

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

(Skripsi)

Oleh

Eka Candra Wati



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

ABSTRAK

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

Oleh

EKA CANDRA WATI

Enzim banyak digunakan dalam kegiatan industri, namun untuk industri di Indonesia kebutuhan enzim belum dapat terpenuhi sehingga harus mengimpor enzim. Salah satu enzim yang memiliki peran penting ialah enzim α -amilase. Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan kestabilan enzim α -amilase dari *A. fumigatus* dengan cara penambahan polietilen glikol (PEG) 6000. Tahapan penelitian yang dilakukan yaitu: produksi, isolasi, pemurnian, dan karakterisasi. Aktivitas enzim α -amilase ditentukan menggunakan metode Fuwa dan Mandels, serta kadar protein ditentukan dengan metode Lowry. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas spesifik enzim hasil pemurnian sebesar 753,83 U/mg yang mengalami peningkatan kemurnian 15 kali dibandingkan dengan ekstrak kasarnya 51,97 U/mg. Enzim hasil pemurnian mempunyai suhu optimum 50°C dan pH optimum 5; uji stabilitas termal pada suhu 50°C mempunyai nilai $k_i = 0,0389 \pm 0,0001 \text{ menit}^{-1}$; $t_{1/2} = 17,42 \pm 0,06 \text{ menit}$; $\Delta G_i = 102,136 \pm 0,003 \text{ kJ mol}^{-1}$. Enzim setelah penambahan PEG 6000 konsentrasi 20, 25, dan 30% memiliki suhu optimum 55°C dan pH optimum 6; uji stabilitas termal enzim setelah penambahan PEG 6000 konsentrasi 20, 25, dan 30% pada suhu 55°C mempunyai nilai $k_i = 0,0058 \pm 0,0000$; $0,0076 \pm 0,0001$; dan $0,0077 \pm 0,0001 \text{ menit}^{-1}$; $t_{1/2} = 119,51 \pm 0,00$; $90,61 \pm 0,84$; dan $90,03 \pm 1,65 \text{ menit}$; dan nilai $\Delta G_i = 107,468 \pm 0,00$; $106,702 \pm 0,01$; dan $106,684 \pm 0,02 \text{ kJ mol}^{-1}$. Penambahan PEG 6000 dapat meningkatkan kestabilan enzim α -amilase dari *A. fumigatus* $6,86 \pm 0,02$ kali dibandingkan enzim hasil pemurnian, ditunjukkan dengan terjadinya penurunan nilai k_i , peningkatan $t_{1/2}$ dan ΔG_i dari enzim setelah penambahan PEG 6000.

Kata kunci: α -amilase, PEG 6000, kestabilan enzim, dan *A. fumigatus*

ABSTRACT

INCREASED STABILITY OF α -AMYLASE FROM *Aspergillus fumigatus* WITH ADDITION OF POLYETHYLENE GLICOL (PEG) 6000

By

EKA CANDRA WATI

Enzymes are widely used in industrial activities, but for industry in Indonesia the need for enzymes can't be fulfilled, so they have to import enzymes. One of the enzymes that have an important role is the α -amylase. This study aims to increase the stability of the α -amylase enzyme from *A. fumigatus* by adding polyethylene glycol (PEG) 6000. The stages of the research carried out were the production, isolation, purification, and characterization. The α -amylase enzyme activity was evaluated using the Fuwa and Mandels method, and the protein content was evaluated using the Lowry method. The results of the research showed the specific activity of the purified enzyme was 753.83 U/mg which increased 15 times in purity compared to the crude extract, which was 51.97 U/mg. The purified enzyme has an optimum temperature of 50°C and an optimum pH of 5, test the thermal stability at 50°C has a value of $k_i = 0.0389 \text{ min}^{-1} \pm 0.0001$; $t_{1/2} = 17.42 \pm 0.06 \text{ min}$; $\Delta G_i = 102.136 \pm 0.003 \text{ kJ mole}^{-1}$. Enzymes after the addition of PEG 6000 concentration of 20, 25, and 30% have an optimum temperature of 55°C and optimum pH of 6; test the thermal stability of the enzyme after addition of PEG 6000 concentration of 20, 25, and 30% at 55°C has a value of $k_i = 0.0058 \pm 0.0000$; 0.0076 ± 0.0001 ; and $0.0077 \pm 0.0001 \text{ min}^{-1}$; $t_{1/2} = 119.51 \pm 0.00$; 90.61 ± 0.84 ; and $90.03 \pm 1.65 \text{ min}$; and value $\Delta G_i = 107.468 \pm 0.00$; 106.702 ± 0.01 ; and $106.684 \pm 0.02 \text{ kJ mol}^{-1}$. The addition of PEG 6000 was able to increase the stability of the α -amylase from *A. fumigatus* 6.86 ± 0.02 times compared to the purified enzymes, indicated by a decrease in the k_i value, an increase in the $t_{1/2}$ and ΔG_i of the enzyme after the addition of PEG 6000.

Keywords: α -amylase, PEG 6000, enzyme stability, and *A. fumigatus*

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

Oleh
Eka Candra Wati

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 Penelitian : **PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM
 α -AMILASE DARI *Aspergillus fumigatus*
DENGAN PENAMBAHAN POLIETILEN
GLIKOL (PEG) 6000**

Nama Mahasiswa : **Eka Candra Wati**

Nomor Pokok Mahasiswa : **1817011021**

Jurusan : **Kimia**

Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**

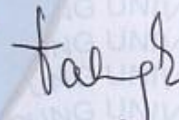


MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

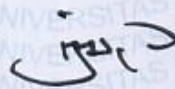


Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S.
NIP. 195609051992031001



Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S.
NIP. 195405101988032001

2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA



Mulyono, Ph.D.
NIP. 197406112000031002

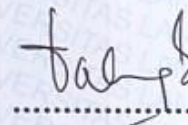
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

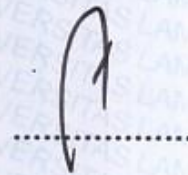
Ketua : **Prof. Dr. Ir. Yandri, A.S., M.S.**



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



Anggota : **Dra. Aspita Laila., M.S.**



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Suripto Dwi Yuwono, M.T.
NIP. 197407052000031001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **5 Desember 2022**

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Eka Candra Wati
Nomor Pokok Mahasiswa : 1817011021
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan bahwa skripsi yang berjudul **“Peningkatan Kestabilan Enzim α -Amilase dari *Aspergillus fumigatus* dengan Penambahan Polietilen Glikol (PEG) 6000”** adalah benar hasil karya sendiri dan tidak pernah digunakan dan diterima sebagai syarat penyelesaian studi pada universitas lain. Saya tidak keberatan jika data dalam skripsi ini digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya disebutkan dan terdapat kesepakatan sebelum dilakukan publikasi.

Bandar Lampung, 10 November 2022

Yang Menyatakan,




Eka Candra Wati
NPM.1817011021

RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Bandar Lampung, pada tanggal 16 September 2000. Anak pertama dari dua bersaudara, putri dari pasangan Bapak P. Subagiyo dan Ibu Suhariyati. Penulis mengawali pendidikan Sekolah Dasar di SD Negeri 1 Sepang Jaya diselesaikan pada tahun 2012, kemudian melanjutkan pendidikan Sekolah Menengah Pertama di SMP Negeri 20

Bandar Lampung diselesaikan pada tahun 2015, dan melanjutkan Sekolah Menengah Atas di SMA Negeri 5 Bandar Lampung diselesaikan pada tahun 2018. Pada tahun 2018, penulis terdaftar sebagai Mahasiswa Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung melalui jalur SNMPTN yang diselesaikan pada tahun 2022.

Selama menempuh pendidikan di perguruan tinggi, penulis pernah bergabung dalam organisasi kemahasiswaan, sebagai Kader Muda Himpunan Mahasiswa Kimia (KAMI) periode 2018, dan selanjutnya menjadi anggota Bidang Sains dan Penalaran Ilmu Kimia Himpunan Mahasiswa Kimia pada periode 2019 dan 2020. Pada tahun 2021 penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) pada bulan Februari-Maret 2021 di Desa Sepang Jaya, Kecamatan Labuhan Ratu, Bandar Lampung. Pada tahun 2021 penulis menyelesaikan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Laboratorium Biokimia, Universitas Lampung dengan Judul “Penentuan Kondisi Optimum *Aspergillus fumigatus* Untuk Menghasilkan Enzim Selulase dengan Media Sekam Padi”. Penulis pernah menjadi koordinator Lomba Karya Tulis Ilmiah Nasional (LKTIN) yang diadakan Himpunan Mahasiswa Kimia pada tahun 2021 dan menjadi asisten Praktikum Biokimia untuk mahasiswa S1 Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung pada tahun 2022

MOTTO

“Maka sesungguhnya bersama kesulitan itu ada kemudahan. Sesungguhnya bersama kesulitan itu ada kemudahan”

(QS. Al-Insyirah : 5-6)

“Wahai orang-orang yang beriman, mohonlah pertolongan (kepada Allah) dengan sabar dan salat. Sungguh, Allah bersama orang-orang yang sabar”

(QS. Al-Baqarah : 153)

“Orang pintar mau belajar dari apa saja dan siapa saja, orang standar hanya akan mau belajar dari pengalamannya masing-masing, orang bodoh tidak mau belajar dari semuanya karena merasa sudah memiliki semua jawaban”

(Sherly Annavita)

“Berusahalah, jangan takut dengan hal buruk yang belum tentu terjadi, insyaallah dapat hasil terbaik”

(Ibu)

“Percayalah pada keyakinan dan dirimu sendiri. Reward yourself and do what you can do”

(Penulis)

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

“Dengan menyebut nama Allah yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang”

Dengan segala rasa syukur, kupersembahkan karya ini kepada:

Kedua orangtuaku,

Bapak dan Ibu hebat yaitu P. Subagiyo dan Suhariyati yang membimbing penulis hingga sampai pada tahap ini. Terima kasih banyak atas semua doa, dukungan, perjuangan, pengorbanan, keringat, dan kasih sayang yang selalu diberikan untukku. Semoga sebuah tulisan kecil ini dapat memberikan sedikit kebanggaan di hati kalian. Selalu sehat dan terus bahagia adalah doa yang selalu kuminta untuk kedua orangtuaku.

Saudaraku,

Adikku Duwi Julia yang selalu memberikan semangat, perhatian dan juga pengertiannya untukku, terima kasih. Semoga kamu bisa menjadi kebanggaan lainnya bagi orangtua kita.

Dengan rasa hormat,

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

Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S., Dra. Aspita Laila, M.S., serta para dosen dan guruku atas segala ilmu dan bimbingan yang diberikan padaku.

*Almamater yang ku banggakan
Universitas Lampung*

SANWACANA

Puji syukur saya haturkan kepada Allah SWT. atas nikmat dan juga karunia-Nya hingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Peningkatan Kestabilan Enzim α -Amilase dari *Aspergillus fumigatus* dengan Penambahan Polietilen Glikol (PEG) 6000”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains di Universitas Lampung.

Dalam penyusunan skripsi ini tentunya tidak lepas dari kesulitan dan hambatan namun semua hal itu dapat dilalui penulis berkat ridho dari Allah SWT serta bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini dengan segala hormat dan ketulusan, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak dan Ibuku tercinta, terima kasih atas doa yang selalu diucapkan untukku, kepercayaan, dukungan dan kasih sayang selalu diberikan kepadaku. Selalu berusaha untuk mencukupi kebutuhanku yang mungkin harus mengorbankan hal yang kalian miliki. Ibuku yang hebat, selalu mendengarkan keluh kesahku, memberikan semangat dan selalu menasehatiku saat diriku takut dan pesimis. Bapakku yang selalu memberikan pembelajaran untukku. Inilah bukti dari didikan kalian selama ini, salah satu mimpi kalian *alhamdulillah* sudah berhasil terwujud. Terima kasih telah menjadi orangtuaku, maafkan putrimu yang belum bisa memberikan hal lebih besar untuk membanggakan kalian dan masih menjadi beban bagi bapak-ibu. Ya Allah, ampunilah aku dan kedua orangtuaku, sayangilah mereka, berikanlah kesehatan dan kebahagiaan dunia-akhirat kepada kedua orangtuaku. Aamiin.
2. Dosen Pembimbing Akademik sekaligus Pembimbing I penelitianku terima kasih kepada Prof. Dr. Ir. Yandri, A.S., M.S. atas waktu yang telah diluangkan selama ini untuk selalu mengawasi *progress* dari penelitian ini, terima kasih untuk semua arahan, bimbingan, ilmu, bantuan, dan kesabaran yang Bapak berikan kepada penulis dari awal perkuliahan hingga penulis menyelesaikan

pendidikan S1 di Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung. Semoga Allah senantiasa membalas kebaikan Bapak.

3. Dosen Pembimbing II, Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S. terima kasih kepada Ibu atas semua bimbingan, saran, nasihat, ilmu, koreksi, dan kesabaran kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Semoga Allah selalu membalas setiap kebaikan Ibu.
4. Dosen Pembahas, Dra. Aspita Laila, M.S. terima kasih kepada Ibu atas waktu yang telah diluangkan, saran, nasihat, dan arahan kepada penulis sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi ini. Semoga Allah selalu membalas setiap kebaikan Ibu.
5. Bapak Mulyono, Ph.D. selaku ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.
6. Bapak Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T. selaku dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.
7. Bapak dan Ibu dosen Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung yang telah memberikan ilmu, motivasi, dan saran kepada penulis selama menjadi mahasiswa.
8. Seluruh karyawan, laboran, dan admin Jurusan Kimia FMIPA Unila atas pelayanan dan bantuannya selama perkuliahan dan penelitian kepada penulis.
9. Keluarga besar dari Ayah maupun Ibu yang turut memberikan dukungan dan selalu mendoakan penulis.
10. Teman-teman penelitian PY'18, Dwi Noviani, Lupia Widya Astuti dan Lily Nur Safitri. Terima kasih untuk semangat, motivasi, dan kebesamaannya. Bekerja sama dengan kalian menjadi suatu kenangan yang sangat berkesan bagi penulis.
11. Kakak-kakak seperbimbingan PY'17, Kak Najma Firdausi, S.Si., Kak Noura Lydia Utami, S.Si. dan Kak Mega Yestikasari, S.Si. terima kasih untuk ilmu, waktu, motivasi, dan saran yang telah diberikan kepada penulis.
12. Kakak tingkat sekaligus mentor penelitianku, Kak Hendri Ropingi, S.Si. dan Kak Ezra Rheinsky Tiarsa, M.Si. terima kasih untuk semua waktu yang sudah diluangkan untuk menanggapi penulis, arahan, dukungan, semangat, motivasi, ilmu, kritik, saran, candaan, dan pengalaman yang dibagikan kepada penulis.

Terima kasih kakak untuk semuanya, sukses selalu, semoga diberi kemudahan dan kelancaran untuk rencana baik kedepannya. Aamiin.

13. Adik tingkat PY'19, terima kasih telah mendoakan, dan menambah pertemanan bagi penulis.
14. Sahabat-sahabatku Editanyisa yang selalu mendoakan, mendukung, menyemangati dan perhatian kepada penulis. Terus semangat untuk mewujudkan mimpi kita *guys*.
15. Teman-temanku, Tania, Farah, Acha, Anggun, Armidla, Noni, Atika, Zhafira Allia Zahra, S.Si., Ninid, Jilda Sofiana Dewi, S.Si., Wulandari, Yesi Nirmala, dan Dian Sastra yang selalu membantu, memotivasi, mendukung, mendoakan, menyemangati, berbagi cerita, dan candaan kepada penulis.
16. Teman-teman KKN Kelurahan Sepang Jaya, Evi, Aflaha, Fahmi, Ridho, kak Arief, dan Rasyid atas dukungan, doa dan semangat yang selalu diberikan kepada penulis.
17. Kakak-kakak dan teman-teman di Laboratorium Biokimia, terimakasih atas semangat, keceriaan, bantuan, dan kerja sama selama penulis melakukan penelitian.
18. Teman-teman Kimia kelas A dan angkatan 2018 yang tidak dapat dituliskan satu persatu, terimakasih atas semangat, kenangan, bantuan, dan kebersamaanya selama perkuliahan dan penelitian.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih terlalu jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, penulis memohon maaf atas segala kekurangan dalam skripsi ini, dan semoga dapat bermanfaat bagi pembaca.

Bandar Lampung, 23 November 2022
Penulis,

Eka Candra Wati

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. Klasifikasi Enzim.....	4
2.1.2. Mekanisme Reaksi Enzim.....	6
2.1.3. Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim.....	7
2.1.4. Kinetika Reaksi Enzim	9
2.1.5. Stabilitas Enzim	10
2.2. Enzim Amilase	11
2.3. Isolasi dan Pemurnian Enzim.....	13
2.4. Uji Aktivitas Enzim α -Amilase.....	14
2.5. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry	14
2.6. <i>A. fumigatus</i>	15
2.7. Polietilen glikol 6000	16
III. METODE PENELITIAN	18
3.1. Waktu dan Tempat	18
3.2. Alat dan Bahan.....	18
3.3. Prosedur Kerja	19
3.3.1. Pembiakan Isolat <i>A. fumigatus</i>	19
3.3.2. Pembuatan Media Inokulum dan Fermentasi, Inokulasi <i>A. fumigatus</i> dan Produksi Enzim α -Amilase	19
3.3.3. Isolasi Enzim α -Amilase	20
3.3.4. Pemurnian Enzim α -Amilase.....	20
3.3.5. Uji Aktivitas Enzim α -Amilase dan Penentuan Kadar Protein	22
3.3.6. Penambahan Polietilen Glikol (PEG) 6000	24

3.3.7. Karakterisasi Enzim α -Amilase	24
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	27
4.1. Pemiakan Isolat <i>A. fumigatus</i>	27
4.2. Produksi dan Isolasi Enzim α -Amilase	27
4.3. Pemurnian Enzim α -Amilase	28
4.3.1. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	28
4.3.2. Dialisis	29
4.4. Karakterisasi Enzim α -Amilase Sebelum dan Setelah Penambahan Polietilen Glikol 6000 dengan Variasi Konsentrasi 20, 25, dan 30%	31
4.4.1. Penentuan Suhu Optimum	31
4.4.2. Penentuan pH Optimum	32
4.4.3. Penentuan K_M dan V_{maks}	33
4.4.4. Penentuan Stabilitas Termal	35
4.4.5. Perubahan Laju Inaktivasi Termal (k_i), Waktu Paruh ($t_{1/2}$), dan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i)	36
V. SIMPULAN DAN SARAN	40
5.1. Simpulan	40
5.2. Saran	41
DAFTAR PUSTAKA	42
LAMPIRAN	47

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Pemurnian enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	30
2. Nilai K_M dan V_{maks} enzim sebelum dan setelah penambahan PEG 6000 dengan konsentrasi 20, 25, dan 30%.....	34
3. Perubahan konstanta laju inaktivasi termal (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim sebelum dan setelah penambahan PEG 6000 konsentrasi 20, 25, dan 30%.....	37
4. Hubungan antara berbagai tingkat kejenuhan amonium sulfat pada beberapa fraksi dengan aktivitas enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	48
5. Hubungan antara tingkat kejenuhan amonium sulfat pada fraksi 0-15% dan 15-90% dengan aktivitas enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	48
6. Hubungan antara suhu optimum terhadap aktivitas unit (U/mL) enzim α -amilase hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan PEG konsentrasi 20, 25, dan 30%.....	49
7. Hubungan antara suhu optimum terhadap aktivitas sisa (%) enzim α -amilase hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan PEG konsentrasi 20, 25, dan 30%.....	49
8. Hubungan antara pH optimum terhadap aktivitas unit (U/mL) enzim α -amilase hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan PEG konsentrasi 20, 25, dan 30%.....	50
9. Hubungan antara pH optimum terhadap aktivitas sisa (%) enzim α -amilase hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan PEG konsentrasi 20, 25, dan 30%.....	50
10. Data untuk penentuan K_M dan V_{maks} enzim α -amilase hasil pemurnian berdasarkan persamaan Lineweaver-Burk.....	51
11. Data untuk penentuan K_M dan V_{maks} enzim α -amilase hasil penambahan PEG 6000 konsentrasi 20, 25, dan 30% berdasarkan persamaan Lineweaver-Burk.....	51

12.	Hubungan antara stabilitas termal terhadap aktivitas unit (U/mL) enzim α -amilase hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan PEG konsentrasi 20, 25, dan 30%.....	52
13.	Hubungan antara stabilitas termal terhadap aktivitas sisa (%) enzim α -amilase hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan PEG konsentrasi 20, 25, dan 30%.....	52
14.	Penentuan k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim α -amilase hasil pemurnian pada suhu 50°C.....	53
15.	Penentuan k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim α -amilase hasil penambahan PEG 6000 konsentrasi 20, 25, dan 30% pada suhu 55°C.....	53
16.	Absorbansi glukosa pada berbagai konsentrasi.....	55
17.	Absorbansi BSA pada berbagai konsentrasi.....	57

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Teori gembok kunci.....	6
2. Teori induksi.....	7
3. Hubungan antara pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim.....	7
4. Hubungan antara pengaruh pH terhadap aktivitas enzim.....	8
5. Hubungan antara laju reaksi dengan konsentrasi enzim.....	8
6. Kurva Lineweaver-Bruk.....	10
7. Struktur polietilen glikol.....	16
8. Skema fraksinasi enzim dengan amonium sulfat.....	21
9. Diagram alir penelitian.....	26
10. Hubungan antara tingkat kejenuhan amonium sulfat (%) terhadap aktivitas spesifik (U/mg) enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	29
11. Hubungan antara suhu optimum terhadap aktivitas sisa (%) enzim hasil pemurnian dan hasil penambahan PEG 20, 25, dan 30%.....	31
12. Hubungan antara pH optimum terhadap aktivitas sisa (%) enzim hasil pemurnian dan hasil penambahan PEG 6000 20, 25, dan 30%.....	32
13. Grafik Lineweaver-Burk enzim hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan PEG 6000 20, 25, dan 30%.....	33
14. Hubungan antara stabilitas termal terhadap aktivitas sisa (%) enzim hasil pemurnian dan penambahan PEG 6000 20, 25, dan 30%.....	35
15. Hubungan $\ln (E_i/E_o)$ enzim α -amilase sebelum dan setelah penambahan PEG 6000 konsentrasi 20, 25, dan 30% untuk penentuan k_i , $t_{1/2}$, dan ΔG_i	36
16. Kurva standar glukosa.....	55
17. Kurva standar BSA.....	57

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Aktivitas enzim pada berbagai tingkat kejenuhan amonium sulfat	48
2. Aktivitas unit dan aktivitas sisa enzim berbagai variasi suhu	49
3. Aktivitas unit dan aktivitas sisa enzim berbagai variasi pH	50
4. Data untuk penentuan K_M dan V_{maks}	51
5. Aktivitas unit dan aktivitas sisa enzim penentuan stabilitas termal	52
6. Penentuan konstanta laju inaktivasi termal enzim	53
7. Contoh perhitungan ΔG_i dan perhitungan $t_{1/2}$ enzim	54
8. Kurva standar glukosa	55
9. Persamaan untuk menghitung aktivitas unit metode Mandels	56
10. Kurva standar BSA	57
11. Persamaan untuk menghitung kadar protein metode Lowry	58

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Enzim telah banyak digunakan dalam proses produksi di bidang industri pangan, farmasi, dan industri kimia. Penggunaan enzim dalam proses produksi dapat meningkatkan efisiensi yang kemudian meningkatkan jumlah produksi (Haedar dkk., 2017). Namun, kebutuhan enzim di Indonesia masih belum dapat terpenuhi dengan baik sehingga Indonesia masih harus mengimpor enzim (Naiola, 2002). Hal tersebut menyebabkan peneliti lebih meningkatkan kemajuan dalam bidang teknologi, salah satunya dengan memanfaatkan peran mikroorganisme dalam bidang industri (Isti'annah *et al.*, 2020).

Enzim amilase ialah salah satu enzim yang berperan di industri. Amilase merupakan enzim ekstraseluler yang mendegradasi ikatan 1,4- glikosidik pada polimer pati menjadi glukosa. Enzim amilase banyak dibutuhkan pada proses hidrolisis pati, pembuatan makanan (bir, roti, sirup, pemanis buatan, industri pakan ternak), produksi etanol, detergen, obat, dan suplemen enzim (Soeka dkk., 2015). Enzim amilase dibedakan menjadi tiga, yaitu: α -amilase, β -amilase, dan γ -amilase (Ramadhan *et al.*, 2021). Enzim amilase dihasilkan oleh semua makhluk hidup untuk mengkatalis reaksi biokimia, sehingga reaksi-reaksi tersebut dapat berlangsung lebih cepat.

Enzim α -amilas memutus ikatan glikosidik pada pati, glikogen, dan oligosakarida menghasilkan dekstrin, maltosa, dan D-glukosa (Ariandi, 2016). Enzim α -amilase diperoleh dari berbagai mikroorganisme seperti kapang, bakteri, dan khamir atau bahkan dari tumbuhan. Selain itu, mikroorganisme dapat dikultur untuk memperoleh enzim yang diinginkan (Ningsih dkk., 2012; Soeka dkk., 2015).

Sumber fungi untuk memproduksi enzim α -amilase sebagian besar bersumber dari mikroorganisme, fungi *Aspergillus sp.* menjadi salah satunya. *Aspergillus fumigatus* dipilih sebagai penghasil enzim α -amilase karena dapat beradaptasi dengan berbagai senyawa organik untuk proses metabolismenya dan tidak membutuhkan nutrisi yang khusus (Veerdonk *et al.*, 2017).

Penggunaan enzim pada aplikasinya dalam industri terhambat oleh beberapa faktor antara lain biaya yang tinggi, tidak stabil pada kondisi ekstrim, dan hanya dapat digunakan sekali pakai (Sarrouh *et al.*, 2012). Untuk memenuhi kebutuhan industri terhadap enzim yang stabil pada kondisi ekstrim dapat dilakukan peningkatan stabilitas enzim. Penambahan zat aditif merupakan salah satu cara yang dapat dipilih untuk meningkatkan kestabilan enzim, karena relatif mudah dilakukan dan biaya tidak mahal. Beberapa jenis zat aditif yang dapat digunakan untuk meningkatkan kestabilan enzim diantaranya sorbitol, xilitol, PEG 6000, gliserol, sukrosa, dan beberapa jenis poliol lainnya (Yandri dkk., 2020). Polietilen glikol (PEG) 6000 merupakan salah satu zat aditif yang dapat digunakan untuk mencegah enzim berikatan dengan air dan terbentuknya ikatan antara rantai panjang pada PEG dengan rantai samping pada enzim akibatnya ikatan tersebut menghasilkan struktur enzim yang lebih kaku, sehingga lebih tahan terhadap perubahan konformasi (Yandri *et al.*, 2011).

Pada penelitian Assegaf (2017), telah dilakukan penambahan PEG 6000 pada enzim α -amilase dari *Rhizopus oligosporus* dan hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa enzim α -amilase hasil pemurnian dengan penambahan PEG 6000 meningkat kestabilannya sebanyak 1,24 kali dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Enzim hasil pemurnian dan penambahan PEG 6000 optimum pada pH 6,5 dan optimum pada suhu 55°C. Waktu paruh dan ΔG_i enzim hasil pemurnian yaitu 70 menit dan 104,35 kJ mol⁻¹. Setelah penambahan PEG 6000 waktu paruh meningkat menjadi 86,6 menit dan ΔG_i sebesar 104,93 kJ mol⁻¹. Selain itu, nilai k_i enzim hasil pemurnian sebesar 0,0099 menit⁻¹ menjadi 0,0080 menit⁻¹ setelah penambahan PEG 6000. Menurut Yandri *et al.*, (2008), terjadinya peningkatan waktu paruh dan ΔG_i serta penurunan harga k_i dari enzim hasil penambahan zat aditif dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian menunjukkan

adanya peningkatan stabilitas enzim. Oleh karena itu, pada penelitian ini telah dilakukan penambahan PEG 6000 dengan konsentrasi berbeda pada enzim α -amilase dari *A. fumigatus* untuk memperoleh peningkatan stabilitas enzim.

1.2. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dilakukannya 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 penambahan zat aditif PEG 6000.

1.3. Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Enzim α -amilase dari *A. fumigatus* dengan kestabilan yang tinggi dapat digunakan untuk konversi enzimatik amilum menjadi glukosa secara optimal sehingga dapat diaplikasikan pada bidang industri.
- b. Memberikan informasi mengenai pengaruh penambahan zat aditif PEG 6000 terhadap kestabilan enzim α -amilase dari *A. fumigatus*.
- c. Memberikan informasi terkait nilai aktivitas, pH dan suhu optimum, K_M , V_{maks} , k_i , $t_{1/2}$, ΔG_i enzim hasil pemurnian dan penambahan PEG 6000.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Enzim

Enzim merupakan kelompok protein yang bersifat katalis dan mengatur perubahan senyawa kimia dalam sistem biologis. Enzim dapat dihasilkan oleh hewan, tumbuhan dan mikroorganisme. Secara katalitik, enzim menjalankan fungsinya dalam berbagai reaksi seperti hidrolisis, oksidasi, reduksi, isomerasi, adisi, transfer gugus, dan kadang-kadang pemutusan rantai karbon. Enzim telah banyak digunakan dalam berbagai proses kimiawi, baik dalam bidang industri maupun dalam bidang bioteknologi (Sumardjo, 2006).

Enzim merupakan biokatalisator yang banyak dimanfaatkan dalam dunia industri dan dapat bekerja pada reaksi-reaksi dalam proses konversi suatu senyawa menjadi senyawa lain tanpa menimbulkan senyawa-senyawa lain yang berbahaya dan dapat menyebabkan terjadinya pencemaran lingkungan. Enzim pada umumnya bekerja pada kondisi fisiologis, bekerja selektif dan spesifik, dan tidak membutuhkan energi yang tinggi (Li *et al.*, 2012). Enzim dari mikroorganisme lebih banyak digunakan dibandingkan dari tanaman atau hewan karena mikroorganisme dapat berkembangbiak dengan cepat, pertumbuhan relatif mudah diatur, enzim yang dihasilkan tinggi sehingga ekonomis bila digunakan untuk industri, dan enzim yang dihasilkan lebih stabil (Yusak, 2004).

2.1.1. Klasifikasi Enzim

Klasifikasi enzim dapat dibedakan sebagai berikut:

- a. Menurut Robinson (2015), berdasarkan tempat bekerjanya enzim dibedakan menjadi dua, yaitu:
 1. Enzim intraseluler, yaitu enzim yang diproduksi dan bekerja di dalam sel.
 2. Enzim ekstraseluler, yaitu enzim yang diproduksi di dalam sel tetapi bekerja di luar sel. Umumnya enzim pada penggunaan industri ialah protein

ekstraseluler baik itu dari jamur maupun bakteri, contohnya jenis *Aspergillus* dan *Bacillus*.

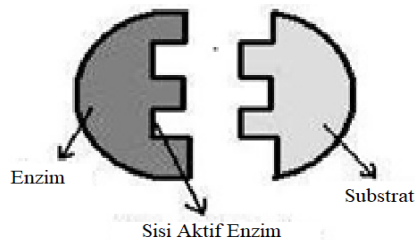
- b. Menurut Ngili (2009), berdasarkan spesifikasinya enzim dibedakan menjadi enam, yaitu:
1. Hidrolase, yaitu enzim yang mengkatalis reaksi hidrolisis substrat atau melakukan pemutusan ikatan antara karbon dengan atom-atom lainnya dengan adanya penambahan air.
 2. Ligase, yaitu enzim yang mengkatalis reaksi penggabungan dua molekul tertentu.
 3. Isomerase, yaitu enzim yang mengkatalis suatu reaksi perubahan konfigurasi molekul dengan cara pengaturan kembali atom-atom substrat sehingga dihasilkan molekul baru yang merupakan isomer dari substrat misalnya perubahan isomer posisi aldosa menjadi ketosa.
 4. Oksidoreduktase, yaitu enzim yang mengkatalis suatu reaksi reduksi oksidasi berupa pemindahan elektron, hidrogen atau oksigen.
 5. Transferase, yaitu enzim yang mengkatalis perpindahan gugus dari molekul satu ke molekul lainnya, misalnya gugus amino, metil, asil, karbonil, ataupun fosforil.
 6. Liase, yaitu enzim yang mengkatalis penambahan gugus fungsi dari suatu molekul tanpa melalui proses hidrolisis.
- c. Menurut Lehninger (2005), berdasarkan proses pembentukannya enzim dibedakan menjadi dua, yaitu:
1. Enzim konstitutif, yaitu enzim yang dihasilkan oleh sel namun jumlahnya dipengaruhi oleh jumlah substrat, contohnya enzim amilase.
 2. Enzim aditif, yaitu enzim yang dihasilkan oleh sel dengan adanya substrat tertentu yang memicu pembentukan enzim tersebut. Contohnya enzim β -galaktosidase yang dihasilkan oleh bakteri *E.coli* yang ditumbuhkan pada media yang mengandung laktosa.

2.1.2. Mekanisme Reaksi Enzim

Enzim mampu mempercepat suatu reaksi dengan cara membentuk suatu keadaan transisi terstabilisasi melalui pembentukan enzim kompleks enzim-substrat yang mempunyai aktivitas lebih rendah. Energi aktivasi adalah energi tertinggi yang harus dicapai agar suatu reaksi dapat terjadi. Apabila energi lebih rendah maka reaksi dapat berjalan lebih cepat. Menurut Shahib (2005), terdapat dua teori mengenai mekanisme kerja enzim, yaitu *lock and key theory* dan *induced fit theory*.

a. *Lock and Key Theory* (Teori Gembok dan Kunci)

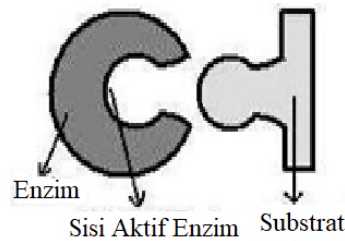
Substrat yang spesifik akan terikat pada area spesifik enzim yang disebut sebagai sisi aktif enzim. Substrat mempunyai daerah polar dan non polar pada sisi aktif yang baik bentuk maupun muatannya merupakan pasangan substrat. Hal ini terjadi karena adanya rantai peptida yang mengandung residu sehingga substrat berinteraksi dengan residu katalitik. Ketika katalisis berlangsung, produk masih terikat pada molekul enzim. Teori gembok kunci ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Teori gembok kunci (Shahib, 2005).

b. *Induced Fit Theory* (Teori Ketepatan Induksi)

Teori ini menerangkan bahwa sisi aktif enzim bersifat fleksibel. Bentuk sisi aktif enzim yang sebelumnya tidak sesuai dengan bentuk substrat, tetapi setelah substrat menempel pada sisi aktif, maka enzim akan terinduksi dan menyesuaikan bentuk dengan bentuk substrat. Teori induksi ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Teori induksi (Shahib, 2005).

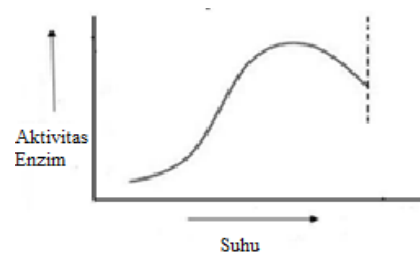
2.1.3. Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim

Kerja enzim dipengaruhi oleh berbagai faktor, yaitu:

a. Suhu

Suhu dapat meningkatkan laju reaksi enzimatik sampai batas tertentu.

Kecepatan suatu reaksi yang dikatalisis oleh enzim akan meningkat seiring dengan peningkatan suhu. Reaksi yang paling cepat akan terjadi pada suhu optimum (Rodwell, 2011). Suhu yang terlalu tinggi atau jauh dari suhu optimum suatu enzim akan mengakibatkan denaturasi enzim. Enzim mengalami denaturasi/ kerusakan struktur baik secara keseluruhan maupun sebagian terutama sisi aktifnya, hal ini mengakibatkan laju reaksi enzimatik menjadi menurun (Poedjiadi, 2006). Hubungan antara pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim ditunjukkan pada Gambar 3.

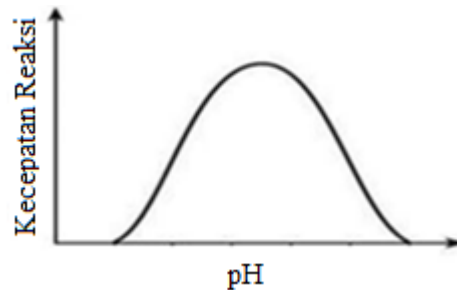


Gambar 3. Hubungan antara pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim (Rodwell, 2011).

b. pH

Perubahan pH lingkungan dapat mengakibatkan perubahan kereaktifan enzim (Winarno, 2002). Dalam suatu reaksi kimia, pH untuk suatu enzim tidak boleh terlalu asam atau terlalu basa karena dapat menurunkan kecepatan reaksi

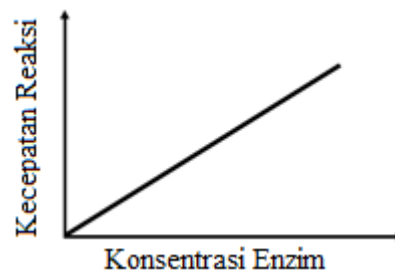
dengan terjadinya denaturasi. Enzim mampu bekerja pada kondisi pH tertentu, umumnya kisaran 4,5-8,0 enzim mempunyai kestabilan yang tinggi. Hubungan antara pengaruh pH terhadap aktivitas enzim ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Hubungan antara pengaruh pH terhadap aktivitas enzim (Winarno, 2002).

c. Konsentrasi enzim

Konsentrasi enzim dapat mempengaruhi laju reaksi enzim, semakin tinggi konsentrasi enzim maka kecepatan reaksi akan meningkat hingga batas konsentrasi tertentu (Poedjiadi, 2006). Hubungan antara laju reaksi dengan konsentrasi enzim ditunjukkan pada Gambar 5.



Gambar 5. Hubungan antara laju reaksi dengan konsentrasi enzim (Poedjiadi, 2006).

d. Inhibitor dan Aktivator

Inhibitor merupakan suatu zat kimia yang dapat menghambat aktivitas enzim (Wirahadikusumah, 2001). Cara kerja inhibitor adalah dengan menyerang sisi aktif enzim, sehingga tidak dapat berikatan dengan substrat dan fungsi katalitik enzim tersebut akan terganggu (Winarno, 2002). Sedangkan aktivator adalah senyawa/ion yang dapat meningkatkan kecepatan reaksi enzimatik. Komponen kimia membentuk enzim disebut kofaktor. Kofaktor dapat berupa ion-ion

anorganik seperti Ca, Zn, Mg, Na, Fe, dan Cu atau berupa molekul organik kompleks yang disebut koenzim (Martoharsono, 2006).

e. Konsentrasi substrat

Penambahan konsentrasi substrat hingga batas tertentu akan meningkatkan laju reaksi enzimatik. Jika konsentrasi substrat rendah maka kompleks enzim-substrat yang terbentuk hanya sedikit. Bila konsentrasi dinaikkan maka akan terbentuk kompleks-enzim substrat yang lebih banyak sehingga laju reaksi akan meningkat karena jumlah enzim bebas berkurang (Poedjiadi, 2006).

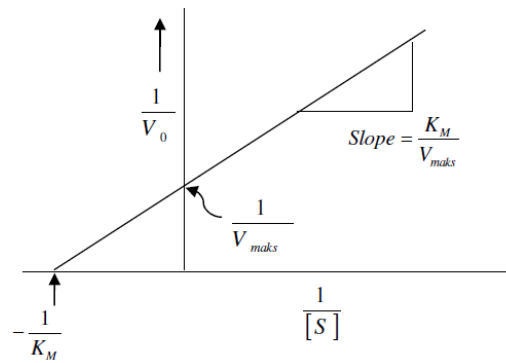
2.1.4. Kinetika Reaksi Enzim

Kinetika enzim adalah salah satu cabang enzimologi yang membahas faktor-faktor yang mempengaruhi kecepatan reaksi enzimatik. Kinetika reaksi enzimatik diketahui dengan mengukur jumlah substrat yang diubah atau produk yang dihasilkan per satuan waktu, pada waktu yang sangat pendek atau pada satu titik tertentu grafik yang disebut kecepatan sesaat (*instantaneous velocity*). Pada umumnya yang disebut kecepatan pada reaksi enzimatik ialah kecepatan awal. Hal ini disebabkan keadaan awal reaksi, dapat diketahui keadaan dengan lebih cepat (Poedjiadi, 2006). Kinetika reaksi enzim memiliki parameter yang disebut konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}). Nilai K_M didefinisikan sebagai konsentrasi substrat tertentu pada saat enzim mencapai kecepatan setengah kecepatan maksimum. Setiap enzim memiliki nilai V_{maks} dan K_M yang khas dengan substrat spesifik pada suhu pH tertentu (Kamelia dkk., 2005). Menurut Lehninger (2005), nilai K_M suatu enzim dapat dihitung dengan menggunakan persamaan Lineweaver-Burk, yang diperoleh dari persamaan Michaelis-Menten yang kemudian dihasilkan suatu kurva Lineweaver-Burk yang ditunjukkan pada Gambar 6.

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

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m + [S]}{V_{maks} [S]}$$

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



Gambar 6. Kurva Lineweaver-Bruk (Murzin *and* Salmi, 2016).

2.1.5. Stabilitas Enzim

Stabilitas enzim merupakan sifat penting yang harus dimiliki oleh enzim sebagai biokatalis. Banyak faktor yang mempengaruhi stabilitas enzim, seperti pH, suhu, kofaktor dan kehadiran surfaktan (Eijnsink *et al.*, 2005). 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 kondisi-kondisi non fisiologis 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 (Junita, 2002). Menurut Illanes (2008), untuk meningkatkan stabilitas enzim dapat dilakukan dengan penggunaan zat aditif, modifikasi kimia, amobilisasi dan rekayasa protein.

Pada suhu yang terlalu rendah kemantapan enzim tinggi, tetapi aktivitasnya rendah. Sedangkan pada suhu yang terlalu tinggi aktivitas enzim tinggi, tetapi kemantapannya rendah. Daerah suhu saat kemantapan dan aktivitas enzim cukup besar disebut suhu optimum (Wirahadikusumah, 2001).

Dalam industri, pada proses reaksinya menggunakan suhu tinggi bertujuan untuk mengurangi tingkat kontaminasi dan meningkatkan laju reaksi. Namun, suhu tinggi merupakan masalah utama dalam stabilitas enzim, karena enzim umumnya

tidak stabil pada suhu tinggi. Stabilitas termal enzim akan jauh lebih tinggi dalam kondisi kering dibandingkan dalam kondisi basah. Adanya air sebagai pelumas membuat konformasi suatu molekul enzim menjadi sangat fleksibel, sehingga bila air dihilangkan molekul enzim akan menjadi lebih kaku (Virdianingsih, 2002).

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, 2002). 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.

2.2. Enzim Amilase

Enzim amilase merupakan enzim yang menghidrolisis amilum dan menghasilkan glukosa. Enzim amilase dihasilkan oleh semua makhluk hidup untuk mengkatalis reaksi biokimia, sehingga reaksi-reaksi tersebut dapat berlangsung lebih cepat. Enzim amilase untuk kebutuhan industri diekstraksi dari berbagai jenis sel makhluk hidup, tetapi pada saat ini enzim lebih banyak diekstraksi dari mikroorganisme, sebab menghasilkan enzim yang dapat dimanfaatkan manusia dalam jumlah dan jenis yang sangat bervariasi. Selain itu, mikroorganisme dapat dikultur untuk memperoleh enzim yang ingin dihasilkan dan memiliki masa pertumbuhan yang pendek (Ningsih dkk., 2012).

Amilase adalah enzim ekstraseluler yang diproduksi di dalam sel, kemudian dikeluarkan dari sel ke substrat sekelilingnya. Enzim ekstraseluler umumnya bersifat terinduksi dan produksinya akan meningkat jika ada substrat yang sesuai di sekelilingnya (Irdawati dkk., 2011). Amilase dapat diperoleh dari berbagai macam sumber seperti tanaman, hewan, dan mikroorganisme. (Hamdani, 2008).

Enzim amilase dibedakan menjadi tiga kelompok yaitu:

a. α -amilase.

α -amilase adalah enzim ekstraseluler yang bersifat termostabil dan berfungsi menghidrolisis ikatan 1,4- α -glikosida sebagian besar α -amilase adalah metaloenzim yang memerlukan ion kalsium (Ca^{2+}) untuk aktivitas, integritas struktural dan stabilitas. Menurut Robia dan Sutrisno (2015), α -amilase disebut juga endoamilase karena enzim tersubstrat memecah pati secara acak dari tengah dan bagian dalam molekul.

b. β -amilase

Enzim β -amilase adalah enzim eksoamilase yang memecahkan ujung rantai granula bukan pereduksi pada molekul amilosa, amilopektin dan glikogen.

Enzim β -amilase tidak dapat menghidrolisis maltotriosa (Diaz *et al.*, 2003).

c. γ -amilase atau glukoamilase

Glukoamilase menghidrolisis unit glukosa tunggal dari non-pereduksi ujung dari amilosa dan amilopektin secara bertahap. Glukoamilase dapat dibedakan dengan enzim amilase lainnya karena hasil reaksinya hanya berupa glukosa (Diaz *et al.*, 2003). γ -amilase efisien pada lingkungan yang bersifat asam dan bekerja pada pH optimum (Algofar dkk., 2021).

Enzim amilase banyak dimanfaatkan dalam teknologi bioproses. Enzim ini menyumbang 30% dari total enzim dunia.. Berbagai industri di Indonesia telah menggunakan amilase sebagai katalis, seperti pada industri pangan amilase berperan dalam pembuatan makanan, minuman, atau gula cair. Pada industri non pangan enzim ini digunakan pada industri tekstil, kertas, dan deterjen (Pangastuti dkk., 2002). Enzim mempunyai nilai ekonomi tinggi, dalam industri pangan. Enzim α -amilase berfungsi menyediakan gula hidrolisis pati sehingga dapat dimanfaatkan untuk produksi sirup glukosa atau sirup fruktosa yang memiliki tingkat kemanisan tinggi, pembuatan roti, dan makanan bayi. Di industri tekstil, digunakan sebagai perekat untuk melindungi benang saat ditenun agar lentur. Proses ini memerlukan suhu sekitar 70°C - 80°C. Mikroorganisme termofil dapat menghasilkan enzim yang tahan terhadap suhu tinggi (Setiasih dkk., 2007).

2.3. Isolasi dan Pemurnian Enzim

Enzim dapat diisolasi secara ekstraseluler dan intraseluler. Isolasi enzim ekstraseluler lebih mudah dibandingkan intraseluler, karena tidak memerlukan pemecahan sel dan enzim mudah dipisahkan dari pengotor lain. Pemisahan ini dilakukan melalui sentrifugasi (Pelczar dan Chan, 2007).

Enzim dapat dimurnikan dengan melakukan beberapa metode yaitu:

a. Sentrifugasi

Prinsip sentrifugasi adalah pemisahan berdasarkan berat jenis molekul dengan cara memberikan gaya sentrifugal sehingga substansi yang lebih berat akan berada di dasar, sementara substansi yang lebih ringan akan terletak di atas. Teknik sentrifugasi dilakukan dengan alat bernama mesin sentrifugasi dengan kecepatan yang bervariasi, contohnya 2500 rpm (*rotation per minute*) atau 3000 rpm (Fatih, 2009). Proses sentrifugasi dilakukan pada suhu dingin 2-4°C untuk mencegah denaturasi enzim karena proses tersebut akan melepaskan panas.

b. Fraksinasi

Fraksinasi adalah proses pemisahan fraksi yang terkandung dalam suatu larutan atau suspensi yang mempunyai karakteristik berbeda (Yuliasih dkk., 2007).

Pemurnian enzim α -amilase dilakukan dengan fraksinasi menggunakan amonium sulfat (Raul *et al.*, 2014). Amonium sulfat sering dipakai untuk mengendapkan enzim. Kelebihan amonium sulfat yaitu, kebanyakan enzim tahan terhadap garam tersebut, memiliki kelarutan yang besar, daya pengendapan yang cukup besar dan mempunyai efek penstabil terhadap kebanyakan enzim. Penambahan garam amonium sulfat dilakukan dengan meningkatkan kejenuhan dari larutan enzim, dengan pembagian fraksi: (0-20)%, (20-40)%, (60-80)%, dan (80-100)% jenuh.

c. Dialisis

Dialisis merupakan proses yang dilakukan untuk menghilangkan molekul kecil seperti garam dari enzim yang didapatkan melalui tahapan sebelumnya. Prinsip dialisis adalah difusi zat terlarut melalui membran semipermeabel ketika membran menjadi batas antara dua larutan yang berbeda konsentrasi. Dialisis dapat dilakukan menggunakan kantong selofan, kantong ini mempunyai ukuran

pori-pori lebih kecil dari ukuran protein sehingga protein tidak dapat keluar dari kantong. Setelah mencapai keadaan seimbang, larutan diluar kantong selofan diganti dengan larutan baru agar konsentrasi ion-ion dalam kantong dialisis berkurang (Adriyanthi, 2017). Keuntungan penggunaan kantong selofan yaitu mudah digunakan, relatif murah, dan mudah untuk didapatkan (Kristanti, 2001).

2.4. Uji Aktivitas Enzim α -Amilase

Dalam penelitian Yandri dkk., (2020) aktivitas enzim α -amilase diketahui dengan melakukan pengujian menggunakan metode Fuwa dan Mandels. Metode Fuwa digunakan pada tahap isolasi dan pemurnian enzim α -amilase. Metode Mandels digunakan pada penentuan data kinetika dan karakterisasi enzim.

a. Metode Fuwa

Metode Fuwa yaitu metode pengukuran aktivitas enzim α -amilase berdasarkan pengurangan jumlah pati yang terhidrolisis dan menghasilkan warna biru setelah penambahan iodine. Warna tersebut akan menyerap cahaya monokromatis pada λ_{maks} 600 nm. Uji Fuwa adalah uji paling spesifik untuk mengidentifikasi aktivitas enzim amilase karena waktu reaksi yang cukup singkat yaitu 10 menit inkubasi dan pati sebagai substrat

b. Metode Mandels

Aktivitas enzim α -amilase ditentukan dengan metode Mandels. Berdasarkan pembentukan glukosa dari hasil hidrolisis substrat yang akan mengalami oksidasi setelah penambahan reagen *Dinitrosalisilic Acid* (DNS) menghasilkan larutan berwarna merah. Semakin pekat warna larutan sampel dibandingkan larutan kontrol menunjukkan bahwa semakin tinggi aktivitasnya.

2.5. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

Penentuan kadar protein enzim α -amilase menggunakan metode Lowry (Yandri dkk., 2020). Metode ini bekerja pada kondisi alkali dan ion tembaga (II) akan membentuk kompleks dengan protein. Ketika reagen *folin-ciocalteau* ditambahkan, maka akan mengikat protein. Ikatan ini secara perlahan akan

mereduksi reagen *folin* menjadi heteromolibdenum dan merubah warna dari kuning menjadi biru. Pada metode ini, pengujian kadar protein didasarkan pada pembentukan kompleks Cu^{2+} dengan ikatan peptida yang akan tereduksi menjadi Cu^+ pada kondisi basa. Cu^+ dan rantai samping tirosin, triptofan dan sistein akan bereaksi dengan reagen *folin-ciocalteau* yang akan mengikat protein. Reagen bereaksi dengan menghasilkan produk tidak stabil yang tereduksi secara lambat menjadi heteromolibdenum. Protein akan menghasilkan intensitas warna yang berbeda tergantung pada kandungan triptofan dan tirosinnya.

2.6. *A. fumigatus*

Fungi *A. fumigatus* merupakan jamur saprotropik yang tersebar luas di alam, dapat ditemukan di dalam tanah dan pembusukan organik seperti kompos, serta mempunyai peran yang penting dalam siklus daur karbon dan nitrogen. Koloni dari jamur menghasilkan ribuan konidia abu-abu hijau permenit dari konidiospora yang siap tersebar di alam. Fungi ini bereproduksi dengan pembentukan konidiospora yang terlepas ke dalam lingkungan (Marvel, 2007). *A. fumigatus* dapat beradaptasi dengan berbagai senyawa organik untuk proses metabolismenya dan tidak membutuhkan nutrisi yang khusus (Veerdonk *et al.*, 2017).

Menurut Gautam *and* Bhadauria (2012), klasifikasi *A. fumigatus*, yaitu:

Kingdom	: Fungi
Division	: Ascomycota
Class	: Eurotimycetes
Orde	: Eurotiales
Family	: Trichocomaceae
Genus	: <i>Aspergillus</i>
Spesies	: <i>A. fumigatus</i>

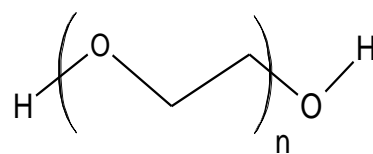
Spesies *Aspergillus* tumbuh dengan cepat, menghasilkan hifa aerial yang membentuk struktur dari konidia. Spesies diidentifikasi menurut perbedaan morfologi dari struktur ini, termasuk ukuran, bentuk, tekstur dan warna dari konidia. (Brooks *et al.*, 2018). *A. fumigatus* memiliki ciri-ciri makroskopis: koloni

berwarna hijau tua dengan bentuk koloni granular dan kompak, hialin reverse. Ciri-ciri mikroskopis: memiliki rantai oval kecil konidia yang melekat pada ujung satu atau dua baris sterigmata yang terartur melingkar pada permukaan ujung konidiafor yang disebut vesikel. Kepala konidial berukuran 100-200 μm panjangnya dan 50-60 μm lebarnya. Konidofor hialin, 150-300 μm anjangnya dan 3-5 μm lebarnya, vesikel berbentuk bulat seperti telur sampai bebentuk seperti labu berdiameter 15-25 μm , sterigmata uniseriate, konidia berbentuk golobose (Afzal *et al.*, 2013).

2.7. Polietilen glikol 6000

Senyawa aditif ialah senyawa yang apabila ditambahkan pada larutan enzim akan meningkatkan stabilitas struktur protein enzim tanpa mempengaruhi interaksi kovalen pada enzim. Pengaruh senyawa aditif terbatas interaksi non kovalen dengan enzim atau pada sistem pelarut enzim (Wulandari, 2008). Penggunaan zat aditif merupakan cara yang paling sederhana untuk meningkatkan stabilitas enzim. Peningkatan stabilitas enzim ditandai dengan peningkatan waktu paruh.

Polietilen glikol (PEG) adalah polimer yang dapat dirumuskan oleh formula $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n \cdot \text{H}_2\text{O}$, n sebagai jumlah rata-rata gugus oksietilen. Berat molekul PEG ini berkisar antara 200-300.000. PEG dengan berat molekul 200-600 berbentuk cairan, PEG 1500 semi padat, dan PEG 3.000-20.000 atau lebih berupa padatan kristalin serta PEG lebih dari 100.000 berbentuk seperti resin pada suhu kamar. Polietilen 4.000, 6.000 dan 8.000 berupa serbuk putih, larut dalam air, serta sedikit larut dalam alkohol (Sweetman, 2009). Semakin besar berat molekul poliol maka semakin tinggi pengaruhnya terhadap stabilitas enzim, salah satu poliol yang dapat digunakan untuk stabilitas enzim adalah polietilen glikol 6000 (Firdausi, 2022). Adapun struktur polietilen glikol ditunjukkan pada Gambar 7.



Gambar 7. Struktur polietilen glikol (Jang *et al.*, 2015).

Sifat lain dari PEG ialah stabil, higroskopis, larut dalam air, dapat berikatan dengan protein dan biomolekul lainnya untuk agregasi dan meningkatkan kelarutan. PEG juga dapat menjaga stabilitas enzim dengan mencegah enzim berikatan dengan air dan terbentuknya ikatan rantai panjang PEG dengan gugus rantai samping pada enzim akibatnya ikatan molekul enzim dengan PEG menghasilkan struktur yang lebih kaku, sehingga lebih tahan terhadap perubahan konformasi (Firdausi, 2022).

Penambahan PEG 6000 enzim α -amilase dari *Rhizopus oligosporus* telah dilakukan oleh Assegaf (2017), hasil dari penelitian tersebut diperoleh aktivitas spesifik enzim hasil pemurnian meningkat sebesar 1,24 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim yaitu sebesar 393,137 U/mg menjadi 1861,89 U/mg. Enzim hasil pemurnian optimum pada pH 6,5 dan suhu optimum 55°C. Waktu paruh dan ΔG_i enzim hasil pemurnian yaitu 70 menit dan 104,35 kJ mol⁻¹. Setelah penambahan PEG 6000 terjadi peningkatan waktu paruh menjadi 86,6 menit dan ΔG_i sebesar 104,93 kJ mol⁻¹. Selain itu, nilai k_i enzim hasil pemurnian sebesar 0,0099 menit⁻¹ menjadi 0,0080 menit⁻¹ setelah penambahan PEG 6000. Menurut Yandri *et al.*, (2008), terjadinya peningkatan waktu paruh dan ΔG_i serta penurunan harga k_i dari enzim hasil penambahan zat aditif dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian menunjukkan adanya peningkatan stabilitas enzim.

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. Analisis spektrofotometri UV-Vis dilakukan di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung

3.2. Alat dan Bahan

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

Adapun bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah PDA (Himedia), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck), CaCl_2 (Merck), MgSO_4 , urea, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 (Merck), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CoCl_2 , pepton (Himedia), pati, Na(K)-Tartarat, NaH_2PO_4 (Merck), Na_2HPO_4 (Merck), reagen *folin-ciocalteu* (Sigma-Aldrich), pereaksi DNS (Himedia), fenol, KI (Merck), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, HCl (Merck), Na_2CO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NaOH (Merck), BSA (*Bovine Serum Albumin*), polietilen glikol 6000 (NOF Corporation), akuades, kantong selofan, kapas sumbat, kasa, kertas, karet, aluminium foil, alkohol, tisu, dan kertas saring.

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

3.3. Prosedur Kerja

3.3.1. Pemiakan 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. Pemiakan *A. fumigatus*

Pemiakan dilakukan dengan diambil sebanyak 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.*, 2010).

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. Sedangkan media fermentasi digunakan sebagai medium pertumbuhan dan perkembangbiakan disertai produksi enzim α -amilase. Media inokulum yang digunakan terdiri dari KH_2PO_4 2 gram, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,4 gram, MgSO_4 0,3 gram, pepton 0,75 gram, urea 0,3 gram, CaCl_2 0,3 gram, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005 gram, $\text{ZnSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,0014 gram, CoCl_2 0,002 gram dan substrat 0,75 gram. Semua bahan dilarutkan dalam 100 mL buffer fosfat pH 6,5 pada labu Erlenmeyer dan disterilisasi pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit.

Sedangkan media fermentasi yang digunakan terdiri dari KH_2PO_4 10 gram, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7 gram, MgSO_4 1,5 gram, pepton 3,75 gram, urea 1,5 gram, CaCl_2 1,5 gram, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,025 gram, $\text{ZnSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,007 gram, CoCl_2 0,01 gram

dan substrat 3,75 gram yang dilarutkan dalam buffer fosfat pH 6,5 sebanyak 500 mL dan disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit.

b. Inokulasi *A. fumigatus*

Sebanyak 3 ose *A. fumigatus* dari media agar miring dipindahkan ke dalam 100 mL media inokulum secara aseptik lalu diletakkan pada *shaker* inkubator dengan kecepatan 125 rpm selama 24 jam.

c. Produksi enzim α -amilase

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

3.3.3. Isolasi Enzim α -Amilase

Isolasi enzim α -amilase dilakukan menggunakan metode sentrifugasi dengan tujuan untuk memisahkan enzim dari komponen sel lainnya. Pada penelitian ini, isolasi enzim α -amilase diperoleh dari media fermentasi yang telah diinkubasi selama 112 jam. Untuk memperoleh ekstrak kasar, enzim α -amilase disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15-20 menit (Yandri *et al.*, 2022 A). Metode ini akan menghasilkan supernatan dan palet. Supernatan merupakan ekstrak kasar enzim α -amilase yang selanjutnya akan diuji aktivitasnya dengan metode Fuwa dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.

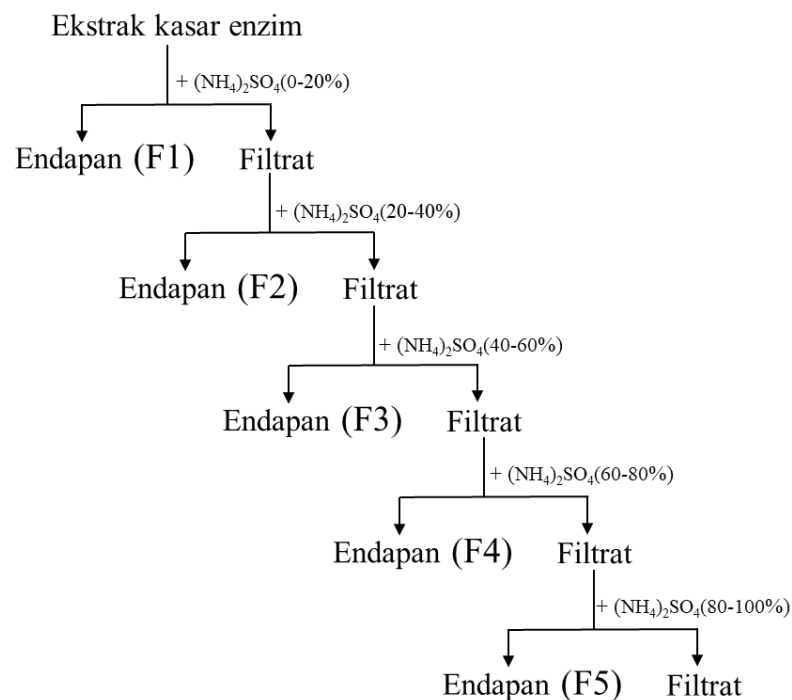
3.3.4. Pemurnian Enzim α -Amilase

a. Fraksinasi menggunakan amonium sulfat

Ekstrak kasar enzim ditambahkan garam amonium sulfat secara perlahan sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Endapan protein enzim yang didapatkan pada tiap tingkat kejenuhan amonium sulfat dipisahkan dari filtratnya dengan sentrifugasi dingin pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Kemudian endapan yang diperoleh dilarutkan dengan buffer fosfat

0,025 M pH 6,5 dan diuji aktivitasnya dengan metode Fuwa serta diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry untuk mengetahui tingkat kejenuhan yang terdapat enzim α -amilase dengan aktivitas spesifik yang tertinggi.

Ekstrak kasar enzim α -amilase yang telah diperoleh selanjutnya diendapkan dengan menggunakan garam amonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pada berbagai tingkat kejenuhan yaitu 0-20%; 20-40%; 40-60%; 60-80%; dan 80-100%. Selanjutnya, filtrat yang didapat dari fraksi 0-20% digunakan untuk diendapkan kembali dengan fraksi kejenuhan 20-40% dengan prosedur yang sama hingga tingkat kejenuhan 80-100% (Yandri *et al.*, 2010). Skema fraksinasi dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Skema fraksinasi enzim dengan amonium sulfat

b. Dialisis

Endapan enzim dari hasil fraksinasi kemudian dimurnikan dengan cara dialisis melalui membran semipermeabel (kantong selofan) dengan buffer fosfat 0,01 M pH 6,5 selama 24 jam dengan suhu rendah. Selama proses dialisis, dilakukan pergantian buffer setiap 4-6 jam agar konsentrasi ion-ion

di dalam selofan menjadi berkurang. Proses ini dilakukan secara berulang sampai ion-ion di dalam kantong selofan dapat diabaikan. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas enzim 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

- a. Pembuatan pereaksi uji aktivitas α -amilase Metode Fuwa.
- b. Pereaksi iodin: sebanyak 2 gram KI dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan dilarutkan dalam 10 mL akuades. Kemudian dimasukkan sebanyak 0,2 gram I_2 ke dalam labu ukur lalu ditambahkan akuades hingga batas miniskus.
- c. Larutan HCl 1 N: dilakukan pengenceran HCl pekat 12 N menjadi 1 N. Sebanyak 8,33 mL HCl pekat dimasukkan dalam labu ukur 100 mL, lalu ditambahkan akuades hingga tanda batas.
- d. Larutan pati: sebanyak 0,1 gram pati dilarutkan dalam 100 mL akuades dan dipanaskan hingga larut.

1. Pengujian aktivitas enzim α -amilase Metode Fuwa.

Aktivitas α -amilase ditentukan dengan metode Fuwa, yang berdasarkan pengurangan jumlah pati yang terdeteksi dengan penambahan iodin. Metode Fuwa ialah metode spesifik yang digunakan untuk mengidentifikasi aktivitas enzim amilase karena waktu reaksi yang singkat yaitu 10 menit inkubasi dengan pati sebagai substratnya. Semakin kecil absorbansi sampel maka semakin baik aktivitas dari enzim tersebut. Sebanyak 0,25 mL enzim ditambahkan dengan 0,25 mL larutan pati 0,1% dan dihomogenkan lalu diinkubasi selama 10 menit dengan suhu 60°C. Kemudian ditambahkan 0,25 mL HCl 1 N lalu ditambahkan 0,25 mL pereaksi iodin dan 4 mL akuades kedalam campuran tersebut. Setelah campuran homogen, diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} 600 nm. Kontrol dibuat dengan cara yang sama hanya menggunakan 0,25 mL enzim yang sudah diinaktivasi dengan penambahan HCl 1 N.

b. Metode Mandels

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

Sebanyak 1 gram DNS dimasukkan ke labu ukur 100 mL, ditambahkan 1 gram NaOH lalu dihomogenkan, ditambahkan 0,2 gram fenol dan 0,05 gram $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0,4 gram Na(K)-tartarat, dan dilarutkan dengan akuades hingga tanda batas.

2. Uji aktivitas enzim α -amilase metode Mandels

Metode ini didasarkan pada glukosa yang terbentuk. Sebanyak 0,25 mL enzim ditambahkan 0,25 mL larutan pati 0,1% dicampurkan lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 60°C , lalu ditambahkan sebanyak 1 mL pereaksi DNS dan dididihkan selama 10 menit pada penangas air. Setelah dingin, ditambahkan akuades sebanyak 1,5 mL kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} 510 nm. Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan menggunakan kurva standar glukosa.

c. Penentuan kadar protein metode Lowry

1. Pembuatan Pereaksi untuk Penentuan Kadar Protein Metode Lowry.

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

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

2. Penentuan kadar protein enzim α -amilase metode Lowry

Kadar protein enzim ditentukan dengan metode Lowry. Sebanyak 0,1 mL enzim ditambah 0,9 ml akuades. Lalu direaksikan dengan 5 mL pereaksi C, dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruang. Selanjutnya, ditambahkan dengan cepat 0,5 mL pereaksi D dan dihomogenkan, didiamkan selama 30 menit. Untuk kontrol, 0,1 mL enzim diganti dengan akuades, dilanjutkan perlakuan seperti sampel. Serapannya diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} 750 nm. Untuk menentukan kadar protein enzim digunakan kurva standar BSA dan perhitungan metode Lowry.

3.3.6. Penambahan Polietilen Glikol (PEG) 6000

Enzim hasil pemurnian yang didapatkan kemudian ditambahkan larutan PEG 6000 dengan konsentrasi 20%, 25%, dan 30%. Penambahan PEG 6000 pada enzim yang telah dimurnikan menggunakan perbandingan 1:1 (Assegaf, 2017).

3.3.7. Karakterisasi Enzim α -Amilase

Aktivitas enzim pada tahap karakterisasi ditentukan menggunakan metode Mandels. Karakterisasi enzim sebelum dan sesudah penambahan PEG 6000 meliputi:

a. Penentuan suhu optimum

Untuk mengetahui suhu optimum enzim dilakukan dengan variasi suhu yaitu 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, dan 80°C, selama 30 menit pada pH 6,5.

b. Penentuan pH optimum

Untuk mengetahui pH optimum enzim sebelum dan setelah penambahan PEG 6000, digunakan buffer fosfat 0,1 M dengan variasi pH 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; dan 8, selama 30 menit pada suhu optimum.

c. Penentuan K_M dan V_{maks}

Konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) enzim sebelum dan setelah penambahan PEG 6000 ditentukan dengan variasi

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.

d. Uji stabilitas termal enzim

Uji stabilitas termal enzim sebelum dan setelah penambahan PEG 6000 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).

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

e. Penentuan Waktu Paruh ($t_{1/2}$), Konstanta Laju Inaktivasi (k_i), dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i)

Penentuan nilai k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim α -amilase hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan PEG 6000 dilakukan dengan menggunakan persamaan kinetika inaktivasi orde 1 dengan persamaan:

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

waktu paruh dapat dihitung dari persamaan laju reaksi inaktivasi enzim orde satu sebagai berikut:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_i}$$

Pada penelitian Yandri *et al.*, (2010), perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan ditentukan menggunakan persamaan:

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

Keterangan :

R = konstanta gas (8,315 J K⁻¹mol⁻¹)

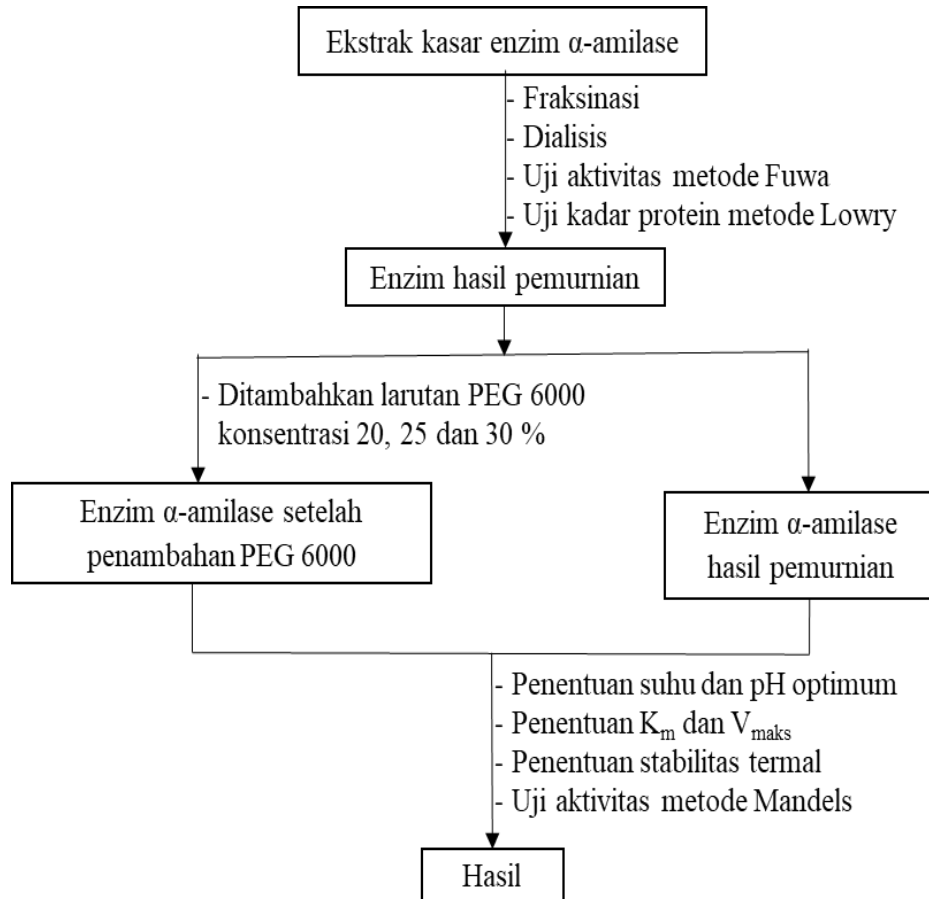
T = suhu (K)

k_i = konstanta laju inaktivasi termal

h = konstanta Planck (6,625 x 10⁻³⁴J det)

k_B = konstanta Boltzmann (1,381 x 10⁻²³JK⁻¹)

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



Gambar 9. Diagram alir penelitian

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

Berdasarkan pembahasan hasil penelitian ini, dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Enzim α -amilase hasil pemurnian memiliki aktivitas spesifik 753,832 U/mg meningkat sebesar 15 kali dibandingkan ekstrak kasar dengan aktivitas spesifik 51,971 U/mg.
2. Suhu optimum enzim hasil pemurnian dan enzim setelah penambahan PEG 6000 konsentrasi 20, 25, dan 30% mengalami pergeseran suhu optimum dari 50°C menjadi 55°C.
3. Setelah penambahan PEG 6000 konsentrasi 20, 25, dan 30% terjadi pergeseran pH dari pH 5 menjadi pH 6.
4. Enzim hasil pemurnian memiliki nilai K_M $8,824 \pm 0,15$ mg mL⁻¹ substrat dan V_{maks} $8,100 \pm 0,22$ μ mol mL⁻¹ menit⁻¹. Setelah penambahan PEG 6000 konsentrasi 20, 25, dan 30% nilai K_M berturut-turut ialah $11,976 \pm 0,10$; $13,651 \pm 0,28$; dan $21,554 \pm 0,48$ mg mL⁻¹ substrat dan V_{maks} berturut-turut sebesar $17,715 \pm 0,11$; $19,705 \pm 0,08$ dan $19,268 \pm 0,05$ μ molmL⁻¹ menit⁻¹.
5. Penambahan PEG 6000 dapat meningkatkan kestabilan enzim α -amilase dari *A. fumigatus*, ditandai dengan meningkatnya waktu paruh dan ΔG_i setelah penambahan PEG 6000. Waktu paruh enzim hasil penambahan PEG 6000 konsentrasi 20, 25, dan 30% secara berturut-turut meningkat 6,86; 5,20 dan 5,17 kali dibandingkan enzim hasil pemurnian.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, disarankan menggunakan konsentrasi zat aditif PEG 6000 yang lebih rendah seperti 10 atau 15% untuk memperoleh kestabilan termal optimal. Menjaga kondisi saat penambahan zat seperti perputaran *spinbar*, dan suhu karena dapat mempengaruhi ikatan enzim dengan zat aditif.

DAFTAR PUSTAKA

- Adriyanthi, F. 2017. Pengaruh Penambahan Sorbitol Terhadap Stabilitas Enzim Selulase dari *Rhizopus oligosporus*. *Skripsi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Afzal, H., Shazad, S., Qamar, S., and Nisa, U. 2013. Morphological identification of *Aspergillus* species from the soil of Larkana District (Sindh, Pakistan). *Asian J. Agri B.* **1** (3): 105-117.
- Algoftar, M. I., Hurryatul, F. R., Rum., Soni, M. dan Fenti, F. 2021. Article review: Studi α -amilase dari mikroba serta pemanfaatannya dalam pembuatan maltodekstrin. *Indones. Nat. Res. Pharm. J.* **6** (1): 102-117.
- Ariandi, M. 2016. Pengenalan enzim amilase (*alpha-amylase*) dan reaksi enzimatisnya menghidrolisis amilosa pati menjadi glukosa. *J. Dinamika.* **7** (1): 74-82.
- Assegaf, S. 2017. Peningkatan Kesetabilan Enzim α -Amilase dari *Rhizopus Oligosporus* dengan Penambahan Polietilen Glikol (PEG) 6000. *Skripsi*. Fakultas MIPA, Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Brooks, G. F., Jawetz., Melnick. and Adelberg. 2018. *Medical Microbiology 26th ed.* McGraw Hill Medical Publishers. New York.
- Diaz, A., Sieiro, C. and Villa. 2003. The characterization of a β -amylase produced by *Xayrhophyllomyces dendrorhous*. *Lett. Appl. Microbiol.* **36**: 203-207.
- Eijsink, G. H., Sirgit, G., Torben, V. and Bertus van de Burg. 2005. Directed evolution of enzym stability. *Biomol. Eng.* New York. **23**: 21-30.
- Fatih, M. 2009. Isolasi dan digesti DNA kromosom. *J. Sains dan Teknol.* **20** (1): 61-67.
- Firdausi, N. 2022. Pengaruh Penambahan Polietilen Glikol (PEG) 6000 Terhadap Stabilitas Enzim Protease dari *Aspergillus fumigatus*. *Skripsi*. Fakultas MIPA, Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Gautam, A. K. and Bhadauria, R. 2012. Characterization of *Aspergillus* species associated with commercially stored triphala powder. *Afr. Biotechnol. J.* **11** (104): 16814-16823.

- Haedar, N., Hasnah, N., Fahrudin. dan Wilda, A. 2017. Produksi dan karakterisasi enzim kitinase dari bakteri kitinolitik asal kerang anadara granosa. *J. Ilmu Alam dan Lingkungan*. **8** (15): 14-21.
- Hamdani. 2008. Deteksi dan produksi amilase. *J. Pangan dan Agroindustri*. **2** (2): 1022-1029.
- Illanes, A. 2008. *Enzyme Production. In: Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications: Enzyme Production*. A. Illanes, Ed. Springer Pub., Chile: 57-106.
- Irdawati, Fifendy, M. dan Biomed, M. 2011. Isolasi Bakteri Termofilik Penghasil Amilase Dari Sumber Air Panas Rimbo Panti Pasaman. *Skripsi*. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang.
- Istia'nah, Dina., Ulfah, U. dan Ahmad, B. 2020. Karakterisasi enzim amilase dari bakteri *Bacillus megaterium* pada variasi suhu, pH dan konsentrasi substrat. *J. Ris. Biol. dan Apl.* **2** (1): 11-17.
- Jang, H. J., Shin, C. Y. and Kim, K. B. 2015. Safety evaluation of polyethylene glycol (PEG) compounds for cosmetic use. *Toxicol. Res.* **31** (2): 105-136.
- Junita. 2002. Mempelajari Stabilitas Termal Enzim Protease dari *Bacillus stearothermophilus* dalam Pelarut Heksana, Toluena, dan Benzena. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Kamelia, R., Muliawati, S. dan Dessy, N. 2005. Isolasi dan karakterisasi protease intraseluler termostabil dari bakteri *Bacillus stearothermophilus* RP1. *Semin. Nas. MIPA*. Departemen Kimia, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Kristanti, N. D. 2001. Pemurnian Parsial dan Karakterisasi Lipase Ekstraseluler dan Kapang *Rhizopus oryzae* TR 32. *Tesis*, Program Pascasarjana. IPB. Bogor.
- Lehninger, A. L. 2005. *Principles of Biochemistry: Fourth edition*. W.H. Freeman and Company. New York : 89-91.
- 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.
- Martoharsono. 2006. *Biokimia Jilid 1*. UGM Press. Yogyakarta.
- Marvel, M. 2007. *Aspergillus fumigatus*. *J. Microbiol.* **70**: 1253-1262
- Murzin, D. Y. and Salmi, T. 2016. *Catalytic Kinetics Chemistry and Engineering Second Edition (2nd ed.)*. Elsevier B. V. India.

- Naiola, E. 2002. Karakterisasi dan optimasi media produksi amilase dari *Aspergillus niger* dan *Aspergillus clavatus*. *Ber. Biol.* **6** (3): 415-421.
- Ngili, Y. S. 2009. Biokimia Struktur dan Fungsi Biomolekul. Graha Ilmu. Yogyakarta. 264-295.
- Ningsih, D. R., Rastuti, U. dan Kamaludin, R. 2012. Karakterisasi enzim amilase dari bakteri *Bacillus amyloliquefaciens*. *Prosiding Seminar Nasional*. :Pengembangan Sumber Daya Pedesaan dan Kearifan Lokal Berkelanjutan II.
- Pangastuti, A., Wahjuningrum, D. dan Suwanto, A. 2002. Isolasi, karakterisasi, dan kloning gen penyandi α -amilase bakteri *Halofil Moderat* asal Bledug Kuwu. *J. Hayati.* **9** (1): 10-14.
- Pelczar, M.J. dan Chan, E. C. S. 2007. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. UI Press. Jakarta.
- Poedjiadi, A. 2006. *Dasar-Dasar Biokimia*. UI-Press. Jakarta.
- Ramadhan, Burhan and Prima R. 2021. Review article: Activities enzyme amylase from lactat acid bacteria (Characterization and Aplication). *Unesa J. Chem.* **10** (2): 109-127.
- Raul, D., Biswas T., Mukhopadhyay, S., Das, S. K. and Gupta, S. 2014. Production and partial purification of alpha amylase from *Bacillus subtilis* (mtcc 121) using solid state fermentation. *Biochem. Res. Int.* 1-5.
- Robia. dan Sutrisno, A. 2015. Karakteristik sirup glukosa dari tepung ubi ungu (Kajian suhu likuifikasi dan konsentrasi α -amilase). *J. Pangan dan Agroindustri.* **3** (4): 1531-1537.
- Robinson, P. K. 2015. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Ess. Biochem.* **59**:1-41.
- Rodwell, V.W. 2011. *Harper's Review of Biochemistry*. EGC Kedokteran. Jakarta.
- Sarrouh, B., Santos, T, M., Miyoshi, A., Dias, R. and Azevedo, V. 2012. Up-to date insight on industrial enzymes applications and global market. *Bioprocess. Biotechniq. J.* **4** (2): 1-10.
- Selvarajan, E., Mohanasrinivasan, V., Subathra, D. and George, P. 2015. Immobilization of β -galactosidase from *Lactobacillus plantarum* HF571129 and ZnO nanoparticles: characterization and lactose hydrolysis. *Bioprocess and Biosyst. Eng.* **38** (9): 1665-1669.

- Setiasih, S., Wahyuntari, B., Trismilah. dan Apriliani, D. 2007. Karakterisasi enzim α -amilase ekstrak dari isolat bakteri termofil SW2. *J. Kim. Indones.* **1** (1): 22-27.
- Shahib, M. N. 2005. *Biologi Molekuler Medik I*. Universitas Padjajaran Press. Bandung.
- Soeka, Yati S., Maman R. dan Sulistianti. 2015. Optimasi enzim α -amilase dari *Bacillus amyloliquefaciens* O1 yang diinduksi substrat dedak padi dan karboksimetilselulosa. *J. Biol. Indones.* **11** (2): 259-266.
- Sumardjo, D. 2006. *Pengantar Kimia. Buku Kedokteran EGC*. Jakarta.
- Sweetman, S. C. 2009. *Martindale The Complete Drug Reference 36th ed.* Pharmaceutical Press. London.
- Veerdonk, F. L., Grestnigt, M. S., Romani, L., Netea, M. G. and Latge, J. P. 2017. *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* **15** (11): 661-674.
- Viridianingsih, R. 2002. Mempelajari Stabilitas Termal Enzim Protease dari *Bacillus pumilus* 1 dalam Pelarut Heksana, Toluena, dan Benzena. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Winarno, F. G. 2002. *Kimia Pangan dan Gizi*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Wirahadikusumah, M. 2001. *Biokimia Protein, Enzim dan Asam Nukleat*. ITB Press. Bandung.
- Witazora, Y., Yandri, A. S., Suhartati, T., Satria, H., and Hadi, S. 2021. Effect of glutaraldehyde addition on the stability of the α -amylase from *Bacillus subtilis* ITBCCB148. *J. Phys.: Conf. Ser.* **1751** (1): 1-9.
- Wulandari, P. 2008. Studi Pengaruh Penambahan Poliol Terhadap Stabilitas Termal Enzim α -amilase dari *Rhizopus oryzae*. *Skripsi*. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Yandri, Y., Nadilla, N., Suhartati, T., Satria, H. dan Hadi, S. 2020. Peningkatan kestabilan enzim α -amilase dengan penambahan gliserol. *J. Analit.* **5** (2): 143-152.
- Yandri, Y., Suhartati, T. and Hadi, S. 2010. Purification and characterization of extracellular α -Amilase enzyme from locale bacteria Isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148. *Eur. J. Sci. Res.* **39** (1): 64-74.

- Yandri, Y., Suhartati, T., Hadi, S. and Herasari, D. 2008. The chemical modification of protease enzyme isolated from local bacteria isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148 with cynuric chloride polyetyleneglycol. *Eur. J. Sci. Res.* **23**: 177-186.
- Yandri, Y., Suhartati, T., Hadi, S. and Herasari, D. 2011. The chemical modification of protease isolated from local bacteria isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148 with nitrophenolcarbonat polyetyleneglycol (NPC-PEG). *Mod. Appl. Sci. Res.* **5** (4): 253-258.
- Yandri, Y., Ropingi, H., Suhartati, T., Hendri, J., Irawan, B and Hadi, S. 2022 A. The effect of zeolite/chitosan hybrid matrix for thermal stabilization enhancement on the immobilization of *Aspergillus fumigatus* α -amilase. *Emerg. Sci. J.* **6** (3): 505-515.
- Yandri, Y., Tiarsa, E. R., Suhartati, T., Satria, H., Irawan, B., and Hadi, S., 2022 B. The stability improvement of α -amilase from *Aspergillus fumigatus* by immobilization on a bentonite matrix. *Biochem. Res. Int.* 2022: 1-7.
- Yuliasih, I., Irawadi, T. T., Sailah, I., Pranamuda, H., Setyowati, K., dan Sunart, T. C. 2007. Pengaruh proses fraksinasi pati sagu terhadap karakteristik fraksi amilosanya. *J. Teknol. Ind. Pertan.* **17** (1): 29-36.
- Yusak, Y. 2004. Pengaruh suhu dan buffer asetat terhadap hidrolisis CMC oleh enzim selulase dari ekstrak *Aspergillus niger* dalam media campuran onggok dan dedak. *J. Sains Kim.* **8** (2): 35-36.