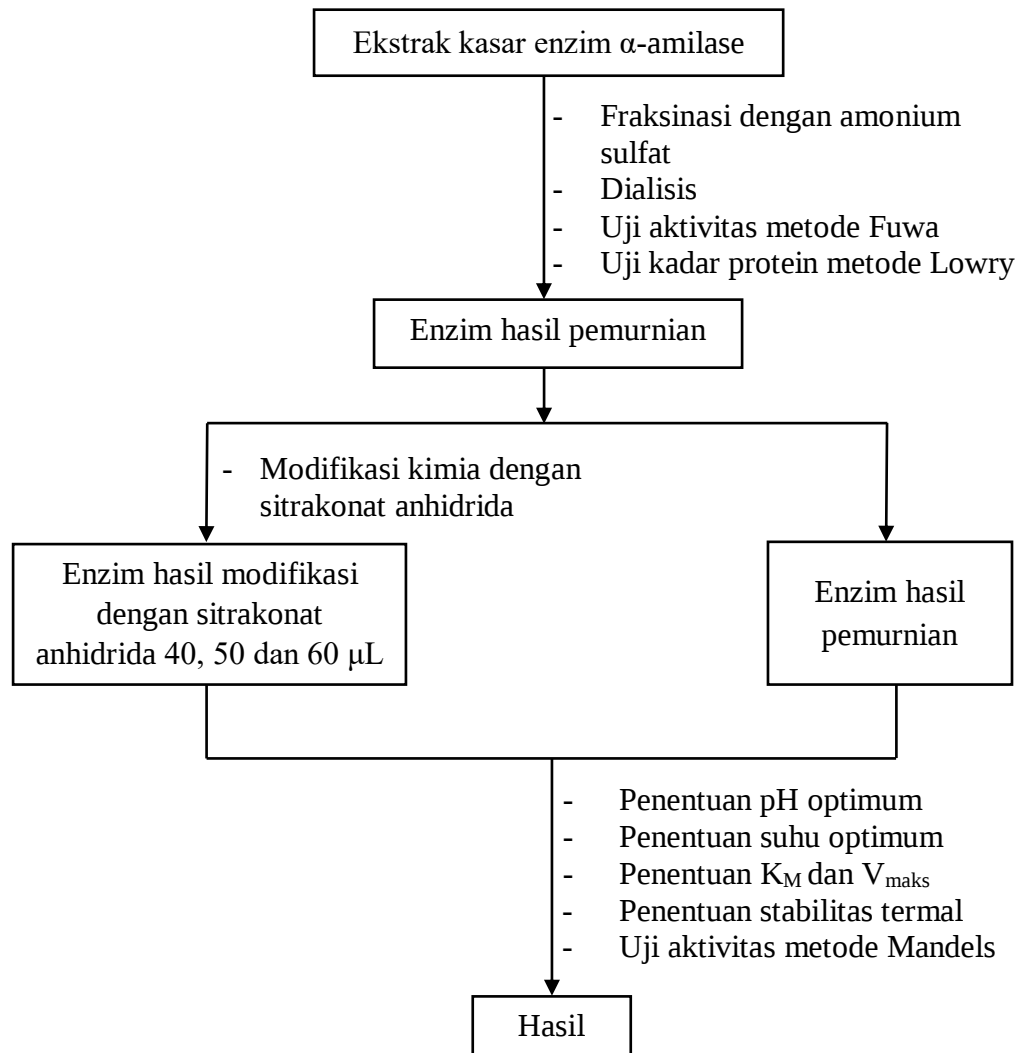
T : Suhu absolut (K)

k_i : Konstanta laju inaktivasi termal

h : Konstanta Planck ($6,625 \times 10^{-34} \text{ J det}$)

k_b : Konstanta Boltzman ($1,381 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$)

Diagram alir yang dilakukan pada penelitian ini dapat ditunjukkan pada Gambar 8.



Gambar 8. Diagram alir penelitian

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

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

1. Aktivitas spesifik enzim α -amilase hasil pemurnian meningkat sebanyak 13,410 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim.
2. Enzim hasil pemurnian mempunyai pH optimum 5; 50°C; $K_M = 3,011$ mg/mL substrat; $V_{maks} = 35,461$ μ mol/mL.menit, dengan nilai $k_i = 0,0179$ menit⁻¹; $t_{1/2} = 38,715$ menit; dan $\Delta G_i = 104,261$ kJ/mol.
3. Enzim hasil modifikasi menggunakan sitrakonat anhidrida 40 μ L memiliki pH optimum 6 sedangkan 50 μ L dan 60 μ L memiliki pH optimum 5,5; 60°C; nilai K_M berturut-turut adalah 4,568; 5,026; dan 5,221 mg/mL substrat; nilai V_{maks} adalah 27,701; 25,773; dan 25,707 μ mol/mL.menit.
4. Uji stabilitas termal enzim hasil modifikasi menggunakan sitrakonat anhidrida 40, 50, dan 60 μ L secara berturut-turut memiliki nilai $k_i = 0,0027$; 0,0023; dan 0,0021 menit⁻¹; $t_{1/2} = 256,667$; 301,304; dan 330,000 menit; dan nilai $\Delta G_i = 109,584$; 110,028; dan 110,279 kJ/mol, hasil penurunan nilai k_i , peningkatan $t_{1/2}$ dan nilai ΔG_i menunjukkan bahwa stabilitas termal enzim modifikasi lebih baik dibandingkan enzim hasil pemurnian.
5. Enzim α -amilase dari jamur *A. fumigatus* yang telah dimodifikasi menggunakan sitrakonat anhidrida dengan variasi penambahan 40, 50, dan 60 μ L meningkatkan stabilitas termal sebesar 6,6-8,5 kali dengan tingkat stabilitas terbaik pada penambahan 60 μ L sitrakonat anhidrida.

5.2. Saran

Dari pembahasan hasil penelitian yang diperoleh, maka disarankan untuk meningkatkan konsentrasi sitrakonat anhidrida serta interval pH, suhu atau waktu pada penelitian selanjutnya sehingga dapat diperoleh perbandingan enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi yang lebih lebar, menjaga suhu penyimpanan enzim pada keadaan dingin agar tidak terjadi denaturasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abou-Elela, G. M., El-Sersy, N. A. and Wefky, S. H. 2009. Statistical optimization of cold adapted α -amylase production by free and immobilized cells of *Nocardiosis aegyptia*. *J. Appl. Sci. Res.* **5** (3): 286-292.
- Amalia, P. 2016. Pengaruh Modifikasi Kimia terhadap Stabilitas Enzim Selulase dari Bakteri Lokal *Bacillus subtilis* ITBCCB148 Menggunakan Sitratkonat Anhidrida. *Tesis*. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Azhar, M. 2016. *Biomolekul Sel: Karbohidrat, Protein, dan Enzim*. UNP Press. Padang.
- Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, C., Ashabil, A. and Osman, G. 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus sp.* isolate ANT-6. *Process Biochem.* **38** (10): 1397-1403.
- Das, R. and Kayastha, A. M. 2019. β -amylase: general properties, mechanism and panorama of applications by immobilization on nano-structures. *Biocatalysis*. 17-38.
- Dey, T. B., Arvind, K., Rintu, B., Piyush, C. and Ramesh, C. K. 2016. Improvement of microbial α -amylase stability: strategic approaches. *Process Biochem.* **51** (10): 1380-1390.
- Duff, S. J. B. and William, D. M. 1996. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A Review. *Bioresour. Technol.* **55**: 1-33.
- Ejaz, U., Sohail, M. and Ghanemi, A. 2021. Cellulases: from bioactivity to a variety of industrial applications. *Biomimetics*. **6** (3): 44.
- Fang, W. and Latgé, J. P. 2018. Microbe profile: *Aspergillus fumigatus*: a saprotrophic and opportunistic fungal pathogen. *J. Microbiol.* **164** (8): 1009.
- Far, B. E., Ahmadi, Y., Khosroshahi, A. Y. and Dilmaghani, A. 2020. Microbial alpha-amylase production: progress, challenges and perspectives. *Adv. Pharm. Bull.* **10** (3): 350.
- Farooq, M. A., Ali, S., Hassan, A., Tahir, H. M., Mumtaz, S. and Mumtaz, S. 2021. Biosynthesis and industrial applications of α -amylase: a review. *Arch.*

Microbiol. **203** (4): 1281–1292.

- Febriyanti, A. D. 2019. Penentuan Kestabilan Enzim α -Amilase dari *Aspergillus fumigatus* dengan Modifikasi Kimia Menggunakan Sitratkonat Anhidrida. *Skripsi*. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- 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. L. G., Getas, I. W. dan Jannah, M. 2019. Studi jamur *Aspergillus fumigatus* penyebab aspergillosis di pasar Cakranegara kota Mataram dengan media pertumbuhan potato dextrose agar (PDA). *JAMBS*. **6** (1): 81-88.
- Gonçalves, P., Melo, A., Dias, M. and Almeida, B. 2020. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* harboring the tr34/l98h mutation: First report in Portugal in environmental samples. *Microorganisms*. **9** (1): 2-10.
- Grand View Research. 2020. *Industrial Enzymes Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Carbohydrases, Proteases, Lipases, Polymerases & Nucleases), By Source, By Application, By Region, And Segment Forecasts, 2020 - 2027*. www.grandviewresearch.com.
<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/industrial-enzymes-market/methodology>. Diakses pada tanggal 4 Januari 2022 Pukul 22.03 WIB.
- Gunnoo, S. B. and Madder, A. 2016. Chemical protein modification through cysteine. *Chem. Eur. J.* **17** (7): 529-553.
- 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 termotabil dari Bakteri *Bacillus stearotheophilus* RP1. *Seminar Nasional MIPA*. Departemen Kimia, IPB. Bogor.
- Kamon, M., Sumitani, J. I., Tani, S. and Kawaguchi, T. 2015. Characterization and gene cloning of a maltotriose-forming exo-amylase from *Kitasatospora* sp. MK-1785. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99** (11): 4743–4753.
- Kartika, I. N. dan Ibrahim, M. 2021. Efek manipulasi pH pada aktivitas enzim selulase bakteri *Bacillus subtilis* strain FNCC 0059 dalam mendegradasi selulosa. *J. LenteraBio*. **10** (1): 51–57.
- 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. Micro. Biotech.* **48** : 191-197.
- Khajeh, K., Habibi, A. E. and Nemat-Gorgani, M. 2004. Chemical modification of lysine residues in *Bacillus licheniformis* α -amylase: Conversion of an endo- to an exo-type enzyme. *J. Biochem. Mol. Biol.* **37** (6): 642-647.

- Khalid-Bin-Ferdaus, K. M., Hossain, M. F., Mansur, S. A., Sajib, S. A., Miah, M. M., Hoque, K. M. F. and Reza, M. A. 2018. Commercial production of alpha amylase enzyme for potential use in the textile industries in Bangladesh. *In. J. Biosci.* **13** (4): 149-157.
- Lehninger, A. L. 2005. *Principles of Biochemistry: Fourth Edition*. W. H. Freeman and Company. New York.
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M. and Wang, X. 2012. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2** (3): 1-11.
- 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.
- Maier, R., Ian L. P. and Charles, P. G. 2000. *Environmental Microbiology*. Academic Press. London.
- Mandels, M., Andreotti, R. and Roche, C. 1976. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotech and Bioeng. Symp.* **6**. John Wiley and Sons Inc.
- Markets and Markets. 2020. *Enzymes Market by Product Type (Industrial enzymes and Specialty enzymes), Source (Microorganism, Plant, and Animal), Type, Industrial Enzyme Application, Specialty Enzymes Application, and Region – Global Forecast to 2025*. URL <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/enzyme-market-46202020.html?gclid=Cj0KCQjwsYb0BRCOARIsAHbLPhGGcAgJg9fONM2wlgHvnHDjMYSWU>. Diakses pada tanggal 4 Januari 2022 Pukul 22.30 WIB.
- Mishra, S. and Behera, N. 2010. Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil receiving kitchen wastes. *Afr. J. Biotechnol.* **7** (18): 3326–3331.
- Mozhaev, V. V. M., Melik-Nubarov, N. S., Šikšnis, V. and Martinek, K. 1990. Strategy for stabilizing enzymes. Part two: Increasing enzyme stability by selective chemical modification. *Biocatalysis.* **3** (3): 189-196.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A. and Rodwell, V. W. 1999. *Biokimia Harper* (terj.). edisi ke-24. Penerbit Buku Kedokteran, E.G.C. Jakarta.
- Nababan, M., Gunam, I. B. W. dan Wijaya, I. M. M. 2019. Produksi enzim selulase kasar dari bakteri selulolitik. *J. Rekayasa Manaj. Agroindustri.* **7** (2): 190-199.
- Nwagu, T. N., Aoyagi, H., Okolo, B., Moneke, A. and Yoshida, S. 2020. Citraconylation and maleylation on the catalytic and thermodynamic properties of raw starch saccharifying amylase from *Aspergillus carbonarius*. *Heliyon.* **6** (7): 1-9.

- Offen, W. A., Viksoe-Nielsen, A., Borchert, T. V., Wilson, K. S. and Davies, G. J. 2015. Three-dimensional structure of a variant Termamyl-like *Geobacillus stearothermophilus* α -amylase at 1.9 Å resolution. *Acta Crystallogr. F: Struct. Biol. Commun.* **71** (1): 66-70.
- Paul, J. S., Gupta, N., Beliya, E., Tiwari, S. and Jadhav, S. K. 2021. Aspects and recent trends in microbial α -Amylase: a review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **193** (8): 2649–2698.
- Pelczar, M. J. dan Chan, E. C. S. 2007. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. UI Press. Jakarta.
- Poedjiaji, A dan Supriyanti, T. 2006. *Dasar-Dasar Biokimia*. UI Press. Jakarta.
- Pothiraj, C., Balaji, P. and Eyini, M. 2006. Raw starch degrading amylase production by various fungal cultures grown on cassava waste. *Mycobiology*. **34** (3): 128-130.
- Pratiwi, S. T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Erlangga. Yogyakarta.
- Rafiee, F. and Rezaee, M. 2021. Different strategies for the lipase immobilization on the chitosan based supports and their applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **179**: 170–195.
- Silva, C., Martins, M., Jing, S., Fu, J. and Cavaco-Paulo, A. 2018. Practical insights on enzyme stabilization. *Crit. Rev. Biotechnol.* **38** (3): 335-350.
- Sinatari, H. M. 2013. Pemurnian selulase dari isolat Kb kompos termofilik desa Bayat Klaten menggunakan fraksinasi amonium sulfat. *J. Chem. Inf.* **1** (1): 130-140.
- Suhartono, M. T. 1992. *Protease*. IPB Press. Bogor.
- Sundarram, A. and Murthy, T. P. K. 2014. α -Amylase production and applications: a review. *Appl. Environ. Microbiol.* **2** (4): 166-175.
- Tarhriz, V., Mohammadzadeh, F., Hejazi, M. S., Nematzadeh, G. and Rahimi, E. 2011. Isolation and characterization of some aquatic bacteria from Qurugöl lake in Azerbaijan under aerobic conditions. *Adv. Environ. Biol.* **5** (10): 3173-3178.
- Tiarsa, E. R. 2022. Studi Komparatif: Peningkatan Kestabilan Enzim α -Amilase dari *Aspergillus fumigatus* Menggunakan Metode Amobilisasi pada Material Kitin, Bentonit, dan Hibrida Kitin-Bentonit. *Tesis*. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Verdasco-Martín, C. M., Villalba, M., dos Santos, J. C., Tobajas, M., Fernandez-Lafuente, R. and Otero, C. 2016. Effect of chemical modification of Novozym 435 on its performance in the alcoholysis of camelina oil. *Biochem. Eng. J.* **111**: 75-86.

- Viridianingsih, R. 2002. Mempelajari Stabilitas Termal dari *Bacillus pumilus* y1 dalam Pelarut Heksana, Toluena, dan Benzena. *Skripsi*. IPB. Bogor.
- Voet, D. and Voet, J. G. 2004. *Biochemistry 3rd Edition*. Wiley JOHN WILEY & SONS, INC. 139.
- Walsh, G. and D.R. Headon. 1994. *Protein Biotechnology*. John Willey and Sons. New York.
- Wirahadikusumah, M. 2001. *Biokimia: Protein, Enzim dan Asam Nukleat*. ITB Press. Bandung.
- Yandri dan Suhartati, T. 2018. *Peningkatan Kestabilan Enzim*. CV. Anugrah Utama Raharja. Bandar Lampung.
- 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.
- 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.
- Yandri, Y., Sundari, E. S., Suhartati, T. and Hadi, S. 2012. The chemical modification of α -amylase from locale bacteria of *Bacillus subtilis* ITBCCB148 using citraconic anhydride. *OJC.* **28** (4): 1613-1618.