

**MODIFIKASI KIMIA ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus fumigatus*
MENGUNAKAN NITROFENOL KARBONAT POLIETILEN GLIKOL
(NPC-PEG)**

(Skripsi)

Oleh

**VIRGINIA NUH REZA AMANDA
NPM 1917011012**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023**

ABSTRACT

CHEMICAL MODIFICATION OF α -AMILASE ENZYME FROM *Aspergillus fumigatus* USING POLYETHYLEN GLYCOL NITROPHENOL CARBONATE (NPC-PEG)

By

VIRGINIA NUH REZA AMANDA

Enzymes of microbial origin are used extensively in industry and medicine. The demand and trade for industrial enzymes are steadily increasing and by 2023 is expected to reach \$7.0 billion. One of the enzymes that has an important role in the industrial field is the α -amylase enzyme. This study aims to increase the stability of the α -amylase enzyme from *Aspergillus fumigatus* through chemical modification using NPC-PEG. This research went through production, isolation, purification, modification, and characterization stages. The activity of the α -amylase enzyme was determined by Fuwa and Mandels method, while for the protein content was by Lowry method. The results showed that specific activity of purified enzyme was 656.742 U/mg which increased 13.7 times from the crude extract of the enzyme which was 47.965 U/mg. Optimum purified enzyme at pH 5 and temperature of 50 °C with a value of $k_i = 0.0258 \text{ min}^{-1} \pm 0.0004$; half-life = 26.87 minutes ± 0.3668 ; and $\Delta G_i = 100.151 \text{ kJ mol}^{-1} \pm 0.0367$. The modified enzymes using NPC-PEG concentrations of 5, 10, and 15 mg had the same optimum pH and temperature, pH of 5.5 and 60 °C temperature, while the value of k_i is $0.0157 \text{ min}^{-1} \pm 0.0001$; $0.02 \text{ min}^{-1} \pm 0.0000$; and $0.0224 \text{ minutes}^{-1} \pm 0.0003$ respectively, half-life of 44.15 minutes ± 0.3977 ; 34.66 minutes ± 0.0000 ; and 30.94 minutes ± 0.3908 ; and ΔG_i value of $104.711 \text{ kJ mol}^{-1} \pm 0.0249$; $104.041 \text{ kJ mol}^{-1} \pm 0.0000$; and $103.727 \text{ kJ mol}^{-1} \pm 0.0379$. Modification using NPC-PEG can increase the stability of the α -amylase enzyme from *A. fumigatus* 1.2-1.6 times compared to the purified enzyme, indicated by a decrease in the value of k_i , an increase in half-life ($t_{1/2}$), and an increase in ΔG_i for the modified enzyme results.

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

ABSTRAK

MODIFIKASI KIMIA ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus fumigatus* MENGGUNAKAN NITROFENOL KARBONAT POLIETILEN GLIKOL (NPC-PEG)

Oleh

VIRGINIA NUH REZA AMANDA

Enzim yang berasal dari mikroba digunakan secara luas dalam industri dan obat-obatan. Permintaan dan perdagangan untuk enzim industri terus mengalami peningkatan dan pada tahun 2023 diperkirakan mencapai \$7,0 miliar. Salah satu enzim yang memiliki peran penting di bidang industri adalah enzim α -amilase. Penelitian bertujuan untuk meningkatkan kestabilan enzim α -amilase dari *Aspergillus fumigatus* melalui modifikasi kimia menggunakan NPC-PEG. Penelitian dilaksanakan melalui beberapa tahap yaitu produksi, isolasi, pemurnian, modifikasi, dan karakterisasi. Aktivitas enzim α -amilase ditentukan dengan metode Fuwa dan Mandels, serta kadar protein metode Lowry. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas spesifik enzim hasil pemurnian 656,742 U/mg meningkat 13,7 kali dari ekstrak kasar enzim sebesar 47,965 U/mg. Enzim hasil pemurnian optimum pada pH 5 dan suhu 50 °C dengan nilai $k_i = 0,0258 \text{ menit}^{-1} \pm 0,0004$; waktu paruh = 26,87 menit $\pm 0,3668$; dan $\Delta G_i = 100,151 \text{ kJ mol}^{-1} \pm 0,0367$. Enzim hasil modifikasi menggunakan NPC-PEG konsentrasi 5, 10, dan 15 mg memiliki pH dan suhu optimum yang sama yaitu 5,5 dan 60 °C. Sedangkan nilai k_i secara berturut-turut adalah $0,0157 \text{ menit}^{-1} \pm 0,0001$; $0,02 \text{ menit}^{-1} \pm 0,0000$; dan $0,0224 \text{ menit}^{-1} \pm 0,0003$, waktu paruh sebesar 44,15 menit $\pm 0,3977$; 34,66 menit $\pm 0,0000$; dan 30,94 menit $\pm 0,3908$; dan nilai ΔG_i 104,711 kJ mol⁻¹ $\pm 0,0249$; 104,041 kJ mol⁻¹ $\pm 0,0000$; dan 103,727 kJ mol⁻¹ $\pm 0,0379$. Modifikasi menggunakan NPC-PEG dapat meningkatkan kestabilan enzim α -amilase dari *A. fumigatus* 1,2-1,6 kali dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian, ditunjukkan dengan penurunan nilai k_i , peningkatan waktu paruh ($t_{1/2}$), dan peningkatan ΔG_i dari enzim hasil modifikasi.

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

**MODIFIKASI KIMIA ENZIM A-AMILASE DARI *Aspergillus fumigatus*
MENGUNAKAN NITROFENOL KARBONAT POLIETILEN GLIKOL
(NPC-PEG)**

Oleh

VIRGINIA NUH REZA AMANDA

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
2023**

Judul Skripsi : **MODIFIKASI KIMIA ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus fumigatus* MENGGUNAKAN NITROFENOL KARBONAT POLIETILEN GLIKOL (NPC-PEG)**

Nama Mahasiswa : **Virginia Nuh Reza Amanda**

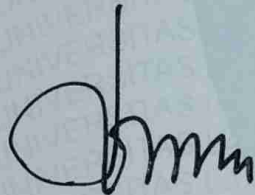
Nomor Pokok Mahasiswa : **1917011012**

Jurusan : **Kimia**

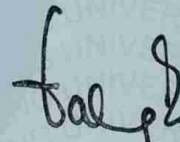
Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

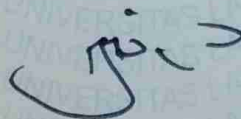


Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S.
NIP 19560905 199203 1 001



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

2. Ketua Jurusan Kimia

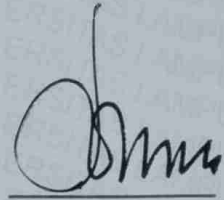


Mulyono, Ph.D.
NIP 19740611 200003 1 002

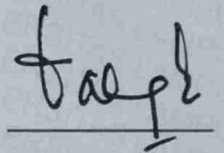
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

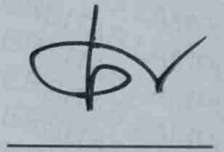
Ketua : Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S.



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



Penguji
Bukan Pembimbing : Dr. Sonny Widiarto, M.Sc.



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.
NIP 19711001 200501 1 002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 2 Agustus 2023

**SURAT PERNYATAAN
KEASLIAN SKRIPSI**

Yang bertanda tangan di bawah ini:

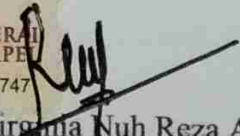
Nama Mahasiswa : Virginia Nuh Reza Amanda
Nomor Pokok Mahasiswa : 1917011012
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi yang berjudul "**Modifikasi Kimia Enzim α -Amilase dari *Aspergillus fumigatus* Menggunakan Nitrofenol Karbonat Polietilen Glikol (NPC-PEG)**" adalah benar karya sendiri dan saya tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data di dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi sesuai dengan kesepakatan.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Bandar Lampung, 15 Agustus 2023
Menvatakan




Virginia Nuh Reza Amanda
1917011012

RIWAYAT HIDUP



Virginia Nuh Reza Amanda lahir di Mengandung Sari, pada 27 April 2001. Penulis merupakan anak kedua dari Bapak Muhammad Nuh dan Ibu Titi Sulaimah. Penulis memiliki satu kakak perempuan, Yeni Nuhricha Sari, satu adik perempuan, Valentina Nuh Rosa Febriana, dan satu adik laki-laki, Afrizal Nuh Rizky Fernando. Penulis telah menyelesaikan pendidikan mulai dari Taman Kanak-kanak di TK Aisiyah Bustanul Atfal, Mengandung Sari, pada tahun 2007, pendidikan sekolah dasar di SDN Kedung Ringin pada tahun 2013, pendidikan sekolah menengah pertama di SMP N 1 Pasir Sakti pada tahun 2016, dan pendidikan sekolah menengah atas di SMAN 1 Pasir Sakti pada tahun 2019.

Pada tahun 2019 penulis diterima sebagai mahasiswa di Universitas Lampung, program S-1 Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, melalui jalur Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN). Penulis juga menjadi salah satu mahasiswa penerima Bantuan Biaya Pendidikan bagi Mahasiswa Miskin Berprestasi (Bidikmisi).

Selama masa perkuliahan penulis pernah menjadi asisten praktikum Kimia Dasar I untuk mahasiswa Teknik Lingkungan Fakultas Teknik, Praktikum Biokimia untuk mahasiswa Biologi Terapan, dan Praktikum Biokimia untuk mahasiswa Kimia pada tahun ajaran 2022-2023. Selain aktif dalam bidang akademik, penulis juga aktif dalam kegiatan organisasi. Organisasi yang pernah penulis ikuti adalah Himpunan Mahasiswa Kimia (Himaki) FMIPA Unila mulai sebagai kader muda pada tahun 2019, anggota Biro Kesekretariatan Himaki FMIPA Unila periode 2020 dan 2021.

Selama berorganisasi di Himaki penulis banyak mengikuti kegiatan baik sebagai peserta maupun panitia, salah satunya sebagai sekretaris pelaksana Chemistry Expo XXV. Penulis pernah mengikuti kegiatan Karya Wisata Ilmiah (KWI) yang diselenggarakan oleh BEM FMIPA Unila pada tahun 2019 di desa Tambah Dadi, Lampung Timur dan melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di desa Siraman, Pekalongan, Lampung Timur pada tahun 2022. Pada tahun yang sama penulis menyelesaikan praktik kerja lapangan dengan judul “Penentuan Kondisi Optimum *Aspergillus fumigatus* Menghasilkan Enzim Alfa-Amilase pada Media Pati Kacang Hijau (*Vigna radiata*)” di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

MOTTO

"Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya"

(Q.S. Al-Baqarah: 286)

"Sesungguhnya bersama kesulitan itu ada kemudahan"

(Q.S. Al-Insyirah: 6)

"Sesungguhnya Allah tidak akan mengubah nasib suatu kaum sehingga mereka mengubah keadaan yang ada pada diri mereka sendiri."

(Q.S. Ar-Ra'd: 11)

"Dan Dia mendapatimu sebagai seorang yang bingung, lalu Dia memberikan petunjuk."

(Q.S. Ad-Duha: 7)

"Ketahuilah bahwa kemenangan bersama kesabaran, kelapangan bersama kesempitan, dan kesulitan bersama kemudahan."

(HR. Tirmidzi)

PERSEMBAHAN

Bismillahirrahmanirrahim

Puji syukur kepada Allah SWT atas limpahan karunia-Nya. Kupersembahkan karya ini sebagai wujud bakti dan tanggung jawabku kepada:

Kedua orang tuaku tercinta,

Papa Muhammad Nuh dan Mama Titi Sulaimah yang telah percaya dan memberi kesempatan kepadaku untuk dapat duduk di bangku perkuliahan. Terima kasih atas kasih sayang, cinta, nasehat, doa, dan dukungan baik materil maupun moril. Papa dan Mama menjadi semangat terbesar penulis untuk menyelesaikan skripsi ini.

Kakakku, Yeni Nuhricha Sari, S.Kom. (Daying) yang selalu menjadi pendengar untuk keluh-kesah dan memberi masukan serta motivasi selama menjalani perkuliahan. Terima kasih karena telah menjadi kakak yang hebat untuk adik-adik.

Adik-adikku, Valentina Nuh Rosa Febriana (Uni) dan Afrizal Nuh Rizky Fernando (Dek iky) yang selalu menghibur dengan canda-tawa, yang menjadi semangat tersendiri untukku.

Pembimbing penelitianku, Prof. Dr. Ir. Yandri, A.S., M.S. dan Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S. yang selalu sabar dalam membimbingku.

Bapak Ibu Dosen Jurusan Kimia atas dedikasi dan ilmu yang telah diberikan selama menempuh pendidikan di kampus.

Virginia Nuh Reza Amanda, terima kasih telah berjuang, terima kasih karena tidak menyerah, terima kasih telah menyelesaikan apa yang kamu mulai. Kamu Hebat.

Serta
Almamaterku Tercinta

SANWACANA

Segala puji bagi Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Modifikasi Kimia Enzim α -Amilase dari *Aspergillus fumigatus* Menggunakan Nitrofenol Karbonat Polietilen Glikol (NPC-PEG)**”. Shalawat serta salam selalu tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW, beserta keluarga dan para sahabat serta umatnya di akhir zaman. Semoga di yaumul akhir kelak mendapatkan syafa’atnya. *Aamiin*.

Penulis menyadari bahwa dalam proses pengerjaan dan penulisan skripsi ini tidak terlepas dari kesulitan dan rintangan yang penulis hadapi. Namun itu semua dapat terlewati berkat rahmat dan ridho Allah SWT serta bantuan, pengarahan, dan bimbingan dari berbagai pihak. Oleh sebab itu, pada kesempatan ini sebagai wujud rasa hormat, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S. selaku Dosen Pembimbing I dan Dosen Pembimbing Akademik, atas kebaikan, bimbingan, arahan, masukan, dan seluruh ilmu pengetahuan yang diberikan selama proses perkuliahan sampai dengan penyelesaian skripsi.
2. Ibu Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S. selaku Dosen Pembimbing II, atas kebaikan, bimbingan, arahan, masukan, dan seluruh ilmu pengetahuan yang diberikan selama proses perkuliahan sampai dengan penyelesaian skripsi.
3. Bapak Dr. Sonny Widiarto, M.Sc. selaku Dosen Pembahas, atas kebaikan, bimbingan, arahan, masukan, dan seluruh ilmu pengetahuan yang diberikan selama proses perkuliahan sampai dengan penyelesaian skripsi.
4. Bapak Mulyono, Ph.D. selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.

5. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung atas seluruh dedikasi dan ilmu yang diberikan kepada penulis selama perkuliahan
6. Bapak dan Ibu Tenaga Kependidikan, Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
7. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si, M.Si. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
8. Kak Hendri Ropingi, S.Si. yang membimbing, membantu, dan memberi motivasi kepada penulis dalam mengerjakan penelitian sehingga dapat diselesaikan dengan lebih cepat.
9. Mba Della selaku PLP Laboratorium Biokimia yang memfasilitasi selama penelitian.
10. Kakak PY'18 (Kak Eka, Kak Dwi, Kak Lily, dan Kak Lupia) yang selalu menjawab pertanyaan penulis tentang penelitian.
11. Teman-teman seperbimbinganku (PY'19), Ayu Ranja Saputri, S.Si., Neng Wiwit Liawati S.Si., dan Diah Indah S.Si. yang telah berjuang bersama menyelesaikan penelitian.
12. Sahabat terbaik penulis "MADESU (Masa Depan Sukses)". Zahra, Happy, Rifdah, Shilvia, Muni, Devy, dan Yohana yang memberikan warna selama masa perkuliahan ini, mendengarkan keluh kesah, memberikan dukungan, dan semangat kepada penulis selama 4 tahun berkuliah.
13. Sahabat kosan : Alinil Masruroh dan Ana Shalihah yang selalu memberi canda-tawa dan menjadi pendengar untuk keluh-kesah penulis.
14. Keluarga Laboratorium Biokimia: Alinil, Cindi, Astin, Verinda, Marcella, Partini, Adiya, Hilda, Rara, Dienus, Dita, Dira, Nabila, Putpita, Putri, Yori, Kak Natasya, Kak Salsa, Kak Aulia, Kak Vezhia, dan PY'20.
15. Teman-teman yang membantu dan kebersamai selama perkuliahan: Rizky Hadi, Kania, Riski Pangestu, Mutiara, Yusuf, dan Ragil
16. Sahabatku dari SMP, Silva May Ananda, S.Pd. yang sama-sama berjuang untuk mengangkat derajat keluarga.
17. Teman-teman Kimia 2019 terutama Kelas A atas segala kenangan selama kuliah.

18. Nenekku tercinta, Almh. Sumini yang penulis harapkan kehadirannya saat wisuda nanti tapi takdir berkata lain. Dan juga Mamaku Tuti Larsih yang selalu membantu penulis khususnya dalam bentuk materil.
19. Bapak dan Ibu kosan yang bersedia tidur larut malam untuk menunggu kepulanganku dari Laboratorium.
20. Ohm Pawat, Yoongi, Yeonjun, dan Jay yang selalu menghibur penulisan saat dalam masa sulit.
21. Serta seluruh pihak yang tidak dapat dituliskan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih terdapat beberapa ketidaksempurnaan, akan tetapi penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat untuk perkembangan ilmu pengetahuan di masa depan.

Bandar Lampung, 15 Agustus 2023
Penulis

Virginia Nuh Reza Amanda

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	4
1.3 Manfaat Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Enzim	5
2.1.1 Klasifikasi Enzim	6
2.1.2 Faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim	7
2.1.3 Teori Pembentukan Kompleks Enzim-Substrat	9
2.2 Stabilitas Enzim	11
2.2.1 Stabilitas Termal Enzim	11
2.2.2 Stabilitas pH Enzim	12
2.3 Enzim Amilase	12
2.4 Isolasi dan Pemurnian Enzim.....	13
2.4.1 Sentrifugasi.....	14
2.4.2 Fraksinasi dengan Garam Ammonium Sulfat (NH ₄) ₂ SO ₄	14
2.4.3 Dialisis	15
2.5 Kinetika Reaksi Enzim	15
2.6 Uji Aktivitas Enzim Amilase	16
2.6.1 Metode Fuwa	16
2.6.2 Metode Mandels	17
2.6.3 Penentuan Kadar Protein Metode Lowry	17
2.7 <i>Aspergillus fumigatus</i>	17
2.8 Modifikasi Kimia	18
2.9 Nitrofenol Karbonat Polietilen glikol (NPC-PEG).....	19
III. METODE PENELITIAN.....	21
3.1 Waktu dan Tempat.....	21

3.2	Alat dan Bahan.....	21
3.3	Prosedur Penelitian	22
3.3.1	Pembiakan Isolat <i>A. fumigatus</i>	22
3.3.2	Pembuatan Media Inokulum dan Fermentasi, Inokulasi <i>A. fumigatus</i> , dan Produksi Enzim α -Amilase	22
3.3.3	Isolasi Enzim α -Amilase	23
3.3.4	Pemurnian Enzim α -Amilase.....	23
3.3.5	Uji Aktivitas dan Kadar Protein Enzim α -Amilase	25
3.3.6	Modifikasi Enzim α -Amilase dengan NPC-PEG	27
3.3.7	Karakterisasi Enzim α -Amilase.....	27
3.3.8	Penentuan Waktu Paruh ($t_{1/2}$), Konstanta Laju Inaktivasi (k_i), dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i).....	28
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	30
4.1	Produksi dan Isolasi Enzim α -Amilase	30
4.2	Pemurnian Enzim α -Amilase	30
4.1.1	Fraksinasi dengan Ammonium Sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	31
4.2.1	Dialisis.....	32
4.3	Modifikasi Kimia Enzim α -Amilase Hasil Pemurnian Menggunakan Nitrofenol Karbonat Polietilen glikol (NPC-PEG) serta Karakterisasi Enzim Hasil Pemurnian dan Hasil Modifikasi.....	34
4.3.1	Penentuan pH Optimum Enzim Hasil Pemurnian dan Modifikasi	34
4.3.2	Penentuan Suhu Optimum Enzim Hasil Pemurnian dan Hasil Modifikasi.....	35
4.3.3	Penentuan K_M dan V_{maks} Enzim Hasil Pemurnian dan Hasil Modifikasi.....	37
4.3.4	Penentuan Stabilitas Termal	39
4.4	Konstanta Laju Inaktivasi (k_i), Waktu Paruh ($t_{1/2}$), dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i).....	40
V.	SIMPULAN DAN SARAN.....	44
5.1	Simpulan	44
5.2	Saran	45
	DAFTAR PUSTAKA	46
	LAMPIRAN.....	52

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Pemurnian enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	33
2. Nilai K_M dan V_{maks} enzim sebelum dan setelah penambahan NPC-PEG konsentrasi 5, 10, dan 15 mg	38
3. Nilai konstanta laju inaktivasi (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi	40
4. Hubungan antara berbagai tingkat kejenuhan ammonium sulfat pada beberapa tingkat fraksi dengan aktivitas enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	53
5. Hubungan antara berbagai tingkat kejenuhan ammonium sulfat pada fraksi 0-15% dan 15-95% dengan aktivitas enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	53
6. Hubungan antara pH optimum terhadap aktivitas unit (U/mL) enzim α -amilase hasil pemurnian sebelum dan sesudah modifikasi menggunakan NPC-PEG 5, 10, dan 15 mg	54
7. Hubungan antara pH optimum terhadap aktivitas sisa (%) enzim α -amilase hasil pemurnian sebelum dan sesudah modifikasi menggunakan NPC-PEG 5, 10, dan 15 mg	54
8. Hubungan antara suhu optimum terhadap aktivitas unit (U/mL) enzim α -amilase hasil pemurnian sebelum dan sesudah modifikasi menggunakan NPC-PEG 5, 10, dan 15 mg	55
9. Hubungan antara pH optimum terhadap aktivitas sisa (%) enzim α -amilase hasil pemurnian sebelum dan sesudah modifikasi menggunakan NPC-PEG 5, 10, dan 15 mg	55
10. Data untuk penentuan K_M dan V_{maks} enzim α -amilase hasil pemurnian berdasarkan persamaan Lineweaver-Burk	56

11.Data untuk penentuan K_M dan V_{maks} enzim α -amilase hasil modifikasi menggunakan NPC-PEG 5, 10, dan 15 mg berdasarkan persamaan Lineweaver-Burk.....	56
12.Hubungan antara stabilitas termal terhadap aktivitas unit (U/mL) enzim α -amilase hasil pemurnian sebelum dan setelah modifikasi menggunakan NPC-PEG	57
13.Hubungan antara stabilitas termal terhadap aktivitas sisa (%) enzim α -amilase hasil modifikasi menggunakan NPC-PEG konsentrasi 5, 10, dan 15 mg	57
14.Penentuan k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim α -amilase hasil pemurnian pada suhu 50 °C.....	58
15.Penentuan k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim α -amilase hasil modifikasi menggunakan NPC-PEG konsentrasi 5, 10, 15 mg pada suhu 60 °C.....	58
16.Absorbansi glukosa pada berbagai konsentrasi	60
17.Absorbansi BSA pada berbagai konsentrasi	62

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Hubungan kecepatan reaksi dengan konsenrasi substrat	7
2. Hubungan aktivitas enzim dengan suhu.....	8
3. Hubungan aktivitas enzim dengan pH	9
4. Teori <i>lock and key</i>	10
5. Teori <i>induced-fit</i>	10
6. Struktur α -amilase	13
7. Grafik Lineweaver-Burk	16
8. Mekanisme pengikatan NPC-PEG pada protein	20
9. Skema fraksinasi dengan ammonium sulfat.....	24
10.Diagram alir penelitian.....	29
11.Hubungan antara tingkat kejenuhan ammonium sulfat (%) terhadap aktivitas spesifik (U/mg) enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	31
12.Hubungan antara tingkat kejenuhan ammonium sulfat (0-15) dan (15-95)% terhadap aktivitas spesifik (U/mg) enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	32
13.Hubungan antara aktivitas sisa (%) enzim α -amilase dengan variasi pH enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi menggunakan NPC-PEG	35
14.Hubungan antara aktivitas sisa (%) enzim α -amilase dengan variasi suhu enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi menggunakan NPC-PEG	36
15.Grafik Lineweaver-Burk enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi menggunakan NPC-PEG	37

16. Grafik stabilitas termal enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi menggunakan NPC-PEG.....	39
17. Grafik $\ln (E_i/E_0)$ enzim hasil pemurnian dan enzim hasil modifikasi untuk penentuan k_i , waktu paruh ($t_{1/2}$), dan ΔG_i	41
18. Kurva standar glukosa.....	60
19. Kurva standar BSA	62

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Aktivitas enzim pada berbagai tingkat kejenuhan ammonium sulfat	53
2. Aktivitas unit dan aktivitas sisa enzim berbagai variasi pH	54
3. Aktivitas unit dan aktivitas sisa enzim berbagai variasi suhu.....	55
4. Data untuk penentuan K_M dan V_{maks}	56
5. Aktivitas unit dan aktivitas sisa enzim penentuan stabilitas termal.....	57
6. Penentuan konstanta laju inaktivasi termal enzim	58
7. Contoh perhitungan ΔG_i dan perhitungan $t_{1/2}$ enzim	59
8. Kurva standar glukosa.....	60
9. Persamaan untuk menghitung aktivitas unit metode Mandels.....	61
10. Kurva standar BSA	62
11. Persamaan untuk menghitung kadar protein metode Lowry.....	63

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Molekul protein yang telah berevolusi untuk bekerja secara efisien di bawah kondisi ringan yang diperlukan untuk mempertahankan fungsionalitas dan integritas sistem biologis dikenal sebagai enzim. Enzim berfungsi sebagai katalis yang telah dioptimalkan melalui evolusi untuk melakukan tugas fisiologisnya di mana semua bentuk kehidupan bergantung (Illanes, 2008). Sebagian besar total protein dalam sel tersusun dari enzim. Dalam suatu sel dapat memuat hingga 2000 jenis molekul enzim (Susanti dan Fibriana, 2017).

Saat ini, enzim yang berasal dari mikroba digunakan secara luas dalam industri dan obat-obatan karena aktivitas katalitik, stabilitas, kemudahan produksi, dan optimasi daripada enzim yang berasal dari tumbuhan dan hewan. Penggunaan enzim di berbagai industri (misalnya, makanan, pertanian, bahan kimia, dan obat-obatan) meningkat pesat karena berkurangnya waktu pemrosesan, efektivitas biaya, input energi yang rendah, ramah lingkungan, dan karakteristik tidak beracun. Enzim dapat mendegradasi senyawa kimia beracun dari limbah industri dan domestik (senyawa fenolik, nitril, amina dll) baik melalui konversi atau degradasi (Singh *et al.*, 2016). Hampir 75% dari semua enzim yang diproduksi pada skala industri bersifat hidrolitik (Liu and Kokare, 2017). Permintaan dan perdagangan untuk enzim industri terus mengalami peningkatan dan pada tahun 2023 diperkirakan mencapai \$7,0 miliar. Sekitar 60% enzim industri dihasilkan dari jamur, 24% dari bakteri, 4% dari ragi, dan sisanya 10% dari tumbuhan dan hewan (Fasim *et al.*, 2021; Raveendran *et al.*, 2018).

Enzim α -amilase (1,4- α -D-glukan-4-glukanohidrolase, E.C.3.2.1.1) adalah enzim kunci dalam metabolisme organisme hidup yang menggunakan pati sebagai sumber karbon dan sumber energi. Enzim α -amilase berupa endoenzim yang dapat menghidrolisis ikatan α -1,4-glikosida pada unit polimer pati yang berantai lurus atau bercabang menghasilkan glukosa (Regulapati *et al.*, 2007). Enzim α -amilase dapat diperoleh dari mikroorganisme seperti jamur dan bakteri. Enzim α -amilase yang dihasilkan dari jamur lebih stabil dibandingkan dengan enzim α -amilase yang dihasilkan dari bakteri. Jamur yang banyak digunakan sebagai penghasil enzim α -amilase ialah kelompok *Aspergillus* (Hidayat dkk., 2016; Suganthi *et al.*, 2011).

Enzim amilase dapat diproduksi oleh mikroorganisme yang tumbuh pada media dengan substrat yang mengandung amilosa dan karbohidrat tinggi. Kebutuhan terhadap amilase terus meningkat hingga 30% dari keseluruhan enzim di dunia (Munoz *et al.*, 2011). Aktivitas amilase kasar dipengaruhi oleh suhu, aktivitas tersebut cenderung meningkat sejalan dengan meningkatnya suhu (Naiola, 2002). Aktivitas enzim berkaitan erat dengan strukturnya, perubahan struktur dapat menyebabkan perubahan aktivitas enzim. Enzim memiliki struktur native tersier yang sensitif terhadap pH dan secara umum denaturasi enzim terjadi pada nilai pH sangat rendah atau tinggi (Copeland, 1994). Amilase yang berasal dari bakteri sumber air panas dengan pH tinggi (termo-alkalifil) sangat dibutuhkan sebagai zat aditif pada industri detergen karena enzim amilase memiliki sifat yang stabil pada suhu dan pH yang tinggi. Selain itu, amilase juga berperan dalam industri tekstil, farmasi, bir, dan produksi gula (Indriati dan Megahati, 2018; Özcan *et al.*, 2001).

Pada umumnya enzim tidak stabil pada suhu dan pH yang ekstrem (Goddette *et al.*, 1993). Dalam bidang industri, diperlukan enzim yang termostabil, atau enzim yang dapat bekerja secara optimum pada suhu antara 60-125°C dan bekerja pada rentang pH yang lebar (Vielle and Zeikus, 1996; Yandri, 2020). Kebanyakan enzim larut dalam air sehingga tidak ekonomis untuk digunakan dalam skala besar. Enzim juga sulit dipisahkan dari substrat dan produk serta sulit digunakan secara berulang (Chibata, 1978). Terdapat tiga cara yang dapat digunakan untuk

meningkatkan kestabilan enzim yaitu amobilisasi, modifikasi kimia, dan mutagenesis terarah (Mozhaev and Martinek, 1984).

Modifikasi kimia merupakan salah satu metode yang digunakan untuk meningkatkan stabilitas enzim yang larut dalam air. Kelebihan dari metode ini dibandingkan dengan metode amobilisasi enzim yaitu: (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 (Janeček, 1993).

NPC-PEG merupakan PEG yang teraktivasi oleh gugus nitrofenol karbonat (NPC) di ujung rantai molekulnya. Modifikasi kimia dengan menggunakan PEG teraktivasi mengandung gugus terminal reaktif yang dapat dihubungkan langsung dengan gugus fungsi dalam protein seperti gugus ϵ -amino dari residu lisin sehingga sisi hidrofobik permukaan enzim terlindungi, hal ini menyebabkan kontak enzim dengan pelarut semakin menurun, kondisi ini sangat menguntungkan bagi struktur enzim α -amilase (Yandri dan Suhartati, 2018). Menurut Yandri dkk. (2005), modifikasi kimia menggunakan PEG-teraktivasi dapat meningkatkan stabilitas termal enzim hasil pemurnian hingga 2-4 kali (berdasarkan penurunan nilai k_i).

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan modifikasi kimia enzim α -amilase dari bakteri *Bacillus subtilis* ITBCCB148 menggunakan beberapa senyawa kimia, diantaranya asam glioksilat, dimetiladipimidat, sitrakonatan anhidrida, CC-PEG, dan NPC-PEG (Anggraini, 2011; Apriyanti, 2010; Sundari, 2011; Yandri dkk., 2003; Yandri, 2004). Dari hasil penelitian tersebut diperoleh hasil bahwa modifikasi kimia dapat meningkatkan stabilitas enzim α -amilase. Pada penelitian ini akan dilakukan isolasi, pemurnian dan modifikasi kimia enzim α -amilase yang diisolasi dari *A. fumigatus* menggunakan senyawa nitrofenol karbonat-polietilenglikol (NPC-PEG) dan diharapkan akan diperoleh peningkatan stabilitas enzim setelah dimodifikasi seperti pada penelitian sebelumnya.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memperoleh enzim α -amilase dari *A. fumigatus* dengan aktivitas dan tingkat kemurnian yang tinggi.
2. Meningkatkan kestabilan enzim α -amilase dari *A. fumigatus* melalui modifikasi kimia dengan menggunakan NPC-PEG.

1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memberikan informasi mengenai teknik isolasi dan pemurnian enzim α -amilase dari *A. fumigatus*.
2. Memberikan informasi dan pengetahuan mengenai cara meningkatkan stabilitas enzim α -amilase.
3. Memberikan informasi mengenai modifikasi kimia enzim α -amilase menggunakan NPC-PEG terhadap stabilitas enzim α -amilase dari *A. fumigatus*.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Enzim

Enzim merupakan molekul protein yang diproduksi oleh sel hidup (Susanti dan Fibriana, 2017). Enzim dapat diartikan sebagai katalis yang telah dioptimalkan melalui evolusi untuk melakukan tugas fisiologisnya dimana semua bentuk kehidupan bergantung (Illanes, 2008). Enzim menyusun sebagian besar total protein dalam sel. Suatu sel dapat memuat 2000 jenis molekul enzim. Enzim memiliki fungsi sebagai katalisator, yaitu mempercepat laju suatu reaksi kimia tanpa ikut terlibat dalam reaksi tersebut (Susanti dan Fibriana, 2017). Enzim dapat mengkatalisis reaksi kimia dengan spesifisitas yang tinggi dan peningkatan kecepatan. Dimana reaksi-reaksi kimia yang terjadi merupakan dasar dari metabolisme semua organisme hidup, dan memberikan peluang besar bagi industri untuk melakukan konversi biokatalitik yang elegan, efisien dan ekonomis (Godfrey and Reichelt, 1982). Enzim diperoleh dari organ-organ pada hewan dan tanaman yang secara katalitik menjalankan berbagai reaksi, seperti redoks, hidrolisis, adisi, isomerasi, transfer radikal, dan pemutusan rantai karbon. Pembentukan enzim memerlukan bahan baku asam amino (Sumardjo, 2006). Enzim umumnya larut baik dalam air sehingga enzim menjadi tidak ekonomis bila digunakan secara berulang (Turah dan Bahri, 2017).

Enzim memiliki kelebihan utama yaitu daya katalitiknya yang sangat besar. Enzim dapat menaikkan kecepatan reaksi sampai 10^{20} dibandingkan reaksi tanpa katalis. Katalis non-enzimatik dapat mempercepat reaksi 10^2 sampai 10^4 . Aktivitas enzim, yaitu, kapasitas enzim untuk mengkatalisis reaksi kimia, sangat bergantung pada struktur molekulnya. Aktivitas enzim bergantung pada

keberadaan struktur yang tepat dari situs aktif, yang terdiri dari sejumlah kecil residu asam amino yang dekat dengan struktur tiga dimensi protein tetapi biasanya berjauhan dalam struktur primer (Illanes, 2008).

2.1.1 Klasifikasi Enzim

Menurut Marks *et al.* (2000), enzim diklasifikasikan berdasarkan jenis reaksi yang dikatalisis, yaitu:

- a. Oksidoreduktase, pemindahan elektron (sebagai e⁻, ion hidrida, atau atom hidrogen) dari suatu senyawa ke suatu akseptor. Contoh: NAD oksido reduktase (CEIUB); Alkohol dehidrogenase (trivial).
- b. Transferase, pemindahan sebuah gugus fungsional, misalnya gugus asil, amino, metil, atau fosfat. Contoh: Glukosa-6-transferase (CEIUB); Glukokinase (trivial).
- c. Hidrolase pemisahan ikatan C-O, C-N, atau C-S dengan penambahan H₂O pada ikatan. Contoh: α -1-4-glukan 4-glukanohidrolase (CEIUB); α -amilase (trivial).
- d. Liase, penambahan gugus ke ikatan rangkap atau pembentukan ikatan rangkap. Contoh: 2-Asam oksalokarboksi-liase (CEIUB); piruvat dekarboksilase (trivial).
- e. Isomerase, pemindahan gugus di dalam molekul untuk menghasilkan bentuk isomerik. Contoh: Alanina rasemase (CEIUB); alanina rasemase (trivial).
- f. Ligase, pembentukan ikatan C-C, C-O, C-N, dan C-S, disertai penguraian ikatan berenergi tinggi misalnya ATP. Contoh: Karbondioksida ligase (CEIUB); piruvat karboksilase (trivial).

Menurut Montgomery (1993), enzim diklasifikasi enzim berdasarkan tempat bekerjanya, yaitu:

- a. Endoenzim, disebut juga enzim intraseluler, yaitu enzim yang bekerja di dalam sel.
- b. Eksoenzim, disebut juga enzim ekstraseluler, yaitu enzim yang bekerja di luar sel.

Berdasarkan cara terbentuknya enzim diklasifikasikan sebagai berikut:

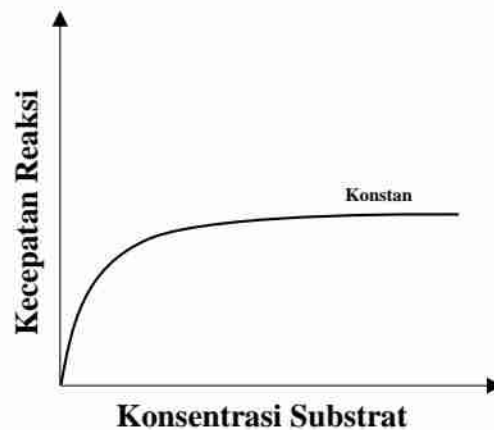
- a. Enzim konsumtif, merupakan enzim yang jumlahnya dipengaruhi kadar substratnya. Contoh: amilase
- b. Enzim adaptif, merupakan enzim yang pembentukannya dirangsang sebab adanya substrat. Contoh: enzim β -galactosidase ditumbuhkan di dalam medium yang mengandung laktosa (Lehninger, 2005).

2.1.2 Faktor Yang Mempengaruhi Kerja Enzim

Adapun faktor yang mempengaruhi kerja enzim sebagai berikut:

a. Konsentrasi Substrat

Jika konsentrasi substrat diturunkan dan konsentrasi enzim tetap, maka laju reaksi menjadi lambat sehingga kompleks enzim-substrat yang terbentuk menjadi sedikit. Hal ini karena tidak semua enzim dapat diikat oleh substrat. Jika konsentrasi substrat dinaikkan dan kadar enzim tetap, maka laju reaksi akan naik sampai kondisi konstan, yaitu ketika semua substrat sudah diikat oleh enzim seperti ditunjukkan pada Gambar 1 (Poedjiadi dan Supriyanti, 1994).

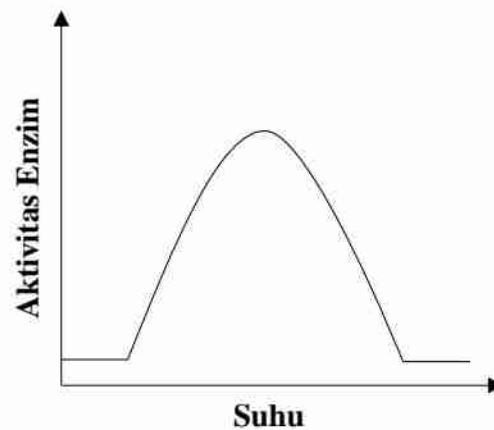


Gambar 1. Hubungan kecepatan reaksi dengan konsenrasi substrat

b. Suhu

Aktivitas enzim meningkat sejalan dengan meningkatnya suhu sampai pada titik tertentu. Pada suhu yang lebih besar, kecepatan molekul substrat akan

meningkat yang menyebabkan terjadinya tumbukan dengan enzim energi sehingga substrat jadi berkurang. Jika suhu optimum sudah terlewati maka akan terjadi denaturasi atau rusaknya bentuk 3 dimensi enzim yang menyebabkan enzim tidak dapat berikatan lagi dengan substrat (Harahap dkk., 2021). Hubungan aktivitas enzim dengan suhu dapat dilihat pada Gambar 2.



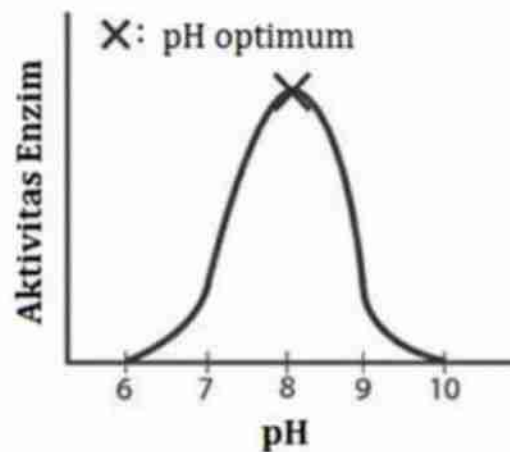
Gambar 2. Hubungan aktivitas enzim dengan suhu

c. Konsentrasi enzim

Konsentrasi enzim secara langsung mempengaruhi laju reaksi enzimatik sehingga dengan bertambahnya konsentrasi enzim maka laju reaksi meningkat (Poedjiadi dan Supriyanti, 1994). Laju reaksi tersebut meningkat secara linier selama konsentrasi enzim jauh lebih sedikit daripada konsentrasi substrat.

d. pH

Setiap enzim memiliki profil yang berbeda terkait dengan pH lingkungannya. Sebagian besar enzim aktif pada kisaran pH antara 4,5 sampai 8 dan beberapa sangat aktif pada pH rendah (contoh: pepsin). pH dimana suatu enzim menunjukkan aktivitas maksimum disebut pH optimum. Perubahan pH dapat mengakibatkan pecahnya ikatan sehingga konformasi dan aktifitas enzimnya akan berubah (Sutrisno, 2017). Hubungan aktivitas enzim dengan pH ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Hubungan aktivitas enzim dengan pH (Sutrisno, 2017)

e. Inhibitor

Inhibitor merupakan suatu zat kimia yang dapat menghambat aktivitas enzim (Wirahadikusumah 2001). Terdapat bahan kimia seperti ion logam dapat menghambat aktivitas enzim. Ada beberapa jenis inhibitor antara lain:

- Inhibitor kompetitif: berkompetisi dengan substrat “merebut” situs aktif.
- Inhibitor non-kompetitif: tidak berebut situs aktif tapi terikat pada tempat lain pada enzim yang menyebabkan perubahan bentuk situs aktif, sehingga aktivitas enzim terhambat (Sutrisno, 2017).

f. Pelarut organik

Keuntungan penggunaan pelarut dalam reaksi enzimatik yaitu kelarutan substrat-organik dan enzim akan lebih tinggi dari air serta meningkatkan kestabilan enzim dengan pelarut (Kwon *and* Rhee, 1986).

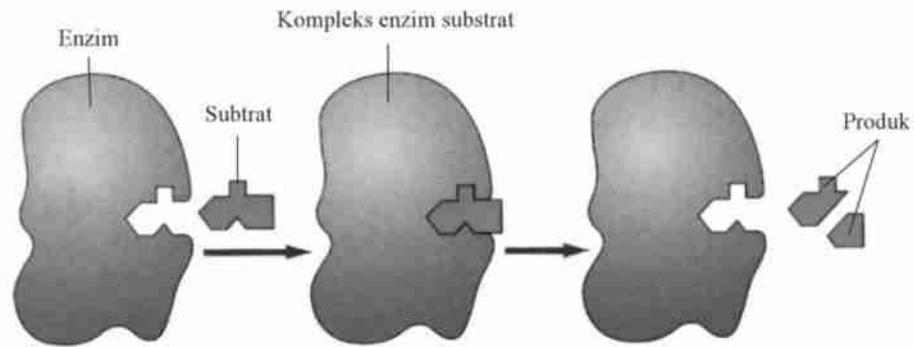
2.1.3 Teori pembentukan kompleks enzim-substrat

Menurut Abdurahman (2008), terdapat dua teori pembentukan enzim-substrat, yaitu:

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

Teori ini menjelaskan cara kerja enzim mirip dengan mekanisme kunci gembok dan anak kunci. Enzim diibaratkan sebagai kunci gembok yang mempunyai sisi

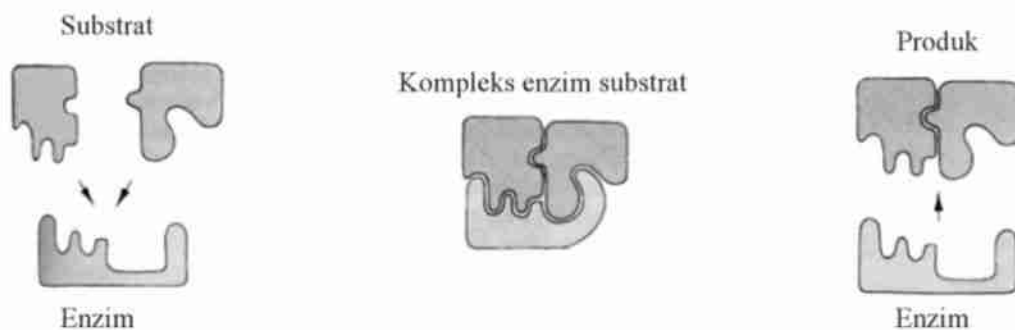
aktif sedangkan substrat diibaratkan sebagai anak kunci. Substrat memasuki sisi aktif enzim seperti anak kunci memasuki kunci gembok. Substrat tersebut kemudian diubah menjadi produk yang kemudian dilepaskan dari sisi aktif dan enzim siap menerima substrat yang baru. Teori *lock and key* dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Teori *lock and key* (Abdurahman, 2008)

b. Teori *Induced-Fit* (Ketetapan Induksi)

Teori ini menyatakan bahwa enzim menyesuaikan bentuk untuk berikatan dengan substrat. Penyesuaian bentuk tersebut bertujuan untuk meningkatkan kecocokan dengan substrat sehingga ikatan enzim substrat lebih reaktif. Molekul enzim memiliki sisi aktif tempat melekatnya substrat dan terbentuklah molekul kompleks enzim-substrat. Molekul enzim akan kembali ke bentuk sempurna setelah terbentuknya produk. Teori *induced-fit* dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Teori *induced-fit* (Abdurahman, 2008)

2.2 Stabilitas Enzim

Stabilitas enzim dapat diartikan sebagai kestabilan aktivitas enzim selama penyimpanan dan penggunaan enzim tersebut, serta kestabilan terhadap senyawa yang bersifat merusak seperti pelarut tertentu (asam atau basa), oleh pengaruh suhu dan kondisi-kondisi nonfisiologis lainnya (Kazan *et al.*, 1997). Terdapat dua cara yang dapat digunakan untuk memperoleh enzim dengan stabilitas tinggi, yaitu menggunakan enzim yang memiliki stabilitas ekstrim alami dan mengusahakan peningkatan stabilitas enzim yang secara alami kurang atau tidak stabil. Peningkatan stabilitas enzim dapat dilakukan dengan cara amobilisasi, liofilisasi dan zat aditif, modifikasi kimia, *protein engineering*, serta *medium engineering* (Bommarius and Paye, 2013; Polizzi *et al.*, 2007). Faktor-faktor yang mempengaruhi stabilitas enzim diantaranya:

2.2.1 Stabilitas Termal Enzim

Enzim merupakan makromolekul yang peka terhadap lingkungannya. Semakin tinggi temperatur maka akan terjadi perubahan struktur enzim yang diikuti oleh hilangnya aktivitas katalitik dari enzim tersebut. Di Indonesia, temperatur optimum bagi proses enzimatik dilakukan pada temperatur kamar. Hampir semua enzim memiliki aktivitas optimum pada temperatur sekitar 30°C dan denaturasi dimulai pada temperatur 45°C (Winarno, 1992). Pada suhu yang terlalu rendah maka kemantapan enzim tinggi, tetapi aktivitasnya rendah. Pada suhu yang terlalu tinggi aktivitas enzim tinggi, tetapi kemantapannya rendah. Kenaikan suhu enzim akan mempengaruhi laju reaksi, namun hanya sampai batas tertentu dan dapat menyebabkan terjadinya denaturasi protein. Daerah suhu saat kemantapan dan aktivitas enzim cukup besar disebut suhu optimum (Wirahadikusumah, 2001). Proses inaktivasi enzim pada suhu tinggi berlangsung dalam dua tahap, yaitu:

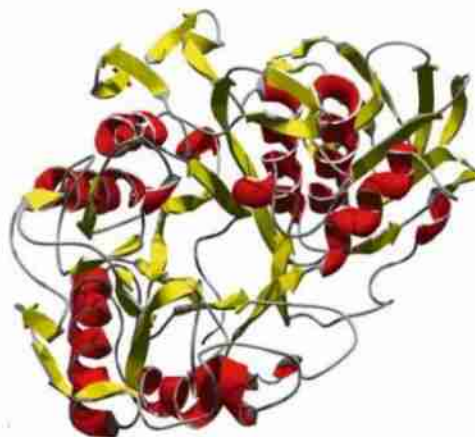
1. Adanya pembukaan parsial struktur sekunder, tersier, dan kuartener molekul enzim.
2. Perubahan struktur primer enzim karena adanya kerusakan asam amino tertentu oleh panas (Ahern and Klivanov, 1987).

2.2.2 Stabilitas pH Enzim

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, 1992). Enzim yang sama seringkali memiliki pH optimum yang berbeda tergantung dari sumber enzim yang digunakan (Mangunwidjaja dan Suryani, 1994). Reaksi enzimatik akan kehilangan aktivitas katalitiknya secara cepat dan *irreversible* apabila jauh dari rentang pH optimumnya. Inaktivasi ini terjadi karena *unfolding* molekul protein sebagai hasil dari perubahan kesetimbangan elektrostatik dan ikatan hidrogen (Kazan *et al.*, 1997).

2.3 Enzim Amilase

Enzim amilase adalah enzim yang mampu menghidrolisis amilum dan menghasilkan glukosa. Enzim amilase dapat dihasilkan oleh semua makhluk hidup untuk mengkatalis atau mempercepat reaksi biokimia. Enzim amilase untuk kebutuhan industri diekstraksi dari berbagai jenis sel makhluk hidup, namun saat ini enzim lebih banyak diekstraksi dari berbagai jenis mikroorganisme, sebab mikroorganisme menghasilkan enzim yang dapat dimanfaatkan manusia dalam jumlah dan jenis yang sangat bervariasi. Selain itu, mikroorganisme dapat dikultur untuk memperoleh enzim yang dihasilkan (Ningsih dkk., 2012). Amilase dapat diperoleh dari berbagai sumber mikroorganisme, tanaman, dan hewan. Enzim α -amilase terdapat pada binatang dan tumbuhan yang merupakan endoglikosidase (Azhar, 2016). Amilase tidak stabil dalam larutan berair dan mengalami *retrograde* (mengendap secara spontan) dikarenakan rantai liniernya yang menyelaraskan diri dengan ikatan hidrogen dan dengan demikian membentuk agregat. Struktur α -amilase dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Struktur α -amilase (Polaina and MacCabe, 2007)

Amilase merupakan enzim yang memiliki kemampuan memecah ikatan glukosida pada polimer pati (Vaseekaran *et al.*, 2011). Enzim ini mengkatalisis reaksi hidrolisis ikatan glikosida α -(1,4) internal secara *random* pada amilosa dan amilopektin. Enzim lainnya adalah β -amilase yang ditemukan pada biji dan umbi beberapa tumbuhan. Enzim β -amilase adalah sebuah *exoglycosidase* (memutus ikatan glikosida terminal). Enzim ini mengkatalisis reaksi hidrolisis ikatan glikosida melepaskan maltosa dari ujung non-pereduksi amilopektin. Dengan demikian, α -amilase dan β -amilase merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis ikatan glikosidik α -(1,4) (Azhar, 2016). Sedangkan enzim glukoamilase menghidrolisis ikatan glukosida alfa-1,4 tetapi hasilnya beta-glukosa yang mempunyai konfigurasi berlawanan dengan hasil hidrolisis oleh enzim alfa-amilase. Selain itu, enzim ini dapat pula menghidrolisis ikatan glikosida alfa-1,6 dan alfa-1,3 tetapi dengan laju yang lebih lambat dibandingkan dengan hidrolisis ikatan glikosida α -1,4 (Judoamidjojo dkk., 1989).

2.4 Isolasi Dan Pemurnian Enzim

Amilase dapat diperoleh dari berbagai sumber mikroorganisme, tanaman, dan hewan. Enzim α -amilase terdapat pada binatang dan tumbuhan yang merupakan endoglikosidase (Azhar, 2016). Enzim α -amilase termasuk ke dalam enzim ekstraseluler dimana enzim ini diproduksi di dalam sel namun bekerja di luar sel,

sehingga mudah diisolasi dan dipisahkan dari pengotor lain serta tidak banyak bercampur dengan bahan-bahan sel lain (Pelczar dan Chan, 1986). Metode yang digunakan untuk isolasi dan pemurnian enzim diantaranya :

2.4.1 Sentrifugasi

Metode sentrifugasi dapat digunakan untuk memisahkan enzim ekstraseluler dari sisa-sisa sel. Sentrifugasi akan menghasilkan enzim terlarut dalam bentuk filtrat yang jernih dan sisa-sisa sel lain serta pengotor dalam bentuk endapan yang terikat kuat pada dasar tabung. Sel-sel mikroba biasanya mengalami sedimentasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit (Scopes, 1994). Proses sentrifugasi dilakukan pada suhu dingin 2-4 °C untuk mencegah denaturasi enzim karena proses tersebut akan melepaskan panas (Suhartono, 1989).

2.4.2 Fraksinasi dengan Garam Ammonium Sulfat (NH₄)₂SO₄

Garam yang sering digunakan untuk fraksinasi adalah garam ammonium sulfat. Ammonium sulfat dapat digunakan untuk fraksinasi karena kebanyakan enzim tahan dengan garam ini, memiliki kelarutan yang besar di dalam air, mempunyai daya pengendapan besar, dan mempunyai efek penstabil terhadap kebanyakan enzim (Wirahadikusumah, 2001). Prinsip pengendapan dengan ammonium sulfat didasarkan pada kelarutan protein yang merupakan interaksi antara gugus polar dengan molekul air, interaksi ionik protein dengan garam dan daya tolak-menolak protein yang bermuatan sama. Kelarutan protein pada pH dan suhu tertentu akan meningkat saat konsentrasi garam meningkat sampai pada konsentrasi tertentu (*salting in*). Selanjutnya, pada penambahan garam dengan konsentrasi tertentu, kelarutan protein akan menurun (*salting out*), karena molekul air yang berikatan dengan ion-ion garam semakin banyak sehingga terjadi penarikan selubung air yang mengelilingi permukaan protein. Peristiwa pengendapan dengan garam ammonium sulfat mengakibatkan protein saling berinteraksi, beragregasi dan kemudian mengendap (Scopes, 1994).

2.4.3 Dialisis

Dialisis digunakan untuk menghilangkan molekul kecil seperti garam atau larutan protein dari enzim yang didapatkan melalui tahapan pemurnian dengan garam ammonium sulfat. Prinsip dialisis adalah difusi zat terlarut melalui membran semipermeabel yang bertindak seperti saringan dengan ukuran pori tertentu. Molekul dengan jari-jari molekul yang lebih besar dari ukuran pori akan tertahan seluruhnya sedangkan yang berjari-jari lebih kecil akan lolos (Scopes, 1994). Proses dialisis terjadi karena adanya perbedaan konsentrasi zat terlarut di dalam dan di luar membran. Difusi zat terlarut bergantung pada suhu dan viskositas larutan. Meskipun suhu tinggi dapat meningkatkan laju difusi, tetapi sebagian besar protein dan enzim stabil pada suhu 4-8 °C sehingga dialisis harus dilakukan pada kondisi dingin (Deuscher, 1990). Proses pemurnian enzim dilakukan untuk memperoleh enzim yang berkualitas. Tingkat keberhasilan pemurnian dapat dilihat dari rendemen dan aktivitas spesifiknya. Enzim hasil pemurnian memiliki aktivitas spesifik yang lebih tinggi dikarenakan protein yang terdapat di dalam enzim semakin sedikit sehingga aktivitas spesifik enzim menjadi lebih tinggi (Pratiwi dkk., 2015; Wijaya, 2002). Menurut Page 1989, aktivitas spesifik enzim diperoleh berdasarkan persamaan berikut :

$$\text{Aktivitas Spesifik} = \frac{\text{aktivitas unit}}{\text{kadar protein}} \dots\dots\dots (1)$$

Keterangan:

Aktivitas Spesifik : Unit per mg protein

Total Protein : mg protein

2.5 Kinetika Reaksi Enzim

Parameter yang digunakan dalam kinetika reaksi enzim adalah konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}). Berdasarkan postulat Michaelis-Menten, suatu reaksi enzimatik terdiri dari beberapa fase yaitu pembentukan kompleks enzim substrat (ES), dengan E adalah enzim dan S adalah substrat, modifikasi dari substrat membentuk produk (P) yang masih berikatan

dengan enzim (EP), dan pelepasan produk dari molekul enzim (Shahib, 2005). Semakin kecil harga K_M , maka interaksi antara enzim dan substrat semakin baik dan laju reaksi semakin cepat. Bila konsentrasi substrat cukup besar sehingga semua enzim terikat pada substrat dalam bentuk kompleks enzim-substrat, maka akan didapat laju reaksi maksimum, V_{maks} (Wirahadikusumah, 2001).

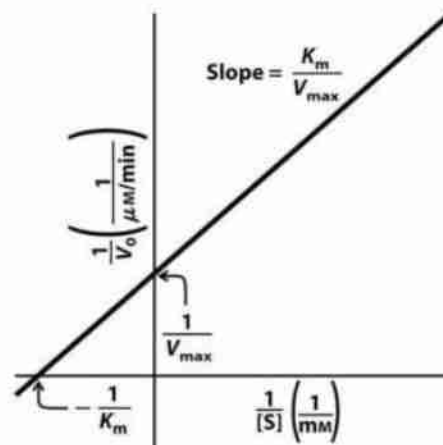
Nilai K_M suatu enzim dapat dihitung dengan persamaan Lineweaver-Burk yang diperoleh dari persamaan Michaelis-Menten yang kemudian dihasilkan suatu diagram Lineweaver-Burk yang ditunjukkan Gambar 7 (Page, 1997).

Persamaan Michaelis-Menten :

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]} \dots\dots\dots (2)$$

Persamaan Lineweaver-Burk :

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



Gambar 7. Grafik Lineweaver-Burk (Lehninger *et al.*, 2005)

2.6 Uji Aktivitas Enzim Amilase

2.6.1 Metode Fuwa

Aktivitas α -amilase ditentukan dengan metode Fuwa yaitu berdasarkan pengurangan jumlah substrat pati yang terhidrolisis dan menghasilkan warna biru

setelah penambahan iodin. Warna tersebut akan menyerap cahaya monokromatis pada λ_{maks} 600 nm. Uji Fuwa merupakan uji yang paling spesifik untuk mengidentifikasi aktivitas enzim amilase karena waktu reaksi yang cukup singkat yaitu 10 menit inkubasi dan pati sebagai substrat (Fuwa, 1954).

2.6.2 Metode Mandels

Metode mandels didasarkan pada pembentukan glukosa dari substrat pati oleh enzim amilase yang dideteksi dengan penambahan pereaksi DNS (*dinitrosalisilic acid*) ke dalam larutan uji serta proses pemanasan, sehingga akan dihasilkan larutan berwarna kuning hingga merah pekat. Semakin pekat warna larutan sampel dibandingkan larutan kontrol, maka semakin tinggi aktivitasnya (Mandels *et al.*, 1976). Warna tersebut akan menyerap cahaya monokromatis pada λ_{maks} 510 nm (Fessenden dan Fessenden, 1982).

2.6.3 Penentuan Kadar Protein Metode Lowry

Penentuan kadar protein menggunakan metode Lowry terjadi pada kondisi alkali dan ion tembaga (II) yang akan membentuk kompleks dengan protein. Ion Cu^{2+} akan bereaksi dengan ikatan peptida pada protein dan membentuk senyawa kompleks. Senyawa kompleks Cu^{2+} yang terbentuk akan tereduksi menjadi Cu^+ pada kondisi alkalis. Kemudian Cu^+ akan terikat pada rantai samping triptofan, tirosin, atau sistein dari protein akan bereaksi dengan reagen Folin-Ciocalteu. Secara perlahan reagen akan direduksi menjadi heteromolibdenum menghasilkan warna hijau kebiruan yang akan menyerap cahaya monokromatis pada λ_{maks} 750 nm. Intensitas warna yang diperoleh tergantung pada kandungan triptofan dan tirosinnya (Lowry, 1951).

2.7 *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus merupakan genus yang terdapat dimana-mana dan hampir dapat tumbuh pada semua substrat. Fungi ini akan tumbuh pada buah busuk, sayuran,

biji-bijian, roti, dan bahan pangan lainnya. Beberapa spesies merupakan fungi yang patogen, misalnya yang dapat menyebabkan penyakit Aspergilosis, dan di antaranya bersifat saprofit yang banyak ditemukan pada bahan pangan (Makfoeld, 1993). Beberapa spesies *Aspergillus* yang dapat menyebabkan penyakit yaitu *A. flavus*, *A. fumigatus*, dan *A. niger* (Sutanto dkk., 2011).

Aspergillus fumigatus ialah jamur saprotopfik yang memiliki peran penting dalam daur ulang karbon dan nitrogen lingkungan. *A. fumigatus* memiliki beberapa karakteristik yang dapat berkontribusi terhadap patogenesisnya. Tidak seperti spesies jamur lainnya, *A. fumigatus* tumbuh dengan baik pada suhu 37°C dan mampu pertumbuhan pada 50°C. Selain itu, *A. fumigatus* memiliki spora yang berukuran sangat kecil (3–5 m), dibandingkan dengan Aspergilli lainnya, yang memungkinkan spora untuk menembus jauh ke dalam paru-paru (Latgé, 1999).

Klasifikasi *A. fumigatus*

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

2.8 Modifikasi Kimia

Modifikasi kimia termasuk ke salah satu metode yang dapat digunakan untuk meningkatkan stabilitas enzim yang larut dalam air. Kelebihan dari 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. Mozhaev *et al.* (1990) dan Janeček (1993) menyarankan modifikasi kimia enzim dengan senyawa berbobot molekul rendah merupakan metode paling sederhana yang dapat dilakukan. Proses modifikasi dilakukan dengan cara menginkubasi larutan enzim dengan larutan pemodifikasi, jika perlu enzim yang telah termodifikasi dipisahkan dari campuran dengan cara dialisis atau kromatografi kolom penyaringan molekul.

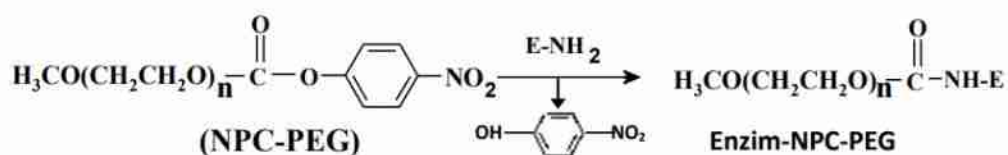
Berdasarkan struktur dari enzim, gugus fungsi yang memiliki kemungkinan paling besar bereaksi dengan zat pemodifikasi adalah gugus fungsi yang terletak di permukaan. Sedangkan gugus ϵ -amino dari lisin merupakan gugus yang paling banyak dilibatkan, karena gugus ini paling melimpah dan paling mudah didekati dari rantai samping asam amino suatu enzim (Janeček, 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). Kazan *et al.* (1997) melaporkan bahwa modifikasi kimia tidak selalu menyebabkan terjadinya perubahan suhu optimum enzim hasil modifikasi.

2.9 Nitrofenol Karbonat Polietilen Glikol (NPC-PEG)

NPC-PEG merupakan PEG yang teraktivasi oleh gugus nitrofenol karbonat (NPC) di ujung rantai molekulnya. Adanya gugus NPC memungkinkan adanya reaksi cepat dengan amina untuk memodifikasi protein, peptida, atau permukaan lainnya yang mengandung gugus amino baik pada residu lisin atau N-terminalnya seperti pada Gambar 8. Menurut Yandri (2004), modifikasi kimia dengan NPC-PEG dapat meningkatkan stabilitas enzim. Enzim hasil modifikasi dengan NPC-PEG stabil pada pH 6,5. Semua enzim hasil modifikasi meningkat stabilitasnya

terhadap pH dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Enzim hasil modifikasi stabil antara pH 4,5 – 9,0. Aktivitas (%) enzim hasil modifikasi (NPC-PEG 56%) pada pH 4,5 adalah 86,6, sedangkan pada pH 9,0 adalah 74,8; NPC-PEG 76% pada pH 4,5 adalah 88,2, sedangkan pada pH 9,0 adalah 75,4; NPC-PEG 89% pada pH 4,5 adalah 80,2, sedangkan pada pH 9,0 adalah 69,1. Sedangkan suhu optimum dari modifikasi enzim dengan NPC-PEG yaitu pada suhu 60°C. Pada enzim hasil modifikasi dan hasil pemurnian tidak terjadi perubahan suhu optimum, diperkirakan karena berat molekul PEG yang besar, sehingga tidak dapat memasuki celah menuju pusat aktif enzim dan modifikasi kimia hanya terjadi pada residu lisin yang hanya dipermukaan. Meskipun tidak terjadi perubahan suhu optimum, akan tetapi aktivitas enzim hasil modifikasi dengan NPC-PEG pada suhu yang lebih tinggi menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian (Yandri dan Suhartati, 2018).



Gambar 8. Mekanisme pengikatan NPC-PEG pada Protein (Yang *et al.*, 1996)

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2022 sampai Juni 2023 di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

3.2 Alat dan Bahan

Adapun alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu: alat-alat gelas, Spektrofotometer *Cary-100 UV-Vis Agilent Technologies*, *laminar air flow* CRUMA model 9005-FL, jarum ose, mikropipet *Eppendorf*, neraca analitik, lemari pendingin, pembakar spiritus, sentrifuga *Cole-Parmer*, tabung sentrifuga, oven, *autoclave* model S-90N, *shaker inkubator*, *waterbath*, inkubator, pH meter, *magnetic stirrer*, botol film, dan botol plastik.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu: *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Himedia), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck), KH_2PO_4 (Merck), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 (Merck), NaH_2PO_4 (Merck), CoCl_2 , Na_2HPO_4 (Merck), KI, I_2 , Na_2CO_3 (Merck), NaOH, HCl, pepton, urea, Na/K-tartrat, Folin Ciocalteu, *Bovine Serum Albumin* (BSA), *Dinitrosalisilic Acid* (DNS), buffer borat, akuades, pati terlarut, kantong selofan, kapas sumbat, kasa, aluminium foil, kertas, karet, kertas saring, alkohol 70%, tisu, es batu, dan NPC-PEG.

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 Pemiakan Isolat *A. fumigatus*

a. Pembuatan Media Agar Miring

Timbang 3,9 gram PDA dan 0,1 gram pati kemudian dilarutkan dalam 100 mL akuades dan dipanaskan. Kemudian dituang ke 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 mengambil 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 mengandung isolat diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama beberapa hari (Yandri *et al.*, 2022).

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

a. Pembuatan Media Inokulum dan Fermentasi

Media inokulum digunakan sebagai medium adaptasi awal pertumbuhan dan medium perkembangbiakan jamur pada media cair tanpa terjadinya produksi enzim α -amilase. Sedangkan media fermentasi digunakan sebagai medium pertumbuhan dan perkembangbiakan yang disertai produksi enzim amilase. Media inokulum dibuat dengan cara menimbang bahan-bahan yang terdiri dari 3,5 gram $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 gram KH_2PO_4 , 0,75 gram $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0125 gram $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0035 gram $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,75 gram urea, 0,005 gram CoCl_2 , CaCl_2 0,75 gram, 1,875 gram pati, dan pepton 1,875 gram. Kemudian bahan-bahan tersebut

dilarutkan dalam 250 mL buffer fosfat pH 6,0 dalam labu Erlenmeyer 500 mL dan disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit (Yandri *et al.*, 2022).

b. Inokulasi *A. fumigatus*

Pindahkan 3 ose *A. fumigatus* dari media agar miring ke dalam media inokulum secara aseptis, lalu dikocok dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam.

c. Produksi Enzim α -Amilase

Produksi enzim α -amilase dilakukan dengan memindahkan media inokulum sebanyak 2% dari jumlah media fermentasi ke dalam media fermentasi secara aseptis lalu dikocok menggunakan *shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm selama 112 jam (Yandri *et al.*, 2022).

3.3.3 Isolasi Enzim α -Amilase

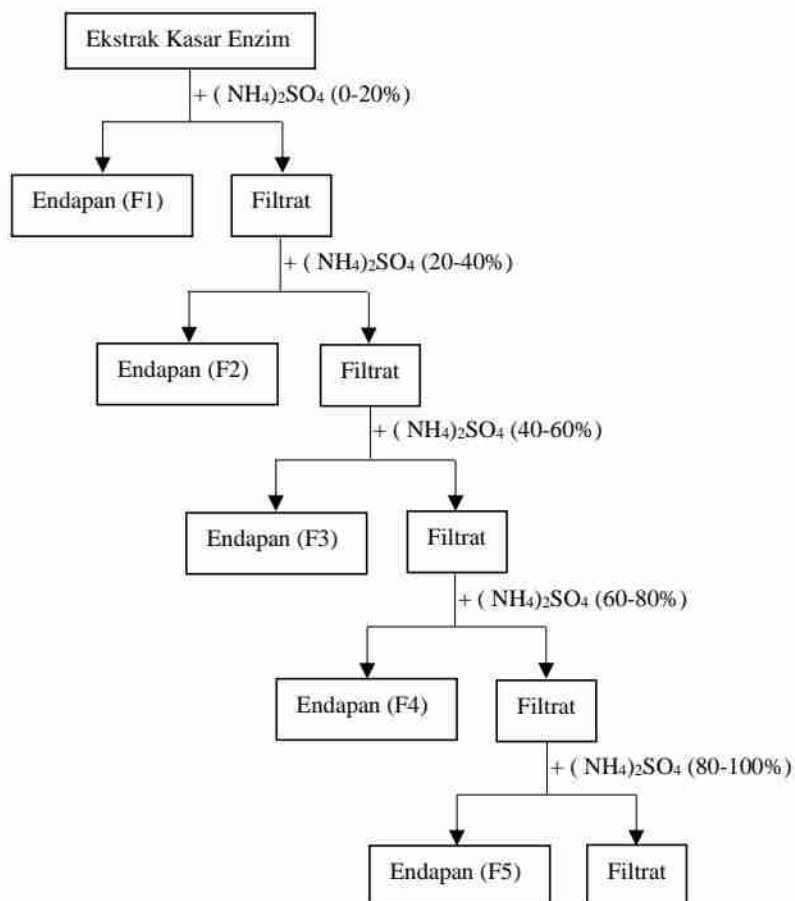
Isolasi enzim α -amilase dilakukan dengan menggunakan metode sentrifugasi. Metode sentrifugasi didasarkan pada kecepatan sedimentasi dengan cara pemusingan. Sentrifugasi dilakukan pada suhu rendah untuk menjaga agar enzim tidak kehilangan aktivitasnya (Suhartono, 1992). Masukkan sampel ke dalam botol sentrifus kemudian pisahkan filtrat dengan endapan menggunakan sentrifuga dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit pada suhu dingin (2-4 °C) lalu saring menggunakan kertas saring. Masukkan filtrat ke dalam botol sampel. Filtrat yang dihasilkan merupakan ekstrak kasar enzim yang selanjutnya dapat diuji aktivitasnya dengan Spektrofotometer UV-Vis menggunakan metode Fuwa dan diukur kadar proteinnya menggunakan Metode Lowry.

3.3.4 Pemurnian Enzim α -Amilase

Enzim hasil isolasi dimurnikan dengan metode fraksinasi menggunakan ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan dialisis.

a. Fraksinasi dengan Ammonium Sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Ekstrak kasar enzim yang diperoleh dari hasil isolasi dimurnikan dengan fraksinasi menggunakan garam ammonium sulfat dengan berbagai kejenuhan yaitu (0-20); (20-40); (40-60); (60-80), dan (80-100)% untuk mengetahui fraksi enzim α -amilase terendapkan.



Gambar 9. Skema fraksinasi dengan Ammonium Sulfat

Penambahan ammonium sulfat pada ekstrak kasar enzim dilakukan secara perlahan sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Endapan protein enzim yang diperoleh pada tiap fraksi kejenuhan ammonium sulfat dipisahkan dari filtratnya menggunakan sentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Selanjutnya, endapan yang diperoleh dilarutkan dengan buffer fosfat 0,025 M pH 6,0 lalu diuji aktivitasnya dengan metode Fuwa dan kadar proteinnya dengan metode Lowry. Kemudian, filtrat yang didapat dari fraksi 0-20% diendapkan kembali dengan fraksi kejenuhan 20-40% dengan prosedur yang sama hingga

fraksi kejenuhan 80-100% (Yandri *et al.*, 2022). Skema fraksinasi dengan menggunakan ammonium sulfat ditunjukkan pada Gambar 9.

b. Dialisis

Enzim hasil fraksinasi dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis selama 24 jam menggunakan buffer fosfat 0,01 M pH 6,5 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 terus-menerus sampai ion-ion di dalam selofan dapat diabaikan. Untuk mengetahui bahwa sudah tidak ada lagi ion-ion garam dalam selofan, maka diuji dengan menambahkan larutan $\text{Ba}(\text{OH})_2$ atau BaCl_2 di luar selofan. Bila terbentuk endapan putih BaSO_4 di luar selofan, maka ion sulfat telah berhasil dikeluarkan dari dalam selofan. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas dengan metode Fuwa dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.

3.3.5 Uji Aktivitas dan Kadar Protein Enzim α -Amilase

a. Metode Fuwa

1. Pembuatan pereaksi pengukuran aktivitas α -amilase metode Fuwa (Fuwa, 1954)
 - Pereaksi iodin: KI 2 gram dilarutkan dengan 10 mL akuades dalam labu takar 100 mL. I_2 0,2 gram dimasukkan ke dalam labu takar dan ditambahkan akuades hingga tanda batas miniskus.
 - Larutan pati: pati 0,1 gram dilarutkan dalam akuades 100 mL dan dipanaskan hingga larut.
 - Larutan HCl 1N: HCl pekat 12 N diencerkan menjadi 1N. Sebanyak 8,3 mL HCl pekat dimasukkan dalam labu ukur 100 mL, akuades ditambahkan hingga batas miniskus.
2. Pengujian aktivitas enzim α -amilase metode Fuwa

Aktivitas α -amilase ditentukan dengan metode iodin (Fuwa, 1954). Metode ini berdasarkan pada pengurangan jumlah substrat (pati). Sebanyak 0,25 mL enzim ditambahkan ke dalam 0,25 mL larutan pati 0,1% lalu diinkubasi pada suhu 60°C

selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 0,25 mL HCl 1N dan kemudian ditambahkan 0,25 mL pereaksi iodin dan 4 mL akuades. Setelah campuran diaduk rata, serapannya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} 600 nm. Kontrol dibuat dengan cara yang sama hanya menggunakan 0,25 mL enzim yang telah diinaktivasi menggunakan HCl.

b. Metode Mandels

1. Pembuatan pereaksi untuk uji aktivitas metode Mandels

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

2. Pengujian aktivitas enzim α -amilase metode Mandels

Metode ini bertujuan untuk melihat adanya glukosa yang terbentuk. Sebanyak 0,25 mL enzim dan 0,25 mL larutan pati dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 60 °C. Kemudian, ditambahkan 1 mL *Dinitrosalisilic Acid* (DNS) dan dididihkan selama 10 menit kemudian dinginkan pada suhu ruang. Selanjutnya, ditambahkan akuades sebanyak 1,5 mL ke dalam tabung reaksi. Diukur serapan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} 510 nm (Mandels *et al.*, 1976).

c. Penentuan kadar protein metode Lowry

1. Pembuatan pereaksi untuk penentuan kadar protein metode Lowry

- Pereaksi A: Na_2CO_3 2 gram dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 N.
- Pereaksi B: larutan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% 5 mL ditambahkan ke dalam 5 mL larutan Na(K)-Tartarat 1%
- Pereaksi C: pereaksi B 2 mL ditambahkan 100 mL pereaksi A.
- Pereaksi D: reagen Folin Ciocalteau diencerkan dengan akuades 1:1.
- Larutan BSA: 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, 1951). Sebanyak 0,1 mL larutan enzim ditambah dengan 0,9 mL akuades dan direaksikan dengan 5 mL pereaksi C, dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruang. Setelah itu, ditambahkan dengan cepat 0,5 mL pereaksi D dan diaduk dengan sempurna, didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Untuk kontrol 0,1 mL enzim diganti dengan 0,1 akuades. Selanjutnya, lakukan perlakuan yang sama seperti sampel. Serapannya diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 750 nm. Untuk penentuan kadar protein enzim digunakan kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumin*) dan perhitungan metode Lowry (Lowry, 1951).

3.3.6 Modifikasi Enzim α -Amilase dengan NPC-PEG

NPC-PEG dicampurkan masing-masing ke dalam 2 mL enzim dan 2 mL buffer fosfat (0,1 M pH 8,0). Pada penelitian ini variasi PEG yang digunakan adalah 5, 10, dan 15 mg. Kemudian larutan dikocok selama 3 jam pada suhu kamar (Takahashi *et al.*, 1985).

3.3.7 Karakterisasi Enzim α -Amilase

a. Penentuan Suhu Optimum

Untuk memperoleh suhu optimum kerja enzim dilakukan dengan menggunakan variasi suhu yaitu 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 dan 80 °C. Selanjutnya diuji aktivitas enzim dengan metode Mandels.

b. Penentuan pH Optimum

Untuk memperoleh pH optimum enzim sebelum dan sesudah modifikasi kimia, digunakan buffer fosfat 0,1 M dengan variasi pH sebagai berikut: 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; dan 7,5. Suhnya dijaga agar tetap 60 °C, dilanjutkan dengan pengukuran aktivitas enzim metode Mendels.

c. Penentuan K_M dan V_{maks}

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

d. Uji Stabilitas Termal Enzim

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

$$\text{Aktivitas Sisa} = \frac{\text{aktivitas enzim setelah perlakuan (akhir)}}{\text{aktivitas enzim tanpa perlakuan (awal)}} \times 100 \% \dots\dots\dots (4)$$

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

Penentuan nilai konstanta laju inaktivasi (k_i) dan waktu paruh ($t_{1/2}$) didasarkan pada persamaan kinetika inaktivasi orde 1 (Kazan *et al.*, 1997) dengan persamaan:

$$\ln \frac{E_t}{E_0} = - k_i t_{1/2} \dots\dots\dots (5)$$

Adapun perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi, ditentukan dengan persamaan termodinamika :

$$\Delta G_i = - RT \ln \frac{k_i \cdot h}{k_b \cdot T} \dots\dots\dots (6)$$

Keterangan:

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

T : Suhu absolut (T)

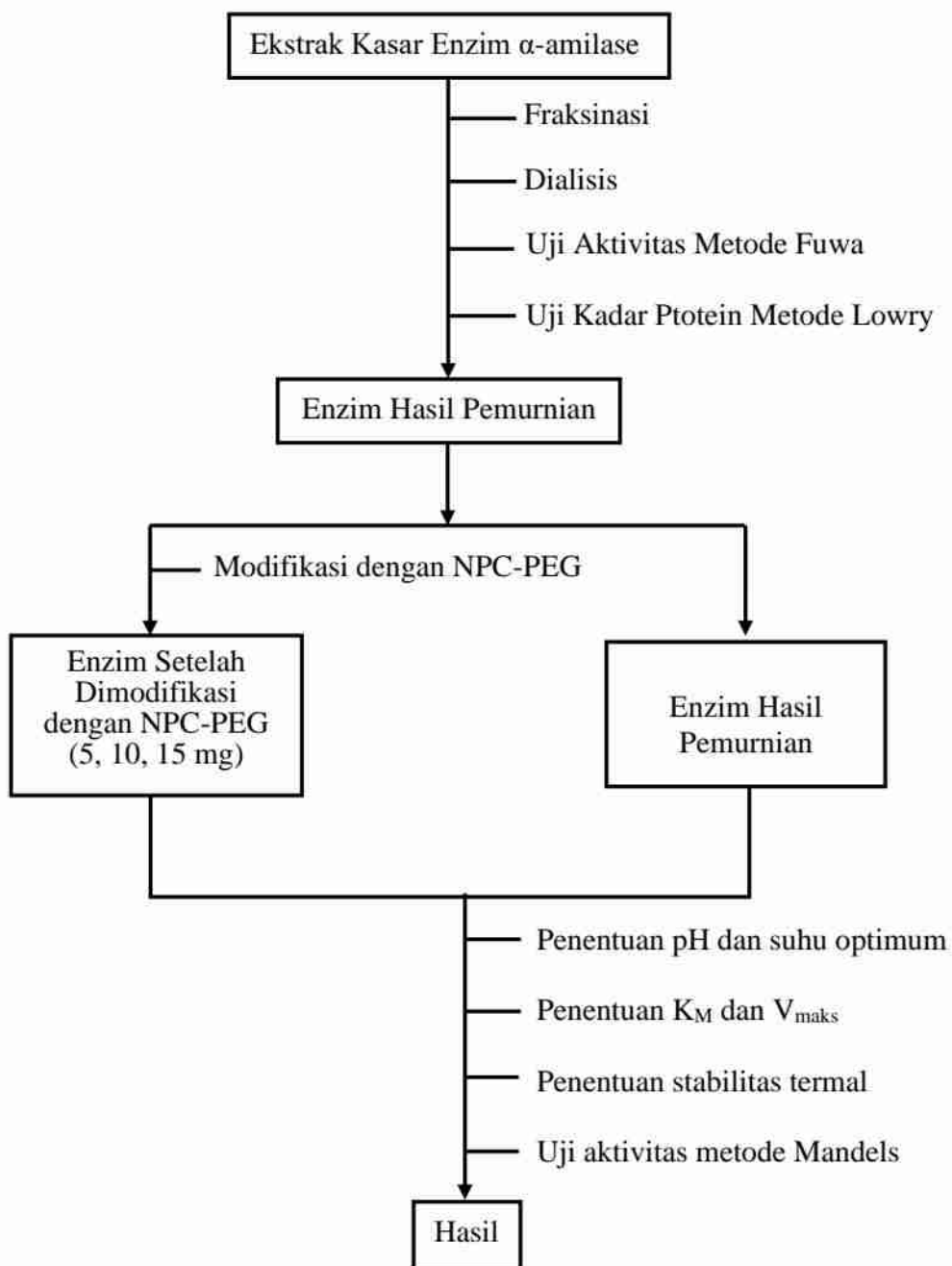
k_i : Konstanta laju inaktivasi termal

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

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

(Kazan *et al.*, 1997).

Secara keseluruhan prosedur penelitian terangkum dalam diagram alir pada Gambar 10.



Gambar 10. Diagram alir penelitian

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Berdasarkan pembahasan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Enzim hasil pemurnian meningkat kemurniannya sebanyak 13,7 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim dengan aktivitas spesifik ekstrak kasar dan enzim hasil pemurnian berturut-turut 47,965 dan 656,74 U/mg.
2. Enzim hasil pemurnian optimum pada pH 5,0; suhu optimum 50 °C; $K_M = 7,61$ mg/mL substrat, $V_{maks} = 10,09$ $\mu\text{mol mL}^{-1}$ menit^{-1} dan uji stabilitas termal enzim hasil pemurnian pada suhu 60 °C selama 100 menit memiliki aktivitas sisa sebesar 5,58% dengan nilai $k_i = 0,0258$ menit^{-1} , $t_{1/2} = 26,87$ menit, dan $\Delta G_i = 100,151$ kJ mol^{-1} .
3. Enzim hasil modifikasi menggunakan NPC-PEG 5, 10, dan 15 mg mengalami pergeseran pH dari pH 5,0 menjadi pH 5,5 dan mengalami pergeseran suhu dari 50 °C menjadi 60 °C.
4. Enzim hasil modifikasi menggunakan NPC-PEG 5, 10, dan 15 mg optimum pada pH 5,5; suhu optimum 60 °C dan mengalami penurunan harga k_i secara berturut-turut $0,0157 \pm 0,0001$; $0,02 \pm 0,0000$; dan $0,0224 \pm 0,0003$.
Berdasarkan penurunan harga k_i enzim hasil modifikasi menggunakan NPC-PEG 5, 10, dan 15 mg mengalami peningkatan kestabilan sebanyak 1,2 – 1,6 kali dari enzim hasil pemurnian.

5. Modifikasi menggunakan NPC-PEG konsentrasi 5, 10, dan 15 mg dapat meningkatkan kestabilan enzim α -amilase dari *A. fumigatus*, ditandai dengan meningkatnya waktu paruh dari enzim hasil pemurnian dan modifikasi menggunakan NPC-PEG konsentrasi 5, 10, dan 15 mg secara berturut-turut yaitu $26,87 \pm 0,3668$; $44,15 \pm 0,3977$; $34,66 \pm 0,0000$; dan $30,94 \pm 0,3908$ menit.

5.2 Saran

Untuk penelitian selanjutnya disarankan agar menggunakan teknik pemurnian ekstrak kasar enzim yang lebih lanjut dan menggunakan konsentrasi zat modifikasi yang lebih kecil, serta menggunakan senyawa lain selain Nitrofenol Karbonat Polietilen Glikol (NPC-PEG) sebagai senyawa modifikasi.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Abdurahman, D. 2008. Biologi Kelompok Pertanian. PT Grafindo Media Pratama. Bandung.
- Ahern, T.J. and Klibanov, A.M. 1987. Why do enzyme irreversibly inactive at high temperature. Stuttgart. New York.
- Anggraini, N. 2011. *Peningkatan Kestabilan Enzim α -amilase dari Bacillus subtilis ITBCCB148 dengan Modifikasi Kimia Menggunakan Asam Glioksilat*. Skripsi. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Apriyanti. 2010. *Peningkatan Kestabilan Enzim α -amilase dari Bacillus subtilis ITBCCB148 dengan Modifikasi Kimia Menggunakan Dimetiladipimidat*. Skripsi. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Azhar, M. 2016. *Biomolekul Sel Karbohidrat, Protein dan Enzim*. UNP Press. Padang.
- Bommarius, A. S. and Paye, M. F. 2013. Stabilizing biocatalysts. *Chem. Soc. Rev.* **42**(15): 6534–6565.
- Chibata, I. 1978. *Immobilized Enzymes: Research and Development*. John Wiley & Sons. Kodansha. New York.
- Copeland, R. A. 1994. *Methods for proteins analysis. A practical guide to laboratory protocols*. Chapman & Hall.
- Deuscher, M. 1990. *Methods in Enzymology Guide to Protein Purification; Purification Procedures*. Academic Press, New York.
- Fasim, A., More, V. S. and More, S. S. 2021. Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. *Curr. Opin. Biotechnol.* **69**: 68–76.
- Fessenden, R. J. dan Fessenden, J. S. 1982. *Kimia Organik Edisi Ke-3 Jilid 1*. Erlangga. Jakarta.
- 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.

- Goddette, D.W., Christianson, T., Ladin, B.F., Lau, M., Mielenz, J.R., Pae, C., Reynolds, R. B., Yang, S.S., and Wilson, C.R. 1993. Strategy and implementation of a system for protein engineering. *J. Biotechnol.* **28**(1): 41-54.
- Godfrey, T. and Reichelt, J. 1982. *Industrial Enzymology: The Application Of Enzymes In Industry*. Nature Press. New York.
- Harahap, D. G. S., Noviantari, A., Hidana, R., Yanti, N. A., Nugroho, E. D., Nurdyansyah, F., Widyastuti, D. A., Pratiwi, R. H., Nendissa, D. M., dan Nendissa, S. J. 2021. *Dasar-Dasar Mikrobiologi dan Penerapannya*. Penerbit Widina. Bandung.
- Hidayat, N., Putri, A. I. and Sumarsih, S. 2016. *Mikologi Industri*. Universitas Brawijaya Press. Malang.
- Illanes, A. 2008. *Enzyme biocatalysis : Principles and Applications*. Editorial Springer-Verlag New York Inc. United States, 1-56.
- Indriati, G. dan Megahati, R. R. P. 2018. Effect of temperature and medium pH on amylase activity of SMG9 thermophile bacteria. *IJISRT.* **3** (3): 678-679.
- Janeček, S. 1993. Strategies for obtaining stable enzymes. *Process Biochemistry.* **28**(7): 435–445.
- Judoamidjojo, M., Abdul, A. D., dan Endang, G. S. 1989. *Teknologi Fermentasi*. Rajawali Press. Jakarta.
- Kamelia, R., Muliawati, S. dan Dessy N. 2005. Isolasi dan karakterisasi protease intraseluler termostabil dari bakteri *Bacillus stearothermophilus* RPI. *Seminar Nasional MIPA*. Departemen Kimia. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Kazan, D., Ertan, H. and Erarslan, A. 1997. stabilization of escherichia coli penicillin g acylase against thermal inactivation by cross-linking with dextran dialdehyde polymers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**(2): 191–197.
- Kwon, D. Y. and Rhee, J. S. 1986. A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **63**(1): 89–92.
- Latgé, J.-P. 1999. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**(2): 310–350.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L. and Cox, M. M. 2005. *Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman. Macmillan. New York.

- Liu, X. and Kokare, C. 2017. *Microbial Enzymes of Use in Industry: Biotechnology of Microbial Enzymes*. Academic Press. India.
- Lowry, O. H. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**(1): 265–275.
- Makfoeld, D. 1993. *Mikotoksin Pangan*. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Mandels, M., Andreotti, R. and Roche, C. 1976. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **6**: 21-33.
- Mangunwidjaja, D. and Suryani, A. 1994. *Teknologi Bioproses*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Marks, A. D., Marks, D. B. and Smith, C. M. 2000. *A Clinical Approach*. EGC. Jakarta.
- Montgomery, R., Dryer, R. L., Conway, T. W., dan Spector, A. A. 1993. *Biokimia* (diterjemahkan oleh M. Ismadi). UGM Press. Yogyakarta.
- Mozhaev, V. V and Martinek, K. 1984. Structure-stability relationships in proteins: new approaches to stabilizing enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* **6**(2): 50–59.
- Mozhaev, V. V., Melik-Nubarov, N.S., Šikšnis, V., dan Karel Martinek. 1990. Strategy for Stabilizing Enzymes Part Two: Increasing Enzyme Stability by Selective Chemical Modification. *Biocatalysis.* **3**(3): 189–196.
- Munoz, J., Quintero, M. and Gutierrez, P. A. 2011. Characterization of the α -amylase gene from *Bacillus sp.* *BBM1. Vitae.* **18**(3):363–369.
- Naiola, E. 2002. Characterization and optimization media for amylase producing of *Aspergillus niger* and *Aspergillus clavatus* isolated from some samples. *Berita Biologi.* **6**(3): 415–421.
- Ningsih, D. R., Rastuti, U. and Kamaludin, R. 2012. Karakterisasi enzim amilase dari bakteri *Bacillus amyloliquefaciens*. *Prosiding Seminar Nasional: Pengembangan Sumber Daya Pedesaan dan Kearifan Lokal Berkelanjutan II*. FKIK Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto. Indonesia. 39-45.
- Özcan, N., Altinalan, A. and Ekinci, M. S. 2001. Molecular cloning of an alpha-amylase gene from *Bacillus subtilis* RSKK246 and its expression in *Escherichia coli* and in *Bacillus subtilis*. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.* **25**(2): 197–201.
- Page, D. S. 1997. *Prinsip-Prinsip Biokimia*. Erlangga. Surabaya.

- Pelczar, M. J. and Chan, E. S. C. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi I dari Element of Microbiology*. UI Press. Jakarta.
- Poedjiadi, A. and Supriyanti, F. M. T. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. UI Press. Jakarta.
- Polaina, J. and MacCabe, A. P. 2007. *Industrial Enzymes*. Springer. Netherlands.
- Polizzi, K. M., Bommarius, A. S., Broering, J. M., Chaparro-Riggers, J. F. 2007. Stability of biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol*. **11**(2): 220–225.
- Pratiwi, R. S., Susanto, T. E., Wardani, Y. A. K., dan Aji Sutrisno. 2015. Enzim kitinase dan aplikasi di bidang industri : kajian Pustaka. *JPA*. **3**(3): 878-887.
- Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalya, S. B., Abraham, A., Mathew, A. K., Madhavan, A., Rebello, S., and Ashok Pandey. 2018. Applications of microbial enzymes in food industry. *Food Technol. Biotechnol*. **56**(1): 16.
- Regulapati, R., Malav, P. N. and Gummadi, S. N. 2007. Production of thermostable α -amylases by solid state fermentation-a review. *Am. J. Food Technol*. **2**(1): 1–11.
- Scopes, R. K. 1994. *Protein Purification: Principles and Practice*. Springer-Verlag. New York.
- Shahib, M. N. 2005. *Biologi Molekuler Medik I*. Universitas Padjajaran Press. Bandung.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., and Praveen Kumar Mehta. 2016. Microbial enzymes: Industrial progress in 21st century. *3 Biotech*. **6**(2): 1–15.
- Soesanto, L. 2013. *Pengantar Pengendalian Hayati Penyakit Tanaman Edisi Kedua*. Rajawali Pers. Jakarta.
- Suganthi, R., Benazir, J. F., Santhi, R., Ramesh, K. V., Hari, A., Meenakshi, N., Nidhiya, K. A., Kavitha, G., and Lakshmi, R. 2011. Amylase production by aspergillus niger under solid state fermentation using agroindustrial wastes. *IJEST*. **3**(2): 1756–1763.
- Suhartono, M. T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. PAU Bioteknologi IPB. Bogor.
- Suhartono, M.T., Suswanto A., dan Widjaja H. 1992. *Diktat Struktur dan Biokimia Protein PA*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Sumardjo, D. 2006. *Pengantar Kimia: Buku Panduan Kuliah Mahasiswa Kedokteran dan Program Strata I*. EGC. Jakarta.

- Sundari, E S. 2011. *Peningkatan Kestabilan Enzim α -amilase dari Bacillus subtilis ITBCCB148 Dengan Modifikasi Kimia Menggunakan Sitrat Anhidrida*. Skripsi. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Susanti, R. and Fibriana, F. 2017. *Teknologi Enzim*. Penerbit Andi. Yogyakarta.
- Sutanto, I., Ismid, I. S., Sjarifuddin, P. K., Sungkar, S. 2011. *Buku Ajar Parasitologi Kedokteran Edisi ke-4*. FK UI. Jakarta.
- Sutrisno, A. 2017. *Teknologi enzim*. Universitas Brawijaya Press. Malang.
- Takahashi, K., Ajima, A., Yoshimoto, T., Okada, M., Matsushima, A., Tamaura, Y. and Inada, Y. 1985. Chemical reactions by polyethylene glycol modified enzymes in chlorinated hydrocarbons. *J. Org. Chem.* **50**(18): 3414–3415.
- Turah, N. and Bahri, S. 2017. penentuan waktu paruh enzim amilase amobil dari kecambah kacang hijau (*Phaseolus aureus*) pada produksi glukosa dari maltodekstrin. *Kovalen.* **3**(2): 150–157.
- Vaseekaran, S., Balakumar, S. and Arasaratnam, V. 2011. isolation and identification of a bacterial strain producing thermostable α - amylase. *Trop Agric Res.* **22**(1): 1.
- Vieille, C. and Zeikus, J. G., 1996, Thermozyms: Identifying molecular determinant of protein structural and functional stability. *Tibtech.* **14**(6): 183-189.
- Viridianingsih, R. 2002. *Mempelajari Stabilitas Termal dari Bacillus pumilusyl dalam Pelarut Heksana, Toluena, dan Benzena*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Winarno, F. G. 1992. *Kimia Pangan dan Gizi*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Wijaya, S. K. S. 2002. Isolasi kitinase dari *Scleroderma columnare* dan *Trichiderma harzianum*. *Jurnal Ilmu Dasar.* **3**(1): 30-35.
- 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-amilase from *Bacillus subtilis* ITBCCB148. *J. Phys.: Conf. Ser.* **1751** (1): 1-9.
- Yandri, A. S. 2004. Modifikasi kimia enzim α -amilase dari bakteri lokal *Bacillus sp. B. 148* dengan nitrofenol karbonat polietilenglikol. Prosiding Seminar Nasional, Bandar Lampung. 94–201.

- Yandri, A. S. and Suhartati, T. 2018. *Peningkatan Kestabilan Enzim*. Penerbit AURA. Bandar Lampung.
- Yandri, A. S., Amalia, P., Suhartati, T., Mulyono, dan Hadi, S. 2017. Increasing stability of cellulase, obtained from *Bacillus subtilis* ITBCCB148 with chemical modification using p-Nitrophenolcarbonate-Polyethylenglycol (NPC-PEG). *Orient. J. Chem.* **33**(5): 2524-2529.
- Yandri, A. S., Kosasih, P., Soetijoso, S., Muliawati, S. 2003. Modifikasi kimia enzim α -amilase dari bakteri lokal *Bacillus sp. B. 148* dengan sianurat klorida polietilenglikol. *J. Sains dan Tek.* **148**: 9–16.
- Yandri, A. S., Nadila, N., Suhartati, T., Satria, H. dan Hadi, S. 2020. Peningkatan kestabilan enzim α -amilase dengan penambahan gliserol. *Analit.* **5**(2): 143-154.
- Yandri, A. S., Radiman, C., Sindumarta, M. dan Soemitro, S. 2005. Pengaruh modifikasi kimia terhadap stabilitas termal enzim α -amilase dari bakteri isolat lokal *Bacillus subtilis* ITBCCB148. *J. Sains Tek.* **11**(2): 75-78.
- Yandri, A. S., Ropingi, H., Suhartati, T., Hendri, J., Irawan, B. dan Hadi, S. 2022A. The effect of zeolite/chitosan hybrid matrix for thermal-stabilization enhancement on the immobilization of *aspergillus fumigatus* α -amylase. *Emerging Science Journal.* **6**(3): 505–518.
- Yandri, Y., Nurmala, N., Suhartati, T., Satria, H., and Hadi, S. 2022B. The stability increase of α -amylase enzyme from *Aspergillus fumigatus* using dimethyladipimidate. *Phys. Sci. Rev.* 1-10.
- 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 polyetylenglycol (NPC- PEG). *Mod. Appl. Set. Res.* **5** (4): 253-258.
- Yang, Z., Domach, M., Auger, R., Yang, F. X., and Russell, A. J. 1996. Polyethylene glycol-induced stabilization of subtilisin. *Enzyme Microb. Technol.* **18**(2): 82–89.