

**MODIFIKASI KIMIA ALFA AMILASE DARI *Aspergillus fumigatus*  
MENGUNAKAN SIANURAT KLORIDA POLIETILENGLIKOL  
(CC-PEG)**

**(Skripsi)**

**Oleh**

**Neng Wiwit Liawati  
NPM 1917011019**



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

## ABSTRAK

### MODIFIKASI KIMIA ALFA AMILASE DARI *Aspergillus fumigatus* MENGUNAKAN SIANURAT KLOORIDA POLIETILENGLIKOL (CC-PEG)

Oleh

Neng Wiwit Liawati

$\alpha$ -Amilase merupakan enzim penghidrolisis pati yang banyak digunakan dalam industri seperti makanan dan fermentasi. Dalam proses industri dibutuhkan enzim yang stabil pada pH dan suhu yang ekstrim. Untuk mendapatkan enzim yang stabil salah satu caranya melalui modifikasi kimia. Pada penelitian ini enzim  $\alpha$ -amilase dari *Aspergillus fumigatus* dimodifikasi menggunakan sianurat klorida polietilen glikol (CC-PEG). Tahapan penelitian meliputi proses isolasi, pemurnian, modifikasi serta karakterisasi enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi. Hasil penelitian menunjukkan enzim  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian mempunyai aktivitas spesifik sebesar 818,834 U/mg yang kemurniannya meningkat 11 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar dengan aktivitas spesifik sebesar 74,493 U/mg. Enzim hasil pemurnian mempunyai pH 5; suhu optimum 55 °C;  $K_M = 6,14$  mg/mL substrat dan  $V_{maks} = 951,47$   $\mu$ mol/mL.menit. Uji stabilitas termal enzim hasil pemurnian pada suhu 55 °C selama 100 menit menunjukkan aktivitas sisa sebesar 11% dengan nilai  $k_i = 0,0182$  menit<sup>-1</sup>;  $t_{1/2} = 38$  menit dan  $\Delta G_i = 102,711$  kJ/mol. Enzim  $\alpha$ -amilase hasil modifikasi dengan variasi konsentrasi CC-PEG 5, 10, dan 15 mg mempunyai pH optimum 5,5; suhu optimum 60 °C; nilai  $K_M$  berturut-turut sebesar 4,33; 6,17; dan 4,04 mg/mL substrat dan nilai  $V_{maks}$  berturut-turut sebesar 572,40; 614,62; dan 541,12  $\mu$ mol/mL.menit. Uji stabilitas termal enzim hasil modifikasi dengan CC-PEG 5, 10, dan 15 mg pada suhu 60 °C selama 100 menit menunjukkan aktivitas sisa berturut-turut sebesar 34, 28, dan 21% dengan nilai  $k_i = 0,0113$ ; 0,0102; dan 0,0128 menit<sup>-1</sup>, nilai  $t_{1/2} = 61$ ; 68; dan 54 serta  $\Delta G_i = 118,370$ ; 112,278; dan 111,642 kJ/mol. Enzim  $\alpha$ -amilase hasil modifikasi dengan CC-PEG 5; 10, dan 15 mg mengalami penurunan nilai  $k_i$ , peningkatan waktu paruh ( $t_{1/2}$ ) dan  $\Delta G_i$  dibandingkan enzim hasil pemurnian. Hasil ini menunjukkan bahwa modifikasi menggunakan PEG teraktivasi (CC-PEG) mampu meningkatkan stabilitas enzim  $\alpha$ -amilase dari *A. fumigatus*.

**Kata kunci:** modifikasi kimia,  $\alpha$ -amilase, *A. fumigatus*, sianurat klorida polietilen glikol (CC-PEG)

## ABSTRACT

### CHEMICAL MODIFICATION OF ALPHA AMILASE FROM *Aspergillus fumigatus* USING CYANURATE CHLORIDE POLYETHYLENGLYCOL (CC-PEG)

By

Neng Wiwit Liawati

$\alpha$ -Amylase is a starch hydrolyzing enzyme that is widely used in industries such as food and fermentation. Industrial processes require enzymes that are stable at extreme pH and temperatures. One way to get a stable enzyme is through chemical modification. In this study, the  $\alpha$ -amylase enzyme from *Aspergillus fumigatus* was modified using cyanuric chloride polyethylene glycol (CC-PEG). The stages of the research included the process of isolation, purification, modification and characterization of the results of enzyme purification and modification results. The results showed that the purified  $\alpha$ -amylase enzyme had a specific activity of 818.834 U/mg which increased 11 times in purity compared to the crude extract with a specific activity of 74.493 U/mg. The purified enzymes have a pH of 5; optimum temperature 55 °C;  $K_M = 6.14$  mg/mL of substrate and  $V_{max} = 951.47$   $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{minute}$ . The thermal stability test of the purified enzymes at 55 °C for 100 minutes showed a residual activity of 11% with a value of  $k_i = 0.0182$   $\text{minutes}^{-1}$ ;  $t_{1/2} = 38$  minutes and  $\Delta G_i = 102.711$  kJ/mol. Modified  $\alpha$ -amylase enzyme with various concentrations of CC-PEG 5, 10, and 15 mg has an optimum pH of 5.5; optimum temperature 60 °C; the  $K_M$  value is 4.33; 6.17; and 4.04 mg/mL of substrate and the  $V_{max}$  values were 572.40; 614.62; and 541.12  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{minutes}$ . The modified enzyme thermal stability test with CC-PEG 5, 10 and 15 mg at 60 °C for 100 minutes showed residual activity of 34, 28, and 21%, respectively, with a value of  $k_i = 0.0113$ ; 0.0102; and 0.0128  $\text{minute}^{-1}$ , the value of  $t_{1/2} = 61$ ; 68; and 54 and  $\Delta G_i = 118.370$ ; 112.278; and 111.642 kJ/mol. Modified  $\alpha$ -amylase enzyme with CC-PEG 5; 10; and 15 mg decreased  $k_i$  values, increased half-life ( $t_{1/2}$ ) and  $\Delta G_i$  compared to the results of enzyme purification. These results indicate that modification using activated PEG (CC-PEG) can increase the stability of the  $\alpha$ -amylase enzyme from *A. fumigatus*.

**Keywords:** chemical modification,  $\alpha$ -amylase, *A. fumigatus*, polyethylene glycol cyanuric chloride (CC-PEG)

**MODIFIKASI KIMIA ALFA AMILASE DARI *Aspergillus fumigatus*  
MENGUNAKAN SIANURAT KLORIDA POLIETILENGLIKOL  
(CC-PEG)**

**Oleh**

**Neng Wiwit Liawati**

**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 ALFA AMILASE DARI *Aspergillus fumigatus* MENGGUNAKAN SIANURAT KLORIDA POLIETILENGLIKOL (CC-PEG)**

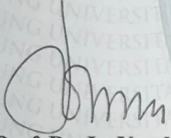
Nama Mahasiswa : **Neng Wiwit Liawati**

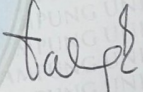
No. Pokok Mahasiswa : 1917011019

Jurusan : Kimia

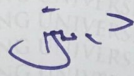
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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

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

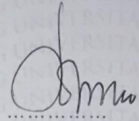
2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA

  
**Mulyono, Ph.D.**  
NIP 19740611 200003 21 002

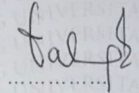
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

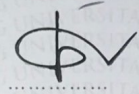
Ketua : **Prof. Dr. Ir. Yandri, A.S., M.S.**



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



Penguji  
Bukan Pembimbing : **Dr. Sony Widiarto, M.Sc.**



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **02 Agustus 2023**

**SURAT PERNYATAAN  
KEASLIAN SKRIPSI**

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Neng Wiwit Liawati  
Nomor Pokok Mahasiswa : 1917011019  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi saya yang berjudul "Modifikasi Kimia Alfa Amilase Dari *Aspergillus fumigatus* Menggunakan Sianurat Klorida Polietilenglikol (CC-PEG)" adalah benar karya sendiri dan saya tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi sesuai dengan kesepakatan.

Bandar lampung, Agustus 2023



Neng Wiwit Liawati  
NPM. 1917011019

## **RIWAYAT HIDUP**

Penulis bernama Neng Wiwit Liawati, dilahirkan di Serang 23 Agustus 2002, sebagai anak kelima dari enam bersaudara pasangan Bapak Halili dan Ibu Nurhyati. Penulis mengawali pendidikan formal di SDN Padarincang 1 yang diselesaikan pada tahun 2013, kemudian pada tahun 2016 penulis menamatkan jenjang tingkat pertama di MTs Model Padarincang yang sekarang menjadi MTsN 2 Serang dan dilanjutkan pada tahun 2019 penulis menamatkan sekolah menengah atas di MAN 1 Kota Serang. Pada tahun yang sama yaitu 2019 penulis diterima di Universitas Lampung pada jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) melalui jalur seleksi SNMPTN.

Selama jadi mahasiswa, penulis pernah menjadi anggota Sains dan Penalaran Ilmu Kimia (SPIK) Himaki FMIPA Unila. Kemudian penulis diamanahkan menjadi asisten praktikum Kimia Dasar Program Studi Teknik Lingkungan, asisten praktikum mata kuliah Biokimia Program Studi Biologi Terapan dan Kimia. Penulis melakukan Praktik Kerja Lapangan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Unila. Penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) Tematik pada tahun 2022 di Desa Cikoneng Kecamatan Anyer Kabupaten Serang selama 43 Hari.



## **MOTTO**

“Tidaklah mungkin bagi matahari mengejar bulan dan malam pun tidak dapat mendahului siang. Masing-masing beredar pada garis edarnya” (Q.S Yaasin : 40)

“Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Maka apabila telah selesai (dari suatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain) Dan hanya kepada TUHAN mu lah engkau berharap” (Q.S Al-Insyirah : 6-8)

“Selalu ada harga dalam sebuah proses. Nikmati saja lelah-lelah itu, lebarkan lagi rasa sabar itu. Semua yang kau investasikan untuk menjadikan dirimu serupa yang kau impikan, mungkin tidak akan selalu berjalan lancar. Tapi gelombang-gelombang itu yang nanti bisa kau ceritakan” (Boy Chandra)

“Hatiku tenang karena mengetahui bahwa apa yang melewatkanmu tidak akan pernah menjadi takdirku, dan apa yang ditakdirkan untukmu tidak akan pernah melewatkanmu” (Umar Bin Khattab)

“Segala sesuatu yang telah diawali, maka harus diakhiri”

(Neng Wiwit Liawati)

# بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Kupersembahkan Karya Kecilku ini Kepada:

Allah SWT,

Terima kasih atas nikmat iman dan islam serta rahmat-Mu yang agung ini.....  
Sebuah perjalanan panjang dan gelap, telah kau berikan secercah cahaya terang.  
Meskipun hari esok penuh teka-teki dan tanda Tanya yang aku sendiri belum tahu pasti jawabannya. Namun aku tahu tidak akan ada pertanyaan tanpa jawaban. Hanya kepada-Mu lah aku meminta pertolongan dan hanya kepada-Mu lah aku berserah diri.

Ibu, Bapak

Tidak ada lembar yang paling indah dalam laporan skripsi ini kecuali lembar persembahan, skripsi ini saya persembahkan sebagai tanda bukti kepada orang tua terkasih. Terima kasih atas untaian doa yang selalu dipanjatkan, kasih sayang yang tidak pernah putus, terimakasih atas kerja keras kalian selama ini demi memenuhi segala keinginanku. Terimakasih telah mengantarkan anakmu ke gerbang masa depan yang cerah. Ibu, Bapak kupersembahkan skripsi ini untuk kalian.

Kakak dan Adikku

Terima kasih atas do'a dan supportnya selama menempuh pendidikan.

Dengan rasa hormat kepada Prof. Dr. Ir. Yandri AS., M.S., Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S., Dr. Sony Widiarto, M.Sc. yang telah membimbing dan memberikan saran dan masukan untuk tercapainya skripsi ini.

Bapak dan Ibu Dosen Kimia FMIPA Unila yang telah memberikan ilmunya serta membimbing saya di Kampus Hijau ini.

Teman-teman seperjuangan serta sahabat yang selalu menyemangati, berbagi keluh kesah dan canda tawa.

Kepada seseorang yang istimewa (FS) yang telah menemani hari-hariku.

Almamaterku tercinta "Universitas Lampung"

## SANWACANA

Puji syukur penulis ucapkan kepada Allah *Subhanallahu wa Ta'ala* yang telah melimpahkan rahmat taufiq serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Modifikasi Kimia Alfa Amilase Dari *Aspergillus fumigatus* Menggunakan Sianurat Klorida Polietilenglikol (CC-PEG)“. Dalam menyelesaikan skripsi ini, penulis menyadari bahwa dalam ini tidak dapat terlepas dari bimbingan serta bantuan dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Ayahanda Halili dan Ibunda Nurhayati yang telah melahirkan, mendidik, merawat, mencurahkan segala kasih sayang dan pengorbanan yang tidak ternilai harganya kepada penulis. Terima kasih yang teramat dalam penulis ucapkan atas segala doa, dukungan, motivasi, serta arahan dari Abah dan Ibu. Sehingga laporan ini dapat terselesaikan..
2. Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S yang begitu sabar dalam membimbing, mendidik, mengarahkan, memotivasi, dan memberikan semangat serta pelajaran hidup yang berharga kepada penulis sejak awal kuliah hingga penulisan laporan ini selesai. Semoga Allah membalas beliau dengan kebaikan di dunia dan akhirat.
3. Ibu Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S. yang begitu sabar dalam membimbing, mendidik, mengarahkan, memotivasi, dan memberikan semangat serta pelajaran hidup yang berharga dan menjadi teman bercerita kepada penulis hingga penulisan laporan ini selesai. Semoga Allah membalas beliau dengan kebaikan di dunia dan akhirat.
4. Ibu Prof. Dr. Buhani, M.Si. selaku pembimbing akademik atas kesediaannya untuk membimbing, menasehati dan memberikan masukan kepada penulis.

5. Laboran Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung, Mba Dela. Terima kasih atas segala bantuan yang telah diberikan kepada penulis.
6. Abang-abangku dan adiku; Ahamd Yani, Ade Khaerul Nufus, Aip Irawan, Yon Anwar dan M. Rio Ramadhan yang telah memberikan begitu banyak perhatian, semangat, serta pengorbanan yang tulus kepada penulis, sehingga laporan ini dapat terselesaikan. Semoga kalian semua dimudahkan urusannya dan selalu dalam keberkahan Allah Swt.
7. Sahabat-sahabatku yang istimewa, *robot club* : Rizky Hadi Wijaya, Erika Noviana, Dian Rifani Muthia, Sabrina Ocha Felinda, dan Machrayana. Kalian lah teman terbaik yang selalu ada dalam keadaan susah maupun senang, tempat curhat dan apapun itu *thank you guys*. Semoga hubungan persahabatan ini terus terjalin sampai kita tua nanti. Terima kasih pula telah memberikan dukungan dan semangat dari awal mula perkuliahan sampai laporan ini terselesaikan. *Jazaakumullaah khayran*. Semoga jalan kita dipermudah dikemudian hari. *Aamiin*.
8. Teman-temanku yang istimewa, *bebegig* : Dian Rifani Muthia, Erika Noviana, Kania Nur Aisyah, Machrayana, Rizky Hadi Wijaya, Nugraha Bramanthio, Sabrina Ocha Felinda, Siti Solehati dan Ayu Ranja Saputri Terima kasih telah memberikan dukungan dan semangat kepada penulis. *Jazaakumullaah khayran*. Semoga jalan kita dipermudah dikemudian hari. *Aamiin*
9. Sahabat-sahabatku yang istimewa, *sedulur perKKNan* : Fadilah Eka Putri, Alya Fakhira, Eka Ananda, Hananta Yoga Ravindra, Tomo, Dienus, Dwi dan Okta. Terimakasih telah memberikan warna selama 43 hari didesa orang yang telah mengajarkan artinya kebersamaan yang tidak bisa dilupakan, terimakasih pula untuk dukungan dan semangat kepada penulis. *Jazaakumullaah khayran*.
10. Rekan-rekan penelitian seperbimbingan “*PY 2019*” : Virginia Nuh Reza Amanda, Ayu Ranja Saputri dan Diah Indah Pratiwi. Terima kasih sudah menemani hari-hariku di Laboratorium Biokimia. terima kasih atas segala

semangat, dukungan, serta pelajaran tentang kesabaran yang diberikan kepada penulis.

11. Kepada seluruh penghuni Laboratorium Biokimia, terima kasih telah berbagi canda tawa selama penulis mengerjakan penelitian.
12. Keluargaku "*Chemistry '19*" terkhusus kelas A yang telah memberikan dukungan, semangat serta keceriaan kepada penulis selama mengerjakan skripsi, dan masih banyak lainnya yang tidak bisa disebutkan satu per satu yang selalu memberi semangat dan motivasi kepada penulis sehingga laporan praktik kerja lapangan dapat terselesaikan.
13. Kepada yang terkasih Ferdy Satriawan yang telah memberikan semangat serta dukungan kepada penulis. Terima kasih telah mendengarkan keluh kesah penulis selama mengerjakan skripsi ini, terima kasih telah menemani hari-hari penulis yang sangat-sangat *overthinking*. Semoga kamu selalu dalam lindungan Allah SWT, dan diberikan kelancaran dalam menggapai apa yang kamu inginkan. *I Love U*.
14. Kepada saudari Fadilah Eka Putri Npm. 1954211007 terima kasih telah menemani hari-hari penulis selama mengerjakan skripsi, terima kasih atas doa, dukungan dan semua yang diberikan kepada penulis. Semoga dila selalu dalam lindungan Allah dan diberikan kelancaran juga dalam mengerjakan skripsi. Terima kasih sudah menjadi teman penulis *I Love you fad*.
15. Teman satu kost Shilvia putri, terima kasih telah menjadi teman curhat selama 2 tahun, berbagi keluh kesah selama menjalani perkuliahan. Terima kasih telah baik meminjamkan motornya untuk dipakai penulis. Semoga pucil selalu dalam Lindungan Allah dan dilancarkan segala persoalan dalam mengerjakan penelitian dan penulisan skripsi.
16. Kepada semua pihak yang telah membantu penulis selama kuliah, penelitian hingga penulisan skripsi ini.
17. *Last but not least, I wanna thank me, I wanna thank me for believing in me, I wanna thank me for doing all this hard work, I wanna thank me for having no days off, I wanna thank me for never quitting.*

Penulis mengucapkan banyak terimakasih kepada semua pihak yang telah membantu penyusunan skripsi ini. Semoga ketulusan bapak, ibu, dan rekan-rekan semua mendapat balasan pahala baik dari Allah SWT. Akhir kata, penulis berharap laporan ini dapat bermanfaat bagi penulis serta pembaca.

Bandar Lampung, Agustus 2023

Penulis

Neng Wiwit Liawati  
NPM.1917011019

## DAFTAR ISI

Halaman

<b>DAFTAR TABEL</b> .....	iii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	v
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	vi
<b>I. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	4
1.3 Manfaat Penelitian.....	4
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
2.1 Enzim .....	5
2.1.1 Klasifikasi Enzim .....	7
2.1.2 Aktivitas Enzimatik .....	8
2.1.3 Teori Pembentukan Enzim Substrat .....	12
2.1.4 Sifat-sifat Enzim.....	13
2.2 Enzim Amilase .....	14
2.3 <i>A. fumigatus</i> .....	16
2.4 Isolasi Enzim .....	17
2.5 Pemurnian Enzim .....	18
2.5.1 Fraksinasi dengan Amonium sulfat (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	18
2.5.2 Dialisis .....	19
2.6 Uji Aktivitas Enzim α-Amilase dengan Metode Fuwa.....	19
2.7 Uji Aktivitas Enzim α-Amilase dengan Metode Mandels .....	20
2.8 Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry.....	20
2.9 Kinetika Reaksi Enzim .....	21
2.10 Stabilitas Enzim.....	22
2.11 Modifikasi Kimia Enzim.....	23
2.12 Sianurat Klorida Polietilenglikol (CC-PEG).....	24

<b>III. METODE PENELITIAN</b> .....	27
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	27
3.2 Alat dan Bahan .....	27
3.3 Prosedur Kerja .....	28
3.3.1 Pemiakan Isolat <i>A. fumigatus</i> .....	28
3.3.2 Pembuatan Media Inoculum dan Fermentasi, Inokulasi <i>A. Fumigatus</i> Dan Produksi Enzim $\alpha$ -Amilase .....	29
3.3.3 Isolasi Enzim $\alpha$ -amilase .....	30
3.3.4 Pemurnian Enzim $\alpha$ -amilase .....	30
3.3.5 Uji aktivitas dan Kadar Protein enzim $\alpha$ -amilase .....	32
3.3.6 Penentuan Kadar Protein Metode Lowry .....	34
3.3.7 Modifikasi Kimia Enzim $\alpha$ -amilase dengan CC-PEG .....	35
3.3.8 Karakterisasi Enzim $\alpha$ -Amilase .....	35
3.3.9 Penentuan Waktu Paruh ( $t_{1/2}$ ), Konstanta Laju Inaktivasi ( $k_i$ ), dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi ( $\Delta G_1$ ) .....	36
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	39
4.1 Produksi dan Isolasi $\alpha$ -Amilase dari <i>A. fumigatus</i> .....	39
4.2 Pemurnian Enzim $\alpha$ -Amilase .....	39
4.2.1 Fraksinasi dengan Amonium Sulfat .....	39
4.2.2 Dialisis .....	42
4.3 Karakterisasi Enzim $\alpha$ -amilase Hasil Pemurnian dan Hasil Modifikasi Menggunakan CC-PEG .....	43
4.3.1 Penentuan pH Optimum .....	43
4.3.2 Penentuan Suhu Optimum .....	45
4.3.3 Penentuan Data Kinetika Enzim ( $K_M$ dan $V_{maks}$ ) .....	47
4.3.4 Penentuan Stabilitas Termal Enzim .....	49
4.3.5 Penentuan Konstanta Laju Inaktivasi Termal ( $k_i$ ), Perubahan Energi Akibat Denaturasi ( $\Delta G_i$ ) dan Waktu Paruh ( $t_{1/2}$ ) .....	50
<b>V. SIMPULAN DAN SARAN</b> .....	54
5.1 Simpulan .....	54
5.2 Saran .....	55
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	56



## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Aktivitas enzim $\alpha$ -amilase dalam ekstrak kasar, fraksi (20-90)% dan dialisis. ....	43
2. Nilai $K_M$ dan $V_{maks}$ enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi. ....	48
3. Nilai $k_i$ , $t_{1/2}$ dan $\Delta G_i$ enzim $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi. ....	51
4. Hubungan antara kejenuhan amonium sulfat (0-100%) dengan aktivitas spesifik enzim $\alpha$ -amilase dari <i>A. fumigatus</i> .....	63
5. Hubungan antara kejenuhan amonium sulfat (0-90%) dengan aktivitas spesifik enzim $\alpha$ -amilase dari <i>A. fumigatus</i> .....	63
6. Hubungan antara pH dengan aktivitas unit enzim $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi. ....	64
7. Hubungan antara pH dengan aktivitas sisa enzim $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi. ....	64
8. Hubungan antara suhu dengan aktivitas unit enzim $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi. ....	65
9. Hubungan antara suhu dengan aktivitas sisa enzim $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi. ....	65
10. Data untuk penentuan $K_M$ dan $V_{maks}$ enzim $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi berdasarkan persamaan Lineweaver-Burk.....	66
11. Hubungan waktu inkubasi dengan aktivitas unit enzim $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi. ....	67
12. Hubungan waktu inkubasi dengan aktivitas sisa enzim $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi. ....	68
13. Data $\ln (E_i/E_0)$ untuk penentuan $k_i$ (konstanta laju inaktivasi termal) enzim $\alpha$ -amilase hasil pemurnian selama inaktivasi termal 55 °C.....	69

14. Data  $\ln (E_i/E_0)$  untuk penentuan  $k_i$  (konstanta laju inaktivasi termal) enzim  $\alpha$ -amilase hasil modifikasi selama inaktivasi termal 60 °C..... 69
15. Absorbansi BSA pada berbagai konsentrasi..... 74
16. Absorbansi BSA pada berbagai konsentrasi..... 75

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Hubungan antara suhu dengan aktivitas enzim. ....	9
2. Hubungan antara pH dengan aktivitas enzim. ....	10
3. Hubungan antara laju reaksi dengan konsentrasi enzim.. ....	10
4. Hubungan antara laju reaksi dengan konsentrasi substrat.....	11
5. Mekanisme kerja enzim model <i>Lock and Key</i> .....	12
6. Mekanisme kerja enzim model <i>Induced Fit</i> . ....	13
7. <i>A. fumigatus</i> secara makroskopis dan mikroskopis. ....	16
8. Reaksi pengikatan enzim ke-PEG teraktivasi.....	26
9. Skema fraksinasi dengan ammonium sulfat. ....	31
10. Diagram alir penelitian. ....	38
11. Hubungan antara tingkat kejenuhan amonium sulfat (0-100)% dengan aktivitas spesifik enzim $\alpha$ -amilase dari <i>A.fumigatus</i> .....	40
12. Hubungan antara tingkat kejenuhan amonium sulfat (0-90)% dengan aktivitas spesifik enzim $\alpha$ -amilase dari <i>A.fumigatus</i> . ....	41
13. pH optimum enzim $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi. ....	43
14. Suhu optimum enzim $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi.....	46
15. Grafik Lineweaver-Burk enzim $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi. ....	47
16. Stabilitas termal enzim $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi. ....	49
17. Grafik $\ln (E_i/E_0)$ enzim $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi. ....	51
18. Kurva standar BSA (Bovine Serum Albumin). ....	74
19. Kurva standar glukosa. ....	75

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Aktivitas enzim $\alpha$ -amilase pada berbagai tingkat kejenuhan ammonium sulfat. ..	63
2. Aktivitas enzim $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi pada variasi pH.....	64
3. Aktivitas enzim $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi pada variasi suhu .....	65
4. Penentuan KM dan $V_{maks}$ enzim $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi. ....	66
5. Penentuan stabilitas termal enzim $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi. ....	66
6. Penentuan nilai $k_i$ enzim $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi. ....	69
7. Perhitungan $\Delta G_i$ dan $t_{1/2}$ enzim $\alpha$ -amilase hasil pemurnian.....	70
8. Perhitungan $\Delta G_i$ dan $t_{1/2}$ enzim $\alpha$ -amilase hasil modifikasi dengan CC-PEG 5 mg. ....	71
9. Perhitungan $\Delta G_i$ dan $t_{1/2}$ enzim $\alpha$ -amilase hasil modifikasi dengan .....	72
10. Perhitungan $\Delta G_i$ dan $t_{1/2}$ enzim $\alpha$ -amilase hasil modifikasi dengan CC-PEG 15 mg.....	73
11. Kurva standar BSA ( <i>Bovine Serum Albumin</i> ). ....	74
12. Kurva standar glukosa.....	75

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Amilase merupakan salah satu enzim utama yang digunakan dalam industri. Enzim ini digunakan untuk menghidrolisis pati menjadi maltooligosakarida dan glukosa dan banyak diaplikasikan untuk berbagai bidang industri seperti makanan, fermentasi, dan farmasi (Gupta *et al.*, 2003). Amilase dapat diperoleh dari tumbuhan, hewan dan mikroorganisme. Isolasi amilase dari mikroba lebih disukai karena mudah ditumbuhkan dan pertumbuhannya cepat, biaya produksi relatif lebih murah, kondisi produksi tidak tergantung perubahan musim dan waktu serta mudah dalam optimasi dan modifikasi. Dua kelas utama amilase yang paling banyak diidentifikasi di antara mikroorganisme adalah  $\alpha$ -amilase dan glukosamilase (Damien *et al.*, 2010). Sedangkan berdasarkan gula anomerik yang dihasilkan oleh reaksi enzim, amilase dibagi menjadi  $\alpha$ -dan  $\beta$ -amilase (Van Der Maarel *et al.*, 2002).

$\alpha$ -Amilase adalah salah satu bentuk amilase industri yang paling populer dan penting (Souza and Magalhaes, 2010). Enzim ini diproduksi oleh spesies bakteri *Bacillus*, *Pseudomonas* dan *Clostridium*. Di antara *Bacillus sp.*, *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) umumnya lebih disukai untuk memproduksi  $\alpha$ -amilase karena mudah dibiakkan dan produktif (Hussain *et al.*, 2013).  $\alpha$ -Amilase (EC 3.2.1.1) mampu mengurai pati dengan menghidrolisis ikatan 1,4-glikosidik polisakarida menghasilkan dekstrin rantai pendek (Sivaramakrishnan *et al.*, 2006).

Secara konvensional, hidrolisis pati dilakukan dengan asam dan suhu tinggi. Saat ini 75% proses hidrolisis pati telah dilakukan secara enzimatis (Kandra, 2003). Hidrolisis pati menggunakan enzim lebih disukai karena sifat selektif dan spesifik enzim yang mampu mengurangi terbentuknya produk yang tidak diinginkan, perolehan glukosa yang lebih tinggi melalui proses yang lebih ringan, tanpa penggunaan pelarut berbahaya sehingga lebih ramah lingkungan (Azmi *et al.*, 2017). Komposisi sakarida hasil hidrolisis pati sangat tergantung pada suhu, kondisi hidrolisis dan asal enzim. Spesifitas, termostabilitas dan respon pH enzim merupakan faktor yang sangat penting untuk keperluan industri (Kandra, 2003).

Aplikasi industri dari enzim seringkali terhambat oleh kurangnya ketersediaan, harga tinggi dan stabilitas yang terbatas dalam kondisi operasional. Penggunaan enzim dalam bentuk bebas sangat tidak ekonomis karena enzim umumnya tidak dapat dibentuk kembali pada akhir reaksi (Talekar *and* Chavare, 2012). Pada umumnya, enzim tidak stabil pada kondisi suhu yang tinggi dan pH yang ekstrim. Menurut Daba *et al.* (2013) enzim dapat distabilkan melalui beberapa cara seperti modifikasi kimia, amobilisasi, mutagenesis terarah dan rekayasa pelarut. Mozhaev *et al.* (1990) menyarankan penggunaan modifikasi kimia untuk meningkatkan kestabilan enzim.

Beberapa kelebihan modifikasi kimia dibandingkan amobilisasi adalah pada interaksi enzim dengan substrat. Modifikasi kimia tidak menggunakan matriks yang tidak larut seperti pada amobilisasi sehingga interaksi enzim dengan substrat tidak terganggu dan penurunan aktivitas enzim dapat ditekan. Selain itu, pada proses amobil, mekanisme kerja enzim yang digunakan dalam bidang klinik selama interaksi dengan reseptor atau komponen lain dari membran seluler kemungkinan berubah karena keberadaan matriks pendukung (Janecek, 1993).

Berbagai cara modifikasi kimia telah berhasil meningkatkan stabilitas termal terhadap enzim salah satunya dengan menggunakan pereaksi bifungsional yang mampu meningkatkan kestabilan enzim melalui ikatan silang inter-dan intramolekular sehingga menghasilkan struktur tersier yang stabil. Pereaksi bifungsional yang populer digunakan yaitu dimetiladipimidat (DMA) dan glutaraldehid (GA) karena kedua senyawa ini mudah didapatkan dan larut dalam pelarut berair. Modifikasi dengan DMA telah dilaporkan oleh Kazan *et al.* (1996) terhadap enzim penicilin G-asilase menghasilkan peningkatan kestabilan termal 4 kali dibanding enzim asli. Sedangkan Yandri *et al.* (2010) melakukan modifikasi menggunakan DMA terhadap enzim  $\alpha$ -amilase menghasilkan enzim dengan kestabilan termal 1,5-3,5 kali lebih tinggi dibanding enzim asli. Daba *et al.* (2013) melaporkan modifikasi dengan GA terhadap enzim  $\beta$ -amilase mampu memodifikasi residu spesifik dari enzim dan memberikan stabilitas yang lebih baik dibandingkan dengan penambahan TNBS dan mPEG. Enzim  $\beta$ -amilase yang dimodifikasi dengan GA mampu mempertahankan aktivitas sisa 50% pada suhu 50 °C sedangkan enzim tanpa dimodifikasi telah kehilangan 50% aktivitas sisanya pada suhu 50 °C.

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan Modifikasi enzim  $\alpha$ -amilase dari bakteri isolat lokal *B. subtilis* ITBCCB148 dengan zat pemodifikasi telah berhasil meningkatkan kestabilan enzim terhadap pH dan suhu. Yandri (2004) juga telah melakukan modifikasi kimia pada enzim  $\alpha$ -amilase dari *B. subtilis* menggunakan CC-PEG ataupun NPC-PEG. Hasil penelitian menunjukkan bahwa modifikasi kimia dengan CC-PEG ataupun NPC-PEG tidak hanya berhasil meningkatkan stabilitas termal enzim hasil pemurnian hingga 2-4 kali (berdasarkan penurunan nilai  $k_d$ ). Modifikasi dengan asam glioksilat dan sitrakonat anhidrida pada enzim yang sama menghasilkan enzim hasil modifikasi yang meningkat kestabilan termalnya (Yandri *et al.*, 2011; Yandri *et al.*, 2012). Maka pada penelitian ini telah dilakukan modifikasi kimia enzim

$\alpha$ -amilase yang diisolasi dari *A. fumigatus* menggunakan *Cyanuric Chloride Polyethylene Glycol* (CC-PEG) dan diperoleh peningkatan stabilitas enzim setelah dimodifikasi.

## 1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Memperoleh enzim  $\alpha$ -amilase dari *A. fumigatus* dengan aktivitas dan tingkat kemurnian yang tinggi.
- b. Meningkatkan stabilitas enzim  $\alpha$ -amilase dari *A. fumigatus* melalui modifikasi kimia menggunakan CC-PEG.

## 1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Memberikan informasi mengenai teknik isolasi dan pemurnian enzim  $\alpha$ -amilase dari *A. fumigatus*.
- b. Memberikan alternatif peningkatan kestabilan enzim  $\alpha$ -amilase dengan cara modifikasi kimia.
- c. Memberikan informasi mengenai pengaruh modifikasi kimia CC-PEG terhadap stabilitas enzim  $\alpha$ -amilase dari *A. fumigatus*.



## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Enzim

Enzim sebagai biokatalis yang mampu memediasi semua reaksi sintesis dan degradatif yang dilakukan oleh organisme hidup. Enzim memiliki banyak bagian fungsional. Pada tingkat molekuler, enzim mengkatalisasi reaksi biokimia dengan mempercepat konversi substrat menjadi produk dalam suatu wadah yang terpendam di dalam sisi aktif enzim. Tanpa katalisis enzim, reaksi akan terlalu lambat untuk berperan dalam proses kehidupan meskipun tidak semua reaksi di alam memerlukan katalisis (Cuesta *et al.*, 2015).

Enzim adalah biomolekul berupa protein berbentuk globular (bulat) yang tersusun dari satu atau lebih rantai polipeptida (Wirahadikusumah, 2001). Enzim berfungsi sebagai biokatalisator yang diproduksi oleh jaringan hidup dan enzim dapat meningkatkan laju reaksi. Bila enzim tidak ada, maka reaksi-reaksi yang menopang kehidupan akan berjalan sangat lambat atau reaksi-reaksi tersebut akan memerlukan kondisi non-fisiologis. Enzim mempunyai berat molekul beraneka ragam berkisar  $10^4$  -  $10^7$  KDa (Dryer, 1993). Enzim dapat mengkatalisis reaksi biokimia yang terjadi di dalam sel ataupun di luar sel. Seperti katalis lainnya, enzim dapat menurunkan energi aktivasi suatu reaksi kimia. Enzim dapat mempercepat reaksi kimia dengan kecepatan  $10^8$  sampai  $10^{11}$  kali lebih cepat daripada reaksi yang dilakukan tanpa katalis (Poedjiadi, 1994).

Pada reaksi katalitiknya, enzim bekerja secara spesifik karena enzim hanya dapat bekerja pada substrat dan bentuk reaksi tertentu (Girindra, 1986). Hal ini disebabkan karena bentuknya unik dan adanya gugus-gugus polar atau non-polar dalam strukturnya (Fessenden dan Fessenden, 1982). Enzim memiliki beberapa fungsi khusus yaitu menurunkan energi aktivasi, mengendalikan reaksi, dan mempercepat reaksi pada suhu dan tekanan tetap tanpa mengubah besarnya tetapan seimbangannya (Page, 1997).

Kelebihan enzim sebagai katalisator antara lain memiliki spesifisitas tinggi, mempercepat reaksi kimiawi spesifik tanpa pembentukan senyawa samping, produktivitas tinggi, dan produk akhir tidak terkontaminasi sehingga mengurangi biaya purifikasi dan efek kerusakan terhadap lingkungan (Chaplin *and* Bucke, 1990). Peranan enzim sebagai biokatalisator diaplikasikan secara komersil untuk proses industri, seperti industri pangan, medis, kimia, dan farmasi (Junita, 2002).

Setiap enzim dapat bekerja pada kondisi optimum yang berbeda-beda, karena enzim merupakan protein yang mudah mengalami perubahan bentuk apabila terjadi perubahan suhu dan pH. Jika enzim tidak berada pada kondisi optimum maka enzim tidak dapat bekerja secara maksimal, bahkan dapat menyebabkan hilangnya fungsi katalitik karena struktur protein enzimnya rusak (Maton *et al.*, 1993).

### 2.1.1 Klasifikasi Enzim

- a. Berdasarkan tipe reaksi yang diketahui, enzim dibagi menjadi 6 kelompok
  1. Enzim oksidoreduktase merupakan enzim yang dapat mengkatalis reaksi oksidasi atau reduksi suatu bahan. Dalam golongan enzim ini terdapat 2 macam enzim yang paling utama yaitu oksidase dan dehidrogenase. Oksidase ialah enzim yang mengkatalis reaksi antara substrat dengan molekul oksigen. Dehidrogenase sebagai enzim yang aktif dalam pengambilan atom hidrogen dari substrat.
  2. Enzim transferase merupakan enzim yang ikut serta dalam reaksi pemindahan (transfer) suatu radikal atau gugus.
  3. Enzim hidrolase merupakan kelompok enzim yang sangat penting dalam pengolahan pangan, yaitu enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis suatu substrat atau pemecahan substrat dengan pertolongan molekul air. Enzim-enzim yang termasuk dalam golongan ini di antaranya adalah amilase, invertase, selulase dan sebagainya.
  4. Enzim liase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi pemecahan ikatan ganda suatu senyawa kimia tanpa penambahan molekul air.
  5. 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, atau dengan perubahan isomer posisi misalnya mengubah aldosa menjadi ketosa.
  6. Enzim ligase adalah enzim yang berperan dalam penggabungan dua molekul melalui pemecahan ATP. Contohnya enzim sintetase (Sri, 2008 ).

- b. Berdasarkan tempat bekerjanya enzim dibedakan menjadi dua, yaitu:
  - 1. Enzim intraseluler, yaitu enzim yang diproduksi dan bekerja di dalam sel.
  - 2. Enzim ekstraseluler, yaitu enzim yang diproduksi di dalam sel, tetapi bekerja di luar sel.
  
- c. Berdasarkan cara terbentuknya dibedakan menjadi dua, yaitu:
  - 1. Enzim konstitutif, yaitu enzim yang jumlahnya dipengaruhi kadar substratnya, misalnya enzim amilase.
  - 2. Enzim adaptif, yaitu enzim yang pembentukannya dirangsang oleh adanya substrat, contohnya enzim B-galaktosidase yang dihasilkan oleh bakteri *E. coli* yang ditumbuhkan di dalam medium yang mengandung laktosa (Lehninger *et al.*, 2017).

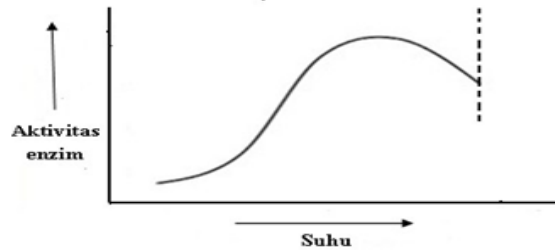
### 2.1.2 Aktivitas Enzimatik

Kerja enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu:

#### 1. Suhu

Sebagai biokatalisator, enzim dapat mempercepat terjadinya reaksi kimia pada suatu sel hidup. Pada batas suhu tertentu, kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim akan naik apabila suhunya naik. Reaksi yang paling cepat, terjadi pada suhu optimum (Rodwell *et al.*, 2015). Jika suhu terlalu tinggi maka dapat menyebabkan enzim terdenaturasi (Poedjiadi, 1994). Namun pada suhu 0°C enzim menjadi tidak aktif (tidak rusak) dan dapat kembali aktif pada suhu normal (Lay dan Sugyo, 1992).

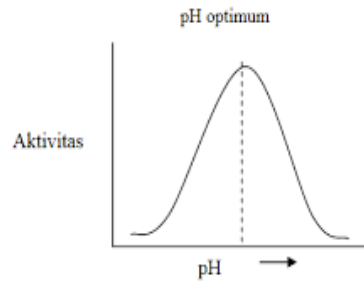
Hubungan antara suhu dengan aktivitas enzim ditunjukkan pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Hubungan antara suhu dengan aktivitas enzim (Rodwell *et al.*, 2015).

## 2. pH

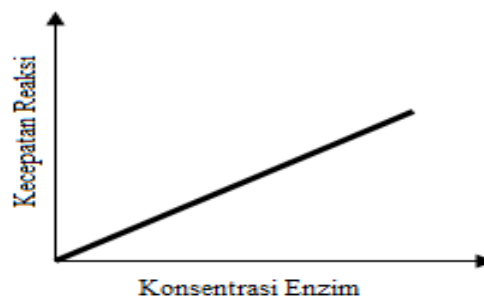
Pada umumnya, enzim bersifat amfolitik yaitu enzim mempunyai konstantadisosiasi pada gugus asam maupun gugus basanya, terutama pada gugus residu terminal karboksil dan gugus terminal aminonya, sehingga enzim dapat berbentuk ion positif dan negatif (*zwitter ion*). Perubahan kereaktifan enzim diperkirakan akibat perubahan pH lingkungan. Perubahan pH akan mempengaruhi efektivitas bagian aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim-substrat. Nilai pH tinggi dapat menyebabkan terjadinya denaturasi sehingga aktivitas enzim menurun (Winarno, 1986). Hubungan antara pH dengan aktivitas enzim ditunjukkan pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Hubungan antara pH dengan aktivitas enzim (Rodwell *et al.*, 2015).

### 3. Konsentrasi enzim

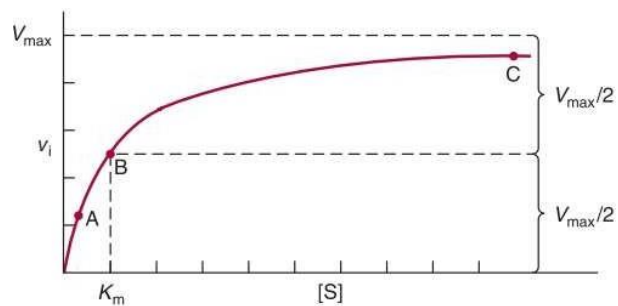
Konsentrasi enzim mempengaruhi kecepatan suatu reaksi yang dikatalisis enzim. Penambahan konsentrasi enzim dapat meningkatkan kecepatan reaksi apabila substrat tersedia berlebih (Wirahadikusumah, 2001). Hasil hidrolisisnya akan konstan dengan naiknya konsentrasi enzim. Apabila semua substrat sudah habis dihidrolisis maka penambahan enzim sudah tidak efektif lagi. Semakin tinggi konsentrasi enzim maka kecepatan reaksinya akan semakin meningkat sampai batas konsentrasi tertentu (Reed, 1975). Hubungan antara laju reaksi dengan konsentrasi enzim ditunjukkan pada Gambar 3.



**Gambar 3.** Hubungan antara laju reaksi dengan konsentrasi enzim (Reed, 1975).

#### 4. Konsentrasi substrat

Pada umumnya, kecepatan reaksi enzimatik bergantung pada konsentrasi substrat. Kecepatan reaksi dapat 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, 2005). Bila konsentrasi enzim cukup besar maka konsentrasi substrat perlu disesuaikan agar semua enzim dapat terikat pada substrat dalam bentuk kompleks enzim-substrat (Wirahadikusumah, 2001). Hubungan antara kecepatan reaksi dengan konsentrasi substrat ditunjukkan pada Gambar 4.



**Gambar 4.** Hubungan antara laju reaksi dengan konsentrasi substrat (Rodwell *et al.*, 2015).

#### 5. Aktivator dan inhibitor

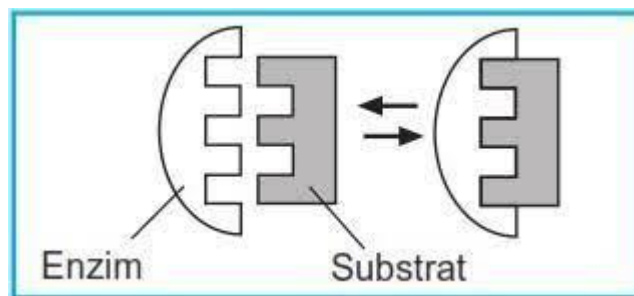
Aktivator adalah senyawa atau ion yang dapat meningkatkan kecepatan reaksi enzimatik. Beberapa enzim memerlukan aktivator dalam reaksi katalisnya. Aktivator dapat berupa kofaktor dan koenzim. Kofaktor dapat berupa ion-ion anorganik seperti Zn, Fe, Ca, Mn, Cu, dan Mg. Sedangkan Koenzim berupa

molekul organik kompleks (Martoharsono dan Soeharsono, 2006).

Inhibitor merupakan senyawa atau ion yang dapat menghambat aktivitas enzim, baik secara *reversible* maupun *irreversible* (Wirahadikusumah, 2001). Inhibitor bekerja dengan menyerang sisi aktif enzim sehingga enzim tidak dapat berikatan dengan substrat yang menyebabkan fungsi katalitik enzim akan terganggu (Winarno, 1986).

### 2.1.3 Teori Pembentukan Enzim Substrat

Sifat komplementer enzim dan substrat dikemukakan dengan teori pemodelan "*Lock and Key*" dan "*Induced Fit*". Pada pemodelan *Lock and Key*, sisi aktif enzim memiliki kesesuaian hanya dengan satu macam substrat saja, sama seperti dengan kunci yang dapat masuk dengan tepat ke dalam gembok. Mekanisme kerja enzim model *Lock and Key* ditunjukkan pada Gambar 5.

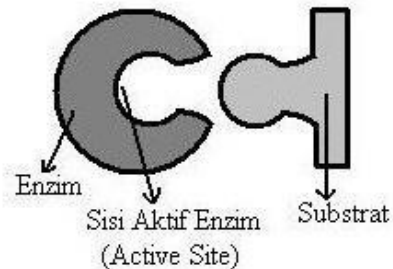


**Gambar 5.** Mekanisme kerja enzim model *Lock and Key* (Shahib, 2005).

Pada model *Induced Fit*, dijelaskan bahwa beberapa enzim cukup fleksibel dalam mengubah bentuk dan ukuran sisi aktif mereka untuk



disesuaikan dengan ruang yang diperlukan oleh substrat yang berbeda. Dengan demikian enzim dan substrat dapat bergabung dan interaksi mereka menyebabkan kesesuaian yang tepat (McMurry and Marry, 1994). Mekanisme kerja enzim model *Induced Fit* ditunjukkan pada Gambar 6.



**Gambar 6.** Mekanisme kerja enzim model *Induced Fit* (Shahib, 2005).

#### 2.1.4 Sifat-sifat Enzim

##### a. Sebagai katalisator

Sifat enzim yang pertama yaitu berperan sebagai katalisator. Enzim adalah katalis yang dapat mengubah laju reaksi tanpa ikut bereaksi.

##### b. Enzim bekerja secara spesifik dan selektif

Enzim bekerja secara spesifik, artinya enzim tertentu hanya dapat mengadakan perubahan pada zat tertentu pula. Dengan kata lain, enzim hanya dapat mempengaruhi satu reaksi dan tidak dapat mempengaruhi reaksi lain yang bukan bidangnya. Satu enzim khusus untuk satu substrat, misalnya enzim katalase hanya mampu menghidrolisis  $H_2O_2$  menjadi  $O_2$ .

c. Enzim bersifat bolak-balik

Ketika ikut bereaksi, struktur kimia enzim berubah, tetapi pada akhir reaksi struktur kimia enzim akan terbentuk kembali seperti semula. Enzim tidak hanya menguraikan molekul kompleks, tetapi juga dapat membentuk molekul kompleks dari molekul-molekul sederhana penyusunnya (reaksi bolak-balik).

d. Enzim bersifat termolabil

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh suhu. Jika suhu rendah, kerja enzim akan lambat. Semakin tinggi suhu reaksi kimia yang dipengaruhi enzim semakin cepat, tetapi jika suhu terlalu tinggi, enzim akan mengalami denaturasi.

e. Enzim mampu menurunkan energi aktivasi

Energi aktivasi suatu reaksi adalah jumlah energi dalam kalori yang diperlukan untuk membawa semua molekul pada 1 mol senyawa, pada suhu tertentu menuju tingkat transisi pada puncak batas energi. Apabila suatu reaksi kimia ditambahkan katalis yaitu enzim, maka energi aktivitas dapat diturunkan dan reaksi akan berjalan dengan lebih cepat (Shahib, 2005).

## 2.2 Enzim Amilase

Enzim amilase termasuk golongan enzim hidrolase. Enzim amilase merupakan enzim yang mempunyai aktivitas memecah ikatan-ikatan pada amilum hingga terbentuk maltosa (Poedjiadi, 1994). Amilase dapat dikelompokkan menjadi tiga yaitu  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase, dan glukamilase.

a.  $\alpha$ -Amilase

$\alpha$ -Amilase menghidrolisis ikatan  $\alpha$ -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  $\alpha$ amilase rata-rata  $\pm 50$  kD. 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  $\alpha$ -amilase bersifat relatif tahan terhadap suhu, pH, dan senyawa seperti urea (Suhartono, 1989). Secara umum  $\alpha$ -amilase stabil pada pH 5,5-8,0 dan aktivitas optimum secara normal berada pada pH 4,8-6,5. Amilase dari *Bacillus subtilis* mempunyai pH optimum 6,0 dan suhu optimum 60 °C (Judoamidjojo, 1989).

Hidrolisis amilosa oleh  $\alpha$ -amilase terjadi melalui dua tahap, pertama yaitu degradasi menjadi dekstrin yang terjadi secara acak. Degradasi ini menjadi sangat cepat diikuti dengan menurunnya viskositas dengan cepat. Tahap kedua relative sangat lambat dengan pembentukan glukosa dan maltose sebagai hasil akhir (Suhartono, 1989).

b.  $\beta$ -Amilase

$\beta$ -Amilase ( $\beta$ -1,4-glukan malthohidrolase), memecah pati dari luar molekul dan menghasilkan unit-unit maltosadari ujung non pereduksi pada rantai polisakarida. Bila tiba pada ikatan  $\alpha$ -1,6 glukosida seperti yang dijumpai pada amilopektin atau glikogen, aktivitas enzim ini akan berhenti. Enzim ini bekerja pada ikatan  $\alpha$ -1,4 glukosida dan memiliki pH optimum antara 5-6.

c. Glukoamilase

Glukoamilase ( $\alpha$ -1,4-D-glukan glukohidrolase) memecah ikatan  $\alpha$ -1,4 dalam amylose, amilopektin dan glikogen dari ujung gula non pereduksi. Enzim ini dapat juga menghidrolisis ikatan  $\alpha$ -1,6 dan  $\alpha$ -1,3, meskipun pemecahan ikatan tersebut sangat lambat. pH optimum enzim ini adalah 4-5 (Judoamidjojo, 1989).

### 2.3 *A. fumigatus*

Jamur *A. fumigatus* adalah mikroorganisme saprotrofik yang banyak tersebar di alam melalui udara dalam bentuk spora (Fang *and* Latge, 2018). *A. fumigatus* mempunyai genom haploid, tidak mengalami siklus seksual. Bereproduksi dengan pembentukan konidiospora yang dilepaskan ke dalam lingkungan (Marvel, 2007). Koloni jamur *A. fumigatus* diproduksi di konidiofor, terdapat ribuan konidia berwarna abu-abu kehijauan dengan diameter 2-3  $\mu$ m (O'Gorman *et al.*, 2009). Jamur *A. fumigatus* termasuk ke dalam divisi *Ascomycota*, kelas *Ascomycetes*, ordo *Euritiales*, family *Eurotiaceae*, genus *Aspergillus* (Landecker *and* Moore, 1996). *A. fumigatus* secara makroskopis dan mikroskopis dapat ditunjukkan pada Gambar 7.



**Gambar 7.** *A. fumigatus* secara makroskopis dan mikroskopis (Afzal *et al.*, 2013).

## 2.4 Isolasi Enzim

Enzim dapat diisolasi secara ekstraseluler dan intraseluler. Enzim ekstraseluler merupakan enzim yang bekerja diluar sel, sedangkan enzim intraseluler merupakan enzim yang bekerja di dalam sel. Ekstraksi enzim ekstraseluler lebih mudah dibandingkan ekstraksi 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, 2005).

Metode sentrifugasi merupakan cara pemisahan enzim dari partikel-partikel lain yang tidak diinginkan. Semakin kecil partikel, kecepatan sentrifugasi yang diperlukan semakin besar. Pemisahan dilakukan pada kecepatan dan gaya berat tertentu sehingga sel-sel mikroorganisme mengendap dan supernatant berisi cairan enzim. Dasar pemisahan secara sentrifugasi yaitu:

- a. Perbedaan antara fasa cair dan padat
- b. Ukuran partikel
- c. Berat jenis bahan cair/larutan
- d. Jari-jari sentrifus (Judoamidjojo, 1989).

Prinsip sentrifugasi didasarkan atas fenomena bahwa partikel yang tersuspensi dalam suatu wadah (tabung atau bentuk lain) akan mengendap ke dasar wadah karena pengaruh gravitasi. Laju pengendapan tersebut dapat ditingkatkan dengan cara meningkatkan pengaruh gravitasional terhadap partikel. Hal ini dapat dilakukan dengan menempatkan tabung berisi suspensi partikel ke dalam rotor suatu mesin sentrifugasi kemudian diputar dengan kecepatan tinggi (Yuwono, 2006).

## 2.5 Pemurnian Enzim

Pemurnian enzim merupakan suatu proses untuk memisahkan enzim yang diinginkan dari senyawa lain yang mengganggu (Wardani dan Ahsanaturun, 2012).

### 2.5.1 Fraksinasi dengan Amonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Fraksinasi merupakan suatu proses pengendapan secara bertahap. Pengendapan ini dilakukan dengan penambahan garam seperti natrium klorida, natrium sulfat, atau ammonium sulfat. Terjadinya pengendapan dikarenakan ion-ion garam yang terlalu cenderung akan menarik molekul-molekul air dari molekul hidrofobik protein, sehingga molekul-molekul protein dapat berinteraksi satu sama lain untuk membentuk agregat. Protein yang hidrofobitasnya tinggi akan mengendap lebih dahulu, sedangkan protein yang memiliki sedikit residu non polar akan tetap larut meskipun pada konsentrasi garam yang paling tinggi (Headon and Walsh, 1994; Scopes, 1982). Pada umumnya garam yang sering digunakan adalah Amonium sulfat karena:

- a. Kebanyakan enzim tahan terhadap garam ini
- b. Mempunyai kelarutan yang besar dalam air
- c. Memiliki daya pengendapan yang besar
- d. Memiliki efek penstabil terhadap kebanyakan enzim.

Diketahui bahwa konsentrasi garam dapat mempengaruhi kelarutan enzim. Penambahan garam ini dalam larutan enzim akan mempengaruhi kelarutan enzim. Jika konsentrasi garam rendah, maka kelarutan enzim dalam air bertambah. Peristiwa ini dinamakan “*salting in*”. sedangkan jika konsentrasi garam tinggi, di mana kandungan garam dalam jumlah yang banyak maka kelarutan pada enzim akan turun. Sehingga garam

yang berlebih akan menyebabkan pengendapan pada enzim. Peristiwa ini dinamakan dengan “*salting out*” (Wirahadikusumah, 2001).

### 2.5.2 Dialisis

Pemurnian enzim tidak menghendaki adanya kelebihan garam, oleh karena itu garam yang tersisa dari proses pengendapan dipisahkan dengan cara dialisis. Dialisis adalah metode yang digunakan untuk memisahkan garam dari larutan protein. Metode ini berdasarkan sifat semipermeabel membran yang mampu menahan molekul-molekul besar, tapi dapat meloloskan molekul-molekul kecil seperti garam (Pohl, 1990). Proses ini dapat terjadi karena konsentrasi garam lebih tinggi didalam membran dialisis daripada di luar membran, sehingga menyebabkan larutan penyangga atau air masuk ke dalam dialisis. Selanjutnya garam akan keluar melalui membran, hingga tercapai kondisi keseimbangan. Tetapi setelah proses dialysis tersebut kadang terjadi penurunan aktivitas enzim yang kemungkinan diakibatkan oleh hilangnya ion penting yang dapat berfungsi mengaktifkan enzim atau biasanya disebut dengan kofaktor (Plummer, 1979).

## 2.6 Uji Aktivitas Enzim $\alpha$ -Amilase dengan Metode Fuwa

Metode Fuwa didasarkan pada perubahan warna yang dihasilkan dari pengikatan iodine ke polimer pati membentuk kompleks warna biru dan menyerap cahaya monokromatis pada  $\lambda_{\text{maks}}$  610 nm (Fuwa *et al.*, 1954). Metode Fuwa digunakan pada tahap isolasi dan pemurnian enzim.

## 2.7 Uji Aktivitas Enzim $\alpha$ -Amilase dengan Metode Mandels

Adapun metode Mandels didasarkan pada pengukuran jumlah gula pereduksi dengan uji asam dinitrosilat (DNS) (Mandels *et al.*, 2009). Reaksi yang terjadi merupakan reaksi redoks yang melibatkan oksidasi gugus aldehid pada gula pereduksi menjadi asam karboksilat, sementara DNS tereduksi menjadi asam 3-amino-5-nitrosalisilat dalam kondisi basa. DNS yang tereduksi akan menghasilkan perubahan warna dari kuning menjadi merah bata (Miller, 1959). Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan menggunakan kurva standar glukosa (Mandels *et al.*, 2009). Metode Mandels digunakan dalam penentuan data kinetika enzim  $\alpha$ -amilase yaitu nilai  $K_M$ ,  $V_{maks}$ ,  $t_{1/2}$  (waktu paruh),  $k_i$  (konstanta laju inaktivasi termal) dan  $\Delta G_i$  (perubahan energi akibat denaturasi).

## 2.8 Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

Metode Lowry bergantung pada dua reaksi yang berbeda. Pertama adalah pembentukan kompleks ion tembaga ( $Cu^{2+}$ ) dengan ikatan amida, membentuk tembaga tereduksi ( $Cu^+$ ) dalam larutan alkali. Kromofor biuret ini biasanya distabilkan dengan penambahan tartrat. Reaksi kedua adalah reduksi reagen *Folin-Ciocalteu* (fosfomolibdat dan fosfotungstat) terutama oleh kompleks ikatan  $Cu^+$  dengan gugus ( $-NH_2^-$ ) pada residu tirosin dan triptofan. Karena pereaksi *Folin-Ciocalteu* tereduksi menghasilkan warna biru, ia dapat dideteksi dengan spektrofotometer dalam  $\lambda$  500 hingga 750 nm. Reaksi Biuret sendiri tidak terlalu sensitif. Reagen *Folin-Ciocalteu* dapat mendeteksi residu tirosin (dalam protein) karena kandungan fenolik dalam residu tersebut mampu mereduksi fosfotungstat dan fosfomolibdat, yang merupakan

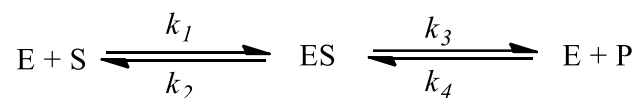


konstituen utama reagen *Folin-Ciocalteu*, menjadi tungsten dan molibdenum yang berwarna biru (Lowry, 1951).

Penentuan konsentrasi protein dengan penyerapan ultraviolet biasanya pada  $\lambda$  280 nm, tergantung pada keberadaan asam amino aromatik dalam protein. Tirosin dan triptofan memiliki ikatan konjugasi yang akan mengalami transisi elektronik pada  $\lambda$  280 nm. Kedua asam amino ini terkandung dalam *Bovine Serum Albumin* (BSA) yang digunakan sebagai kurva standar. BSA adalah standar yang paling umum digunakan untuk pengujian protein meskipun merupakan protein "lengket" yang cenderung mengikat protein dan molekul lain sehingga sangat sulit diperoleh dalam bentuk murni 100% (Mandula, 2006).

## 2.9 Kinetika Reaksi Enzim

Kinetika enzim mempelajari tentang factor-faktor yang mempengaruhi laju reaksi yang dikatalisis oleh enzim. Reaksi enzimatik diperkenalkan oleh Leonor Michaelis dan Maud Menten seperti ditunjukkan pada persamaan dibawah ini:



Substrat (S) pertama-tama berikatan dengan enzimnya (E) sehingga membentuk kompleks enzim-substrat (ES). Ikatan ini terjadi dengan cepat tetapi secara reversibel ( $k_1$  dan  $k_2$ ) menjadi konstanta laju untuk proses ini. Enzim-substrat selanjutnya diubah menjadi produk (P) yang terlepas dari enzim, suatu proses yang juga reversibel (konstanta laju  $k_3$  dan  $k_4$ ). Kekuatan katalitik enzim pada substrat yang diberikan melibatkan dua variabel dasar:

1.  $K_M$  (Konstanta Michaelis-Menten), adalah konsentrasi substrat pada saat laju reaksi sama dengan setengah dari nilai maksimalnya ( $1/2 V_{maks}$ ).  $K_M$  menunjukkan ukuran afinitas enzim terhadap substratnya. Enzim dengan afinitas rendah terhadap substratnya akan memiliki  $K_M$  tinggi dan enzim dengan afinitas tinggi akan memiliki  $K_M$  rendah.
2.  $V_{maks}$ , adalah laju reaksi pada saat enzim sepenuhnya jenuh oleh substrat yang menunjukkan bahwa semua sisi pengikatan terus-menerus terisi kembali.  $V_{maks}$  merupakan ukuran laju maksimal katalisis enzimatis.  $V_{maks}$  konstan untuk jumlah enzim tertentu. Baik  $V_{maks}$  dan  $K_M$  sensitif terhadap perubahan pH, suhu, kekuatan ionik dan ada atau tidaknya inhibitor enzim (Engelking, 2015).

## 2.10 Stabilitas Enzim

Stabilisasi enzim sangat penting dalam banyak aplikasi. Dua jenis stabilitas utama dapat didefinisikan sebagai: 1) Stabilitas penyimpanan; berkaitan dengan stabilitas enzim ketika disimpan sebagai sediaan yang didehidrasi, suatu larutan atau sebagai sediaan yang diamobilisasi dan khususnya berkaitan dengan perubahan aktivitas dari waktu ke waktu. Bagi produsen enzim, umur simpan produk-produk berbasis enzim umumnya tergantung pada stabilitas enzim selama penyimpanan dan 2) Stabilitas penggunaan; berkaitan dengan perubahan aktivitas enzim saat digunakan yang diukur dalam waktu paruh ( $t_{1/2}$ ), yaitu waktu yang dibutuhkan untuk suatu enzim mengalami penurunan aktivitas hingga setengah dari aktivitas aslinya. Hal ini penting dalam penggunaan enzim sebagai biokatalisis atau biotransformasi dan sistem pemantauan analitis (Drago *and* Gibson, 2001).

Kemampuan enzim untuk mempertahankan strukturnya dalam kondisi fisiologis seperti pH dan suhu dalam waktu tertentu juga menunjukkan

kestabilan suatu enzim. Kestabilan termal suatu enzim dalam rentang waktu tertentu dihitung pada persamaan 1:

$$\text{Aktivitas sisa} = \frac{\text{Aktivitas unit enzim pada } t_i}{\text{Aktivitas unit enzim pada } t_0} \times 100\% \quad (1)$$

Stabilitas enzim dapat dilihat pula dari nilai waktu paruh ( $t_{1/2}$ ), konstanta laju reaksi inaktivasi ( $k_i$ ) dan perubahan energy akibat denaturasi ( $\Delta G_i$ ). Semakin kecil laju inaktivasi ( $k_i$ ) menunjukkan enzim hasil modifikasi jauh lebih stabil dibandingkan enzim hasil pemurnian. Enzim hasil modifikasi lebih sulit unfolding sehingga kestabilan enzim meningkat (Yang *et al.*, 1996). Semakin besar energy denaturasi ( $\Delta G_i$ ) enzim menunjukkan enzim hasil modifikasi lebih kaku (rigid). Semakin rigid enzim maka ikatan yang dimiliki semakin kuat sehingga konformasi (struktur tersier) enzim tidak mudah terbuka dan struktur tersier lebih dipertahankan (Kazan *et al.*, 1997).

## 2.11 Modifikasi Kimia Enzim

Menurut Mozhaev *and* Martinek (1984), untuk meningkatkan stabilitas enzim dapat dilakukan dengan tiga cara, yaitu: amobilisasi, modifikasi kimia dan mutagenesis terarah. Modifikasi kimia merupakan salah satu metode untuk meningkatkan stabilitas enzim yang larut dalam air (Janecek, 1993) dan metode ini telah disarankan oleh Mozhaev *et al.*, (1990). Dibandingkan amobilisasi, modifikasi kimia memiliki keuntungan yaitu: interaksi enzim dengan substrat tidak terhalangi matriks, sehingga penurunan aktivitas enzim dapat ditekan. Dalam bidang klinik, mekanisme kerja enzim yang diamobilisasi selama interaksi dengan reseptor atau komponen lain dari

membran seluler dapat berubah karena keberadaan matriks pendukung (Janecek, 1993).

Dalam reaksi enzim dengan zat pemodifikasi, gugus fungsi pada permukaan enzimlah yang paling mungkin berikatan dengan zat pemodifikasi. Gugus fungsi tersebut merupakan gugus tiol seperti sistein dan lisin, karena paling banyak membentuk *folding* dan bereaksi dengan zat pemodifikasi (Price, 1996). Gugus amino dari lisin merupakan gugus yang paling banyak dilibatkan karena gugus ini paling melimpah dan paling mudah didekati dari rantai samping asam amino suatu enzim Janecek (1993).

Menurut Mozhaev *et al.*, (1990), modifikasi kimia dengan ikatan kovalen stabil dapat dilakukan dalam beberapa cara seperti: (1) modifikasi dengan menggunakan pereaksi bifungsional (pembentukan ikatan silang antara gugus-gugus fungsi pada permukaan protein), (2) modifikasi kimia dengan menggunakan pereaksi non polar (meningkatkan interaksi hidrofobik), (3) penambahan gugus polar bermuatan atau polar baru (menambah ikatan ionik atau hidrogen) dan (4) hidrofilisasi permukaan protein (mencegah terjadinya kontak antara gugus hidrofobik dengan lingkungan berair yang tidak disukainya).

## **2.12 Sianurat Klorida Polietilenglikol (CC-PEG)**

Polietilenglikol (PEG) adalah polimer yang banyak digunakan dalam industri pangan, kosmetik dan farmasi. PEG merupakan sekelompok polimer sintetik yang larut dalam air dan memiliki kesamaan struktur kimia berupa adanya gugus hidroksil primer pada ujung rantai polieter yang mengandung oksietilen ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ). Dalam industri farmasi, PEG digunakan untuk

melarutkan obat-obat yang tidak larut dalam air. Penggunaan PEG sebagai pelarut dapat meningkatkan penyebaran obat di dalam tubuh manusia. PEG juga dapat digunakan untuk melapisi kaca atau metal, campuran cat serta tinta, pembuatan kosmetik, perlengkapan mandi, serta alat-alat rumah tangga. Selain itu, PEG juga banyak dimanfaatkan dalam industri kertas, bahan karet, kulit dan tekstil (Harris, 1992).

Polietilenglikol atau PEG [HO-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH] teraktivasi merupakan reagen yang banyak digunakan sebagai zat pemodifikasi enzim. Menurut Yang *et al.* (1996), PEG teraktivasi mengandung gugus reaktif yang dapat dihubungkan langsung dengan gugus fungsi dalam enzim. Berdasarkan struktur enzim, residu lisin yang berada di permukaan memiliki kemungkinan paling besar untuk bereaksi dengan zat pemodifikasi. Gugus amino dari lisin merupakan gugus yang paling banyak dilibatkan, karena gugus ini paling melimpah dan paling mudah didekati dari rantai samping asam amino suatu enzim (Janecek, 1993).

Modifikasi kimia yang telah dilakukan Yang *et al.* (1996) terhadap enzim subtilisin menggunakan sianurat klorida polietilenglikol (CC-PEG) terbukti mampu meningkatkan kestabilan enzim terhadap suhu dan pH serta mampu menekan penurunan aktivitas enzim modifikasi. Yandri (2004), berhasil melakukan modifikasi kimia terhadap enzim  $\alpha$ -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 menggunakan PEG teraktivasi, yaitu nitrofenolkarbonat-polietilenoliglikol (NPC-PEG) dan sianurat klorida polietilenglikol (CC-PEG). Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan stabilitas termal enzim modifikasi sebanyak 2-4 kali dari enzim hasil pemurnian. Reaksi pengikatan enzim ke PEG teraktivasi ditunjukkan pada Gambar 8.



### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan pada bulan Oktober 2022-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 antara lain: alat-alat gelas, Spektrofotometer *UV-VIS Cary 100 Agilent Technologies*, *laminar air flow* CRUMA model 9005-FL, jarum ose, mikropipet *Eppendroff*, neraca analitik, lemari pendingin, pembakar spiritus, sentrifuga *Cole Parmer*, tabung sentrifuga, oven, *autoclave* model S-90N, *shaker* inkubator, *waterbath*, oven, inkubator, pH meter, magnetic stirrer, botol film, dan botol plastik.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain PDA (*Potato Dextrose Agar*) (Himedia),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck), HCl 1N,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2$  (Merck),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Merck),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Merck),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck),  $\text{CoCl}_2$ , KI,  $\text{I}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Merck), NaOH 0,1N,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , Na/K-tartrat, *folin ciocelteau*, BSA (*Bovine Serum Albumin*), pepton, urea, akuades, pati terlarut,

kantong selofan, kapas sumbat, kasa, kertas, karet, aluminium foil, alkohol 70%, tisu, kertas saring, es batu, dan CC-PEG.

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

### 3.3 Prosedur Kerja

#### 3.3.1 Pemiakan Isolat *A. fumigatus*

a. Pembuatan Media Agar Miring

Timbang sebanyak 3,9 gram PDA dilarutkan dalam 100 mL akuades lalu dipanaskan. Selanjutnya dituangkan dalam tabung reaksi sebanyak 5 mL. Tabung reaksi ditutup dengan sumbat kapas dan disterilkan media dalam *autoclave* pada suhu 121 °C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Tabung reaksi disimpan dalam posisi miring sampai media memadat.

b. Pemiakan *A. fumigatus*

Pemiakan dilakukan dengan diambil satu tarikan ose biakan murni *A. fumigatus* lalu ditusuk ke permukaan media agar miring. Proses dilakukan dalam *laminar air flow* yang telah disterilisasi dengan sinar UV. Media agar yang telah mengandung isolat diinkubasi selama beberapa hari dalam inkubator pada suhu 37 °C (Yandri *et al.*, 2010).



### 3.3.2 Pembuatan Media Inokulum dan Fermentasi, Inokulasi *A. Fumigatus* Dan Produksi Enzim $\alpha$ -Amilase

a. Pembuatan media inokulum dan fermentasi

Media inokulum yang digunakan sebagai medium adaptasi awal pertumbuhan dan medium perkembangbiakan jamur pada media cair tanpa terjadinya produksi enzim  $\alpha$ -amilase. Sedangkan media fermentasi digunakan sebagai medium pertumbuhan dan perkembangbiakan disertai produksi enzim  $\alpha$ -amilase. Media inokulum yang digunakan terdiri dari 5 gram  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 3,5 gram  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,75 gram  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,875 gram pepton; 0,75 gram urea; 0,75 gram  $\text{CaCl}_2$ ; 0,0125 gram  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,0035 gram  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,005 gram  $\text{CoCl}_2$ ; dan 1,875 gram pati singkong. Kemudian semua bahan dilarutkan dalam akuades 100 mL dalam labu Erlenmeyer 250 mL dan distrerilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121 °C, tekanan 1 atm selama 15 menit.

b. Inokulasi *A. fumigatus*

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

c. Produksi enzim  $\alpha$ -amilase

Produksi enzim  $\alpha$ -amilase dilakukan dengan memindahkan media inokulum sebanyak 2% dari jumlah media fermentasi ke dalam media fermentasi secara aseptis lalu dikocok menggunakan *shaker inkubator* dengan kecepatan 150 rpm selama 112 jam (Yandri *et al.*, 2010).

### 3.3.3 Isolasi Enzim $\alpha$ -Amilase

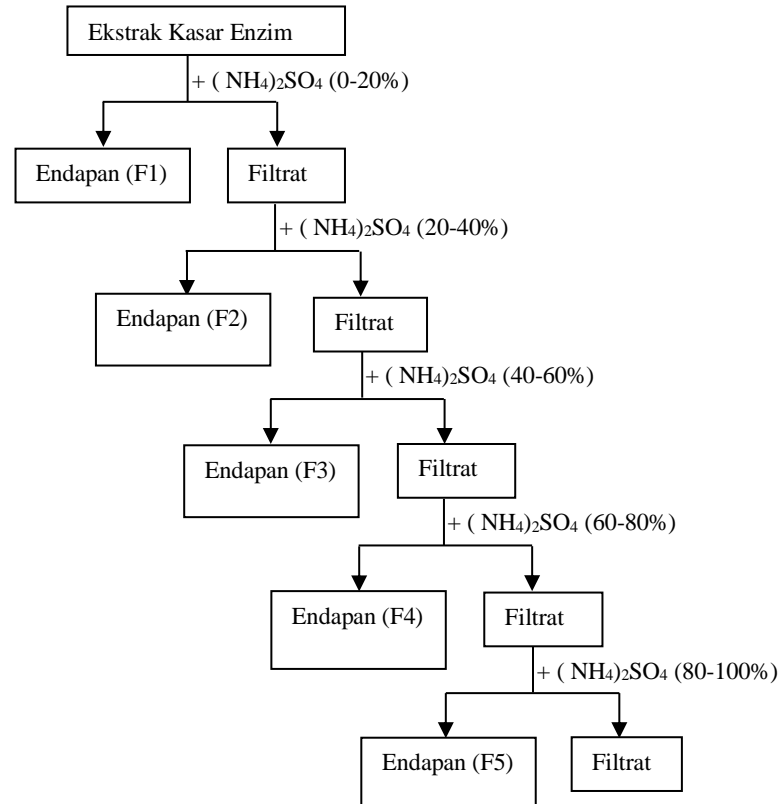
Isolasi enzim  $\alpha$ -amilase dilakukan dengan metode sentrifugasi. Prinsipnya berdasarkan kecepatan sedimentasi dengan cara pemusingan. Sentrifugasi digunakan untuk memisahkan enzim ekstraseluler dari sisa-sisa sel. Sentrifugasi dilakukan pada suhu rendah yaitu 4 °C (di bawah suhu kamar) hal ini dilakukan untuk menjaga kehilangan aktivitas enzim (Suhartono, 1992). Untuk memisahkan enzim dengan komponen sel lainnya digunakan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit, kemudian saring dengan menggunakan kertas saring. Masukkan filtrat ke dalam botol sampel. Filtrat yang didapat merupakan ekstrak kasar enzim yang selanjutnya dapat diuji aktivitasnya dengan Spektrofotometer UV-Vis metode Fuwa dan pengukuran kadar protein dengan metode Lowry.

### 3.3.4 Pemurnian Enzim $\alpha$ -Amilase

Setelah enzim  $\alpha$ -amilase diisolasi, kemudian enzim tersebut dimurnikan menggunakan metode fraksinasi dengan 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 dimurnikan dengan cara fraksinasi menggunakan garam ammonium sulfat pada berbagai derajat kejenuhan yaitu (0-20)%; (20-40)%; (40-60)%, (60-80)%, dan (80-100)% untuk mengetahui pada fraksi mana enzim  $\alpha$ -amilase terendapkan. Skema fraksinasi dengan ammonium sulfat ditunjukkan dalam Gambar 9.



**Gambar 9.** Skema fraksinasi dengan ammonium sulfat.

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 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.*, 2010).

b. Dialisis

Enzim hasil fraksinasi dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis dengan buffer fosfat 0,01 M pH 6,0 dengan volume buffer sebanyak 1L selama 24 jam pada suhu dingin. Selama proses dialisis, dilakukan pergantian buffer setiap 4-6 jam agar konsentrasi ion-ion di dalam selofan dapat dikurangi. Proses ini dilakukan secara kontinyu sampai ion-ion di dalam selofan dapat diabaikan. Untuk mengetahui bahwa sudah tidak ada lagi ion-ion garam dalam selofan, maka diuji dengan menambahkan larutan  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  atau  $\text{BaCl}_2$  di luar selofan. Bila masih ada ion sulfat dalam kantong, maka akan terbentuk endapan putih  $\text{BaSO}_4$ . Semakin banyak endapan yang terbentuk, maka semakin banyak ion sulfat yang ada dalam kantong. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas dengan metode Fuwa, serta diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.

### 3.3.5 Uji aktivitas dan Kadar Protein Enzim $\alpha$ -Amilase

#### A. Pengujian aktivitas enzim $\alpha$ -amilase Metode Mandels

1. Pembuatan Pereaksi untuk Pengukuran Aktivitas  $\alpha$ -amilase Metode Fuwa (Fuwa, 1954).
  - a) Pereaksi iodin: dimasukkan KI 2 gram dalam labu takar 100 mL dan dilarutkan dalam akuades 10 mL. 0,2 gram  $\text{I}_2$  dimasukkan dan ditambahkan akuades hingga tanda batas miniskus.
  - b) Larutan pati: pati 0,1 gram dilarutkan dalam akuades 100 mL dan dipanaskan hingga larut.
  - c) Larutan HCl 1N: diencerkan HCl pekat 12 N menjadi 1N. Sebanyak HCl pekat 8,3 mL dimasukkan dalam labu ukur 100 mL. Kemudian ditambahkan akuades hingga batas miniskus.

## B. Pengujian Aktivitas Enzim $\alpha$ -amilase Metode Fuwa

Aktivitas  $\alpha$ -amilase ditentukan dengan metode iodine (Fuwa, 1954). Metode ini berdasarkan pada pengurangan jumlah substrat (pati). Sebanyak 0,25 mL enzim ditambahkan ke dalam 0,25 mL larutan pati 0,1% lalu diinkubasi pada suhu 60 °C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 0,25 mL HCl 1N dan kemudian ditambahkan 0,25 mL pereaksi iodine dan 4 mL akuades. Setelah campuran diaduk rata, serapannya diukur menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada  $\lambda$  maks 600 nm. Kontrol dibuat dengan cara yang sama hanya menggunakan 0,25 mL enzim yang telah diinaktivasi menggunakan HCl.

## C. Pengujian aktivitas enzim $\alpha$ -amilase Metode Mandels

### 1. Pembuatan pereaksi uji aktivitas enzim $\alpha$ -amilase dengan Metode Mandels

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

### 2. Uji Aktivitas enzim $\alpha$ -amilase Metode Mandels

Metode ini digunakan untuk melihat adanya glukosa yang terbentuk. Sebanyak 0,25 mL enzim dan 0,25 mL larutan pati dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian diinkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit dalam penangas air. Setelah itu, ditambahkan DNS (*dinitrosalisilic acid*) sebanyak 1 mL. Dipanaskan selama 10 menit kemudian dinginkan. Selanjutnya, ditambahkan aquades sebanyak 1,5

mL ke dalam tabung reaksi. Di uji menggunakan Spektrofotometer UV-Vis (Mandels *et al.*, 1976).

### 3.3.6 Penentuan Kadar Protein Metode Lowry

- a. Pereaksi uji kadar protein Enzim  $\alpha$ -amilase dengan media pembuatan Lowry.

Uji kadar protein Enzim  $\alpha$ -amilase dengan metode Lowry diawali dengan pembuatan pereaksi.

1. Pereaksi A : 2 gram  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 N.
2. Pereaksi B : 5 mL larutan  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1% ditambahkan ke dalam 5 mL larutan Na(K)-Tartarat 1%. Pereaksi C 2 mL pereaksi B ditambah 100 mL pereaksi A.
3. Pereaksi C : reagen *follin clocalteau* diencerkan dengan aquades 1:1.
4. Pereaksi D : larutan BSA (*Bovine Serum Albumin*) dengan kadar 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm.

- b. Kadar protein enzim  $\alpha$ -amilase metode Lowry

Kadar protein enzim ditentukan dengan metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Sebanyak 0,1 mL larutan enzim ditambah dengan 0,9 mL akuades. Kemudian direaksikan dengan 5 mL pereaksi C, dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruang. Setelah itu, ditambahkan dengan cepat 0,5 mL pereaksi D dan diaduk dengan sempurna, didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Untuk kontrol 0,1 mL enzim diganti dengan 0,1

akuades. Selanjutnya, lakukan perlakuan yang sama seperti sampel. Serapannya diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 750 nm. Untuk menentukan kadar protein enzim digunakan kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumin*) dan perhitungan metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

### 3.3.7 Modifikasi Kimia Enzim $\alpha$ -amilase dengan CC-PEG

Sebanyak 2 mL (0,15 mg/mL) enzim  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dimasukkan ke dalam vial *wheaton* 8 mL yang mengandung 0,25 mg PEG teraktivasi dalam 2 mL bufer borat (0,1 M, pH 8,0). Pada penelitian ini perbandingan molar PEG terhadap enzim  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian adalah 5, 10 dan 15mg. Larutan dikocok selama 3 jam pada suhu kamar, selanjutnya didialisis dalam bufer fosfat (20 mM, pH 8,0) selama 24 jam, dan diliofilisasi selama 48 jam pada alat *freeze dryer*.

### 3.3.8 Karakterisasi Enzim $\alpha$ -Amilase

#### a. Penentuan pH Optimum

Untuk mengetahui pH optimum enzim sebelum dan sesudah modifikasi digunakan bufer asetat 0,1 M dengan pH bervariasi, yaitu 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 dan 8,0. Suhu dijaga tetap pada suhu optimum yang telah ditentukan, dilanjutkan dengan pengukuran aktivitas enzim dengan metode Mendels.

b. Penentuan Suhu Optimum

Sedangkan untuk mengetahui suhu optimum, digunakan variasi suhu yaitu 45; 50; 55; 60; 65; 70; 75; dan 80°C. Kemudian diuji aktivitas enzim dengan metode Mandels.

c. Penentuan  $K_M$  dan  $V_{maks}$

Nilai Konstanta Michaelis-Menten ( $K_M$ ) dan laju reaksi maksimum ( $V_{maks}$ ) enzim  $\alpha$ -amilase ditentukan dengan memvariasikan konsentrasi substrat 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1% dalam buffer fosfat pada pH 6,5 dan suhu 60°C selama 30 menit. Selanjutnya data aktivitas enzim dengan konsentrasi substrat diplotkan ke dalam kurva Lineweaver-Burk untuk penentuan  $K_M$  dan  $V_{maks}$  (Fuwa, 1954).

d. Uji stabilitas termal enzim

Penentuan stabilitas termal enzim (Yang *et al.*, 1996) sebelum dan sesudah modifikasi dilakukan dengan mengukur aktivitas sisa enzim setelah diinkubasi selama 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 dan 100 menit pada pH dan suhu optimumnya.

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

### 3.3.9 Penentuan Waktu Paruh ( $t_{1/2}$ ), Konstanta Laju Inaktivasi ( $k_i$ ), dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi ( $\Delta G_1$ )

Penentuan nilai konstanta laju inaktivasi termal ( $k_i$ ) enzim  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dan hasil amobilisasi dilakukan dengan membuat grafik (waktu



inkubasi terhadap  $\ln([E]_i/[E]_0)$ . Adapun penentuan perubahan energi akibat denaturasi ( $\Delta G_i$ ) enzim hasil pemurnian dan enzim amobil, diturunkan dari Persamaan:

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

Keterangan :

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

T = suhu absolut ( $^{\circ}\text{K}$ )

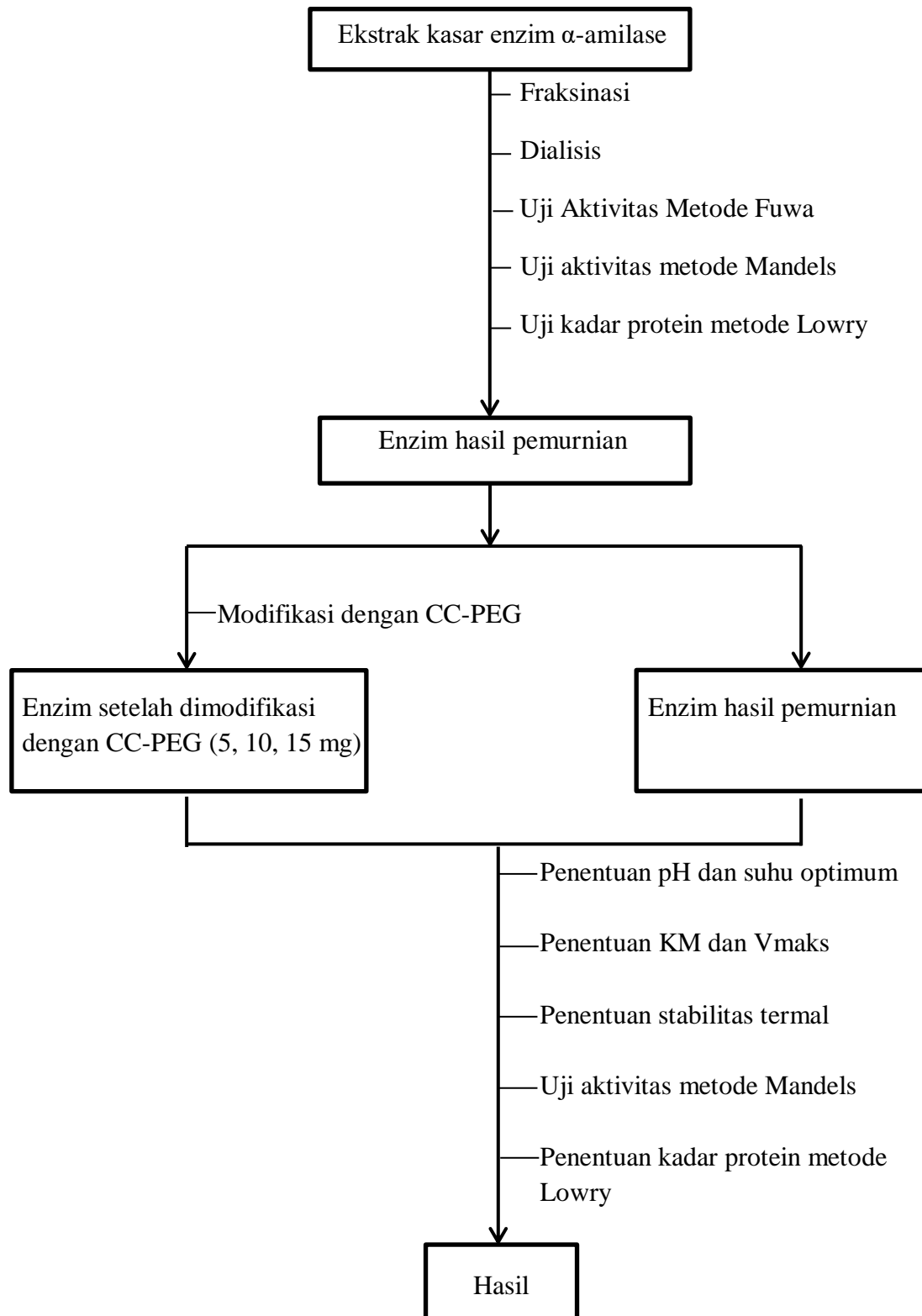
$k_i$  = konstanta laju inaktivasi termal

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

$k_B$  = konstanta Boltzmann ( $1,381 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$ )

(Yandri *et al.*, 2010).

Secara keseluruhan, penelitian ini terangkum dalam diagram alir penelitian yang ditunjukkan dalam Gambar 10.



**Gambar 10.** Diagram alir penelitian.

## V. SIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Simpulan

Dari pembahasan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka didapatkan simpulan sebagai berikut:

1. Enzim  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian meningkat kemurniannya sebanyak 11 kali dibandingkan ekstrak kasar enzim dengan aktivitas spesifik 818,834 U/mg.
2. Enzim hasil pemurnian mempunyai pH 5; suhu optimum 55°C;  $K_M = 6,14$  mg/mL substrat dan  $V_{maks} = 951,47$   $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$ . Uji stabilitas termal enzim hasil pemurnian pada suhu 55 °C selama 100 menit menunjukkan aktivitas sisa sebesar 11% dengan nilai  $k_i = 0,0182$   $\text{menit}^{-1}$ ;  $t_{1/2} = 38$  menit dan  $\Delta G_i = 102,711$  kJ/mol.
3. Enzim  $\alpha$ -amilase hasil modifikasi dengan variasi konsentrasi CC-PEG 5, 10 dan 15 mg mempunyai pH optimum 5,5; suhu optimum 60°C; nilai  $K_M$  berturut-turut sebesar 4,33; 6,17; dan 4,04 mg/mL substrat dan nilai  $V_{maks}$  berturut-turut sebesar 572,40; 614,62; dan 541,12  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$ .
4. Uji stabilitas termal enzim hasil modifikasi dengan CC-PEG 5, 10, dan 15 mg pada suhu 60 °C selama 100 menit menunjukkan aktivitas sisa berturut-turut sebesar 34, 28, dan 21% dengan nilai  $k_i = 0,0113$ ; 0,0102; dan 0,0128  $\text{menit}^{-1}$ , nilai  $t_{1/2} = 61$ ; 68; dan 54 serta  $\Delta G_i = 118,370$ ; 112,278; dan 111,642 kJ/mol.
5. Enzim  $\alpha$ -amilase hasil modifikasi dengan CC-PEG 5; 10; dan 15 mg mengalami penurunan nilai  $k_i$ , peningkatan waktu paruh ( $t_{1/2}$ ) dan  $\Delta G_i$

dibandingkan enzim hasil pemurnian. Hasil ini menunjukkan bahwa modifikasi menggunakan PEG teraktivasi (CC-PEG) mampu meningkatkan stabilitas enzim  $\alpha$ -amilase dari *A. fumigatus*.

## 5.2 Saran

Dari hasil penelitian yang diperoleh, maka disarankan untuk mencari metode pemurnian lain yang dapat meningkatkan kemurnian enzim lebih baik dan melakukan penelitian lebih lanjut mengenai modifikasi  $\alpha$ -amilase menggunakan PEG teraktivasi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Afzal, H., Shazad, S., Qamar, S., and Nida, U. 2013. Morphological identification of *Aspergillus* species from the soil of Larkana District Sindh Pakistan. *Asian. J. Agric. Biotechnol.* **1**(3): 105-117.
- Azmi, A.S., Malek, M.I.A. and Puad, N.I.M. 2017. A Review on Acid and Enzymatic Hydrolyses of Sago Starch. *Int. Food Res. J.* **24**: 265-273.
- Boyer, R.F. 1986. *Modern Experimental Biochemistry*. Benjamin Cumming Publishing Company. Redwood City, California.
- Chaplin, M.F. and Bucke. 1990. *Enzyme Technology*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Cuesta, S. M., Rahman, S. A., Furnham, N. and Thornton, J. M. 2015. The Classification and Evolution of Enzyme Function. *Biophys. J.* **109**(6): 1082-1086.
- Daba, T., Kojima, K. and Inouye, K. 2013. Chemical Modification of Wheat  $\beta$ -Amylase by Trinitrobenzenesulfonic Acid, Methoxypolyethylene Glycol, and Glutaraldehyde to Improve Its Thermal Stability and Activity. *Enzyme Microb. Technol.* **53**(6-7): 420-426.
- Damien, M., Catherine, J., Patrice, D. and Christopher, B. 2010. Enhanced Mechanical Properties of Partially Beta-Amylase Trimmed Starch for Material Application. *Carbohydr. Poly.* **80**(3): 747-752.
- Drago, G. A. and Gibson, T. D. 2001. Enzyme Stability and Stabilisation: Applications and Case Studies. *Eng. Manuf. Biotechnol.* **4**: 361-376.
- Dryer, R.L. 1993. *Biokimia Jilid 1*. UGM-Press. Yogyakarta.
- Engelking, L. R. 2015. Enzyme Kinetics. *Textb. Vet. Physiol. Chem.* 32-38.
- Ersson, B., Rydén, L. and Janson, J-C. 201. Introduction to Protein Purification. *Methods. Biochem. Anal.* **54**: 3-22.

- Fang, W. and Large, J. P. 2018. Microbe profile: *Aspergillus fumigatus* a saprotrophic and opportunistic fungal pathogen. *J. Microbiol.* **164**(8): 1009-1011.
- Fessenden, R.J. dan J.S. Fessenden. 1982. *Kimia Organik Jilid II*. Erlangga. Jakarta.
- Fuwa, H. 1954. A New Method for Microdetermination of Amylase Activity by The Use of Amylase as The Substrate. *J. Biochem.* **41**(5): 583-603.
- Girindra, A. 1986. *Biokimia I*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K. and Chauhan, B. 2003. Microbial  $\alpha$ -Amylases: A Biotechnological Perspective. *Process Biochem.* **38**(11): 1599-1616.
- Harris, J. M. 1992. *Polyethyleneglycol*. Plenum Press. New York.
- Headon, D. R and Walsh, G. 1994. The introduction of enzymes. *Biotechnol. Adv.* **12**: 635-646.
- Hernaiz, M.J., J.M.S. Montero and J.V. Sinisterra. 1992. Modification of purified lipases from *Candida rugosa* with polyethylene glycol: A systematic study. *Enzyme Microb. Technol.* **24**. 181-190.
- Hussain, I., Siddique, F., Mahmood, M. S. and Ahmed, S. I. 2013. A Review of The Microbiological Aspect of  $\alpha$ -Amylase Production. *Int. J. Agric. Biol.* **15**: 1029-1034.
- Janecek, S. 1993. Strategies for Obtaining Stable Enzymes. *Process Biochem.* **28**: 435-445.
- Judoamidjojo, M. 1989. *Teknologi Fermentasi*. Rajawali Press. Jakarta.
- Junita. 2002. *Mempelajari Stabilitas Termal Enzim Protease dari Bacillus subtilis stearothermophilus dalam Pelarut Heksana, Toluena, dan Benzena*. (Skripsi). IPB. Bogor.
- Kandra, L. 2003.  $\alpha$ -Amylases of Medical and Industrial Importance. *J. Mol. Struct. (Theochem)*. 487-498.
- Kazan, D., Ertan, H. and Erarslan, A. 1996. Stabilization of Penicillin G acylase Against pH by Chemical Cross-Linking. *Process Biochem.* **31**(2): 135-140.
- Kazan, D. H., Ertan., and Erarslan, A. 1997. Stabilization of *Escherichia coli* penicillin G Acylase againsts thermal inactivation by cross-linking with dextran dialdehyde polymers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**: 191-197.

- Landecker and Moore. 1996. *Fundamental of The Fungi*. Prentice Hall. New Jersey.
- Lay, B.W. dan Sugyo, H. 1992. *Mikrobiologi*. Rajawali Pers. Jakarta.
- Lehninger, A.L. 2005. *Dasar-Dasar Biokimia Alih Bahasa oleh Maggy Thenawidjaya*. Erlangga. Jakarta.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. D., and Michael, M. C. 2017. *Principles of Biochemistry Lehninger Seventh Edition (7th ed.)*. W. H. Freeman and Company. New York.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Mandels, M., Raymond, A. Charles, R. 1976. Measurement of saccharifying cellulose. *Biotech & Bioeng. Symp.* No 6. John Wiley & Sons Inc.
- Mandels, M., Eveleigh, D.F. Andreotti, R. and Roche. R. 2009. Measurement of Saccharifying Cellulose. *Biotechnol. Biofuels.* **2**(21): 1-8.
- Mandula, H. 2006. Role of Site-Specific Binding to Plasma Albumin in Drug Availability to Brain . *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **317**(2): 667-675.
- Martoharsono dan Soeharsono. 2006. *Biokimia jilid I*. UGM-Press. Yogyakarta.
- Marvel, M. 2007. *Aspergillus fumigatus*. *J. Microbiol.* **70**: 1253-1262.
- Maton, A., H. Jean, D.L.C.W. McLaughlin, J. Susan, J.D. Wright and Q.W. Maryanna. 1993. *Human Biology and Health*. Prentice Hall. Englewood Cliffs, New Jersey, USA.
- McMurry, J. and Marry, E. C. 1994. *Fundamental of Organic and Biological Chemistry*.
- Miller, G. L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* **31**(3): 426-428.
- Mozhaev, V. V. and Martinek, K. 1984. Structure-Stability Relationship in Proteins: New Approaches to Stabilizing Enzymes. *Enzyme Microb Technol.* **6**: 50-59.
- Mozhaev, V. V., Melik-Nubarov, N.S., Siksniš, V. and Martinek, K. 1990. Strategy for Stabilizing Enzymes. Part Two: Increasing Enzyme Stability by Selective Chemical Modification. *Biocatal.* **3**: 189-196.

- O'Gorman, C.M., Fuller, H., and Dyer, P. S. 2009. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *A. fumigatus*. *Nature*. **457** (7228): 471-475.
- Olson, B. J. S. C. 2016. Assays for Determination of Protein Concentration . *Cur. Protoc. Pharmacol.* **73**: A.3A.1-A.3A.32.
- Page, D.S. 1997. *Prinsip-Prinsip Biokimia*. Erlangga. Jakarta.
- Pelczar, M. J. dan Chan , E. C. S. 2005. *Dasar-Dasar Mikrobiologi I*. UI Press. Jakarta.
- Plummer D. T. 1979. *An Introduction to Practical Biochemistry, Second Edition*. Tata McGaraw-Hill Publishing Company. New Delhi.
- Poedjiadi, A. 1994. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: UI Press.
- Pohl, T. 1990. *Concentration of Protein Removal of Salute Dalam M.P. Deutscher, Methods of Enzymology. Guide to Protein Purification*. Academia Press. New York.
- Price, N. C. 1996. *Protein*. BIOS Scientific Publisher Limited. Oxford, UK.
- Reed, G. 1975. *Enzymes in Food Processing*. Academic Press. New York.
- Regan, D.L., Dunnill, P., and Lilly, M. D. 1974. Immobilized Enzyme Reaction Stability: Attrition of The Support Material. *Biotechnol. Bioeng.* **16**(3): 333-343.
- Rodwell, V., Rodwell, V., Bender, D., Botham, K., Kennelly, P., and Weil, P. 2015. *Harper's Illustrated Biochemistry*. McGraw Hill Education. New York.
- Scopes, R. 1982. *Protein Purification Principles and Practise*. Springer Verlag. New Jersey.
- Scopes, R. K. 1994. *Protein Purification: Principles and Practice* 3<sup>rd</sup> Edition. Springer. New York.
- Selvarajan, F., Mohanasrinivasan, V., Subathra Devi, C., and George Priya, D.C. 2015. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus plantarum* HF571129 on ZnO Nanoparticles: Characterization ans Lactose Hydrolysis. *Bioproc. Biosyst. Eng.* **38**(9): 1655-1669.
- Shahib, N. M. 2005. *Biologi Molekuler*. Universitas Padjajaran. Bandung.



- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Soccol, C. R. and Pandey, A. 2006.  $\alpha$ -Amylases from Microbial Sources-An Overview on Recent Developments. *Food Technol. Biotechnol.* **44**(2) : 173-184.
- Soemitro, S. 2005. Pengaruh Modifikasi Kimiawi Selektif Terhadap Kestabilan  $\alpha$ -Amilase dari *Saccharomyces fibuligera*. *J. Bionatura.* **7**(3): 259-273.
- Souza, P. M. and Magalhaes, P. O. 2010. Application of Microbial  $\alpha$ -Amylase in Industry-A Review. *Braz. J. Microbiol.* **41**: 850-861.
- Sri, R. 2008. Yellow Sweet Potato Starch Hydrolysis Into Glucose Enzymatically. *Jurnal Teknik Kimia.* **3**(1): 215-223.
- Stahl, S. 1999. Thermophilic microorganism: The biological background for thermophily and thermoresistance of enzyme in *Thermostability of Enzymes* (Gupta, M.N. editor). Springer Verlag. New Delhi. 59-60.
- Suhartono, M. T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. IPB Press. Bogor.
- Suhartono, M.T., Suswanto A., dan Widjaja H. 1992. *Diktat Struktur dan Biokimia Protein PA*. IPB. Bogor.
- Talekar, S. and Chavare, S. 2012. Optimization of Immobilization of  $\alpha$ -Amylase in Alginate Gel and Its Comparative Biochemical Studies With Free  $\alpha$ -Amylase. *Recent Res. Sci. Techno.* **4** (2): 1-5.
- Van der Maarel, M. J. E., van der Veen, B., Uitdehaag, J. C., Leemhuis, H. and Dijkhuizen, L. 2002. Properties and Applications of Starch-Converting Enzymes of The  $\alpha$ -Amylase Family. *J. Biotechnol.* **94**(2): 137-155.
- Wardani, A. dan Ahsanatul, S. 2012. *Purifikasi dan Strategi Enzim*. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Winarno, F.G. 1986. *Enzim Pangan dan Gizi*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Wirahadikusumah, M. 2001. *Biokimia: protein, enzim, dan asam nukleat*. ITB. Bandung.
- Yandri, A.S. 2004. *Karakterisasi dan Modifikasi Kimia  $\alpha$ -Amilase dari Bakteri Isolat Lokal Bacillus subtilis ITBCCB148*. Disertasi. ITB. Bandung.
- Yandri, Apriyanti, Suhartati, T and Hadi, S. 2010. The Increase of Thermal Stability of  $\alpha$ -Amylase from Local Bacteria Isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148 by Chemical Modification With Dimethyladipimidate. *Biosci. Biotechnol. Res. Asia.* **07**(2): 713-718.

- Yandri, Anggraini, N., Suhartati, T. and Hadi, S. 2011. Chemical Modification of  $\alpha$ -Amylase from Local Bacteria Isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148 With Glyoxylic Acid. *Orient. J. Chem.* **27**(3): 985-990.
- Yandri, Sundari, E. S., Suhartati, T. and Hadi, S. 2012. The Chemical Modification of  $\alpha$ -Amylase from Local Bacteria of *Bacillus subtilis* ITBCCB148 Using Citraconic Anhydride. *Orient. J. Chem.* **28**(4): 1613-161.
- Yang, Z., Michael, D., Robert, A., Fang, X. Y and Alan, J. R. 1996. Polyethylene Glycol-Induced Stabilization of Subtilisin. *Enzyme Microb. Technol.* **18**: 82-89.
- Yuwono, T. 2010. *Biologi Molekular*. Erlangga. Jakarta.