

**PENGARUH PENAMBAHAN POLIETILEN GLIKOL (PEG) 4000
TERHADAP STABILITAS ENZIM α -AMILASE DARI
*Aspergillus fumigatus***

(Skripsi)

Oleh

**AYU RANJA SAPUTRI
NPM 1917011007**



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

ABSTRACT

THE EFFECT OF ADDITION POLYETHYLENE GLYCOL (PEG) 4000 ON STABILITY OF α -AMYLASE ENZYME FROM *Aspergillus fumigatus*

By

AYU RANJA SAPUTRI

The enzyme industry has occupied an important position in the industrial field. However, the enzymes application in the industrial sector is limited because the cost of enzymes is quite high, and the enzymes stability that are not resistant to extreme conditions. This study aims to obtain the α -amylase enzyme from *Aspergillus fumigatus* with high activity and purity level and increase the stability of the α -amylase enzyme through the addition of polyethylene glycol (PEG) 4000. To achieve this goal, this research did the production, isolation, purification and characterization of the purified enzymes and the enzymes with PEG 4000 added. The activity of the α -amylase enzyme was tested by Fuwa and Mandels method, and the protein content was tested by Lowry method. The results showed that the specific activity of purified enzyme was 456.88 U/mg which increased about 15 times compared to the crude extract enzyme which only had a specific activity of 31.18 U/mg.. The purified enzymes had optimum pH of 5.0 at 50 °C with a value of $k_i = 0.0163 \pm 0.0001 \text{ min}^{-1}$; $t_{1/2} = 42.524 \pm 0.3690$ minutes; and $\Delta G_i = 101.384 \pm 0.0233 \text{ kJ mol}^{-1}$. While the enzymes resulting from the addition of PEG 4000 at concentrations of 12, 18, and 24% had optimum pH of 5.5 at 55 °C with the values of $k_i = 0.0117 \pm 0.0001$; 0.0098 ± 0.0001 ; and $0.0088 \pm 0.0003 \text{ min}^{-1}$; $t_{1/2} = 59.243 \pm 0.3550$; 70.730 ± 0.0001 ; and 78.767 ± 2.5330 minutes; and $\Delta G_i = 103.888 \pm 0.016$; 104.383 ± 0.0001 ; and $104.677 \pm 0.0877 \text{ kJ mol}^{-1}$. The addition of PEG 4000 can increase the stability of the α -amylase enzyme from *A. fumigatus* as indicated by decrease in the inactivation rate constant value, increase in the half-time value, and increase in energy due the denaturation.

Keywords: α -amylase, *A. fumigatus*, PEG 4000, stability of enzyme

ABSTRAK

PENGARUH PENAMBAHAN POLIETILEN GLIKOL (PEG) 4000 TERHADAP STABILITAS ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus fumigatus*

Oleh

AYU RANJA SAPUTRI

Industri enzim telah menduduki posisi penting dalam bidang industri. Namun, aplikasi enzim di bidang industri terbatas karena biaya enzim yang cukup tinggi dan stabilitas enzim yang tidak tahan terhadap kondisi ekstrim. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan enzim α -amilase dari *Aspergillus fumigatus* dengan aktivitas dan tingkat kemurnian yang tinggi serta meningkatkan stabilitas enzim α -amilase melalui penambahan polietilen glikol (PEG) 4000. Untuk mencapai tujuan tersebut, dilakukan produksi, isolasi, pemurnian, dan karakterisasi enzim hasil pemurnian dan enzim hasil penambahan PEG 4000. Aktivitas enzim α -amilase diuji dengan metode Fuwa dan Mandels serta kadar proteinnya diuji dengan metode Lowry. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas spesifik enzim hasil pemurnian adalah 456,88 U/mg yang meningkat sebanyak 15 kali dibandingkan ekstrak kasar enzim yang hanya memiliki aktivitas spesifik sebesar 31,18 U/mg. Enzim hasil pemurnian memiliki pH optimum 5,0 pada suhu 50 °C dengan nilai $k_i = 0,0163 \pm 0,0001 \text{ menit}^{-1}$; $t_{1/2} = 42,524 \pm 0,3690 \text{ menit}$; dan $\Delta G_i = 101,384 \pm 0,0233 \text{ kJ mol}^{-1}$. Sementara enzim hasil penambahan PEG 4000 konsentrasi 12, 18, dan 24% memiliki pH optimum 5,5 pada suhu 55 °C dengan nilai $k_i = 0,0117 \pm 0,0001$; $0,0098 \pm 0,0001$; dan $0,0088 \pm 0,0003 \text{ menit}^{-1}$; $t_{1/2} = 59,243 \pm 0,3550$; $70,730 \pm 0,0001$; dan $78,767 \pm 2,5330 \text{ menit}$; dan $\Delta G_i = 103,888 \pm 0,016$; $104,383 \pm 0,0001$; dan $104,677 \pm 0,0877 \text{ kJ mol}^{-1}$. Penambahan polietilen glikol 4000 dapat meningkatkan stabilitas enzim α -amilase dari *A. fumigatus* yang ditunjukkan dengan terjadinya penurunan harga konstanta laju inaktivasi, peningkatan harga waktu paruh, dan peningkatan energi akibat denaturasi.

Kata kunci: α -amilase, *A. fumigatus*, PEG 4000, stabilitas enzim

**PENGARUH PENAMBAHAN POLIETILEN GLIKOL (PEG) 4000
TERHADAP STABILITAS ENZIM α -AMILASE DARI
*Aspergillus fumigatus***

Oleh

AYU RANJA SAPUTRI

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
2023**

Judul Skripsi : **PENGARUH PENAMBAHAN POLIETILEN GLIKOL (PEG) 4000 TERHADAP STABILITAS ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus fumigatus***

Nama Mahasiswa : **Ayu Ranja Saputri**

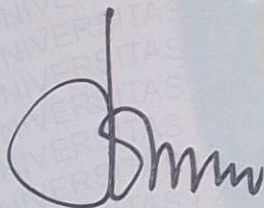
Nomor Pokok Mahasiswa : **1917011007**

Jurusan : **Kimia**

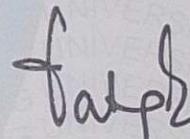
Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**

MENYETUJUI

1. **Komisi Pembimbing**

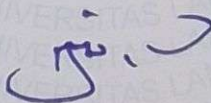


Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S.
NIP 19560905 199203 1 001



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

2. **Ketua Jurusan Kimia**

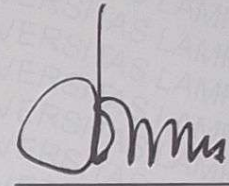


Mulyono, Ph.D.
NIP 19740611 200003 1 002

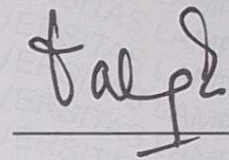
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

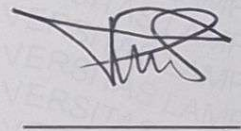
Ketua : **Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S.**



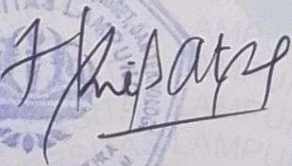

Sekretaris : **Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S.**



Anggota : **Prof. Sutopo Hadi, M.Sc., Ph.D.**



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 : **3 Agustus 2023**

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Ayu Ranja Saputri
Nomor Pokok Mahasiswa : 1917011007
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya dan sesungguhnya, bahwa skripsi saya yang berjudul **Pengaruh Penambahan Polietilen Glikol (PEG) 4000 Terhadap Stabilitas Enzim α -Amilase dari *Aspergillus fumigatus*** adalah benar karya saya sendiri yang tidak terdapat pada karya orang lain, kecuali disebutkan dalam daftar pustaka. Sehingga, apa yang tercantum di dalam skripsi saya ini dapat dipertanggungjawabkan. Kemudian, saya tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data di dalam skripsi ini digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi selama nama saya tercantum dalam publikasi tersebut atas kesepakatan bersama.

Demikianlah surat ini saya buat dengan sebenar-benarnya untuk digunakan sebagai mestinya.

Bandar Lampung, 15 Agustus 2023
Yang menyatakan,



Ayu Ranja Saputri
NPM. 1917011007

RIWAYAT HIDUP



Penulis bernama lengkap Ayu Ranja Saputri. Lahir di Prabumulih pada tanggal 17 Juli 2001 sebagai anak pertama dari dua bersaudara dan merupakan putri dari Bapak Agus Zulkarnain dan Ibu Wagiyem. Penulis pertama kali menempuh pendidikan di Taman Kanak-kanak Cindo I Prabumulih Barat yang diselesaikan pada tahun 2006.

Kemudian dilanjutkan ke Sekolah Dasar Negeri 43 Kota Prabumulih yang ditamatkan pada tahun 2013. Selanjutnya penulis melanjutkan pendidikan di Sekolah Menengah Pertama Negeri 4 Kota Prabumulih yang ditamatkan pada tahun 2016. Lalu penulis bersekolah di Sekolah Menengah Atas Negeri 1 Kota Prabumulih lalu menamatkan pendidikan pada tahun 2019. Pada awal tahun 2019, penulis mendaftarkan diri pada Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN) tahun 2019 dengan Jurusan Kimia sebagai pilihan pertama di Universitas Lampung. *Qadarullah*, penulis berhasil lulus seleksi tersebut dan menjadi mahasiswa Jurusan Kimia Universitas Lampung Angkatan 2019.

Selama menempuh pendidikan di dunia kampus, penulis ikut menjadi anggota organisasi kemahasiswaan Himpunan Mahasiswa Kimia (Himaki) pada tahun 2020 dan 2021 sebagai anggota Biro Kesekretariatan. Penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Batu Putih, Kecamatan Baturaja Barat, Kota Baturaja, Provinsi Sumatera Selatan selama 40 hari. Setelah melaksanakan kewajiban KKN, penulis melaksanakan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Lampung dari bulan maret hingga bulan oktober tahun 2022 dengan judul “Penentuan Kondisi Optimum Enzim

α -Amilase dari *Aspergillus fumigatus* pada Media Beras (*Oryza sativa*)". Selama menjalani perkuliahan, penulis pernah menjadi asisten praktikum Biokimia untuk mahasiswa jurusan Biologi angkatan 2022 pada semester genap 2023 dan mahasiswa Kimia angkatan 2020 pada semester genap tahun 2023.

Penulis berharap masih dapat meneruskan tulisan-tulisan maupun karya-karya selanjutnya agar dapat memberi manfaat bagi keluarga, agama, bangsa, dan negara.

MOTTO HIDUP

Pendidikan memiliki akar yang pahit, tapi buahnya manis.

(Aristoteles)

Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari sesuatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain). Dan hanya kepada Tuhanmulah engkau berharap.

(QS. Al-Insyirah: 6-8)

Tidak ada ujian yang tidak bisa diselesaikan. Tidak ada ujian yang melebihi batas kesanggupan. Karena Allah tidak akan membebani seseorang melainkan sesuai dengan kadar kesanggupannya.

(QS. Al-Baqarah: 286)

Susah, tapi *bismillah*.

(Fiersa Besari)

PERSEMBAHAN

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT atas Rahmat-Nya serta sholawat dan salam kepada kekasih Allah, Nabi Muhammad SAW.



Dengan segala kerendahan hati, karya sederhana ini kupersembahkan kepada:

**Kedua orang tuaku tercinta dan saudaraku satu-satunya,
Bapak Agus Zulkarnain, Ibu Wagiyem, dan Adinda Wahyu**

Yang senantiasa memberikan motivasi, nasihat, cinta dan kasih, do'a, dan dukungan secara moril dan finansial kepadaku selama ini.

**Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri AS., M.S. | Ibu Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S. |
Bapak Prof. Sutopo Hadi, S.Si., M.Sc., Ph.D.
dan seluruh dosen Jurusan Kimia**

Terima kasih telah mendidik, membimbing, dan memberikan wawasan selama saya menempuh pendidikan di kampus. Semoga Allah SWT membalas kebaikan bapak dan ibu kelak, *Aamiin*.

Keluarga besar dan sahabat-sahabat seperjuangan

Almamater tercinta

dan

Diriku.

SANWACANA

Assalammu'alaikum Warrahmatullahi Wabarakatuuh.

Alhamdulillahirabbil'alaamiin, puja dan puji syukur penulis panjatkan kepada Allah Subhanahuwata'aalaa, serta tak lupa pula salam cinta kepada Baginda Nabi Muhammad SAW, karena berkat Rahmat dan Hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul **PENGARUH PENAMBAHAN POLIETILEN GLIKOL (PEG) 4000 TERHADAP STABILITAS ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus fumigatus*** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Selain bersyukur kepada dzat pencipta bumi dan kekasih-Nya, penulis juga ingin berterima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu penulis menyelesaikan tugas akhir ini. Adapun pihak-pihak tersebut, antara lain:

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri AS., M.S., sebagai pembimbing pertama penulis. Terima kasih atas bimbingan, arahan, dukungan, dan ilmu pengetahuan yang telah diberikan kepada penulis mulai dari saat penulis melaksanakan Praktik Kerja Lapangan hingga melaksanakan penelitian untuk menuntaskan tugas akhir ini.
2. Ibu Pof. Dr. Tati Suhartati, M.S., sebagai pembimbing kedua penulis. Terima kasih atas kritik dan saran terhadap format penulisan tugas akhir penulis dan saran atas diksi-diksi yang terdapat dalam tugas akhir penulis.

3. Bapak Prof. Sutopo Hadi, S.Si., M.Sc., Ph.D., sebagai pembahas tugas akhir penulis. Terima kasih karena telah memberikan masukan-masukan yang membangun untuk kemudian dijadikan sebuah pembelajaran oleh penulis.
4. Bapak Prof. Andi Setiawan, M.Sc., Ph.D., selaku dosen Pembimbing Akademik penulis. Terima kasih telah membimbing dan selalu memberi arahan kepada penulis mengenai bimbingan akademik dan pengenalan tentang perkuliahan sejak penulis menjadi mahasiswa baru hingga menyelesaikan tugas akhir ini.
5. Bapak Mulyono, Ph.D., selaku ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
6. Ibu Dr. Mita Rilyanti, M.Si., selaku Sekretaris Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
7. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, M.Si., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
8. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung yang telah memberikan ilmu, baik dalam bidang akademik maupun non akademik.
9. Laboran, staff administrasi, satuan pengaman, dan seluruh pegawai di lingkungan Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
10. Kepada yang tersayang, ayah dan ibu penulis, yang selalu memberikan nasihat, arahan, semangat, serta dukungan moril dan finansial kepada penulis. Terima kasih karena selalu mendukung pilihan penulis, terima kasih atas cinta dan kasih sayang yang selalu diberikan di setiap jalan penulis menempuh pendidikan, terima kasih atas do'a yang selalu dipanjatkan kepada Allah SWT sehingga penulis selalu diberikan dan diberkahi kelancaran dalam setiap urusan dalam menyelesaikan pendidikan.

11. Kepada yang terkasih, *the one and only*, saudara kandung satu-satunya penulis, Wahyu. Terima kasih telah memberi semangat dan do'a kepada penulis. Terima kasih pula kepada keluarga besar penulis yang selalu mendukung dan mendoakan penulis.
12. *Partner* kerja laboratorium, Virginia Nuh Reza Amanda, Neng Wiwit Liawati, dan Diah Indah Pratiwi, terima kasih atas bahu, telinga, pengorbanan waktu istirahat, keringat, dan air mata yang telah dikorbankan selama menjalankan penelitian bersama penulis di laboratorium.
13. Kelompok belajar *Bebegig*, Dian Rifani Muthia, Erika Noviana, Kania Nur Aisyah, S.Si., Neng Wiwit Liawati, Nugraha Bramanthio, Rizky Hadiwijaya, S.Si., Sabrina Ocha Felinda, S.Si., dan Siti Solehati, terima kasih telah berjuang bersama menghadapi perkuliahan yang sangat sulit bersama penulis.
14. Sahabat-sahabat penulis, Adiya, Alinil, Astin, Cindi, Dira, Dita, Cella, Happy, Munifah, Natasya, Nabila, Partini, Putpita, Rara, Shilvia, Verinda, Yohana, Zahra, dan masih banyak lagi. Terima kasih telah mengisi hari-hari penulis saat suka maupun duka. Terima kasih karena telah melalui proses menyelesaikan tugas akhir bersama-sama.
15. Terima kasih kepada adik-adik PY'20, Avi, Defa, Maria, dan Stephani . Terima kasih kepada Aulia Siti Paradina, S.Si., Eka Candra Wati, S.Si., Hendri Ropingi, S.Si., Nur Mayana Putri, S.Si., Salsabila Bethari Purworini, S.Si., Salsabila, S.Si., dan Vhezia Sheiscatamya, S.Si., atas ilmu dan pengalaman yang diberikan selama penulis menyelesaikan tugas akhir ini, terima kasih telah mewarnai hari-hari penulis selama menjalankan penelitian di laboratorium.
16. Sahabat-sahabat Girls Squad, Friska Charity, S.Pd., Niken Tri Monica, Rindi Juliantika, A.Md., Yessynia Agel, terima kasih sudah mau menjadi saksi *ups* dan *downs* kehidupan pribadi dan perkuliahan penulis. Kepada grup Calon Sarjana, Minda, Dhinda, Lyansaputri, S.Farm., dan Risna, terima kasih sudah

selalu menemani setiap *step* usaha penulis dalam memperoleh gelar, mau diajak berdiskusi, dan menjadi sahabat seperjuangan di perantauan.

17. Kepada seluruh mahasiswa Kimia Angkatan 2019 yang namanya tidak dapat penulis sebutkan satu per satu, yang secara langsung maupun tidak langsung membantu penulis menyelesaikan tugas akhir ini. Kompaklah selalu, *Chemistry'19*.

Bandar Lampung, 15 Agustus 2023

Penulis

Ayu Ranja Saputri

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xii
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	5
2.1.2. Sifat Katalitik Enzim	6
2.1.3. Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim	7
2.1.4. Kinetika Reaksi Enzim	10
2.1.5. Stabilitas Enzim.....	11
2.2. Enzim Amilase	12
2.3. Isolasi dan Pemurnian Enzim	15
2.4. Uji Aktivitas dan Penentuan Kadar Protein Enzim Amilase.....	16
2.4.1. Uji Aktivitas dengan Metode Fuwa	16
2.4.2. Uji Aktivitas dengan Metode Mandels.....	17
2.4.3. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry	17
2.5. <i>A. fumigatus</i>	18
2.6. Polietilen Glikol (PEG) 4000	19
III. METODE PENELITIAN	21
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian	21
3.2. Alat dan Bahan	21
3.3. Prosedur Penelitian.....	22
3.3.1. Pemiakan Isolat <i>A. fumigatus</i>	22
3.3.2. Pembuatan Media Inokulum dan Fermentasi, Inokulasi <i>A. fumigatus</i> dan Produksi Enzim α -amilase	23
3.3.3. Fraksinasi dengan Ammonium Sulfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	24
3.3.4. Dialisis.....	25

3.3.5. Uji Aktivitas Enzim α -Amilase dengan Metode Fuwa	25
3.3.6. Uji Aktivitas Enzim α -Amilase dengan Metode Mandels	26
3.3.7. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry	26
3.3.8. Penambahan Polietilen Glikol (PEG) 4000.....	27
3.3.9. Karakterisasi Enzim α -Amilase Sebelum dan Setelah Penambahan Polietilen Glikol (PEG) 4000 dengan Variasi Konsentrasi 12, 18, dan 24%	27
3.3.10. Penentuan Konstanta Laju Inaktivasi (k_i), Paruh Waktu ($t_{1/2}$), dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i).....	29
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	31
4.1. Produksi dan Isolasi Enzim α -Amilase	31
4.2. Pemurnian Enzim α -Amilase	32
4.2.1. Fraksinasi atau Pengendapan dengan Garam Ammonium Sulfat.....	32
4.2.2. Dialisis	34
4.3. Karakterisasi Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Setelah Penambahan Polietilen Glikol (PEG) 4000	36
4.3.1. Penentuan pH Optimum Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Setelah Penambahan Polietilen Glikol (PEG) 4000	36
4.3.2. Penentuan Suhu Optimum Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Setelah Penambahan Polietilen Glikol (PEG) 4000	38
4.3.3. Penentuan K_M dan V_{maks} Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Setelah Penambahan Polietilen Glikol (PEG) 4000	39
4.3.4. Stabilitas Termal Enzim Hasil Pemurnian Sebelum dan Setelah Penambahan PEG 4000	40
4.3.5. Perubahan Konstanta Laju Inaktivasi (k_i), Waktu Paruh ($t_{1/2}$), dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i) Enzim Hasil Pemurnian Sebelum dan Setelah Penambahan PEG 4000 Konsentrasi 12, 18, dan 24%	42
V. SIMPULAN DAN SARAN	45
5.1. Simpulan	45
5.2. Saran	46
DAFTAR PUSTAKA	47
LAMPIRAN.....	53

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Pemurnian enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	35
2. Nilai K_M dan V_{maks} enzim hasil pemurnian dan hasil penambahan PEG 4000 dengan variasi konsentrasi 12, 18, dan 24%	40
3. Perubahan konstanta laju inaktivasi termal (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan hasil penambahan PEG 4000 dengan variasi konsentrasi 12, 18, dan 24%	43
4. Hubungan antara berbagai variasi tingkat kejenuhan garam ammonium sulfat pada beberapa pola fraksi dengan aktivitas unit, kadar protein, dan aktivitas spesifik α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	53
5. Hubungan antara tingkat kejenuhan garam ammonium sulfat pada pola fraksi (0-15)% dan (15-95)% dengan aktivitas unit, kadar protein, dan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	53
6. Hubungan antara pH optimum terhadap aktivitas unit enzim α -amilase dari enzim hasil pemurnian dan enzim hasil penambahan PEG 4000 dengan variasi konsentrasi 12, 18, dan 24%	54
7. Hubungan antara pH optimum terhadap aktivitas sisa enzim α -amilase dari enzim hasil pemurnian dan enzim hasil penambahan PEG 4000 dengan variasi konsentrasi 12, 18, dan 24%	54
8. Hubungan antara suhu optimum terhadap aktivitas unit enzim α -amilase dari enzim hasil pemurnian dan enzim hasil penambahan PEG 4000 dengan variasi konsentrasi 12, 18, dan 24%	55
9. Hubungan antara suhu optimum terhadap aktivitas sisa enzim α -amilase dari enzim hasil pemurnian dan enzim hasil penambahan PEG 4000 dengan variasi konsentrasi 12, 18, dan 24%	55
10. Data penentuan penentuan Konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim hasil penambahan PEG 4000 dengan variasi konsentrasi 12, 18, dan 24%	56

11. Data penentuan penentuan Konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim hasil penambahan PEG 4000 dengan variasi konsentrasi 12, 18, dan 24% berdasarkan persamaan Lineweaver-Burk	56
12. Hubungan antara stabilitas termal terhadap aktivitas unit enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil penambahan PEG 4000 variasi konsentrasi 12, 18, dan 24%	57
13. Hubungan antara stabilitas termal terhadap aktivitas sisa enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil penambahan PEG 4000 variasi konsentrasi 12, 18, dan 24%	57
14. Penentuan konstanta laju inaktivasi (k_i) enzim α -amilase hasil pemurnian pada suhu $T = 50\text{ }^\circ\text{C}$	58
15. Penentuan konstanta laju inaktivasi (k_i) enzim α -amilase hasil penambahan PEG 4000 dengan variasi konsentrasi 12, 18, dan 24% pada suhu $T = 55\text{ }^\circ\text{C}$	58
16. Absorbansi glukosa pada berbagai konsentrasi	60
17. Absorbansi BSA pada berbagai konsentrasi	62

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Hubungan antara suhu dan aktivitas enzim.....	8
2. Hubungan antara pH dan aktivitas enzim	8
3. Hubungan antara kecepatan reaksi enzim dengan konsentrasi substrat.....	9
4. Grafik persamaan Lineweaver-Burk	10
5. Struktur enzim α -amilase	13
6. Struktur polietilen glikol (PEG).....	19
7. Skema fraksinasi	24
8. Diagram alir penelitian.....	30
9. Hubungan antara pola fraksinasi (0-25), (25-50), (50-75), dan (75-100)% garam ammonium sulfat terhadap aktivitas spesifik (U/mg) enzim α -amilase	33
10. Hubungan antara pola fraksinasi (0-15) dan (15-95)% garam ammonium sulfat terhadap aktivitas spesifik (U/mg) enzim α -amilase.....	34
11. pH optimum enzim hasil pemurnian dan enzim setelah penambahan PEG 4000 variasi konsentrasi 12, 18, dan 24%	37
12. Suhu optimum enzim hasil pemurnian dan enzim setelah penambahan PEG 4000 variasi konsentrasi 12, 18, dan 24%	38
13. Grafik Lineweaver-Burk enzim hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan PEG 4000 dengan variasi konsentrasi 12, 18, dan 24%	39
14. Hubungan antara stabilitas termal terhadap aktivitas sisa (%) enzim hasil pemurnian dan hasil penambahan PEG 4000 dengan variasi konsentrasi 12, 18, dan 24%	41

15. Hubungan $\ln(E_i/E_0)$ enzim α -amilase sebelum dan setelah penambahan PEG 4000 variasi konsentrasi 12, 18, dan 24% untuk penentuan k_i , $t_{1/2}$, dan ΔG_i	42
16. Kurva standar glukosa.....	60
17. Kurva standar BSA	62

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Aktivitas enzim pada berbagai tingkat kejenuhan ammonium sulfat (mencari pola fraksi)	53
2. Aktivitas unit dan aktivitas sisa enzim dalam berbagai variasi pH.....	54
3. Aktivitas unit dan aktivitas sisa enzim dalam berbagai variasi suhu	55
4. Data penentuan Konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks})	56
5. Aktivitas unit dan aktivitas sisa enzim pada penentuan stabilitas termal	57
6. Penentuan konstanta laju inaktivasi (k_i) 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 untuk metode Mandels.....	61
10. Kurva standar BSA	62
11. Persamaan untuk menghitung kadar protein dengan metode Lowry	63

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Enzim adalah jenis protein yang bertindak sebagai katalis atau senyawa yang meningkatkan laju reaksi kimia. Meskipun perkembangan proses fermentasi dalam satu abad terakhir membuat enzim dapat mengalami perubahan selama proses ini, pada akhir reaksi, enzim kembali ke bentuk aslinya. Selain meningkatkan jumlah reaksi, enzim menyediakan cara untuk mengontrol laju reaksi dan jalur metabolisme dalam tubuh (Dawn dkk., 2000). Enzim menempati tempat penting dalam bidang industri. Penerapan metode enzimatik dalam bidang industri mulai mengalami perkembangan sejak tahun 1960-an. Enzim merupakan primadona industri saat ini dan di masa depan karena penggunaannya yang hemat energi serta ramah lingkungan (Santoso dkk., 2011).

Salah satu enzim yang berperan penting serta menguntungkan dalam kehidupan adalah enzim amilase. Amilase adalah enzim yang mengkatalisis hidrolisis ikatan dalam pati untuk menghasilkan dekstrin, oligosakarida, maltosa, dan D-glukosa. Amilase bisa berasal dari hewan, jamur, dan sumber tanaman (Wang, 2009). Enzim amilase diproduksi dari berbagai jenis sel untuk keperluan industri, namun saat ini, enzim lebih banyak diproduksi dari berbagai jenis mikroorganisme karena mikroorganisme menghasilkan enzim yang dapat digunakan dalam jumlah dan jenis yang bervariasi (Ningsih dkk., 2012). Salah satu contoh keuntungan produksi enzim dalam sektor industri yakni enzim α -amilase komersial yang telah mencapai 25% dari produksi enzim global, dan biaya industri pengolahan pati adalah US\$ 62,2 juta per tahun (Bal *et al.*, 2016; Roth *et al.*, 2019; Salem *et al.*, 2020).

Enzim α -amilase adalah enzim endoamilase yang memotong ikatan α -1,4-glikosidik amilosa atau amilopektin untuk menghasilkan produk struktural (Martinez *et al.* 2015). Enzim α -amilase dapat dihasilkan dari beberapa contoh fungi, antara lain *Aspergillus niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. flavus*, *Rhizopus sp.*, dan *A. fumigatus* (Far *et al.*, 2020; John, 2019; Planchot and Colonna, 1995).

Produksi enzim amilase tidak lepas dengan adanya faktor-faktor yang mendukung keberhasilan produksi suatu enzim. Faktor yang sangat terpenting adalah suhu, pH, dan substrat. Suhu sangat mempengaruhi aktivitas enzim karena enzim adalah rangkaian asam amino yang sistem kerjanya berkaitan erat dengan suhu lingkungan (Tarigan dkk., 2015). Aktivitas enzim juga akan dipengaruhi oleh pH. Aktivitas enzim sangat dipengaruhi oleh pH media fermentasi. pH saat aktivitas enzim maksimum disebut dengan pH optimum (Kumaunang dan Vanda, 2011). pH optimum adalah pH donor dan akseptor proton yang berperan penting pada tempat katalitik enzim atau tempat terikatnya substrat dengan derajat ionisasi yang diinginkan, sehingga substrat dapat berinteraksi dengan mudah (Nielsen *et al.*, 1999). Selain itu, pH tinggi juga dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi yang akan mengakibatkan aktivitas enzim berkurang (Poedjiadi, 2006).

Industri enzim telah berkembang pesat dan menempati posisi penting dalam bidang industri dan penggunaan enzim semakin meningkat dari tahun ke tahun hingga mencapai 10-15% (Mufarikha dkk., 2014). Namun, penggunaan enzim dalam aplikasi di sektor industri dibatasi. Hal ini disebabkan oleh biaya enzim yang cukup tinggi. Selain itu, enzim memiliki kestabilan yang tidak tahan pada kondisi ekstrim dan enzim hanya dapat digunakan satu kali pemakaian (Sarrouh *et al.*, 2012). Aplikasi industri enzim mencakup lebih dari 80% pasar enzim global. Setidaknya, 50% dari enzim yang ada saat ini dapat dimodifikasi secara genetik. Kegunaan utama enzim bagi organisme adalah sebagai katalis hayati. Kebutuhan enzim di Indonesia masih belum dapat terpenuhi dengan baik sehingga Indonesia masih harus mengimpor enzim (Naiola, 2002). Namun, hal ini dapat diatasi dengan cara peningkatan stabilitas suatu enzim. Peningkatan stabilitas enzim dapat dilakukan dengan teknik amobilisasi enzim, modifikasi kimia, rekayasa molekuler, dan penambahan zat aditif (Stellwagen, 1984).

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan beberapa penelitian mengenai peningkatan stabilitas enzim α -amilase dengan penambahan zat aditif, seperti sorbitol (Yandri dkk., 2020 A), gliserol (Yandri dkk., 2020 B) polietilen glikol (PEG) 6000 (Assegaf, 2017), serta penambahan sorbitol terhadap stabilitas termal enzim α -amilase dari *Rhizopus oryzae* (Yandri dan Wulandari, 2009). Dari hasil penelitian tersebut diperoleh hasil bahwa penambahan beberapa senyawa aditif kimia dapat meningkatkan stabilitas enzim α -amilase. Pada penelitian ini, dilakukan isolasi, pemurnian, dan penambahan zat aditif kimia polietilen glikol (PEG) 4000 terhadap stabilitas enzim α -amilase yang diisolasi dari fungi *A. fumigatus* yang diharapkan akan diperoleh peningkatan stabilitas enzim setelah penambahan zat aditif seperti yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya.

1.2. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Memperoleh enzim α -amilase dari fungi *A. fumigatus* dengan aktivitas dan tingkat kemurnian yang tinggi.
- b. Meningkatkan kestabilan enzim α -amilase dari fungi *A. fumigatus* melalui penambahan polietilen glikol (PEG) 4000.

1.3. Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Memberikan informasi mengenai teknik isolasi dan pemurnian enzim α -amilase dari fungi *A. fumigatus*.
- b. Memberikan informasi mengenai pengaruh penambahan polietilen glikol (PEG) 4000 terhadap kestabilan enzim α -amilase dari fungi *A. fumigatus*.
- c. Memberikan informasi mengenai nilai aktivitas, pH optimum, suhu optimum, K_M , V_{maks} , k_i , $t_{1/2}$, dan ΔG_i enzim α -amilase dari hasil pemurnian dan hasil dari penambahan polietilen glikol (PEG) 4000.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Enzim

Enzim dapat didefinisikan sebagai biokatalisator yang bekerja untuk meningkatkan laju reaksi dalam jaringan yang menghasilkannya itu sendiri. Semua enzim yang diketahui sampai saat ini hampir merupakan protein. Ukuran molekul enzim juga sangat bervariasi, mencakup rentang yang luas. Enzim meningkatkan laju reaksi sehingga keseimbangan kimia terbentuk antara produk dan reaktan. Dalam kesetimbangan, urutan reaktan dan produk tidak pasti dan tergantung pada asumsi kita. Dalam kondisi fisiologis normal, enzim tidak mempengaruhi jumlah produk dalam reaksi yang sebenarnya diperoleh tanpa adanya enzim. Oleh karena itu, jika kondisi kesetimbangan tidak menguntungkan untuk pembentukan suatu senyawa, enzim tidak dapat mengubahnya (Salisbury and Ross, 1995).

Media produksi untuk membuat atau memproduksi enzim harus memenuhi kebutuhan dasar untuk menghasilkan sel serta produk. Unsur utama yang paling dibutuhkan adalah nitrogen dan karbon. Nitrogen sangat penting untuk pertumbuhan sel, sementara unsur karbon digunakan untuk meningkatkan energi biosintesis (Aunstrup, 1979).

Enzim dari mikroorganisme sering digunakan dibandingkan daripada yang berasal dari tanaman atau hewan karena mikroorganisme dapat berkembang biak dengan cepat, pertumbuhannya relatif mudah diatur, enzim yang dihasilkan tinggi, sehingga dapat menghemat biaya bila digunakan untuk industri dan produksi enzim yang dihasilkan lebih stabil (Yusak, 2004). Mikroorganisme penghasil enzim dapat berupa fungi dan bakteri (Alam *et al.*, 2004). Penggunaan

mikroorganisme lebih bermanfaat karena pertumbuhannya membutuhkan waktu yang lebih singkat, lebih ekonomis, dapat tumbuh pada substrat, mudah diproduksi dalam jumlah yang besar, dan hasil produknya dapat ditingkatkan melalui pengaturan kondisi pertumbuhan dan juga dapat ditingkatkan dengan upaya rekayasa genetik (Said dan Likadja, 2012).

2.1.1. Klasifikasi Enzim

Enzim terbagi menjadi dua tipe, yakni enzim ekstraseluler atau eksoenzim (berfungsi di luar sel) dan enzim intraseluler atau endoenzim (berfungsi dalam sel) (Pelczar dan Chan, 2010).

Klasifikasi enzim dapat dibedakan sebagai berikut:

- a. Berdasarkan tipe reaksi yang diketahui, enzim dibagi menjadi enam kelompok, antara lain:
 - 1) Oksidoreduktase
Enzim oksidoreduktase adalah enzim yang dapat mengkatalisis reaksi oksidasi atau reduksi suatu bahan.
 - 2) Transferase
Enzim transferase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi pemindahan (transfer) gugus fungsional antara dua substrat.
 - 3) Hidrolase
Enzim hidrolase adalah kelompok enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis suatu substrat atau pemecahan substrat, seperti karbohidrat, protein, dan ester.
 - 4) Liase
Enzim liase adalah enzim yang aktif dalam pemutusan ikatan karbon, karbon sulfur, dan karbon nitrogen (tidak termasuk ikatan peptida).
 - 5) Isomerase
Enzim isomerase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi perubahan konfigurasi molekul dengan cara pengaturan kembali atom-atom substrat sehingga dihasilkan molekul baru yang merupakan isomer dari substrat.

6) Ligase

Enzim ligase adalah enzim yang mengkatalisis pembentukan ikatan-ikatan tertentu, misalnya pada pembentukan ikatan C-C, C-O, dan C-S dalam biosintesis koenzim-A, serta pembentukan ikatan C-N dalam sintesis glutamin (Winarno, 2002).

b. Berdasarkan tempat bekerjanya, enzim dapat dibedakan menjadi dua, antara lain:

- 1) Endoenzim, disebut juga enzim intraseluler, yaitu enzim yang bekerja di dalam sel.
- 2) Eksoenzim, disebut juga enzim ekstraseluler, yaitu enzim yang bekerja di luar sel.

c. Berdasarkan cara terbentuknya, enzim dapat dibedakan menjadi dua, antara lain:

- 1) Enzim konstitutif, yaitu enzim yang jumlahnya dipengaruhi kadar substratnya.
- 2) Enzim adaptif, yaitu enzim yang pembentukannya dirangsang oleh adanya substrat (Lehninger, 1982).

2.1.2. Sifat Katalitik Enzim

Enzim bersifat spesifik dalam kerja katalitiknya. Kespesifikan ini disebabkan oleh bentuknya yang unik dan adanya gugus-gugus polar atau non-polar dalam struktur enzim. Suatu enzim dapat mempercepat reaksi 10^5 sampai 10^{17} kali lebih cepat dibandingkan dengan reaksi yang dilakukan tanpa katalis (Lehninger *et al.*, 2017). Dengan adanya enzim, molekul awal (substrat) akan dipercepat perubahannya menjadi molekul lain yang disebut produk (Grisham *and* Reginald, 1999).

Adapun sifat-sifat katalitik khas dari enzim, antara lain:

- a. Enzim mampu meningkatkan laju reaksi pada kondisi fisiologik dari tekanan, suhu, dan pH.
- b. Enzim berfungsi dengan selektivitas tinggi terhadap substrat dan jenis reaksi yang dikatalisis.

- c. Enzim memberikan peningkatan laju reaksi yang tinggi dibanding dengan katalis biasa (Page, 1997).

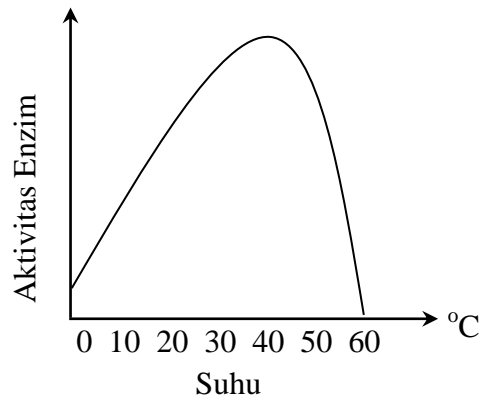
2.1.3. Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim

Enzim merupakan katalisator yang dapat mempercepat laju reaksi tanpa ikut serta dalam reaksi tersebut. Laju reaksi enzim dipengaruhi beberapa faktor seperti konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, pH, temperatur, dan inhibitor. Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain suhu, pH, konsentrasi enzim, substrat, kehadiran kofaktor atau inhibitor (Poedjiadi, 2006).

Berikut adalah faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim, antara lain:

- a. Suhu

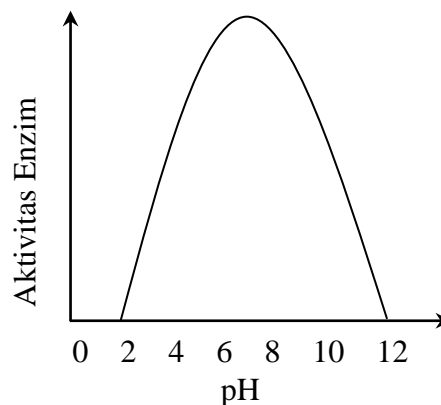
Suhu berpengaruh terhadap reaksi enzimatik. Peningkatan suhu secara umum akan meningkatkan kecepatan reaksi kimia enzim, tetapi kenaikan suhu yang terlalu tinggi akan menyebabkan terjadinya denaturasi enzim yaitu berubahnya struktur protein enzim, sehingga menyebabkan terjadinya penurunan kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim tersebut (Saropah dkk., 2012). Dalam batas-batas tertentu, kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim akan naik bila suhunya naik. Reaksi yang paling cepat terjadi pada suhu optimum (Rodwell *et al.*, 1987). Suhu optimum merupakan suhu pada saat enzim memiliki aktivitas maksimum. Suhu yang terlalu tinggi akan menyebabkan enzim terdenaturasi (Poedjiadi, 2006). Jika suatu protein terdenaturasi, maka susunan tiga dimensi rantai khas polipeptida terganggu dan molekul ini terbuka menjadi struktur acak, tanpa adanya kerusakan pada struktur kerangka kovalen (Lehninger, 1982). Grafik hubungan antara suhu dengan aktivitas enzim ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Hubungan antara suhu dan aktivitas enzim (Rodwell *et al.*, 2011).

b. Derajat Keasaman (pH)

Perubahan kereaktifan enzim merupakan salah satu akibat dari perubahan pH lingkungan (Rodwell *et al.*, 1987). Kondisi pH yang terlalu asam atau terlalu basa dapat menyebabkan asam amino penyusun enzim menjadi inaktif (Kusumaningrum dkk., 2019). Hubungan antara pH dan aktivitas enzim ditunjukkan pada Gambar 2.



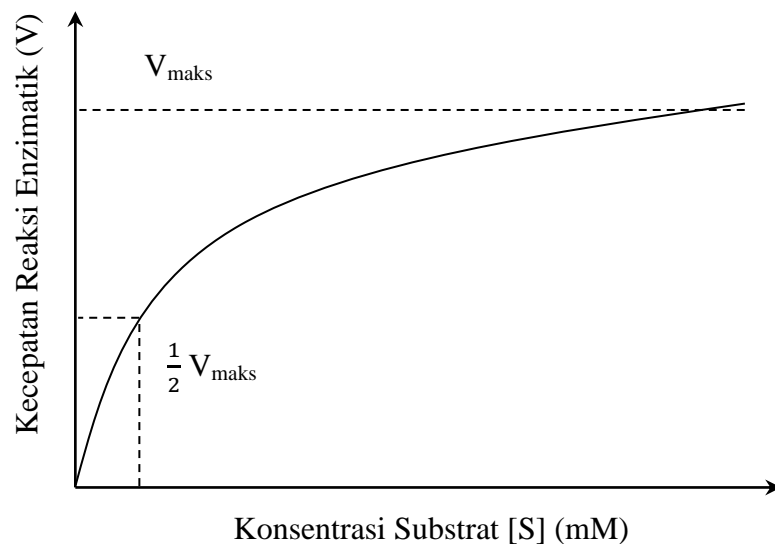
Gambar 2. Hubungan antara pH dan aktivitas enzim (Page, 1997)

c. Konsentrasi Enzim

Konsentrasi enzim secara langsung mempengaruhi laju reaksi enzimatis sehingga dengan bertambahnya konsentrasi, maka laju reaksi meningkat (Poedjiadi, 2006). Semakin tinggi konsentrasi enzim, maka kecepatan reaksi akan meningkat hingga batas konsentrasi tertentu. Kecepatan reaksi tersebut meningkat selama konsentrasi enzim jauh lebih sedikit daripada konsentrasi substrat (Page, 1997).

d. Konsentrasi Substrat

Konsentrasi substrat mempengaruhi laju reaksi, karena semakin banyak substrat yang ada maka semakin banyak pula ikatan yang terjadi antara enzim dan substrat. Kecepatan reaksi akan meningkat apabila konsentrasi substrat meningkat. Peningkatan kecepatan reaksi ini akan semakin kecil hingga tercapai suatu titik batas yang pada akhirnya penambahan konsentrasi substrat hanya akan sedikit meningkatkan kecepatan reaksi (Lehninger, 1982). Jika konsentrasi substrat dinaikkan dan kadar enzim tetap, maka laju reaksi akan naik sampai kondisi konstan, yaitu ketika semua substrat sudah diikat oleh enzim (Poedjiadi, 2006). Hubungan antara kecepatan reaksi enzim dengan konsentrasi substrat ditunjukkan pada Gambar 3.



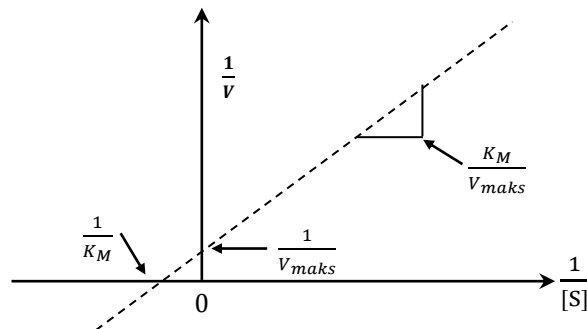
Gambar 3. Hubungan antara kecepatan reaksi enzim dengan konsentrasi substrat (Lehninger, 1982).

e. Aktivator dan Inhibitor

Senyawa kofaktor yang berupa ion logam ada yang berpotensi meningkatkan aktivitas kerja suatu enzim yang disebut sebagai aktivator enzim, ada pula ion logam yang menghambat aktivitas enzim disebut inhibitor enzim (Sumardjo, 2008).

2.1.4. Kinetika Reaksi Enzim

Untuk mengetahui konsentrasi substrat yang dapat menghasilkan laju reaksi maksimum, diperlukan penentuan tetapan Michaelis-Menten (K_M). K_M merupakan konstanta yang menunjukkan afinitas enzim terhadap substrat. Semakin kecil harga K_M , maka interaksi 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 atau V_{maks} . Nilai K_M dapat ditentukan dengan mengekstrapolasikan data eksperimental ke dalam grafik persamaan Lineweaver-Burk, seperti pada Gambar 4.



Gambar 4. Grafik persamaan Lineweaver-Burk (Murzin *and* Salmi, 2016)

Persamaan Lineweaver-Burk merupakan persamaan kebalikan berganda yang linier dari persamaan Michaelis-Menten. Berikut adalah persamaan Michaelis-Menten seperti pada Persamaan (1):

$$V_o = \frac{V_{maks} S}{K_M + S} \quad (1)$$

Persamaan Lineweaver-Burk ditunjukkan pada Persamaan (2):

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

(Palmer *and* Bonner, 2007).

2.1.5. Stabilitas Enzim

Stabilitas enzim dapat diartikan sebagai kestabilan aktivitas enzim selama penyimpanan dan penggunaan enzim tersebut, serta kestabilan terhadap berbagai senyawa yang bisa merusak enzim, seperti pelarut tertentu (asam atau basa) dan pengaruh suhu dan kondisi-kondisi non-fisiologis lainnya (Kazan *et al.*, 1997). Stabilitas enzim merupakan sifat penting yang harus dimiliki oleh enzim sebagai biokatalis. Enzim mempunyai kestabilan yang lebih baik dibandingkan dengan katalis sintetik karena enzim mempunyai spesifisitas tinggi, enzim bekerja secara spesifik (hanya mengkatalisis substrat tertentu), tidak berbentuk produk samping yang tidak diinginkan, mempunyai produktivitas tinggi, produk akhir pada umumnya tidak terkontaminasi sehingga mengurangi biaya pemurnian, dan mengurangi efek kerusakan terhadap lingkungan (Chaplin *and* Bucke, 1990).

Faktor yang sangat diperhatikan pada enzim yang akan diaplikasikan dalam industri dan akan mempengaruhi kestabilannya ialah suhu dan pH. Banyak faktor yang mempengaruhi stabilitas enzim seperti suhu, pH, pelarut, kofaktor, dan inhibitor (Eijsink *et al.*, 2005). Faktor-faktor yang mempengaruhi kestabilan enzim, antara lain:

a. Pengaruh Temperatur Tinggi (Stabilitas Termal)

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 (Rodwell *et al.*, 1987). 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. Proses inaktivasi enzim pada suhu tinggi berlangsung dalam dua tahap, antara lain:

- 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* Klibanov, 1987).
- b. Pengaruh pH (Stabilitas Terhadap pH)
- pH merupakan faktor yang memegang peranan penting dalam kestabilan enzim, karena semua reaksi enzim dipengaruhi oleh pH medium tempat reaksi terjadi. Pada umumnya enzim menunjukkan aktivitas maksimum pada suatu kisaran pH yang disebut pH optimum. Dalam hal ini, enzim yang sama sering kali pH optimumnya berbeda tergantung dari sumber enzim. Enzim menunjukkan aktivitas maksimum pada kisaran pH optimum enzim dengan stabilitas yang tinggi (Rodwell *et al.*, 1987).

2.2. Enzim Amilase

Amilase adalah kelas enzim yang mengkatalisis hidrolisis pati menjadi gula seperti glukosa dan maltosa. Amilase ialah enzim hidrolase glikosida yang mengkatalisis pemecahan pati menjadi gula. Amilase merupakan salah satu enzim yang paling penting dalam bioteknologi saat ini (Elkhalil *and* Gaffar, 2011). Amilase merupakan salah satu enzim yang mempunyai karakteristik yang netral, dimana dalam enzim ini memiliki pH atau pun derajat keasaman.

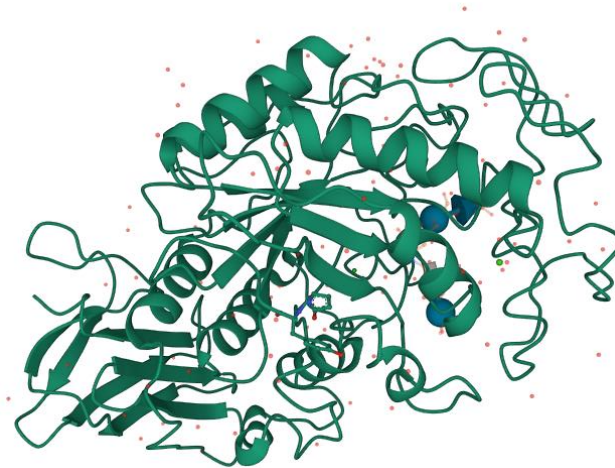
Amilase merupakan enzim yang memecah pati yang diproduksi oleh berbagai jenis makhluk hidup seperti dari bakteri, jamur, tumbuhan, dan manusia (Pandey *et al.*, 2000). Amilase telah diturunkan dari beberapa jamur, ragi, bakteri, dan *actinomycetes*. Akan tetapi, enzim dari jamur dan bakteri merupakan sumber yang dominan pada sektor industri. Sumber jamur terbatas pada isolat terrestrial, terutama spesies *Aspergillus* dan hanya satu spesies *Penicillium*, *P. brunneum*. Amilase jamur cukup labil, dihancurkan dengan cepat pada suhu di atas 60 °C, sedangkan amilase bakteri yang paling stabil dan menunjukkan sedikit inaktivasi pada suhu sampai 85 °C. Komposisi dan konsentrasi media sangat mempengaruhi

pertumbuhan bakteri dan produksi amilase ekstraseluler (Srivastava *and* Baruah, 1986).

Enzim amilase dapat dikelompokkan menjadi tiga golongan enzim, antara lain:

a. α -amilase (alfa-amilase)

Enzim α -amilase umumnya terdapat di hewan, tumbuhan, dan mikroba. Jamur dan bakteri banyak digunakan untuk memproduksi α -amilase tetapi bakteri lebih disukai karena menawarkan beberapa keuntungan (Pandey *et al.*, 2000). Enzim α -amilase cenderung lebih cepat kerjanya dibanding β -amilase karena dapat bekerja dimana saja pada substrat. Cara kerja enzim α -amilase terjadi melalui dua tahap. Tahap pertama, degradasi amilosa menjadi maltosa dan maltotriosa yang terjadi secara acak. Degradasi ini terjadi sangat cepat dan diikuti pula dengan menurunnya viskositas yang cepat. Tahap kedua, pembentukan glukosa dan maltosa sebagai hasil akhir dan caranya tidak acak yang relatif sangat lambat. Keduanya merupakan kerja enzim α -amilase pada molekul amilosa (Winarno, 1980). Berikut adalah struktur enzim α -amilase yang ditunjukkan dalam Gambar 5.



Gambar 5. Struktur enzim α -amilase (Boel *et al.*, 1990)

Enzim α -amilase menghidrolisis ikatan α -1,4-glikosidik amilosa, amilopektin, dan glikogen. Enzim ini bersifat sebagai endoamilase, yaitu enzim yang memecah pati secara acak dari tengah atau bagian dalam molekul. Berat molekul α -amilase rata-rata \pm 50 kDa. Enzim ini mempunyai rantai peptida tunggal pada gugusan proteinnya dan setiap molekul mengandung satu gram

atom Ca. Adanya kalsium yang berikatan dengan molekul protein enzim, membuat enzim α -amilase bersifat relatif tahan terhadap suhu, pH, dan senyawa seperti urea (Suhartono, 1989). Daya kerja α -amilase sangat dipengaruhi oleh suhu dan pH. pH optimum α -amilase adalah 7, akan tetapi nilai ini berbeda-beda untuk setiap sumber amilase. Enzim α -amilase juga memiliki sifat termostabilitas yang berbeda bergantung pada sumber enzimnya. Termostabilitas ini diperlukan pada pemilihan enzim untuk modifikasi pati (Sundarram *and* Murthy, 2014).

b. β -amilase (beta-amilase)

β -amilase (β -1,4-glukan malthohidrolase) merupakan enzim yang memecah pati dari luar molekul dan menghasilkan unit-unit maltosa dari ujung non pereduksi pada rantai polisakarida. Bila tiba pada ikatan α -1,6-glukosida seperti yang terdapat pada amilopektin atau glikogen, aktivitas enzim ini akan terhenti. Enzim ini bekerja pada ikatan α -1,4-glukosida dan memiliki pH optimum antara 5-6. β -amilase tidak dihasilkan pada jaringan hewan, kecuali jika mikroorganisme terdapat dalam saluran pencernaannya. Beberapa mikroorganisme yang mampu menghasilkan enzim β -amilase yaitu *B. polymyxa*, *B. cerens*, *B. megaterium*, *Streptomyces sp.*, *Pseudomonas sp.*, dan *R. japonicus* (Winarno, 2002).

c. γ -amilase (gamma-amilase)

Glukoamilase (α -1,4-D-glukan glukohidrolase) memecah ikatan α -1,4 dalam amilosa, amilopektin, dan glikogen. Enzim ini dapat juga menghidrolisis ikatan α -1,6 dan α -1,3, meskipun pemecahan ikatan tersebut sangat lambat. pH optimum enzim ini adalah 4-5. Pemutusan ikatan akhir α (1-4) glikosida pada ujung non reduksi dari amilosa dan amilopektin, untuk menghasilkan unit glukosa, γ -amilase sangat efisien pada lingkungan yang bersifat asam dan bekerja pada pH optimum 3 (Judoamidjojo dkk., 1989).

2.3. Isolasi dan Pemurnian Enzim

Enzim dapat diisolasi secara ekstraseluler dan intraseluler. Enzim ekstraseluler merupakan enzim yang bekerja di luar sel, sedangkan enzim intraseluler merupakan enzim yang bekerja di dalam sel. Ekstraksi enzim ekstraseluler lebih mudah dibandingkan ekstraksi dari intraseluler, karena tidak memerlukan pemecahan sel, dan enzim yang dikeluarkan dari sel mudah dipisahkan dari pengotor lain serta tidak banyak bercampur dengan bahan-bahan sel lain (Pelczar dan Chan, 2010).

a. Sentrifugasi

Sentrifugasi merupakan tahap awal pemurnian enzim. Metode ini digunakan untuk memisahkan enzim ekstraseluler dari sisa-sisa sel. Sentrifugasi akan menghasilkan supernatan yang jernih dan endapan yang terdapat pada dasar tabung, kemudian dipisahkan secara manual. Sel-sel mikroba biasanya mengalami kerusakan atau lisis pada kecepatan 6000 rpm selama 15-20 menit (Vincentelli, 2019). Proses sentrifugasi dilakukan pada suhu dingin 2-4 °C untuk mencegah denaturasi enzim karena proses tersebut akan melepaskan panas (Suhartono, 1989).

b. Fraksinasi Garam Ammonium Sulfat

Fraksinasi merupakan proses pengendapan secara bertahap. Pengendapan ini dapat dilakukan dengan penambahan garam seperti natrium klorida, natrium sulfat, atau ammonium sulfat. Pada umumnya garam yang sering digunakan adalah ammonium sulfat karena kebanyakan enzim tahan terhadap garam ini, memiliki kelarutan yang besar dalam air, mempunyai daya pengendapan besar, dan mempunyai efek penstabil terhadap kebanyakan enzim.

Penambahan senyawa elektrolit akan menurunkan kelarutan protein karena kelarutannya dipengaruhi oleh kekuatan ion (Suhartono, 1989). Dengan meningkatnya kekuatan ion, kelarutan enzim akan semakin besar atau disebut dengan peristiwa *salting in*, setelah mencapai suatu titik tertentu kelarutannya akan semakin menurun atau disebut peristiwa *salting out*. Pada kekuatan ion

yang rendah, protein akan terionisasi sehingga interaksi antar-protein akan menurun dan kelarutan protein akan meningkat. Peningkatan kekuatan ion akan meningkatkan kadar air yang terikat pada ion dan jika interaksi antar ion kuat, kelarutannya menurun akibatnya interaksi antar protein lebih kuat dan kelarutannya menurun (Agustien dan Munir, 1997).

c. Dialisis

Dialisis merupakan metode yang digunakan untuk memisahkan garam dari larutan protein. Metode ini berdasarkan pada sifat semipermeabel membran yang dapat menahan molekul-molekul besar, tapi dapat meloloskan molekul-molekul kecil seperti garam. Proses dialisis berlangsung 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, namun sebagian besar protein dan enzim stabil pada suhu 4-8 °C sehingga dialisis harus dilakukan pada kondisi suhu dingin (Pohl, 1990).

2.4. Uji Aktivitas dan Penentuan Kadar Protein Enzim Amilase

Pengujian aktivitas α -amilase dilakukan dengan metode Fuwa dan metode Mandels. Aktivitas enzim dihitung sebagai fungsi absorbansi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Metode Fuwa digunakan pada tahap isolasi dan pemurnian enzim α -amilase. Adapun metode Mandels digunakan dalam penentuan data kinetika enzim α -amilase yaitu pH optimum, suhu optimum, nilai K_M dan V_{maks} , stabilitas termal enzim, nilai k_i , $t_{1/2}$, dan ΔG_i (Assegaf, 2017).

2.4.1. Uji Aktivitas dengan Metode Fuwa

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

2.4.2. Uji Aktivitas dengan Metode Mandels

Metode Mandels didasarkan pada pembentukan produk (glukosa) hasil hidrolisis substrat pati yang akan mengalami oksidasi setelah penambahan reagen DNS menghasilkan larutan berwarna merah. Warna tersebut akan menyerap cahaya monokromatis pada λ_{maks} 510 nm (Fessenden dan Fessenden, 2011). Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan menggunakan kurva standar glukosa.

2.4.3. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

Pengukuran kadar protein metode Lowry didasarkan pada kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumine*) sebagai protein standar yang mengandung asam amino tirosin dan triptofan. Asam amino tersebut memiliki ikatan konjugasi yang mengalami transisi elektronik pada λ_{maks} 280 nm (Boyer, 2012). Pada metode Lowry, ion Cu(II) bereaksi dengan ikatan peptida pada protein (enzim) membentuk senyawa kompleks. Selanjutnya, kompleks Cu^{2+} dengan protein yang terbentuk tersebut akan tereduksi menjadi Cu^+ pada kondisi alkalis. Kemudian, Cu^+ yang terikat pada rantai samping tirosin, triptofan, atau sistein dari protein (enzim) akan bereaksi dengan reagen Folin-Ciocalteu yang akan mengikat protein. Reaksi ini secara perlahan akan mereduksi reagen tersebut menjadi heteromolibdenum menghasilkan warna hijau kebiruan yang akan menyerap cahaya monokromatis pada λ_{maks} 750 nm. Intensitas warna yang dihasilkan tergantung pada kandungan triptofan dan tirosin pada protein (enzim) (Lowry *et al.*, 1951).

2.5. *A. fumigatus*

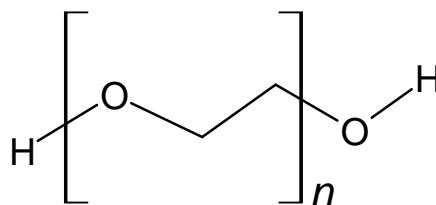
Fungi adalah mikroorganisme tidak berklorofil, berbentuk hifa atau sel tunggal, eukariotik, berdinding sel dari kitin atau selulosa, bereproduksi seksual dan aseksual. Dalam dunia kehidupan, fungi merupakan kingdom tersendiri, karena cara mendapatkan makanannya berbeda dari organisme eukariotik lainnya, yaitu melalui absorpsi. Sebagian besar tubuh fungi terdiri atas benang-benang yang disebut hifa, yang saling berhubungan menjalin semacam jala, yaitu miselium. Miselium dapat dibedakan atas miselium vegetatif yang berfungsi menyerap nutrisi dari lingkungan, dan miselium fertil yang berfungsi dalam reproduksi (Gandjar dkk., 1999).

Aspergillus merupakan fungi yang mampu hidup pada media dengan derajat keasaman dan kandungan gula yang tinggi. Fungi *A. fumigatus* dapat ditemukan di tanah, air, dan tumbuhan yang mengalami pembusukan, khususnya pada pupuk kandang dan humus (Gandi dkk., 2019). Fungi *A. fumigatus* termasuk mikroorganisme heterotrof karena tidak memiliki kemampuan untuk mengoksidasi senyawa karbon anorganik atau senyawa karbon yang memiliki satu karbon. Senyawa karbon organik yang dapat dimanfaatkan fungi untuk membuat materi sel baru berkisar dari molekul sederhana seperti gula sederhana, asam organik, polimer rantai pendek dan rantai panjang mengandung karbon, hingga pada senyawa kompleks seperti karbohidrat, protein, lipid, dan asam nukleat (Gadd, 1988; Ningrum dkk., 2013).

Sebagian besar tubuh jamur adalah hifa berfungsi menyerap nutrisi dari lingkungan. Hifa berisi protoplasma yang dikelilingi oleh dinding yang kuat. Dinding sel memberi bentuk fungi dan melindungi isi sel dari lingkungan meskipun kokoh dinding sel tetap bersifat permeabel untuk nutrisi-nutrisi yang diperlukan fungi bagi kehidupannya (Carlile and Watkinson, 1994).

2.6. Polietilen Glikol (PEG) 4000

Polietilena merupakan polimer sintetik yang merupakan hasil rekayasa manusia, polimer umumnya dikelompokkan berdasarkan perilaku mekanik dan struktur rantai atau molekulnya. Polimer termoplastik, misalnya polietilena, adalah jenis polimer yang memiliki sifat-sifat termoplastik yang disebabkan oleh struktur rantainya yang linier (*linear*), bercabang (*branched*) atau sedikit bersambung (*cross linked*). Polimer dari jenis ini akan bersifat lunak dan kental (*viscous*) pada saat dipanaskan dan menjadi keras dan kaku (*rigid*) pada saat didinginkan (Saputro dkk., 2012). Struktur polietilen glikol dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Struktur polietilen glikol (PEG).

Polietilen glikol (PEG) adalah polimer yang banyak digunakan dalam industri pangan, kosmetik, dan farmasi. PEG mempunyai kelarutan yang baik dalam air dan keasaman secara struktur kimia karena adanya gugus hidroksil primer pada ujung rantai polieter yang mengandung oksietilen ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$). Polietilen glikol atau PEG teraktivasi merupakan reagen yang banyak digunakan sebagai zat pemodifikasi enzim. PEG teraktivasi mengandung gugus reaktif yang dihubungkan langsung dengan gugus fungsi dalam enzim (Yang *et al.*, 1996). Polietilen glikol (PEG) merupakan polimer dari etilen oksida dan air, dibuat menjadi bermacam-macam panjang rantainya. Bahan ini terdapat dalam berbagai macam berat molekul dan yang paling banyak digunakan adalah polietilen glikol 200, 400, 600, 1000, 1500, 1540, 3350, 4000, dan 6000. Pemberian nomor menunjukkan berat molekul rata-rata lebih dari 1000 berupa lilin putih, padatan. Macam-macam kombinasi dari PEG bisa digabung dengan cara melebur.

PEG merupakan polimer larut air, polimer ini tidak berwarna, tidak berbau dan kekentalannya berbeda-beda tergantung jumlah $n = 2, 3, 4$, dan maksimum n berjumlah 180. Polimer dengan berat molekul rendah ($n = 2$) disebut dietil glikol

dan ($n = 4$) disebut tetra etil glikol. Polimer dengan berat molekul yang tinggi biasanya disebut poli (etilena glikol). Penggunaan PEG dapat dijumpai di berbagai industri. Area industri yang paling banyak menggunakan PEG adalah farmasi dan industri tekstil. Contoh berbagai produk yang menggunakan PEG adalah keramik, *metalforming*, obat supositoria, krim kosmetik, *lotion*, deodoran, dan minyak pelumas. Sifat PEG yang lunak dan rendah racun membuatnya banyak dipergunakan sebagai dasar obat salep dan pembawa dari bahan obat. Sifat PEG yang larut dalam air menyebabkan bahan obat mudah terlepas dan terserap pada kulit lebih cepat dari minyak yang teremulsi dalam air. Daya larut dalam air memberi keuntungan lantaran memberi kemudahan pengeluaran formulasinya setelah mencapai tujuan. PEG mempunyai beberapa keuntungan antara lain secara fisiologi inert, tidak terhidrolisis, tidak mendukung pertumbuhan jamur, mempunyai beberapa macam molekul. PEG mempunyai sifat stabil, mudah larut dalam air hangat, tidak beracun, non-korosif, tidak berbau, tidak berwarna, memiliki titik lebur yang sangat tinggi (580 °F), tersebar merata, higroskopik (mudah menguap), dan juga dapat mengikat pigmen. PEG berupa putih seperti lilin yang menyerupai paraffin. Berupa bentuk padat dalam suhu kamar, mencair pada suhu 104 °F, memiliki berat molekul rata-rata 1000 (Yang *et al.*, 1996). Semakin besar nilai berat molekul PEG maka akan semakin padat PEG tersebut dan sebaliknya. PEG berdasarkan berat molekulnya dibagi menjadi: PEG 200, 400, 600, 1000, 1500, 1540, 3350, 4000, 6000, 8000, dan diatas 100.000 sampai dengan 30.000. PEG dengan berat molekul dibawah 1000 berupa cairan jernih tidak berwarna, PEG dengan berat molekul 1000-1500 berupa semi padat. PEG 3000-20.000 berupa padatan semi kristalin, diatas 100.000 berupa resin pada suhu kamar. Jadi PEG semakin meningkat kekerasannya dengan bertambah besarnya berat molekul (Leuner *and* Dressman, 2000). Pada penelitian ini menggunakan polietilen glikol (PEG) 4000.

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2022 sampai dengan bulan Juni 2023 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung yang berlokasi di Jl. Prof. Dr. Ir. Sumantri Brojonegoro No. 1, Gedong Meneng, Kec. Rajabasa, Kota Bandar Lampung, Lampung 35141.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini, antara lain alat-alat gelas, jarum ose, mikropipet *Eppendorf*, neraca analitik, lemari pendingin, pembakar spirtus, sentrifuga *Cole-Parmer*, tabung sentrifuga, *autoclave* model S-90N, oven, *laminar air flow* CRUMA model 9005-FL, *shaker incubator*, *waterbath*, *incubator*, pH meter, *hot plate-magnetic stirrer*, botol film, botol plastik, dan spektrofotometer *Cary-100 UV-Vis Agilent Technologies*.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini, antara lain pati, PDA (*Potato Dextrose Agar*) (Himedia), KH_2PO_4 (Merck), HCl, $\text{FeSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), CaCl_2 (Merck), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, NaH_2PO_4 (Merck), Na_2HPO_4 (Merck), CoCl_2 , KI, I_2 , Na_2CO_3 (Merck), NaOH 0,1 N, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck), Na/K-tartrat, reagen Folin-Ciocalteu, BSA (*Bovine Serum Albumin*), DNS (*dinitrosalicylic acid*), pepton, urea, akuades, kantong selofan,

kapas sumbat, kertas, karet, *aluminium foil*, alkohol 70%, tisu, kertas saring, es batu, buffer fosfat, dan polietilen glikol (PEG) 4000.

Mikroorganisme penghasil enzim α -amilase yang digunakan pada penelitian ini adalah *A. fumigatus* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung, yang dibiakkan terlebih dahulu sebelum digunakan.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Pembiakan Isolat *A. fumigatus*

a. Pembuatan Media Agar Miring

Pembuatan media agar miring dilakukan dengan melarutkan sebanyak 3,9 gram PDA (*Potato Dextrose Agar*) dan 0,1 gram pati dalam 100 mL akuades lalu dipanaskan. Kemudian, dituangkan dalam tabung reaksi sebanyak 4-5 mL. Tabung reaksi ditutup dengan sumbat kapas, dilapisi dengan *aluminium foil* dan disterilkan media tersebut dalam *autoclave* pada suhu 121 °C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah disterilisasi, tabung reaksi yang berisi media agar disimpan dalam posisi miring sampai media mengeras sekitar 72 jam.

b. Pembiakan *A. fumigatus*

Pembiakan dilakukan dengan mengambil satu ose biakan murni *A. fumigatus* kemudian ditusuk ke permukaan media agar miring. Proses ini dilakukan dengan keadaan aseptis di dalam *laminar air flow* yang telah melewati sterilisasi dengan sinar UV selama 10 menit dan *blower* selama 10 menit. Media agar miring yang telah mengandung isolat diinkubasi selama beberapa hari dalam *incubator* pada suhu 37 °C (Yandri *et al.*, 2022).

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

a. Pembuatan Media Inokulum dan Fermentasi

Media fermentasi dibuat dari KH_2PO_4 5,0 gram, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,5 gram, MgSO_4 0,75 gram, pepton 1,875 gram, urea 0,75 gram, CaCl_2 0,75 gram, $\text{FeSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,0125 gram, $\text{ZnSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0,0035 gram, CoCl_2 0,005 gram dan pati 1,875 gram. Kemudian semua bahan dilarutkan dalam 250 mL buffer fosfat 0,05 M pH 6,0 dalam labu Erlenmeyer 500 mL. Lalu, dipanaskan di atas *hot plate* agar semua bahan homogen. Setelah homogen, sebanyak 50 mL media fermentasi dipindahkan ke labu Erlenmeyer 250 mL untuk dijadikan sebagai media inokulum. Kemudian, media fermentasi dan media inokulum disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121 °C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Kemudian, media fermentasi dan media inokulum disimpan pada *laminar air flow*. Media fermentasi disimpan selama 48 jam, sementara media inokulum disimpan selama 24 jam untuk selanjutnya akan dilakukan inokulasi *A. fumigatus* (Yandri *et al.*, 2022).

b. Inokulasi *A. fumigatus*

Inokulasi *A. fumigatus* dilakukan dengan memindahkan sebanyak 3 ose biakan *A. fumigatus* dari media agar miring ke dalam media inokulum secara aseptis di dalam *laminar air flow*, lalu dikocok dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam.

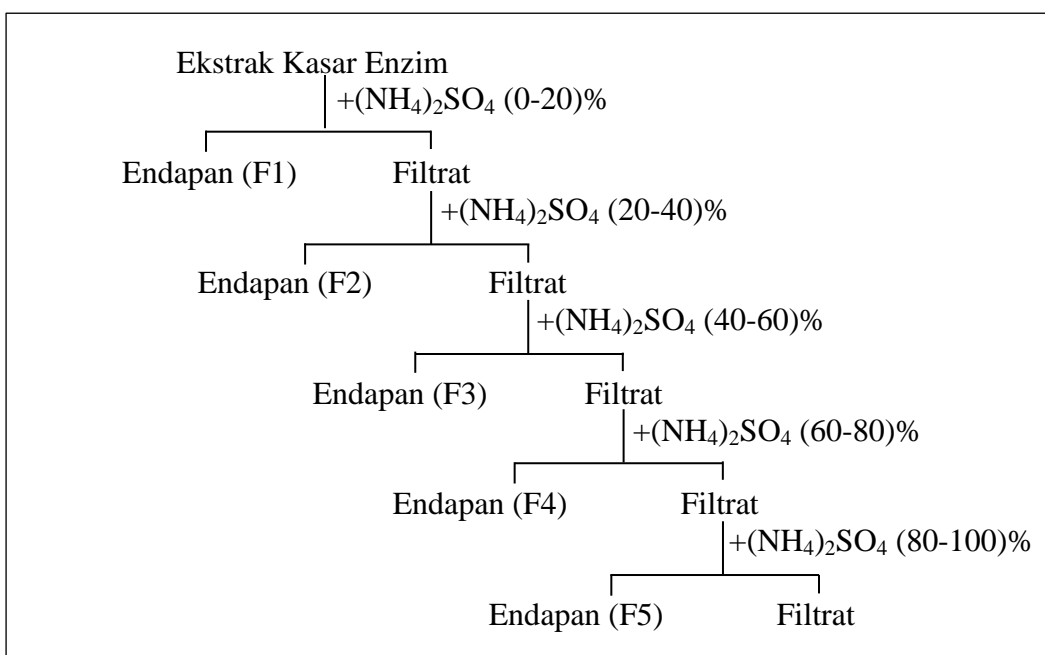
c. Produksi Enzim α -amilase

Produksi enzim α -amilase dilakukan dengan cara memindahkan media inokulum sebanyak 2% dari volume media fermentasi ke dalam media fermentasi secara aseptis di dalam *laminar air flow* lalu dikocok dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm pada suhu ruang selama 120 jam. Hasil fermentasi disentrifuga untuk mendapatkan ekstrak kasar enzim α -amilase selama 15-20 menit (Yandri *et al.*, 2022). Hasil sentrifuga akan membentuk supernatan dan pellet. Supernatan yang diperoleh adalah enzim amilase (ekstrak kasar) yang dapat diuji aktivitasnya (Wahyuni dkk., 2017), sedangkan pellet dibuang (Shaw *et al.*, 1995). Ekstrak kasar enzim α -amilase selanjutnya

akan diuji aktivitasnya dengan metode Fuwa dan metode Mandels, serta diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.

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

Ekstrak kasar enzim yang diperoleh dimurnikan dengan cara fraksinasi menggunakan garam ammonium sulfat dari berbagai derajat kejenuhan, yakni (0-20); (20-40); (40-60), (60-80), dan (80-100)%. Skema fraksinasi dengan ammonium sulfat ditunjukkan dalam Gambar 7.



Gambar 7. Skema fraksinasi

Ekstrak kasar enzim ditambahkan dengan garam ammonium sulfat secara perlahan sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Endapan protein enzim yang didapatkan pada tiap fraksi kejenuhan ammonium 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 6,0 dan diuji aktivitasnya dengan metode Fuwa dan metode Mandels, serta diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry. Selanjutnya, filtrat yang didapat dari fraksi (0-20)% digunakan untuk diendapkan kembali dengan fraksi kejenuhan (20-40)% dengan prosedur yang sama hingga fraksi kejenuhan (80-100)% (Yandri *et al.*, 2022).

3.3.4. Dialisis

Enzim hasil fraksinasi dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis dengan buffer fosfat 0,01 M pH 6,0 selama 24 jam pada suhu dingin. Selama proses dialisis, dilakukan pergantian buffer setiap 4-6 jam agar konsentrasi ion-ion di dalam selofan dapat dikurangi. Proses ini dilakukan secara kontinu 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 kantong selofan. Selanjutnya, dilakukan uji aktivitas dengan metode Fuwa dan metode Mandels, serta diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.

3.3.5. Uji Aktivitas Enzim α -Amilase dengan Metode Fuwa

a. Pembuatan Pereaksi Iodin

Memasukkan sebanyak 2,0 gram KI ke dalam labu takar 100 mL lalu dilarutkan dengan 10 mL akuades. Kemudian, menambahkan 0,2 gram I_2 . Selanjutnya, ditambahkan akuades hingga batas miniskus.

b. Pembuatan Larutan Pati

Sebanyak 0,1 gram pati dilarutkan dalam 100 mL akuades lalu dipanaskan hingga larut.

c. Pembuatan Larutan HCl 1 N

Menghitung pengenceran HCl pekat 12 N menjadi 1 N. Maka, akan diperoleh 8,3 mL HCl pekat yang selanjutnya ditambah dengan akuades hingga batas miniskus pada labu ukur 100 mL.

d. Uji Aktivitas Enzim α -Amilase

Sebanyak 0,25 mL ekstrak kasar enzim ditambahkan ke dalam 0,25 mL larutan pati 0,1% dalam tabung reaksi, lalu diinkubasi pada suhu 60 °C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 0,25 mL HCl 1 N, kemudian ditambahkan 0,25 mL pereaksi iodin dan 4 mL akuades. Campuran diaduk rata,

lalu diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ 600 nm. Kontrol dibuat dengan cara yang sama, namun hanya menggunakan 0,25 mL enzim yang telah diinaktivasi menggunakan HCl.

3.3.6. Uji Aktivitas Enzim α -Amilase dengan Metode Mandels

a. Pembuatan Pereaksi

Pembuatan pereaksi dilakukan dengan memasukkan DNS (*dinitrosalicylic acid*) 1%, NaOH 1%, fenol 0,2%, Na₂SO₃ 0,05%, Na/K tartarat 40% ke dalam labu ukur 100 mL. Kemudian dilarutkan dengan akuades hingga tanda batas (Mandels *et al.*, 1976).

b. Uji Aktivitas Enzim α -Amilase

Sebanyak 0,25 mL enzim dan 0,25 mL larutan pati 0,1% dicampur lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 60 °C. Kemudian, ditambahkan 1 mL pereaksi DNS (*dinitrosalicylic acid*) dan dididihkan selama 10 menit pada penangas air. Selanjutnya dibiarkan hingga suhu ruang dan ditambahkan 1,5 mL akuades. Serapannya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} 510 nm.

3.3.7. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

a. Pembuatan Pereaksi

Untuk penentuan kadar protein dengan metode Lowry, hal pertama yang dilakukan yaitu membuat pereaksi. Pereaksi-pereaksi yang dibuat untuk penentuan kadar protein dengan metode Lowry, antara lain sebagai berikut:

- a) Pereaksi A : Na₂CO₃ 2 gram dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 N.
- b) Pereaksi B : Larutan CuSO₄.5H₂O 1% 5 mL ditambahkan ke dalam 5 mL larutan Na/K tartarat 1%.
- c) Pereaksi C : Sebanyak 2 mL pereaksi B ditambahkan 100 mL pereaksi A.

- d) Pereaksi D : Reagen Folin-Ciocalteu diencerkan dengan akuades dengan perbandingan 1 : 1.
- e) Larutan standar : Larutan BSA (*Bovine Serum Albumin*) dengan kadar 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm.

b. Penentuan Kadar Protein

Kadar protein enzim ditentukan dengan metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Sebanyak 0,1 mL larutan enzim ditambah 0,9 mL akuades dan 5 mL pereaksi C, dikocok lalu didiamkan selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan 0,5 mL pereaksi D, dikocok lalu didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit. Untuk kontrol, sebanyak 0,1 mL enzim diganti dengan 0,1 mL akuades dan dilakukan perlakuan yang sama seperti pada sampel. Serapannya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} 750 nm. Untuk menentukan konsentrasi protein enzim, maka digunakan digunakan kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumin*).

3.3.8. Penambahan Polietilen Glikol (PEG) 4000

Pada ekstrak kasar enzim yang telah dimurnikan, ditambahkan larutan polietilen glikol (PEG) 4000 dengan konsentrasi 12%, 18%, dan 24% dengan perbandingan 1:1. Penambahan dilakukan dengan menghomogenkan enzim hasil pemurnian dan larutan polietilen glikol (PEG) 4000 menggunakan *magnetic stirrer* selama ± 30 menit (Sari, 2017).

3.3.9. Karakterisasi Enzim α -Amilase Sebelum dan Setelah Penambahan Polietilen Glikol (PEG) 4000 dengan Variasi Konsentrasi 12, 18, dan 24%

a. Penentuan pH Optimum

Untuk mengetahui pH optimum enzim α -amilase sebelum dan setelah penambahan polietilen glikol (PEG) 4000, digunakan buffer fosfat 0,1 M dengan variasi pH, yakni 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; dan 8,0. Kemudian, aktivitas enzim diuji dengan metode Mandels.

b. Penentuan Suhu Optimum

Untuk mengetahui suhu optimum enzim α -amilase hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan polietilen glikol (PEG) 4000, dapat ditentukan dengan memvariasikan suhu pada saat inkubasi dengan variasi suhu 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 dan 80 °C. Kemudian, aktivitas enzim diuji dengan metode Mandels.

c. Penentuan Kinetika Enzim (K_M dan V_{maks})

Nilai Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) enzim α -amilase hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan polietilen glikol (PEG) 4000 dapat ditentukan dengan memvariasikan konsentrasi substrat yang digunakan, yakni 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1,0%. Kemudian, dilakukan pengukuran aktivitas enzim dengan metode Mandels. Selanjutnya, data yang diperoleh akan diplotkan dalam kurva Lineweaver-Burk untuk mendapatkan nilai Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}).

d. Uji Stabilitas Termal Enzim

Uji stabilitas termal enzim α -amilase hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan polietilen glikol (PEG) 4000 dapat ditentukan dengan memvariasikan waktu inkubasi. Waktu inkubasi dibutuhkan oleh enzim untuk bereaksi dengan substrat secara optimum. Dalam penelitian ini, dilakukan pengukuran aktivitas sisa enzim α -amilase sebelum dan setelah diinkubasi selama 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, dan 100 menit. Aktivitas awal enzim (tanpa pemanasan) diberi nilai 100%. Sehingga aktivitas sisa enzim dapat ditentukan dengan Persamaan (3) seperti berikut:

$$\text{Aktivitas Sisa (\%)} = \frac{E_i}{E_o} \times 100\% \quad (3)$$

Keterangan:

E_o = Aktivitas sisa enzim pada t_o atau tanpa inaktivasi

E_i = Aktivitas enzim sesudah diinaktivasi selama t_i

(Yang *et al.*, 1996).

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

Penentuan konstanta laju inaktivasi (k_i) enzim hasil pemurnian sebelum dan sesudah penambahan polietilen glikol (PEG) 4000 dilakukan dengan menggunakan persamaan kinetika inaktivasi orde 1, yakni dengan Persamaan (4) sebagai berikut:

$$\ln \left[\frac{E_i}{E_0} \right] = -k_i t \quad (4)$$

Waktu paruh ($t_{1/2}$) dapat dihitung dengan persamaan laju reaksi inaktivasi enzim orde 1 (Kazan *et al.*, 1997), seperti Persamaan (5) berikut:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_i} = \frac{0,69315}{k_i} \quad (5)$$

Penentuan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan polietilen glikol (PEG) 4000 dilakukan dengan menggunakan Persamaan (6) sebagai berikut:

$$\Delta G_i = -RT \ln \left(\frac{k_i h}{k_B T} \right) \quad (6)$$

Keterangan:

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

T = Suhu absolut (K)

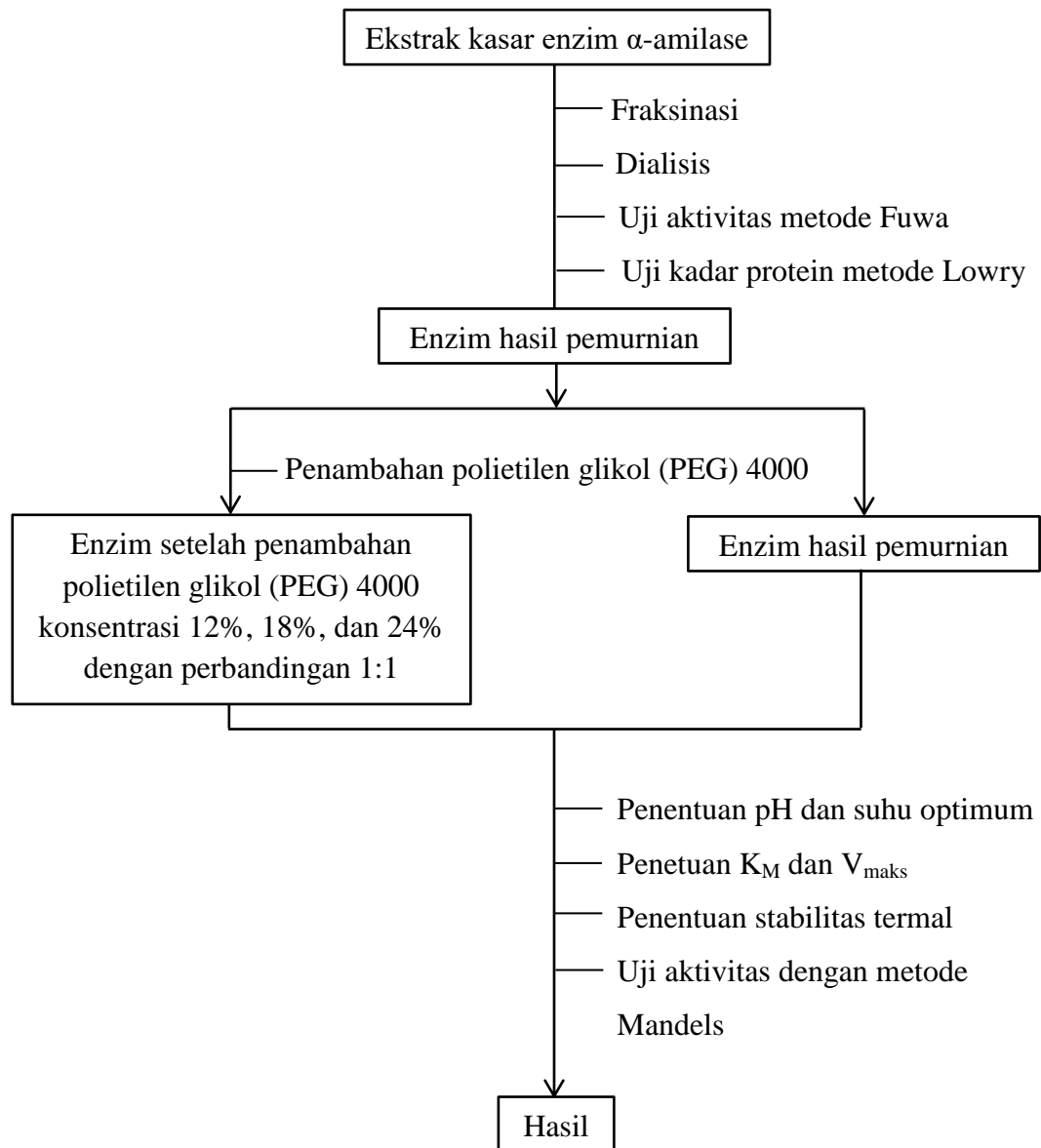
k_i = Konstanta laju inaktivasi termal

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

k_B = Konstanta Boltzmann ($1,381 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$)

(Kazan *et al.*, 1997).

Secara keseluruhan, penelitian ini terangkum dalam diagram alir penelitian yang ditunjukkan pada Gambar 8.



Gambar 8. Diagram alir penelitian

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

Dari pembahasan yang telah diperoleh dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Enzim α -amilase hasil pemurnian memiliki aktivitas spesifik sebesar 456,88 U/mg yang meningkat sebanyak 15 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim yang hanya memiliki aktivitas spesifik sebesar 31,18 U/mg.
2. pH optimum enzim hasil pemurnian dan enzim hasil penambahan PEG 4000 konsentrasi 12, 18, dan 24% mengalami pergeseran yang semula 5,0 menjadi 5,5.
3. Suhu optimum enzim hasil pemurnian dan enzim hasil penambahan PEG 4000 mengalami pergeseran yang semula 50 °C menjadi 55 °C.
4. Enzim hasil pemurnian memiliki nilai K_M sebesar $7,924 \pm 0,031$ mg mL⁻¹ substrat dan V_{maks} sebesar $8,865 \pm 0,033$ μ mol mL⁻¹ menit⁻¹. Nilai K_M enzim hasil penambahan PEG 4000 konsentrasi 12, 18, dan 24% berturut-turut adalah $9,151 \pm 0,261$; $11,001 \pm 0,053$; dan $11,052 \pm 0,049$ mg mL⁻¹ substrat, sementara nilai V_{maks} berturut-turut adalah $11,601 \pm 0,362$; $13,123 \pm 0,281$; dan $16,393 \pm 0,038$ μ mol mL⁻¹ menit⁻¹.
5. Stabilitas enzim α -amilase mengalami peningkatan yang ditunjukkan oleh menurunnya nilai konstanta laju inaktivasi, meningkatnya waktu paruh, dan meningkatnya energi akibat denaturasi. Waktu paruh enzim hasil penambahan PEG 4000 secara berturut-turut adalah meningkat 1,393; 1,663; dan 1,852 kali dari enzim hasil pemurnian.

5.2. Saran

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, maka disarankan untuk memakai penggunaan konsentrasi zat aditif yang lebih tinggi lagi, misalnya konsentrasi 25, 30, dan 35% untuk memperoleh stabilitas enzim yang lebih baik lagi. Untuk penelitian selanjutnya, diharapkan tetap menjaga suhu sekitar enzim pada saat sedang isolasi, pemurnian, uji aktivitas, uji kadar protein, dan karakterisasi agar enzim tidak mengalami denaturasi.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Agustien, A. dan Munir, E. 1997. Purifikasi penisilin asilase dari *Bacillus*. *Prosiding Seminar Wawasan Keilmuan Untuk Meningkatkan Kualitas Pembangunan Bangsa Indonesia*. PPI Universitas Sains Malaysia. 270-277.
- Ahern, T. J., Casal, J. I., Petsko, G. A., and Klibanov, A. M. 1987. Control of oligomeric enzyme thermostability by protein engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **84**: 675-679.
- Alam, M. Z., Manchulur, M. A., and Anwar, M. N. 2004. Isolation, purification, characterization of cellulolytic enzymes produced by the isolate *Streptomyces omiyaensis*. *J. Biol. Sci.* **7**(10): 1647–1653.
- Assegaf, S. 2017. *Peningkatan Kestabilan Enzim α -Amilase dari *Rhizopus oligosporus* dengan Penambahan Polietilen Glikol (PEG) 6000*. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Bandar Lampung. 33-35.
- Aunstrup, K. 1979. Production, isolation, and economic of extracellular enzyme. *Appl. Biochem and Bioeng.* **2**:27-69.
- Bal, E., Pinar, O., Kazan, D., Öztürk, H. U., and Sayar, A. A. 2016. Immobilization of α -amylase from *Bacillus subtilis* SDP1 isolated from the Rhizosphere of *Acacia cyanophylla* Lindey. *eJBio.* **12**(2): 115–121.
- Boel, E., Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z., Dodson, G. G., Jensen, V. J., Petersen, S. B. Swift, H., Thim, L., and Woldike, H. F. 1990. Calcium binding in α -amylase: an x-ray diffraction study at 2.1- \AA resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochem.* **29**(26): 6244-6249.
- Boyer, R. F. 2012. *Biochemistry Laboratory: Modern Theory and Techniques Second Edition*. Pearson Education Inc. London. 70-71.
- Carlile, M. J. and Watkinson, S. C. 1994. *The Fungi*. Academic Press Ltd. London. 482.
- Chaplin, M. F. and Bucke, C. 1990. *Enzyme Technology*. Cambridge University Press. Great Britain. 137.

- Dawn, B. M., Allan, D. M., dan Colleen, M. S. 2000. *Biokimia Kedokteran Dasar Sebuah Pendekatan Klinis*. Penerbit Buku kedokteran EGC. Jakarta. 321.
- Eijsink, V. G. H., Sirgit, G., Torben, V. B., and Bertus, B. 2005. Directed evolution of enzyme stability. *Biomol. Eng.* **22**(3): 21–30.
- Elkhalil, E. A. I. and Gaffar, F. Y. 2011. Biochemical characterization of thermophilic amylase enzyme isolated from *Bacillus* strains. *IJSN*. **2**(3): 616–620.
- Far, B. E., Ahmadi, Y., Khosroushahi, A. Y., and Dilmaghani, A. 2020. Microbial alpha-amylase production: progress, challenges, and perspectives. *Adv. Pharm. Bull.* **10**(3): 350–358.
- Fessenden, R. J. dan Fessenden, J. S. 2011. *Kimia Organik Jilid 2 Edisi Ketiga*. Erlangga. Jakarta. 436-442.
- 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.
- Gadd, G. M., Boswell, G. P., Jacobs, H., Davidson, F. A., and Ritz, K. 2002. Functional consequences of nutrient translocation in mycelial fungi. *J. Theor. Biol.* **217**(4): 459-477.
- Gandi, N. L. G., Getas, I. W., dan Jannah, M. 2019. Studi jamur *Aspergillus fumigatus* penyebab aspergillosis di Pasar Cakranegara Kota Mataram dengan media pertumbuhan potato dextrose agar (PDA). *JAMBS*. **6**(1): 81-89.
- Gandjar, I., Samson, R. A., Vermeulen, K. V. D. T., Oetari, A., dan Santoso, I. 1999. *Pengenalan Kapang Tropik Umum*. Yayasan Obor Indonesia. Jakarta. 2.
- Grisham, M. C. and Garret, R. H. 1999. *Biochemistry Second Edition*. Cengage Learning. Philadelphia. 677.
- John, J. 2019. Amylases bioprocess and potential applications: a review. *Int. J. Bioinf. Biol. Sci.* **5**(2): 41–50.
- Judoamidjojo, M., Sa'id, G. E., dan Hartono, L. 1989. *Biokonversi*. Depdikbud Dirjen Dikti PAU Bioteknologi IPB. Bogor. 126.
- Kazan, D., Ertan, H., and Erarslan, A. 1997. Stabilization of *Escherichia coli* penicillin G acylase by polyethylene glycols against thermal inactivation. *Appl. Microb. Biotechnol.* **62**: 1–13.
- Kumaunang, M. dan Vanda, K. 2011. Aktivitas enzim bromelin dari ekstrak kulit nenas (*Ananas comosus*). *J. Ilm. Sain.* **11**(2): 198–201.

- Kusumaningrum, A., Gunam, I. B. W., dan Wijaya, I. M. M. 2019. Optimasi suhu dan pH terhadap aktivitas enzim endoglukanase menggunakan response surface methodology (RSM). *Jur. Rek. Manaj. Agroind.* **7**(2): 243-253.
- Lehninger, A. L. 1982. *Dasar-dasar Biokimia*. Erlangga. Jakarta. 237-256.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., and Michael, M. C. 2017. *Principles of Biochemistry Lehninger Seventh Edition (7th ed.)*. W. H. Freeman and Company. New York. 525.
- Leuner, C. and Dressman, J. 2000. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersion. *Euro. J. Pharm. Biopharm.* **50**(2000): 47-60.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Far, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**(1): 265-275.
- Mandels, M., Andreotti, R., and Roche, C. 1976. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **6**: 21-33.
- Martinez, M. M., Joana, P., and Manuel, G. 2015. Physicochemical modification of native and extruded wheat flours by enzymatic amylolysis. *Food Chem.* **167**: 447-453.
- Mufarrikha, I., Roosdiana, A., dan Prasetyawan, S. 2014. Optimasi kondisi produksi pektinase dari *Aspergillus niger*. *Kim. Stud. Journ.* **2**(1): 393-399.
- Murzin, D. Y. and Salmi, T. 2016. *Catalytic Kinetics Chemistry and Engineering Second Edition (2nd ed.)*. Elsevier B. V. India. 320.
- Naiola, E. 2002. Karakterisasi dan optimasi media produksi amilase dari *Aspergillus niger* dan *Aspergillus clavatus*. *Ber. Biol.* **6**(3): 415-421.
- Nielsen, J. E., Beier, L., Otzen, D., Brochert, T. V., Frantzen, H. B., Andersen, K. V., and Svenden, A. 1999. Electrostatics in the active site of an α -amylase. *Euro. J. Biochem.* **264**(3): 816-824.
- Ningrum, N. R., Widhorini, dan Yuliani, E. 2013. Analisis pertumbuhan jamur *Aspergillus fumigatus* dalam media kacang hijau (*Phaseolus radiatus L.*). *JKK.* **8**(1): 15-25.
- Ningsih, D. R., Rastuti, U., dan Kamaludin, R. 2012. Karakterisasi enzim amilase dari bakteri *Bacillus amyloliquefaciens*. *Prosiding Seminar Pengembangan Sumber Daya Pedesaan dan Kearifan Lokal Berkelanjutan II*. Purwokerto. 39-45.
- Page, D. S. 1997. *Prinsip-Prinsip Biokimia Edisi Ketiga*. Erlangga. Jakarta.

- Palmer, T. and Bonner, P. L. 2007. *Enzymes: Biochemistry, Biotechnology and Clinical Chemistry Second Edition (2nd ed.)*. Horwood Publishing Limited. Cambridge. 239.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., and Mohan, R. 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **31**(2): 135–152.
- Pelczar, M. J. dan Chan, E. S. C. 2010. *Dasar-dasar Mikrobiologi Jilid I*. UI Press. Jakarta.
- Planchot, V. and Colonna, P. 1995. Purification and characterization of extracellular alpha-amylase from *Aspergillus fumigatus*. *Carbohydr. Res.* **272**(1): 97–109.
- Poedjiadi, A. 2006. *Dasar-dasar Biokimia Edisi Revisi*. UI Press. Jakarta.
- Pohl, T. 1990. *Concentration of Protein Removal of Salute In M.P. Deutscher, Methods of Enzymology Guide to Protein Purification*. Academic Press. New York. 182.
- Rodwell, V. W., David, A. B., Kathleen, M. B., Peter, J. K., and Anthony, W. 2011. *Harper's Illustrated Biochemistry 30e*. The McGraw-Hill Education. New York. 78.
- Rodwell, V. W., Darmawan, Iyan, Martin, David, W., and Mayes, P. A. 1987. *Harper's Review of Biochemistry*. EGC Kedokteran. Jakarta. 63-65.
- Roth, C., Moroz, O. V., Turkenburg, J. P., Blagova, E., Waterman, J., Ariza, A., Ming, L., Tianqi, S., Andersen, C., Davies, G. J., and Wilson, K. S. 2019. Structural and functional characterization of three novel fungal amylases with enhanced stability and pH tolerance. *Int. J. Mol. Sci.* **20**(19): 1–15.
- Said, M. I. dan Likadja, J. C. 2012. Isolasi dan identifikasi bakteri yang berpotensi sebagai penghasil enzim protease di industri penyamakan kulit PT. Adi Satria Abadi (ASA) Yogyakarta. *JITP.* **2**(2): 121–128.
- Salem, K., Elgharbi, F., Ben Hlima, H., Perduca, M., Sayari, A., and Hmida, S. A. 2020. Biochemical characterization and structural insights into the high substrate affinity of a dimeric and Ca²⁺ independent *Bacillus subtilis* α -amylase. *Biotech. Progress.* **36**(4): 1–14.
- Salisbury, F. B. and Ross, C. W. 1995. *Plant Physiology*. Wardsworth Pub. Co. California. 485.
- Santoso, A., Intan, K. T., dan Silaban, R. 2011. Studi persepsi masyarakat terhadap peran enzim dalam pembuatan susu terfermentasi. *Jur. Pend. Kim.* **3**(1): 31-41.

- Saputro, D. F., Widiarto, S., dan Yuwono, S. D. 2019. Studi pendahuluan pembuatan dan karakterisasi plastik ramah lingkungan dari campuran polistirena-poli asam laktat. *Prosiding SNSMAIP III*. 388-392.
- Sari, M. R. 2017. *Studi Pengaruh Penambahan Polietilen Glikol 6000 Terhadap Kestabilan Enzim Protease dari Rhizopus oligosporus*. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Bandar Lampung. 41.
- Saropah, D. A., Jannah, A., dan Maunatin, A. 2012. Kinetika reaksi enzimatis ekstrak kasar enzim selulase bakteri selulolitik hasil isolasi dari bekatul. *Alchemy*. **2**(1): 34–45.
- Sarrouh, B., Santos, T. M., Miyoshi, A., Dias, R., and Azevedo, V. 2012. Up-to-date insight on industrial enzymes applications and global market. *J. Bioprocess. Biotech*. **4**(2): 1-10.
- Shaw, F. J., Lin, P. F., Chen, S. C., and Chen, H. C. 1995. Purification and properties of an extracellular α -amylase from *Thermus sp.* *Bot. Bull. Acad. Sin.* **36**(3): 195–200.
- Srivastava, R. A. K. and Baruah, J. N. 1986. Culture conditions for production of thermostable amylase by *Bacillus stearothermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**(1): 179–184.
- Stellwagen, E. 1984. Strategies for increasing the stability of enzymes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **434**(1): 1-6.
- Suhartono, M. T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Depdikbud Dirjen Dikti PAU Bioteknologi IPB. Bogor.
- Sumardjo, D. 2006. *Pengantar Kimia Buku Panduan Kuliah Mahasiswa Kedokteran*. EGC. Jakarta. 183.
- Sundarram, A. and Murthy, T. P. K. 2014. α -amylase production and applications: a review. *Appl. Environ. Microbiol.* **2**(4): 166-175
- Tarigan, W. F., Sumardi., dan Setiawan, W.A. 2015. Karakterisasi enzim selulase dari bakteri selulolitik *Bacillus sp.* *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi IV*. Bandar Lampung. 736-747.
- Vincentelli, R. 2019. *High-Throughput Protein Production and Purification Methods and Protocols Methods in Molecular Biology*. Humana Press. New York.
- Wahyuni, S., Suarya, P., dan Saputra, I. M. A. 2017. Isolasi enzim amilase dari kecambah biji jagung lokal seraya (*Zea mays L.*) untuk hidrolisis pati. *J. Chem.* **11**(2): 122–128.

- Wang, N. S. 2009. *Starch Hydrolysis by Amylase*. Department of Chemical and Biomolecular Engineering. Maryland. 2-3.
- Winarno, F. G. 2002. *Kimia Pangan dan Gizi*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Winarno, F. G. 1980. *Pengantar Teknologi Pangan*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 81-82.
- Witazora, Y., Yandri, Y., 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.
- 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 polyethyleneglycol (NPC-PEG). *Mod. Appl. Sci. Res.* **5** (4): 253-258.
- Yandri, Y., Wahyuningsih, F., Suhartati, T., Satria, H., dan Hadi, S. 2020 A. Peningkatan kestabilan enzim α -amilase dengan penambahan sorbitol. *Prosiding Seminar Nasional Kimia*. Surabaya.
- Yandri, Y., Nadila, N., Suhartati, T., Satria, H., dan Hadi, S. 2020 B. Peningkatan kestabilan enzim α -amilase dengan penambahan gliserol. *Anal. Environ. Chem.* **5**(2): 143–154.
- Yandri, Y., Ropingi, H., Suhartati, T., Hendri, J., Irawan B., and Hadi, S. 2022. The effect of zeolite/chitosan hybrid matrix for thermal-stabilization enhancement on the immobilization of *Aspergillus fumigatus* α -amylase. *ESJ.* **6**(3): 505-518.
- Yandri, Y. dan Wulandari, P. 2009. Pengaruh penambahan sorbitol terhadap stabilitas termal enzim α -amilase dari *Rhizopus oryzae*. *J. Sains MIPA.* **15**(2): 111–118.
- 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.
- 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 Kimia.* **8**(2): 35–36.