

**STUDI PENGARUH PENAMBAHAN XILITOL TERHADAP
STABILITAS ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus sp.***

(Skripsi)

Oleh

**SAJIDDAH TALFAH
NPM 2117011091**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2025**

ABSTRAK

STUDI PENGARUH PENAMBAHAN XILITOL TERHADAP STABILITAS ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus sp.*

Oleh

SAJIDDAH TALFAH

Enzim dalam industri banyak digunakan sebagai biokatalisator. Namun, kondisi penggunaan enzim yang terbatas, seperti suhu dan pH memerlukan pengembangan lebih lanjut agar memperoleh enzim dengan stabilitas yang diharapkan.

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh enzim α -amilase dari *Aspergillus sp.* dengan aktivitas dan tingkat kemurnian yang tinggi dibandingkan ekstrak kasar enzim, serta mempelajari pengaruh penambahan xilitol terhadap stabilitas enzim α -amilase dari *Aspergillus sp.* Tahap penelitian meliputi produksi, pemurnian dengan metode fraksinasi amonium sulfat dan dialisis, serta karakterisasi enzim.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa enzim hasil dialisis mengalami peningkatan kemurnian sebanyak 10,25 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim yang ditunjukkan dengan peningkatan nilai aktivitas spesifik dari 244,6844 U/mg untuk ekstrak kasar enzim, menjadi 2.500,82 U/mg untuk enzim hasil dialisis. Hasil karakterisasi menunjukkan bahwa enzim hasil dialisis dan penambahan xilitol (0,5; 1; dan 1,5 M) memiliki pH optimum yang sama, yaitu 4,0. Sedangkan suhu optimum, enzim hasil penambahan xilitol mengalami peningkatan menjadi 60 °C untuk enzim-xilitol 0,5 M, 65 °C untuk enzim-xilitol 1 dan 1,5 M, dibandingkan enzim hasil dialisis dengan suhu optimum 50 °C. Uji stabilitas termal dilakukan pada suhu 60 °C selama 100 menit, enzim hasil dialisis memiliki aktivitas sisa sebesar 69,5418 % dengan waktu paruh 210,0446 menit, sedangkan enzim hasil penambahan xilitol 0,5; 1; dan 1,5 M berturut-turut menunjukkan aktivitas sisa sebesar 78,9942; 81,3803; dan 80,4696 % serta waktu paruh 277,2589; 330,0701; dan 407,7336 menit. Peningkatan stabilitas enzim hasil penambahan xilitol 0,5; 1; dan 1,5 M berturut-turut sebesar 1,32; 1,57; dan 1,94 kali dibandingkan dengan enzim hasil dialisis.

Kata kunci: xilitol, α -amilase, *Aspergillus sp.*, stabilitas enzim, industri

ABSTRACT

STUDY OF THE EFFECT OF XYLITOL ADDITION ON THE STABILITY OF α -AMYLASE ENZYMES FROM *Aspergillus sp.*

By

SAJIDDAH TALFAH

Enzymes in industry are widely used as biocatalysts. However, the limited conditions of enzyme use, such as temperature and pH require further development in order to obtain enzymes with the expected stability.

This research aims to obtain α -amylase enzyme from *Aspergillus sp.* with high activity and purity level compared to enzyme crude extract, and to study the effect of xylitol addition on the stability of α -amylase enzyme from *Aspergillus sp.* The research stage includes production, purification by ammonium sulfate fractionation and dialysis methods, and enzyme characterization.

The results showed that the dialyzed enzyme increased in purity by 10.25 times compared to the enzyme crude extract as indicated by an increase in specific activity value from 244.6844 U/mg for the enzyme crude extract, to 2,500.82 U/mg for the dialyzed enzyme. Characterization results showed that the dialyzed enzyme and the addition of xylitol (0.5; 1; and 1.5 M) had the same optimum pH, which was 4.0. While the optimum temperature, the enzyme from xylitol addition increased to 60 °C for enzyme-xylitol 0.5 M, 65 °C for enzyme-xylitol 1 and 1.5 M, compared to the enzyme from dialysis with an optimum temperature of 50 °C. The thermal stability test was conducted at 60 °C for 100 minutes, the dialyzed enzyme had a residual activity of 69.5418 % with a half-life of 210.0446 minutes, while the enzyme from the addition of xylitol 0.5; 1; and 1.5 M respectively showed a residual activity of 78.9942; 81.3803; and 80.4696 % and a half-life of 277.2589; 330.0701; and 407.7336 minutes. The increase in enzyme stability from the addition of xylitol 0.5; 1; and 1.5 M was 1.32; 1.57; and 1.94 times compared to the dialyzed enzyme, respectively.

Keywords: xylitol, α -amylase, *Aspergillus sp.*, enzyme stability, industry

**STUDI PENGARUH PENAMBAHAN XILITOL TERHADAP
STABILITAS ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus sp.***

Oleh

SAJIDDAH TALFAH

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
2025**

Judul Skripsi

: **STUDI PENGARUH PENAMBAHAN
XILITOL TERHADAP STABILITAS
ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus sp.***

Nama Mahasiswa

: **Sajiddah Talfah**

Nomor Pokok Mahasiswa

: 2117011091

Program Studi

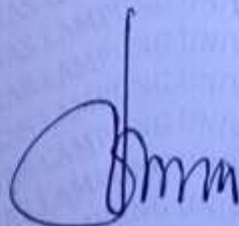
: Kimia

Fakultas

: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing



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



Prof. Sutopo Hadi, S.Si., M.Sc., Ph.D.
NIP. 197104151995121001

2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA

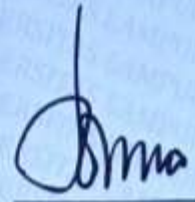


Prof. Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si.
NIP. 197205302000032001

MENGESAHKAN

1. Tim penguji

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



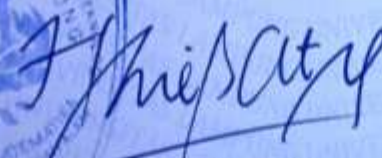
Sekretaris : Prof. Sutopo Hadi, S.Si., M.Sc., Ph.D.



Anggota : Dr. Sonny Widiarto, S.Si., M.Sc.



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.
NIP. 197110012005011002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: **9 Juli 2025**

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : SAJIDDAH TALFAH
NPM : 2117011091
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi saya yang berjudul “**Studi Pengaruh Penambahan Xilitol Terhadap Stabilitas Enzim α -Amilase dari *Aspergillus sp.***” adalah benar karya saya sendiri, baik gagasan, hasil, dan analisisnya. Selanjutnya saya tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya disebutkan dan terdapat kesepakatan sebelum dilakukan publikasi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sadar dan sebenar-benarnya untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Bandar Lampung, 22 Juli 2025

Menyatakan,



Sajiddah Talfah
NPM. 2117011091

RIWAYAT HIDUP

Penulis lahir di Bandar Lampung, 29 Agustus 2003 sebagai anak pertama dari Bapak Alwan dan Ibu Sutriasih. Penulis memulai pendidikannya pada tahun 2008 di Taman Kanak-kanak Sari Teladan hingga tahun 2009. Selanjutnya pendidikan Sekolah Dasar pada tahun 2009-2015 di SD Negeri 1 Sawah Lama, Sekolah Menengah Pertama pada tahun 2015-2018 di SMP Negeri 4 Bandar Lampung, dan Sekolah Menengah Kejuruan pada tahun 2018-2021 di Sekolah Menengah Teknologi Industri (SMTI) jurusan Analisis Pengujian Laboratorium (APL). Pada tahun 2021 penulis terdaftar sebagai mahasiswa Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung melalui jalur SBMPTN.

Penulis pernah menjadi anggota aktif biro penerbitan Himpunan Mahasiswa Kimia (Himaki) 2022, anggota bidang informasi dan komunikasi ROIS FMIPA 2022, sekretaris biro penerbitan Himpunan Mahasiswa Kimia (Himaki) 2023, sekretaris eksekutif Badan Eksekutif Mahasiswa (BEM) FMIPA 2024, dan sekretaris pelaksana pemilihan raya (Pemira) FMIPA Unila 2022. Selain itu, penulis juga pernah menjadi asisten praktikum Biokimia jurusan S1 Kimia dan Biologi Terapan pada tahun 2024 dan 2025. Penulis juga telah melaksanakan praktik kerja lapangan (PKL) di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung pada tahun 2023 dan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Braja Gemilang, Lampung Timur pada tahun 2024. Selain itu, penulis juga menjadi tutor mata pelajaran kimia untuk SMA di bimbel Afkar Harun Dua sejak 2024. Pada tahun 2025, penulis menyelesaikan penelitiannya di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Unila dengan judul “Studi Pengaruh Penambahan Xilitol Terhadap Stabilitas Enzim α -Amilase dari *Aspergillus sp.*”.

MOTTO

“...Sungguh, atas kehendak Allah semua ini terwujud, tidak ada kekuatan kecuali dengan pertolongan Allah...”

(Al-Kahf: 39)

“Dan Kami pasti akan menguji kamu dengan sedikit ketakutan, kelaparan, kekurangan harta, jiwa, dan buah-buahan. Dan sampaikanlah kabar gembira kepada orang-orang yang sabar, yaitu orang-orang yang apabila ditimpa musibah mereka berkata Inna lillahi wa inna ilaihi roji’un (sesungguhnya kami milik Allah dan kepada-Nyalah kami kembali)”

(Al-Baqarah: 155-156)

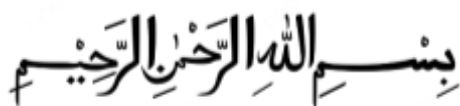
“Setiap manusia adalah pemimpin dan setiap pemimpin akan dimintai pertanggungjawaban atas apa yang dipimpinnya”

(HR. Bukhari dan Muslim)

“Tidak akan bergeser kedua kaki seorang hamba pada hari kiamat nanti, sampai ditanya tentang umurnya untuk apa ia habiskan, ilmunya sejauh mana ia amalkan, hartanya dari mana ia dapatkan dan untuk apa harta tersebut digunakan, serta tubuhnya untuk apa ia manfaatkan”

(HR. At-Tirmidzi)

PERSEMBAHAN



Puji syukur atas kehadiran Allah Subhanahu Wa Ta'ala atas rahmat dan karunia-Nya, selawat dan salam kepada Nabi Muhammad Shallallahu Alaihi Wasallam

Kupersembahkan karya ini dengan segala kerendahan hati, sebagai wujud bakti, rasa syukur, dan ucapan terima kasih kepada:

Kedua orang tua, Ibu Sutriasih dan Ayah Alwan yang telah merawat, mengasihi, mendoakan, memperjuangkan, dan merelakan tenaga, pikiran, serta materi untuk anak-anaknya selama ini.

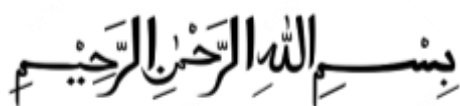
Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S., Bapak Prof. Sutopo Hadi, S.Si., M.Sc., Ph.D., Bapak Dr. Sonny Widiarto, S.Si., M.Sc., serta seluruh Bapak dan Ibu dosen Jurusan Kimia

Terima kasih telah membimbing, menasehati, serta memberikan ilmu-ilmunya selama menempuh pendidikan di Jurusan Kimia FMIPA Unila. Semoga Allah Subhanahu Wa Ta'ala memberikan kemudahan dan membalas segala kebaikan yang telah diberikan.

Keluarga besar, diriku sendiri, dan teman-teman seperjuangan

**Serta Almamater Tercinta
Universitas Lampung**

SANWACANA



Puji syukur atas rahmat dan karunia yang telah Allah Subhanahu Wa Ta'ala berikan, serta selawat dan salam kepada Nabi Muhammad Shallallahu Alaihi Wasallam yang senantiasa diharapkan syafaatnya di hari akhir kelak. Atas segala kemudahan yang telah Allah berikan, penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Studi Pengaruh Penambahan Xilitol Terhadap Stabilitas Enzim α -Amilase dari *Aspergillus sp.*”** sebagai salah satu syarat yang harus dipenuhi untuk mendapatkan gelar Sajana Sains pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

Selama penulisan skripsi ini penulis banyak mendapatkan bantuan, saran, doa, dan semangat dari orang-orang yang hadir di dalam kehidupan penulis. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tua, Ayah Alwan dan Ibu Sutriasih yang telah berjuang membesarkan, mendidik, mendoakan, dan mendukung anak-anaknya dalam menjalani kehidupan ini.
2. Keluarga besar Kakek Alm. Amin dan Kakek Sugiono yang telah menemani, mendoakan, dan memahami penulis selama berkegiatan dimasa perkuliahan.
3. Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S., selaku dosen pembimbing satu yang telah banyak memberikan bantuan ilmu, nasihat, dan bantuan lainnya baik morel maupun materil selama penulis menyelesaikan perkuliahan.

4. Bapak Prof. Sutopo Hadi, S.Si., M.Sc., Ph.D. selaku dosen pembimbing dua yang telah memberikan saran, masukan, serta ilmu yang bermanfaat bagi penulis.
5. Bapak Dr. Sonny Widiarto, S.Si., M.Sc., selaku dosen pembahas yang telah memberikan nasihat, saran, masukan, serta ilmu yang bermanfaat bagi penulis.
6. Bapak Diky Hidayat, S.Si., M.Si., selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan nasihat serta ilmu selama penulis menyelesaikan perkuliahan.
7. Ibu Dr. Mita Rilyanti, M.Si. dan Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si. selaku Ketua dan Sekretaris Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
8. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, M.Si. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung
9. Bapak dan Ibu dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah memberikan ilmu, nasihat, dan pendampingan yang sangat bermanfaat selama menyelesaikan perkuliahan.
10. Teman seperjuangan (*Yandri's Research*) Aziza Ulma'rifah, S.Si., Harry Firmanda, S.Si., dan Misbakhul Anam, S.Si.
11. Kakak seperjuangan Virginia Nuh Reza Amanda, S.Si. yang telah membimbing, membantu, dan menjadi tempat berdiskusi selama penulis melaksanakan penelitian.
12. Kakak-kakak PY'20 Rusmauli Defana Panjaitan, S.Si., Avi Eriyani, S.Si., Stephani Marisca, S.Si., dan Maria Agustina Sidabutar, S.Si. atas bimbingan, nasihat, dan kebaikan-kebaikan lainnya. Serta adik-adik PY'22.
13. Sahabat Ber 6 Ber S.Si, Amelia Rizky Az-zahra, Tiara Zalfa Nur'alifah, Anisah Isti Roqhmah, Desvica Romanda, dan Desrita Pratiwi atas kebersamaan yang kita jalani dari awal hingga akhir dengan segala cerita yang selama ini harus kita lalui.
14. Sahabat Sisterlillah Rima Soraya Permata Sari dan Amelia Rizky Az-zahra, karena telah saling membantu dan menemani penulis dalam suka dan duka dunia perkuliahan.

15. Teman-teman Laboratorium Biokimia yang saling memberikan semangat dan meramaikan suasana di laboratorium.
16. Kepada 15 Manusia Kuat, Trie Abe, Amel, Alya, Hafiz, Fildza, Govin, Ulma, Andra, Vira, Rima, Naurah, Radit, dan Fera yang telah mewarnai kehidupan perkuliahan penulis serta saling memberikan semangat.
17. Keluarga Ceramah, Ceni, Ririn, Diah, Erwin dan Abe yang telah hadir untuk saling memberikan cerita dan pembelajaran yang berharga.
18. Bapak Agus Wahyono selaku Kepala Desa Braja Gemilang, perangkat dan masyarakat desa yang telah menerima penulis beserta teman-teman dengan sangat baik untuk menyelesaikan kegiatan KKN.
19. Sobat 40 hari, Yessa, Nisa, Tamara, Almira, Petrus, dan Zidan yang sama-sama bertahan selama 40 hari untuk menyelesaikan KKN.
20. Seluruh mahasiswa jurusan kimia angkatan 2021 yang sama-sama berjuang untuk menyelesaikan perjalanan mendapatkan gelar sarjana sains.

Semoga pertemuan ini bukan menjadi akhir, namun terus berlanjut untuk saling memberikan kebermanfaatan dan meneruskan ilmu-ilmu yang telah didapatkan sebelumnya. Semoga Allah Subhanahu Wa Ta'ala membalas segala kebaikan dan melimpahkan pahala atas bantuan yang telah diberikan kepada penulis. Penulis sadar masih terdapat banyak kekurangan dalam penulisan skripsi ini. Namun, penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca dan kemajuan ilmu pengetahuan di masa yang akan datang.

Bandar Lampung, 22 Juli 2025



Sajiddah Talfah

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR PERSAMAAN.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian	4
1.3. Manfaat Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Jamur <i>Aspergillus sp.</i>	5
2.2. Enzim	7
2.3. Amilase (α -amilase).....	9
2.4. Pati	11
2.5. Pengaruh Aktivitas Enzim	12
2.6. Stabilitas Enzim	14
2.7. Zat Aditif.....	15
2.8. Pemurnian Enzim.....	17
2.9. Penentuan Aktivitas Enzim Menggunakan Metode Mandels.....	18
2.10. Penentuan Kadar Protein Menggunakan Metode Lowry	19
2.11. Penentuan Aktivitas Enzim Metode Fuwa.....	20
2.12. Spektrofotometer UV-Visible	21
2.13. Kinetika Reaksi Enzim	22

III. METODE PENELITIAN	23
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	23
3.2. Alat dan Bahan.....	23
3.3. Prosedur Penelitian	24
3.3.1. Pembiakan Isolat <i>Aspergillus sp.</i>	24
3.3.2. Pembuatan Media Inokulasi dan Fermentasi, Inokulasi <i>Aspergillus sp.</i> , dan Produksi Enzim α -amilase	25
3.3.3. Isolasi Enzim α -Amilase	25
3.3.4. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	26
3.3.5. Dialisis	28
3.3.6. Uji Aktivitas Enzim α -Amilase Menggunakan Metode Mandels.	28
3.3.7. Uji Kadar Protein Menggunakan Metode Lowry	29
3.3.8. Uji Aktivitas Enzim Metode Fuwa	30
3.3.9. Pembuatan Larutan Buffer	30
3.3.10. Penambahan Xilitol.....	32
3.3.11. Karakterisasi Enzim α -Amilase	32
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	35
4.1. Peremajaan Isolat <i>Aspergillus sp.</i>	35
4.2. Produksi dan Isolasi Enzim α -Amilase	35
4.3. Pemurnian Enzim α -Amilase	36
4.3.1. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	36
4.3.2. Dialisis	38
4.4. Karakterisasi Enzim α -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i> Hasil Dialisis dan Setelah Penambahan Xilitol.....	40
4.4.1. Penentuan pH Optimum Enzim α -amilase Hasil Dialisis dan Setelah Penambahan Xilitol	40
4.4.2. Penentuan Suhu Optimum Enzim α -amilase Hasil Dialisis dan Setelah Penambahan Xilitol	41
4.4.3. Penentuan K_M dan V_{maks} Enzim α -amilase Hasil Dialisis dan Setelah Penambahan Xilitol	43
4.4.4. Penentuan Kestabilan Termal Enzim α -amilase Hasil Dialisis dan Setelah Penambahan Xilitol	45
4.4.5. Penentuan Konstanta Laju Inaktivasi Termal (k_i) , Waktu Paruh ($T_{1/2}$), dan Perubahan Energi Akibat Denturasi (ΔG_i) Enzim Hasil Dialisis dan Penambahan Xilitol	46
V. SIMPULAN DAN SARAN	48
5.1. Simpulan	48
5.2. Saran	48
DAFTAR PUSTAKA.....	49

LAMPIRAN.....	55
----------------------	-----------

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Perhitungan massa garam amonium sulfat untuk fraksinasi dengan berbagai persentase kejenuhan.....	27
2. Hasil pemurnian enzim α -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i>	39
3. Nilai K_M dan V_{maks} enzim α -amilase hasil dialisis dan penambahan xilitol.....	44
4. Nilai k_i , $t_{1/2}$, dan ΔG_i enzim α -amilase hasil dialisis dan penambahan xilitol (0,5; 1; dan 1,5 M).....	47
5. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Visible dengan metode Fuwa (λ_{maks} : 600 nm) pada ekstrak kasar enzim, hasil fraksinasi, dan dialisis.	56
6. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Visible dengan metode Lowry (λ_{maks} : 750 nm) pada ekstrak kasar enzim, hasil fraksinasi, dan dialisis.	57
7. Hubungan antara berbagai tingkat kejenuhan amonium sulfat dengan aktivitas unit, kadar protein, dan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i>	59
8. Hubungan tingkat kejenuhan amonium sulfat 0-15 dan 15-85 % dengan aktivitas unit, kadar protein, dan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i>	59
9. Hubungan antara pH dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim hasil dialisis	60

10. Hubungan antara pH dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim hasil penambahan xilitol 0,5 M	60
11. Hubungan antara pH dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim hasil penambahan xilitol 1 M	60
12. Hubungan antara pH dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim hasil penambahan xilitol 1,5 M	61
13. Hubungan antara suhu optimum dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim hasil dialisis	63
14. Hubungan antara suhu optimum dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim hasil penambahan xilitol 0,5 M	63
15. Hubungan antara suhu optimum dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim hasil penambahan xilitol 1 M	63
16. Hubungan antara suhu optimum dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim hasil penambahan xilitol 1,5 M	64
17. Hubungan antara konsentrasi substrat dengan aktivitas unit dan aktivitas spesifik enzim amilase dari <i>Aspergillus sp.</i> hasil dialisis.....	65
18. Hubungan antara konsentrasi substrat dengan aktivitas unit dan aktivitas spesifik enzim hasil penambahan xilitol 0,5 M.....	65
19. Hubungan antara konsentrasi substrat dengan aktivitas unit dan aktivitas spesifik enzim hasil penambahan xilitol 1 M.....	65
20. Hubungan antara konsentrasi substrat dengan aktivitas unit dan aktivitas spesifik enzim hasil penambahan xilitol 1,5 M.....	66
21. Data grafik Lineweaver-Burk α -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i> hasil dialisis dan penambahan xilitol (0,5; 1; dan 1,5 M).....	66
22. Hubungan antara aktivitas unit, aktivitas sisa, dan laju inaktivasi termal ($\ln E_t/E_0$) enzim α -amilase hasil dialisis dengan variasi waktu inaktivasi pada suhu 60 °C	68

23. Hubungan antara aktivitas unit, aktivitas sisa, dan laju inaktivasi termal ($\ln E_i/E_0$) enzim α -amilase hasil penambahan xilitol 0,5 M dengan variasi waktu inaktivasi pada suhu 60 °C	68
24. Hubungan antara aktivitas unit, aktivitas sisa, dan laju inaktivasi termal ($\ln E_i/E_0$) enzim α -amilase hasil penambahan xilitol 1 M dengan variasi waktu inaktivasi pada suhu 60 °C	69
25. Hubungan antara aktivitas unit, aktivitas sisa, dan laju inaktivasi termal ($\ln E_i/E_0$) enzim α -amilase hasil penambahan xilitol 1,5 M dengan variasi waktu inaktivasi pada suhu 60 °C	69
26. Data grafik laju inaktivasi termal orde satu enzim α -amilase hasil dialisis dan penambahan xilitol (0,5; 1; dan 1,5 M) setelah inaktivasi termal pada suhu 60 °C	70
27. Perhitungan waktu paruh ($t_{1/2}$) enzim hasil pemurnian dan penambahan xilitol (0,5; 1; dan 1,5 M).....	71
28. Absorbansi Bovine Serum Albumin (BSA) (λ_{maks} 750 nm) pada variasi konsentrasi.....	74
29. Absorbansi glukosa (λ_{maks} 510 nm) pada variasi konsentrasi.....	75

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Jamur <i>Aspergillus sp.</i>	6
2. Mekansime kerja enzim <i>lock and key</i>	8
3. Mekanisme kerja enzim <i>induced fit</i>	8
4. Struktur α -amilase dari jamur <i>Aspergillus</i>	11
5. Struktur xilitol.....	16
6. Pengikatan xilitol pada rantai samping enzim	17
7. Reaksi reduksi asam 3,5-dinitrosalisilat.....	19
8. Reaksi protein dengan reagen biuret.....	20
9. Skema fraksinasi menggunakan amonium sulfat.....	26
10. Diagram alir penelitian.....	34
11. Isolat <i>Aspergillus sp.</i> hasil peremajaan	35
12. Hubungan antara tingkat kejenuhan amonium sulfat (%) terhadap aktivitas spesifik (U/mg) enzim α -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i>	37
13. Hubungan amonium sulfat (0-15 dan 15-85 %) terhadap aktivitas spesifik (U/mg) enzim α -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i>	37
14. pH optimum enzim α -amilase hasil dialisis dan penambahan xilitol	41

15. Suhu optimum enzim α -amilase hasil dialisis dan penambahan xilitol	42
16. Grafik Lineweaver-Burk enzim hasil dialisis dan penambahan xilitol.....	43
17. Stabilitas termal enzim hasil dialisis dan penambahan xilitol	45
18. Grafik laju inaktivasi termal enzim α -amilase hasil dialisis dan penambahan xilitol (0,5; 1; dan 1,5 M).....	46
19. Kurva standar Bovine Serum Albumin (BSA)	74
20. Kurva standar glukosa.....	75

DAFTAR PERSAMAAN

Persamaan	Halaman
1. Michaelis-Menten.....	22
2. Lineweaver-Burk.....	22
3. Molaritas Larutan Menggunakan Massa Jenis	30
4. Pengenceran Larutan	31
5. Molaritas Larutan	31
6. Persen Aktivitas Sisa	33
7. Waktu Paruh.....	33
8. Laju Inaktivasi Termal Orde Satu	33
9. Perubahan Energi Akibat Denaturasi	33
10. Aktivitas Unit Metode Fuwa	56
11. Kadar Protein Metode Lowry	57
12. Aktivitas Spesifik	58
13. Aktivitas Unit Metode Mandels	61
14. Aktivitas Sisa Metode Mandels.....	62
15. Kadar Protein.....	76

16. Aktivitas Spesifik	76
17. Aktivitas Total.....	76
18. Protein Total	76
19. Hasil (%).....	76
20. <i>Purity</i>	76

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Data Hasil Pengukuran Absorbansi Spektrofotometer UV-Visible	56
2. Penentuan Pola Fraksinasi.....	59
3. Data Penentuan pH Optimum Enzim Hasil Dialisis dan Penambahan Xilitol (0,5; 1; dan 1,5 M).....	60
4. Data Penentuan Suhu Optimum Enzim Hasil Dialisis dan Penambahan Xilitol (0,5; 1; dan 1,5 M).....	63
5. Data Penentuan K_M dan V_{maks} Enzim Hasil Dialisis dan Penambahan Xilitol (0,5; 1; dan 1,5 M).....	65
6. Data Kestabilan Termal.....	68
7. Data Grafik Laju Inaktivasi Termal Enzim Orde Satu.....	70
8. Perhitungan Waktu Paruh ($t_{1/2}$)	71
9. Perhitungan Perubahan Energi Bebas Akibat Denaturasi (ΔG_i)	72
10. Kurva Standar Bovine Serum Albumin (BSA)	74
11. Kurva Standar Glukosa	75
12. Persamaan untuk Kuantifikasi Enzim Sebelum dan Setelah Pemurnian	76

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Industri saat ini telah banyak memanfaatkan fungsi dari suatu enzim dalam proses pengadaan produknya, baik produk pangan maupun nonpangan. Enzim secara umum berfungsi sebagai biokatalisator yang dapat mempercepat reaksi kimia. Sifatnya yang selektif dan spesifik sangat berguna selama reaksi kimia berlangsung (Suryani dan Taupiqurrahman, 2021). Salah satu jenis enzim yang banyak digunakan dan sangat berpengaruh dalam industri enzimatik, contohnya enzim α -amilase. Enzim tersebut memiliki kemampuan untuk memecah ikatan α -1,4 glikosidik pada bagian dalam polimer pati (Haryani dkk., 2022). Kemampuan tersebut dapat dibedakan karena enzim amilase secara umum digolongkan menjadi tiga jenis berdasarkan cara kerjanya, seperti endoamilase (α -amilase), eksoamilase (β -amilase), dan enzim pemecah cabang (pullulanase dan isoamilase). Enzim α -amilase digolongkan sebagai endoenzim atau endoamilase karena dapat memecah pati secara acak pada bagian tengah dan dalam molekul untuk menghasilkan glukosa, maltosa, dan maltooligosakarida. Keberadaan enzim α -amilase banyak ditemukan pada tumbuhan, jaringan hewan, dan juga mikroorganisme (Sahnoun *et al.*, 2012).

Enzim α -amilase yang diproduksi menggunakan mikroorganisme memiliki aplikasi lebih luas jika dibandingkan dengan enzim α -amilase yang diproduksi dari tumbuhan atau hewan. Keuntungan utamanya karena proses produksi dalam skala industri terhitung lebih ekonomis dan dapat memudahkan optimasi untuk menghasilkan produk enzim dengan karakteristik yang diharapkan.

Mikroorganisme penghasil enzim α -amilase contohnya seperti jamur, ragi, dan

bakteri. Namun, enzim yang bersumber dari jamur dan bakteri menjadi pilihan utama penggunaannya dalam industri. Beberapa contoh penggunaan enzim α -amilase dalam proses industri, seperti industri makanan, fermentasi, tekstil, kertas, deterjen, dan farmasi (Souza and Magalhaes, 2010).

Enzim α -amilase dapat diproduksi dari spesies *Bacillus* seperti *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. alvei*, *B. amyloliquefaciens*, *Geobacillus stearothermophilus*, dan *Anoxybacillus*. Produksi enzim α -amilase dari spesies *Bacillus* biasanya banyak digunakan untuk produksi enzim penghidrolisis pati. Selain itu, produksi enzim α -amilase juga dapat dilakukan dengan menggunakan isolat jamur. Sebagian besar diperoleh dari spesies *Aspergillus* seperti *Aspergillus spp.*, *A. oryzae*, *A. niger*, dan *A. awamori*. Isolat dari spesies *Aspergillus* paling umum digunakan untuk produksi enzim α -amilase secara komersial diantara spesies lainnya (Algofar dkk., 2021).

Penggunaan enzim secara komersial sangat ditentukan dengan sifat fisika maupun kimia yang ada pada enzim tersebut. Hal ini berkaitan dengan mekanisme kerja enzim yang harus memenuhi kondisi spesifik selama reaksi berlangsung. Sehingga perubahan sedikit keadaan dari kondisi spesifiknya akan sangat berpengaruh terhadap kerja enzim. Proses katalitik enzim yang ramah lingkungan menjadi alternatif untuk pengembangan berkelanjutan suatu industri, maka dari itu penelitian terus berlanjut untuk menghasilkan enzim dengan stabilitas yang sesuai dengan kebutuhan industri. Stabilitas menjadi parameter utama aplikasi enzim dalam industri. Kondisi reaksi enzim yang ketat membatasi aplikasinya dalam skala besar. Enzim yang memiliki stabilitas tinggi memungkinkan proses aplikasi yang lebih maksimal, enzim tersebut dapat bertahan pada suhu yang tinggi dan sangat menguntungkan terhadap laju reaksi yang dihasilkan. Kestabilan enzim berhubungan dengan struktur yang ada pada enzim tersebut. Sedikit perubahan struktur dapat berpengaruh pada reaksi enzimatisnya dan perubahan struktur tersebut dipengaruhi oleh gangguan fisik maupun kimia, seperti suhu, pH, dan konsentrasi garam. Untuk dapat menjaga reaksi enzimatis tetap berlangsung secara maksimal, perlu mempertahankan stabilitasnya dengan cara melindungi

struktur asli enzim (Niketa *et al.*, 2023). Enzim memerlukan fleksibilitas untuk menjalankan fungsinya. Namun, sedikit perubahan konformasi dapat memengaruhi fungsi kerja enzim tersebut. Sehingga perubahan konformasi yang signifikan harus dihindari. Maka dari itu, peningkatan stabilitas berfungsi untuk mengurangi kemampuan enzim untuk mengubah konformasi secara signifikan atau menghasilkan struktur yang lebih stabil (Haiyu *et al.*, 2023). Salah satu metode peningkatan kestabilan enzim yang telah banyak digunakan seperti imobilisasi enzim, namun bahan pendukung yang digunakan sukar larut dalam air, contohnya seperti *zeolite*, karbon aktif, keramik, dan kaca. Hal ini mengakibatkan terbatasnya difusi substrat dan berkurangnya akses enzim mencapai substrat tersebut. Sehingga pada akhirnya akan mengurangi efisiensi pada proses katalitik enzim (Zhang *et al.*, 2024).

Struktur protein yang menyusun suatu enzim sangatlah sensitif, contohnya dengan adanya pemanasan pada enzim yang termasuk dalam golongan protein dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi dan mengakibatkan perubahan struktur protein. Perubahan struktur protein tersebut dapat berpengaruh pada penurunan kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim (Fransiska *et al.*, 2024). Sehingga perlu distabilkan dengan adanya bahan pendukung contohnya seperti sukrosa, maltodekstrin, gliserol, ataupun sorbitol. Zat aditif yang tergolong sebagai poliol atau senyawa organik yang mengandung beberapa gugus hidroksi alkohol dapat meningkatkan stabilitas protein enzim. Adanya penambahan zat aditif dapat mengubah pola pengikatan. Ikatan hidrogen yang terjadi antara molekul air dan protein dapat digantikan oleh ikatan hidrogen antara gugus hidroksil dari zat aditif dengan protein (Hmad and Gargouri, 2024). Polihidroksi alkohol (poliol) seperti gliserol, sorbitol, dan xilitol mengandung gugus hidroksil yang berfungsi untuk mempertahankan struktur aktif enzim pada suhu yang tinggi dengan cara mensubstitusi lapisan hidrasi permukaan enzim. Adanya lapisan tersebut berfungsi sebagai lapisan pelindung agar selanjutnya struktur enzim menjadi lebih terlindungi (Buzatu *et al.*, 2024). Penelitian yang dilakukan Bustos *et al.*, (1996) mempelajari bagaimana pengaruh penambahan poliol (gliserol, xilitol, dan sorbitol) terhadap kestabilan enzim tripsin. Setelah dilakukan pengujian waktu

paruh, masing-masing jenis poliol mengubah waktu paruh menjadi lebih tinggi. Efek penstabilan dari penambahan poliol (gliserol, xilitol, sorbitol) meningkat seiring dengan peningkatan berat molekul zat aditif yang ditambahkan.

Berdasarkan latar belakang tersebut perlu dilakukan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh penambahan xilitol terhadap stabilitas enzim α -amilase dari *Aspergillus sp.* serta mengetahui pengaruhnya terhadap nilai aktivitas, suhu optimum, K_M , V_{Maks} , k_i , $t_{1/2}$, dan ΔG_i enzim hasil pemurnian maupun dengan penambahan xilitol, sehingga nantinya diperoleh enzim dengan aktivitas dan stabilitas optimum yang dapat dimanfaatkan lebih lanjut.

1.2. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memperoleh enzim α -amilase dari *Aspergillus sp.* dengan aktivitas dan tingkat kemurnian yang tinggi dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim.
2. Mempelajari pengaruh penambahan xilitol terhadap kestabilan enzim α -amilase dari *Aspergillus sp.*

1.3. Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mendapatkan informasi terkait pengaruh penambahan xilitol terhadap stabilitas enzim α -amilase dari *Aspergillus sp.*
2. Mendapatkan informasi tentang nilai aktivitas, suhu optimum, K_M , V_{Maks} , k_i , $t_{1/2}$, dan ΔG_i enzim α -amilase hasil pemurnian dan penambahan xilitol.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Jamur *Aspergillus sp.*

Jamur merupakan salah satu jenis organisme eukariotik yang dapat tumbuh dalam dua bentuk dasar, yaitu ragi dan kapang. Apabila jamur tumbuh dalam bentuk kapang, maka terjadi melalui pembentukan koloni berserabut multiseluler. Koloni-koloni tersebut mengandung hifa dengan diameter 1 sampai 10 μm . Jamur *Aspergillus sp.* tumbuh dan berkembang sebagai koloni berserat, halus, dan cembung dengan koloni berwarna hijau keabu-abuan, hijau coklat, hingga kehitaman. *Aspergillus sp.* merupakan salah satu jenis mikroorganisme eukariotik atau memiliki dinding sel namun tidak memiliki klorofil. Jika diamati secara mikroskopis, *Aspergillus sp.* dapat dicirikan dengan hifa bersekat dan membentuk konidia berwarna hijau, coklat, maupun kehitaman. Spesies dari *Aspergillus sp.* sangat mudah ditemukan pada berbagai jenis lingkungan dan hampir seluruh jenis *Aspergillus sp.* dapat tumbuh dengan baik pada berbagai macam substrat (Hidayatunnafsiyah dan Suprihartini, 2023).

Aspergillus sp. dapat tumbuh dengan baik pada suhu 27-37 °C dengan kisaran pH yang cukup luas. *Aspergillus* mempunyai kemampuan yang baik dalam memproduksi berbagai enzim, contohnya seperti selulase, amilase, glukoamilase, lipase, dan protease (Sari dkk., 2017). Selain itu, beberapa enzim industri seperti β -glukosidase, hemiselulase, pektinase, laktase, keratinase, dan aril alkohol oksidase juga dapat diproduksi oleh *Aspergillus sp.* Enzim-enzim tersebut memiliki aplikasi yang luas, seperti pada industri *pulp* dan kertas, makanan, pakan ternak, tekstil, dan bioenergi (Manjusha *et al.*, 2023).

Aspergillus sp. merupakan organisme yang hidupnya memerlukan zat-zat organik dari organisme lain. Senyawa nutrisi yang diperlukan agar jamur dapat hidup, contohnya seperti senyawa organik, sumber karbon yang diperoleh dari glukosa, maltosa, selulosa, sumber nitrogen yang diperoleh dari pepton, asam amino, garam amonium, urea, ion-ion anorganik essensial, seperti Na, P, Mg, dan S, serta tambahan zat-zat yang dapat memberikan faktor tumbuh pada jamur. Berdasarkan kebutuhan nutrisi tersebut, maka apabila dilakukan proses isolasi jamur, nutrisi tersebut harus dipenuhi dalam medium pertumbuhan yang digunakan. Salah satu contoh medium pertumbuhan yang banyak digunakan untuk pertumbuhan jamur adalah media *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Suryani dkk., 2020).

Aspergillus sp. dapat ditumbuhkan dalam laboratorium dengan menggunakan media pertumbuhan yang sesuai, salah satunya dengan menggunakan media PDA. Ekstrak kentang dalam media PDA berperan sebagai bahan nutrisi penyumbang karbohidrat pada pertumbuhan jamur. Sedangkan kandungan *dextrose* berfungsi sebagai bahan tambahan sumber karbon dan sebagai bahan pematat media. Media PDA dapat mendukung pertumbuhan jamur karena memiliki pH yang rendah, sekitar 4,5 hingga 5,6. Tingkat keasaman yang rendah tersebut berfungsi untuk menghambat pertumbuhan bakteri yang membutuhkan lingkungan dengan pH netral (Rafika dkk., 2022). Jamur *Aspergillus sp.* dapat dilihat pada Gambar 1.



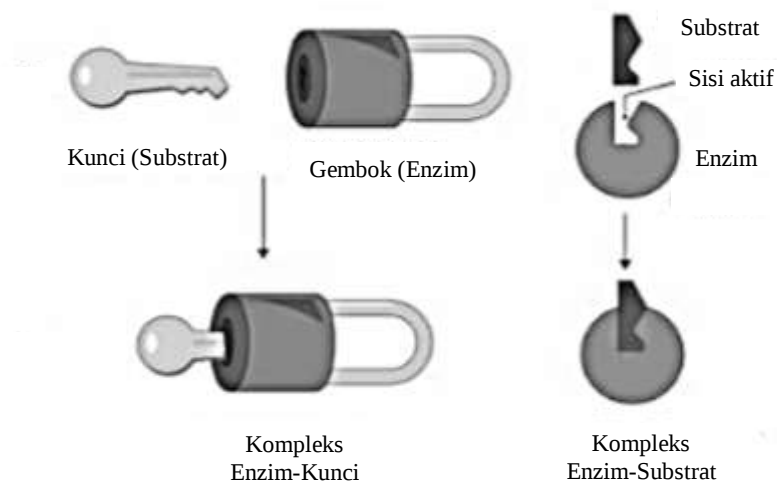
Gambar 1. Jamur *Aspergillus sp.* (Mawarni dkk., 2021).

Aspergillus sp. memiliki peran penting dan beragam manfaat karena dapat menghasilkan metabolit sekunder, yaitu metabolit primer atau biomolekul yang berperan langsung dalam tahap pertumbuhan dan metabolisme individu yang telah

melalui tahap biosintetik. *Aspergillus sp.* banyak ditemukan pada lahan-lahan dengan kualitas tanah yang baik, yaitu tanah dengan kadar bahan organik tinggi. Oleh karena itu, pengaturan tingkat keasaman suatu tanah sangat berpengaruh terhadap kualitas *Aspergillus sp.* Pada umumnya jamur ini dapat tumbuh pada kondisi tanah yang masam sebagai lingkungan optimalnya, yaitu sekitar pH 6,6-7 (Mawarni dkk., 2021).

2.2. Enzim

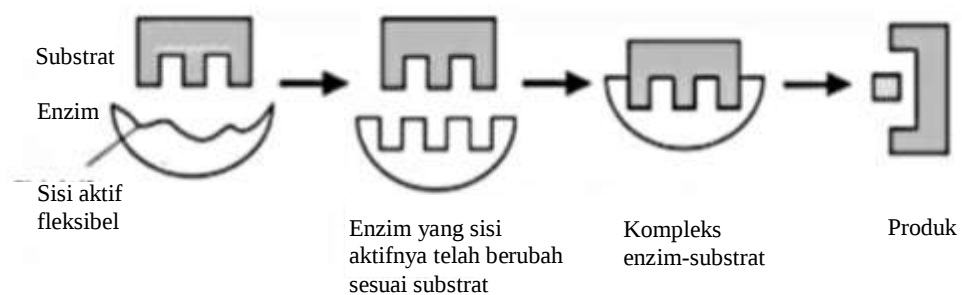
Enzim merupakan protein yang berperan untuk mengkatalisis reaksi kimia selama proses metabolisme seluler dengan cara menurunkan energi aktivasi (E_a). Reaksi kimia pada umumnya dapat berlangsung apabila terjadi dua hal yang perlu dipenuhi, yaitu interaksi pada keadaan yang sesuai dan energi yang cukup untuk mencapai keadaan tersebut. Enzim sebagai agen pengkatalis reaksi dapat membantu kondisi tersebut lebih mudah tercapai. Secara umum, mekanisme kerja enzim ialah terbentuknya kompleks antara enzim dan substrat sebelum menghasilkan produk. Cara kerja enzim dapat dibagi menjadi dua, pertama ialah mekanisme gembok dan kunci (*lock and key*). Menurut mekanisme tersebut, enzim mempunyai sisi aktif kosong yang nantinya berfungsi sebagai tempat menempelnya substrat, sehingga enzim dapat aktif menjalankan kerjanya secara efisien. Saat sisi aktif enzim diisi oleh substrat, maka akan terbentuk kompleks enzim-substrat. Sisi aktif enzim tersebut mempunyai bentuk yang spesifik dan tidak fleksibel sama halnya dengan gembok dan kunci, sehingga hanya substrat tertentu yang nantinya dapat membentuk kompleks enzim-substrat pada sisi aktif tersebut. Pada mekanisme kerja enzim *lock and key* dapat terlihat bahwa enzim bekerja secara spesifik, yaitu apabila substrat yang masuk ke dalam sisi aktif tersebut adalah substrat yang sesuai (Wibowo dkk., 2021). Mekanisme kerja enzim *lock and key* tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Mekansime kerja enzim *lock and key* (Wibowo dkk., 2021).

Reaksi katalitik yang spesifik pada sisi aktif enzim dapat terjadi akibat dari pembentukan beberapa asam amino pada jarak tertentu dalam rantai peptida akibat dari ikatan yang dihasilkan dari struktur sekunder dan tersier enzim. Rantai samping dari asam amino tersebut nantinya akan berikatan dengan substrat dan proses katalitik enzim dapat berlangsung secara spesifik (Hikmah dkk., 2022).

Mekanisme lain yang dapat digunakan untuk mengatasi spesifisitas model *lock and key* ialah mekanisme *induced fit*. Pada mekanisme ini terjadi fleksibilitas situs aktif, adanya interaksi dari substrat akan menginduksi perubahan konformasi sisi aktif enzim sehingga substrat dapat memasuki sisi aktif dan terjadi reaksi kimia (Wahyuni, 2017). Mekanisme kerja enzim *induced fit* pada Gambar 3.



Gambar 3. Mekanisme kerja enzim *induced fit* (Wibowo dkk., 2021).

Enzim merupakan biokatalisator yang berfungsi untuk mempercepat reaksi kimia dan saat reaksi telah selesai, enzim tidak mengalami perubahan jumlah sehingga jumlah enzim sebelum dan setelah bereaksi adalah tetap. Salah satu sifat enzim ialah mempunyai selektivitas dan spesifisitas yang tinggi terhadap reaktan dan jenis reaksi yang sedang dikatalisis. Pada umumnya enzim tersusun dari protein, baik berupa protein sederhana atau protein yang terikat pada gugus nonprotein. Penggolongan enzim dapat dilakukan dengan beberapa klasifikasi, salah satunya penggolongan enzim berdasarkan daya katalisisnya. Hidrolase adalah jenis pengklasifikasian enzim berdasarkan kemampuannya untuk mengkatalisis suatu reaksi-reaksi hidrolisis (Suryani dan Taupiqurrahman, 2021).

2.3. Amilase (α -amilase)

Amilase digolongkan sebagai enzim sakaridase, yaitu enzim yang memotong polisakarida menjadi monosakarida. Produk akhir dari proses hidrolisis tersebut adalah dekstrin, oligosakarida, maltosa, dan D-glukosa. Enzim amilase mempunyai banyak manfaat dalam industri. Contohnya seperti pada industri deterjen, amilase yang bercampur dengan enzim protease dan lipase berfungsi sebagai pencuci noda pakaian, lalu peranannya pada industri makanan digunakan sebagai bahan pembuatan sirup manis serta penghilang pati dalam proses produksi *jelly* (Ariandi, 2016).

Amilase dapat diklasifikasikan sesuai dengan mekanisme pemotongan ikatan glikosidik. Terdapat tiga jenis enzim amilase, yaitu alfa amilase (α -amilase), beta amilase (β -amilase), dan gamma amilase (γ -amilase). α -amilase merupakan jenis enzim endoamilase, sedangkan β -amilase dan γ -amilase digolongkan sebagai jenis enzim eksoamilase. α -amilase bekerja dengan cara memutus ikatan 1,4-glikosidik dari bagian dalam amilosa atau amilopektin secara acak. Produk hidrolisis amilosa ialah maltotriosa dan maltosa. Sedangkan produk hidrolisis amilopektin ialah maltosa, laktosa, dan dekstrin. β -amilase bekerja memutus ikatan 1,4-glikosidik yang terdapat pada bagian luar pati menjadi glukosa, amilopektin, dan dekstrin.

Sedangkan γ -amilase bekerja dengan cara memotong ikatan 1,6-glikosidik dan 1,4-glikosidik di bagian amilosa dan amilopektin yang tidak tereduksi (Ramadhan dan Wikandari, 2021).

Cara kerja α -amilase untuk menghidrolisis molekul amilosa terjadi dalam dua tahapan. Tahap yang pertama adalah degradasi amilosa menjadi maltotriosa yang terjadi secara acak dan diikuti dengan penurunan viskositas dalam waktu yang relatif cepat. Tahap yang kedua adalah pembentukan glukosa dan maltosa sebagai produk akhir yang terjadi dalam waktu singkat. Sedangkan pada amilopektin, enzim α -amilase akan menghasilkan glukosa, maltosa, dan oligosakarida yang terdiri dari empat atau lebih residu gula dengan ikatan α -1,6-glikosidik. Proses hidrolisis α -amilase pada amilosa akan lebih cepat dibandingkan pada amilopektin atau glikogen. Hal tersebut karena laju hidrolisis akan lebih cepat pada rantai lurus (Risnoyatiningsih, 2011).

Enzim α -amilase dapat diproduksi dari tumbuhan, hewan, maupun mikroba. Meskipun sumber yang dapat memproduksi enzim α -amilase relatif beragam, namun α -amilase yang berasal dari jamur dan bakteri lebih disukai dalam skala industri. Hal tersebut karena beberapa keuntungan yang dihasilkan, seperti efektivitas biaya, sedikit waktu dan ruang yang diperlukan selama proses produksi berlangsung, serta kemudahan dalam modifikasi dan optimasi produk yang telah dihasilkan. Terdapat beberapa jenis bakteri dan jamur yang biasanya digunakan dalam produksi enzim α -amilase, di antaranya bakteri dari spesies *Bacillus sp.* seperti, *B. stearothermophilus*, *B. Licheniformis*, *B. Amyloliquefaciens*, dan juga *B. subtilis* dikenal sebagai penghasil enzim α -amilase yang baik dan banyak digunakan untuk tujuan komersial. Selain itu, produksi enzim α -amilase juga dapat menggunakan isolat jamur berfilamen, salah satunya dari spesies *Aspergillus* yang telah digunakan selama berabad-abad karena produktivitas produksinya (Sivaramakrishna *et al.*, 2006). Struktur α -amilase ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Struktur α -amilase dari jamur *Aspergillus* (Algofar dkk., 2021)

2.4. Pati

Pati adalah jenis karbohidrat berupa polimer glukosa yang terdiri dari amilosa dan amilopektin yang biasanya terdapat pada bagian tanaman dan berfungsi sebagai sumber energi. Pati diperoleh dari beberapa jenis komoditas seperti umbi-umbian, kacang-kacangan, biji-bijian, serta beberapa jenis buah. Kandungan pati di dalam tanaman paling banyak terdapat pada bagian buahnya, walaupun dapat ditemukan di hampir semua jaringan tanaman, seperti daun, akar, batang, dan biji. Struktur polisakarida pati disusun dari monomer-monomer glukosa yang berikatan dengan adanya ikatan glikosidik. Dua komponen utama penyusun pati ialah amilosa dan amilopektin. Amilosa merupakan homopolimer dengan ikatan α -1,4-glikosidik dan pada setiap rantainya memiliki 500-2000 unit D-glukosa. Amilopektin adalah polimer dengan ikatan α -1,4-glikosidik pada rantai lurus dan α -1,6-glikosidik pada rantai cabangnya. Pada setiap rantainya terdapat 20-30 unit D-glukosa. Umumnya pati memiliki perbandingan amilosa dan amilopektin sebesar 20 % untuk amilosa dan 80 % untuk kandungan amilopektin. Sumber alami dengan kandungan pati yang cukup tinggi dapat ditemui dalam tanaman jagung, labu, kentang, ubi jalar, gandum, ubi kayu, dan sagu (Rahayu dkk., 2023).

Singkong merupakan salah satu jenis umbi-umbian yang dapat dimanfaatkan menjadi bahan baku pembuatan gula-gula sederhana. Kandungan karbohidrat yang cukup tinggi dalam singkong, seperti pada singkong karet yaitu 98 % dari

total berat kering singkong sehingga berpotensi untuk dijadikan sebagai sumber pembuatan pati. Proses konversi pati menjadi gula-gula sederhana dapat dilakukan menggunakan dua cara, yaitu hidrolisis kimiawi dengan penggunaan asam seperti asam sulfat dan asam klorida. Sedangkan cara yang kedua adalah dengan menggunakan hidrolisis enzim yang memiliki beberapa keuntungan seperti, tidak terjadi degradasi gula hasil hidrolisis, tidak terjadi reaksi samping, dan ramah lingkungan karena tidak menggunakan bahan-bahan yang bersifat korosif seperti pada hidrolisis asam. Enzim mempunyai spesifisitas yang tinggi, sehingga mekanisme kerja enzim akan menghasilkan produk yang optimal apabila substrat dan konsentrasi yang digunakan dalam jumlah yang tepat. Enzim dalam proses hidrolisis pati digunakan sebagai katalis yang spesifik dan selektif untuk mempercepat proses hidrolisis, contohnya seperti enzim amilase yang hanya dapat digunakan pada proses hidrolisis pati menjadi glukosa (Aryanika dkk., 2022).

2.5. Pengaruh Aktivitas Enzim

Enzim memerlukan kondisi optimum agar proses reaksi yang berlangsung dapat berjalan secara maksimal. Hal tersebut karena enzim memiliki sisi aktif yang spesifik untuk membentuk kompleks enzim-substrat. Beberapa faktor yang dapat memengaruhi aktivitas enzim adalah sebagai berikut:

a. Konsentrasi enzim

Suatu reaksi sangat dipengaruhi oleh penambahan maupun pengurangan konsentrasi suatu zat yang berkerja dalam reaksi tersebut. Salah satunya adalah dengan penambahan konsentrasi enzim dapat berperan terhadap peningkatan laju reaksi suatu proses kimia. Sama halnya dengan penggunaan katalis, kecepatan reaksi yang menggunakan enzim bergantung pada konsentrasi enzim yang diberikan. Laju reaksi akan bertambah dengan adanya penambahan konsentrasi enzim.

b. Konsentrasi substrat

Penambahan konsentrasi substrat pada jumlah yang sesuai dapat meningkatkan laju reaksi. Sedangkan pada batas konsentrasi tertentu, kenaikan konsentrasi substrat tidak akan berpengaruh dengan laju reaksi yang dihasilkan. Hal ini dijelaskan dengan persamaan Michaelis-Menten, untuk menghasilkan kerja enzim perlu adanya kompleks enzim-substrat. Apabila substrat rendah, sisi aktif enzim hanya menampung sedikit substrat, sehingga laju yang dihasilkan juga rendah. Saat konsentrasi dinaikkan, maka kompleks enzim-substrat akan diperbesar dan laju reaksi meningkat. Namun pada batas tertentu, penambahan substrat telah masuk ke fase jenuh sehingga tidak akan berpengaruh terhadap laju reaksi yang dikatalisis oleh enzim.

c. Suhu

Peningkatan suhu secara umum dapat meningkatkan laju reaksi akibat dari meningkatnya energi kinetik, yaitu energi yang dimiliki suatu spesi untuk berinteraksi. Namun, peningkatan suhu yang signifikan dapat menginisiasi proses denaturasi bagi enzim yang tergolong sebagai molekul protein. Apabila proses denaturasi terjadi, maka akan terjadi perubahan konformasi sisi aktif enzim. Seiring dengan hal tersebut kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim akan menurun. Maka dalam reaksi yang dikatalisis oleh adanya penambahan enzim perlu diketahui suhu optimum, yaitu suhu yang paling tepat bagi suatu reaksi untuk menggunakan enzim tersebut tanpa terjadi proses denaturasi.

d. Pengaruh pH

Struktur ion enzim dalam pembentukan kompleks enzim-substrat bergantung pada pH lingkungannya, enzim dapat membentuk ion positif, negatif, dan bermuatan ganda (*zwitter ion*). Sehingga, sedikit pergeseran pada nilai pH yang digunakan dapat berpengaruh pada efektivitas pembentukan kompleks enzim-substrat.

e. Pengaruh Inhibitor

Inhibitor merupakan molekul atau ion yang apabila ditambahkan ke dalam mekanisme kerja enzim, maka akan menghambat proses reaksi tersebut.

Hambatan yang terjadi dapat digolongkan menjadi dua tipe, yaitu hambatan tidak *reversible* yang disebabkan oleh proses modifikasi gugus fungsi pada molekul enzim. Sedangkan hambatan *reversible* ialah dengan mengikatnya molekul inhibitor tanpa menyebabkan perubahan konformasi enzim (Ischak dkk., 2017).

2.6. Stabilitas Enzim

Stabilitas enzim dapat digolongkan dalam dua kategori, yaitu stabilitas terhadap penyimpanan dan stabilitas terhadap penggunaannya. Stabilitas yang mengacu pada proses penyimpanan, berkaitan dengan kemampuannya untuk mempertahankan aktivitasnya selama proses penyimpanan dari waktu ke waktu dalam bentuk yang dimodifikasi, seperti dalam bentuk larutan maupun imobilisasi. Sedangkan stabilitas terhadap penggunaannya ialah bagaimana aktivitas enzim tetap dapat dipertahankan dengan retensi penggunaan dengan jumlah tertentu. Stabilitas enzim sangat dipengaruhi oleh struktur penyusun protein enzim yang dapat dipengaruhi oleh adanya penambahan dan jenis pelarut yang digunakan. Pelarut tersebut dapat menimbulkan gaya intermolekuler, perubahan tekanan yang menyebabkan perubahan konformasi keseluruhan enzim atau mengubah susunan situs aktif enzim, sehingga stabilitas suatu enzim juga akan menurun (Hemker *et al.*, 2023).

Kestabilan suatu enzim dapat diamati dengan dua hal, yaitu menentukan waktu paruh dan data termodinamika yang berhubungan dengan kestabilan seperti konstanta laju inaktivasi (k_i) dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i). Semakin kecil laju inaktivasi enzim maka laju proses denaturasi semakin menurun atau enzim tersebut semakin stabil. Semakin tinggi nilai ΔG_i , maka semakin sulit enzim tersebut mengalami proses denaturasi dan semakin stabil enzim tersebut. Terdapat beberapa cara yang dapat digunakan untuk mendapatkan enzim dengan

stabilitas dan aktivitas yang tinggi pada kondisi ekstrem, yaitu dengan cara isolasi langsung dari mikroorganisme yang ada di alam dan hidup pada kondisi ekstrem (ekstrimofilik) atau dengan dilakukan modifikasi kimia terhadap enzim yang berasal dari organisme yang hidup pada kondisi tidak ekstrem (mesofilik) (Yandri dan Suhartati 2018).

Perubahan bentuk suatu enzim untuk tujuan tertentu, seperti pengeringan enzim menjadi bentuk padat atau bubuk agar selama proses penyimpanan lebih tahan lama berpotensi untuk mengubah konformasi aslinya yang dapat berpengaruh pada aktivitas katalitiknya. Sehingga dari masa ke masa terus dilakukan perbaikan agar meningkatkan kemampuan penanganan enzim yang lebih baik lagi, yaitu dengan mempertahankan stabilitasnya walaupun dilakukan preparasi yang berpotensi mengubah konformasi suatu enzim (Shimizu *et al.*, 2017).

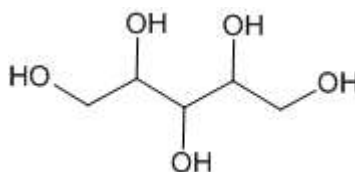
2.7. Zat Aditif

Penambahan zat aditif merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk meningkatkan stabilitas enzim, selain dari metode modifikasi kimia, amobilisasi, dan rekayasa protein. Penambahan zat aditif berperan sebagai metode paling sederhana yang dipilih untuk meningkatkan stabilitas enzim. Beberapa contoh zat aditif yang telah digunakan untuk meningkatkan stabilitas enzim ialah xilitol, sorbitol, maltodekstrin, sukrosa, dan gliserol. Penambahan zat aditif yang tergolongkan sebagai senyawa poliol dapat menimbulkan hidrasi air atau adanya interaksi hidrofobik, sehingga konformasi protein lebih terjaga dari kemungkinan *unfolding*, sejalan dengan hal tersebut kestabilan enzim akan meningkat yang ditandai salah satunya dengan peningkatan waktu paruh (Yandri dkk., 2020).

Zat aditif yang dapat digunakan untuk meningkatkan stabilitas enzim secara umum dipisahkan dalam enam kelompok, yaitu substrat atau koenzim, garam dan anion, ion logam, polimer, gula dan glikol, serta zat aditif lainnya. Beberapa contoh zat aditif yang dapat mempertahankan stabilitas enzim ialah gula, seperti

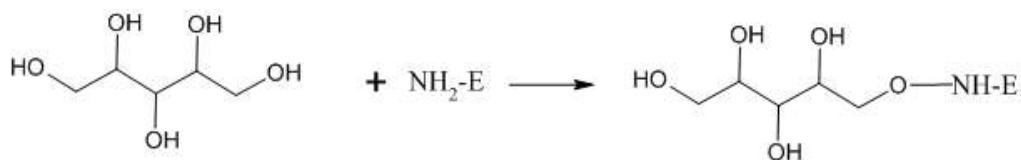
sukrosa dan laktosa, alkohol polihidrat atau poliol seperti gliserol, sorbitol, dan manitol, serta garam-garam seperti amonium disulfida, dan beberapa kelompok polimer. Pelarut organik sebenarnya dapat memberikan efek untuk meningkatkan stabilitas pada suhu rendah. Namun pada peningkatan suhu yang signifikan dapat memicu terjadinya proses denaturasi. Sehingga penambahan zat aditif dari golongan poliol atau polialkohol seperti glikol dan gliserol diketahui sangat berpengaruh untuk meningkatkan stabilitas enzim. Hal tersebut karena poliol mampu mempertahankan kebasaaan dari larutan enzim dan dapat mereduksi keberadaan air. Gugus fungsi hidroksil pada poliol dapat mencegah terbukanya rantai polipeptida (Lestari dkk., 2011).

Poliol biasanya dapat digunakan sebagai pelarut yang secara bersamaan dapat berfungsi untuk menstabilkan protein. Poliol dapat mengubah konformasi protein agar lebih fleksibel. Salah satu jenis poliol lainnya yang dapat digunakan untuk menstabilkan protein ialah xilitol. Xilitol merupakan molekul gula alkohol yang dapat ditemukan pada berbagai jenis makanan seperti buah-buahan, sayuran, jamur, dan lainnya. Penambahan senyawa gula alkohol seperti xilitol dalam protein dapat memberikan perlindungan dan stabilitas termal. Adapun struktur dari xilitol dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Struktur xilitol (Fairus dkk., 2013)

Pada penelitian yang dilakukan untuk mengamati hubungan antara penambahan xilitol dengan enzim karbosiipeptidase A (CPA) disimpulkan bahwa xilitol secara spontan dapat berikatan dengan enzim karbosiipeptidase melalui ikatan hidrogen. Ikatan tersebut terbentuk dari xilitol dengan residu rantai samping enzim untuk meningkatkan kestabilan enzim (Mohammadi *et al.*, 2022). Penstabilan enzim menggunakan penambahan zat aditif xilitol dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Pengikatan xilitol pada rantai samping enzim (Mohammadi *et al.*, 2022)

2.8. Pemurnian Enzim

Pemurnian enzim menjadi salah satu proses yang paling berguna dan penting dalam proses kimia yang memanfaatkan enzim sebagai katalis reaksi. Pemurnian enzim bertujuan untuk memisahkan enzim yang diinginkan dari senyawa-senyawa pengotor atau senyawa yang tidak dikehendaki keberadaanya. Tahapan yang digunakan selama proses pemurnian bergantung pada tujuan akhir penggunaan enzim. Untuk enzim yang hanya dimurnikan sebagian, biasanya digunakan pada proses komersial. Sedangkan enzim dengan kemurnian tinggi banyak digunakan untuk proses riset atau dipakai dalam produk analitik. Enzim yang telah dimurnikan untuk tujuan penelitian, biasanya digunakan untuk mempelajari aktivitas enzim, struktur, dan fungsinya. Ekstrak kasar enzim dapat diperoleh dengan menggunakan metode sentrifugasi, yaitu metode yang bertujuan untuk memisahkan enzim intraseluler dari sisa-sisa sel dengan gaya sentrifugal pada kecepatan dan waktu tertentu. Selama proses pemurnian biasanya akan terdapat protein yang hilang, sehingga tahapan pemurnian harus lebih spesifik untuk menghasilkan sampel atau enzim yang optimal (Rahmi dkk., 2020).

Ekstrak kasar enzim yang diperoleh dapat dimurnikan dengan penambahan amonium sulfat. Penambahan amonium sulfat bertujuan untuk mengendapkan protein dengan bantuan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer*. Protein yang telah mengendap dapat diketahui dengan perubahan warna menjadi keruh. Penambahan amonium sulfat diberikan pada rentang konsentrasi tertentu, seperti 0-70 %. Pengendapan protein juga bertujuan untuk mengurangi kadar air, sehingga diperoleh enzim dengan aktivitas yang lebih baik karena mengurangi

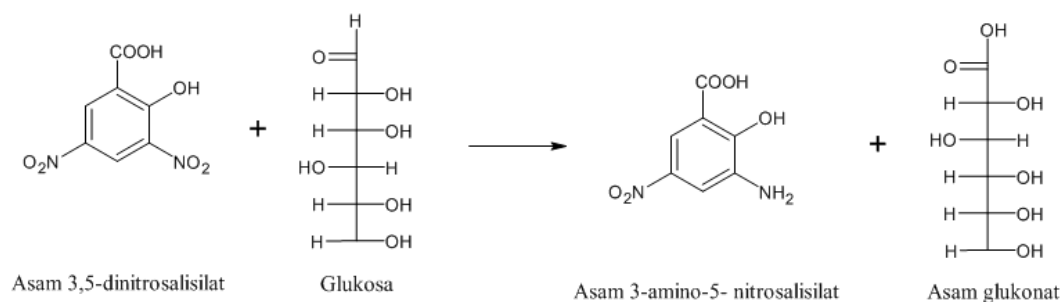
kontaminan yang dapat mengganggu sisi aktif enzim untuk berikatan (Purwanto, 2016). Proses pemurnian dengan metode fraksinasi didasarkan pada prinsip *salting in* dan *salting out*. Pada penambahan sedikit garam kelarutan protein meningkat akibat ion-ion garam yang mengelilingi protein, sehingga protein akan bermuatan dan mudah larut, tahap ini disebut sebagai *salting in*. Sedangkan pada konsentrasi garam yang lebih tinggi berakibat pada berkurangnya kelarutan protein. Konsentrasi garam yang meningkat akan melepas ikatan antara air dan protein, sehingga protein-protein saling menempel membentuk ikatan hidrofobik dan menghasilkan endapan, proses inilah yang disebut sebagai *salting out*. Proses penambahan garam amonium sulfat dilakukan bertahap pada suhu dingin dengan dilakukan pengadukan. Suhu perlu dikondisikan karena selama proses pengadukan akan terjadi peningkatan suhu (Selvia dkk., 2013).

Endapan yang diperoleh kemudian dilanjutkan dengan proses dialisis, yaitu memisahkan molekul besar dari molekul-molekul kecil. Proses dialisis menggunakan kantong selofan sebagai membran semipermeabel yang dapat mengeluarkan molekul-molekul kecil, seperti ion garam dan mempertahankan molekul besar seperti protein untuk tetap di dalamnya (Widowati dkk., 2020). Dialisis dilakukan pada suhu rendah, sekitar 4 °C untuk mencegah terjadinya kerusakan pada protein enzim yang dimurnikan. Pelarut yang digunakan pada proses dialisis harus diganti setiap 3 jam sekali untuk memastikan ion-ion dalam larutan telah hilang atau dapat diabaikan (Katoch, 2011).

2.9. Penentuan Aktivitas Enzim Menggunakan Metode Mandels

Aktivitas enzim dapat diuji dengan menggunakan metode asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) atau dengan menggunakan metode Mandels. Metode DNS merupakan metode kuantitatif yang banyak digunakan untuk menghitung gula pereduksi yang dihasilkan selama proses hidrolisis, berdasarkan reduksi asam 3,5-dinitrosalisilat menjadi 3-amino-5-nitrosalisilat yang ditandai dengan perubahan warna dari kuning menjadi merah bata. Setelah penambahan reagen DNS ke dalam sampel,

dilakukan proses pemanasan selama 10 menit pada suhu 100 °C. Tujuan dilakukannya proses pemanasan adalah meningkatkan laju perubahan warna menjadi merah bata yang stabil (Nero *et al.*, 2022). Metode DNS yang dibuat oleh Miller pada tahun 1959 menggunakan asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS). Namun metode ini seringkali dimodifikasi dalam proses penggunaannya, hal tersebut bergantung pada jumlah dan jenis buffer yang digunakan. Contohnya seperti konsentrasi substrat yang digunakan, jumlah reagen DNS, waktu inkubasi, dan waktu reaksi. Proses pengukuran aktivitas enzim dilakukan menggunakan dua sampel, yaitu sampel uji dan sampel kontrol. Selanjutnya, sampel diuji dengan menggunakan spektrofotometer UV-Visible pada λ 510 nm. Gula pereduksi yang dihasilkan (glukosa dan oligosakarida) menyebabkan perubahan asam 3,5-dinitrosalisilat menjadi 3-amino-5-nitrosalisilat yang ditandai perubahan warna menjadi oranye hingga merah bata. Perubahan warna tersebut bergantung pada jumlah gula pereduksi yang dihasilkan (Grata, 2020). Mekanisme reaksi dapat dilihat pada Gambar 7.



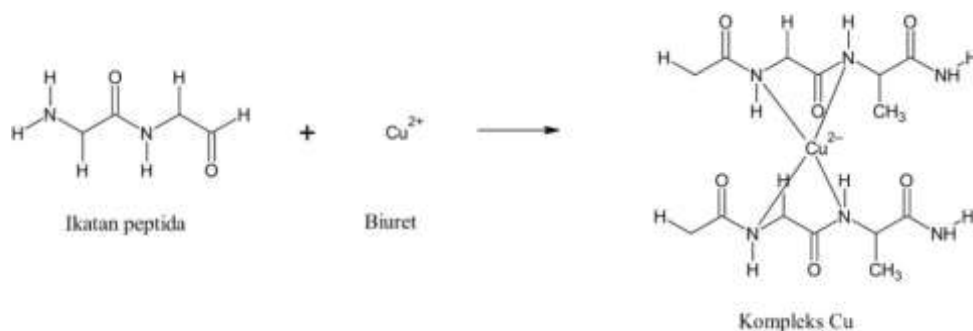
Gambar 7. Reaksi reduksi asam 3,5-dinitrosalisilat (Grata, 2020).

2.10. Penentuan Kadar Protein Menggunakan Metode Lowry

Penentuan kadar protein menggunakan pereaksi Lowry, diperlukan pereaksi A dan B. Pada penambahan awal akan terbentuk warna kuning sebagaimana pereaksi Lowry yang ditambahkan. Setelah diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang, larutan dapat berubah menjadi biru. Perubahan warna menjadi biru diakibatkan dari reaksi antara ion Cu^{2+} dengan ikatan peptida dan reduksi asam

fosfomolibdat serta asam fosfotungstat dari pereaksi *Folin-Ciocalteu* oleh tirosin dan triptofan yang terdapat pada residu protein. Protein dengan garam fosfotungstat dalam keadaan basa akan memberikan warna biru yang intensitasnya bergantung pada konsentrasi protein. Secara kuantitatif, kadar protein dapat ditentukan dengan spektrofotometer UV-Visible panjang gelombang 600 nm (Hasan, 2022).

Penentuan kadar protein dengan menggunakan metode Lowry diperlukan larutan Bovine Serum Albumin (BSA) yang bertujuan untuk memperkirakan kandungan protein pada panjang gelombang yang berbeda karena dibuat dengan tingkat konsentrasi yang berbeda. Selain itu, penggunaan pereaksi Lowry juga harus diperhatikan, yaitu pereaksi dalam kondisi baru. Hal tersebut karena pereaksi mudah sekali teroksidasi. Lama waktu inkubasi juga menjadi faktor keberhasilan metode Lowry (Harjanto, 2017). Mekanisme reaksi dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Reaksi protein dengan reagen biuret (Koeswara dkk., 2024)

2.11. Penentuan Aktivitas Enzim Metode Fuwa

Aktivitas enzim α -amilase dapat ditentukan dengan metode Fuwa berdasarkan pengurangan jumlah pati yang telah terhidrolisis dan menghasilkan kompleks amilosa-iodin berwarna biru setelah penambahan pereaksi iodin. Kompleks warna yang dihasilkan amilosa-iodin memiliki serapan maksimum sekitar 600-650 nm (Fuwa, 1954). Uji aktivitas enzim α -amilase dengan metode Fuwa memerlukan pemanasan yang bertujuan agar enzim mencapai suhu optimum untuk

meningkatkan kecepatan reaksi. Kemudian penambahan larutan HCl bertujuan untuk menghentikan aktivitas enzim, dan larutan KI yang ditambahkan bertujuan untuk menghasilkan kompleks heliks berwarna biru yang intensitasnya akan diukur. Pada sampel, intensitas warna biru yang dihasilkan akan berkurang karena sebagian dari pati telah terhidrolisis oleh enzim amilase (Tazkiah dkk., 2017).

2.12. Spektrofotometer UV-Visible

Spektrofotometri merupakan metode analisa berdasarkan pengukuran serapan sinar monokromatis oleh larutan berwarna pada panjang gelombang tertentu. Ketika molekul atau ion menyerap energi yang diberikan, maka molekul tersebut akan mengalami perubahan konfigurasi elektron valensinya dan mengalami transisi tingkat energi. Jenis transisi energi inilah yang nantinya dapat menjelaskan rentang panjang gelombang untuk penyerapan energi dan kemungkinan jenis ikatan serta gugus fungsi yang ada pada molekul sampel. Ikatan dan gugus fungsi yang menimbulkan penyerapan radiasi sinar UV dan *visible* disebut sebagai kromofor (Harvey, 2000). Sedangkan auksokrom adalah gugus fungsi dengan pasangan elektron bebas yang terikat pada gugus kromofor dan menguatkan absorpsi sinar UV-Visible pada kromofor. Spektrofotometer UV-Visible dapat digunakan untuk menentukan sampel yang berupa larutan, gas, maupun uap. Namun umumnya sampel harus diubah menjadi larutan yang jernih dengan syarat, larutan tidak mengandung ikatan rangkap terkonjugasi pada strukturnya dan tidak berwarna (tidak mengabsorpsi sinar yang digunakan untuk mengukur sampel). Untuk memperoleh spektrum UV-Visible yang baik perlu memerhatikan konsentrasi sampel yang diukur. Hubungan linear yang dihasilkan dari absorbansi dan konsentrasi sampel ialah berkisar antara 0,2 hingga 0,8 atau disebut sebagai daerah berlakunya hukum Lambert-Beer (Suhartati, 2017).

2.13. Kinetika Reaksi Enzim

Kinetika enzim merupakan gambaran seberapa cepat suatu reaksi yang dikatalisis oleh enzim. Kinetika enzim memberikan informasi mengenai seberapa efisien enzim bekerja. Salah satu yang dipelajari dalam kinetika enzim adalah pengaruh konsentrasi substrat. Kinetika reaksi enzim yang didukung oleh substrat inilah yang dipelajari menggunakan konstanta Michaelis-Menten pada Persamaan 1.

$$V = \frac{V_{\text{maks}} [S]}{K_M + [S]} \quad (1)$$

Cara lain yang dapat digunakan untuk menentukan nilai K_M dan V_{maks} ialah dengan membuat persamaan garis lurus Lineweaver-Burk (Persamaan 2) melalui penataan ulang konstanta Michaelis-Menten (Persamaan 1).

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

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

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{\text{maks}}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{maks}}} \quad (2)$$

Sehingga diperoleh persamaan garis lurus $y = ax + b$ dengan sumbu y adalah $1/V$ dan sumbu x $1/S$ (Ischak dkk., 2017)

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan November 2024 sampai bulan Mei 2025 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Analisis spektrofotometri UV-Visible dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah spektrofotometer UV-Visible (Shimadzu 1780), neraca analitik (V220A DJ- lucky), *Laminar Air Flow* (9005-FL Crumair), *autoclave* (LS-35L EDAM 63), *shaker* model (201-KJ BD Kang Jian), *incubator* (350 W Memmert), pengaduk magnetik pelat panas (CB162 Stuart) dan *stir bar*, pH meter (MetroHM 827), mikropipet (Eppendroff) dan mikrotip, sentrifuga (Cole Parmer), oven (Heraeus), lemari es, rak tabung reaksi, termometer, tabung sentrifus (15 dan 50 mL), *waterbath*, jarum ose (lurus), pembakar spirtus, spatula, tabung reaksi, gelas kimia (50-2000 mL), gelas ukur (5-1000 mL), labu ukur (5-1000 mL), botol film, dan Erlenmeyer (50-2000 mL).

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu, *Aspergillus* sp., *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Himedia), NaH_2PO_4 (Merck), Na_2HPO_4 (Merck), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck), KH_2PO_4 (Merck), urea (Merck), MgSO_4 (Merck), CaCl_2

(Merck), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), CoCl_2 (Merck), pepton, Na/K-Tartat (Merck), KI (Merck), HCl pekat (Merck), NaOH (Merck), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck), Na/K-tartrate tetrahidrat (Merck), *Folin Ciocalteu's phenol* (Merck), Na_2SO_3 (Merck), fenol (Merck), asam asetat glasial (Merck), natrium asetat (Merck), pati singkong (Loba Chemie), akuades, pereaksi *Dinitrosalicylic Acid* (DNS), Bovine Serum Albumin (BSA), kantong selofan, alkohol 70 %, xilitol, akuades, kapas sumbat, kasa, karet, tisu, dan kertas saring. Mikroorganisme penghasil enzim α -amilase yang digunakan pada penelitian ini adalah *Aspergillus sp.* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, Universitas Lampung.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Pemiakan Isolat *Aspergillus sp.*

a. Pembuatan Media Agar Miring

Sebanyak 3,9 g PDA dilarutkan dalam 100 mL akuades lalu dipanaskan. Kemudian dituangkan dalam tabung reaksi sebanyak 4-5 mL. Tabung reaksi ditutup dengan sumbat kapas dan disterilkan media dalam *autoclave* pada suhu 121 °C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Tabung reaksi disimpan dalam posisi miring sampai media mengeras.

b. Pemiakan *Aspergillus sp.*

Pemiakan dilakukan dengan diambil satu tarikan ose biakan murni *Aspergillus sp.* lalu digores 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 .

3.3.2. Pembuatan Media Inokulasi dan Fermentasi, Inokulasi *Aspergillus sp.*, dan Produksi Enzim α -amilase

a. Pembuatan Media Inokulasi dan Fermentasi

Media inokulum dibuat dengan cara menimbang $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,7 g, KH_2PO_4 1 g, urea 0,15 g, MgSO_4 0,15 g, CaCl_2 0,15 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0025 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0007 g, CoCl_2 0,001 g, pepton 0,375 g, dan pati singkong 0,375 g. Lalu dilarutkan dengan 50 mL larutan buffer fosfat pH 6,0. Media fermentasi dibuat dengan menimbang, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,5 g, KH_2PO_4 5 g, urea 0,75 g, MgSO_4 0,75 g, CaCl_2 0,75 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0125 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0035 g, CoCl_2 0,005 g, pepton 1,875 g, dan pati singkong 1,875 g. Semua bahan dilarutkan dengan 250 mL larutan buffer fosfat pH 6,0. Media inokulum dan fermentasi kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit.

b. Inokulasi *Aspergillus sp.*

Sebanyak 3 ose *Aspergillus sp.* dari media agar miring dipindahkan ke dalam media inokulum secara aseptik, lalu dihomogenkan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam.

c. Produksi Enzim α -Amilase

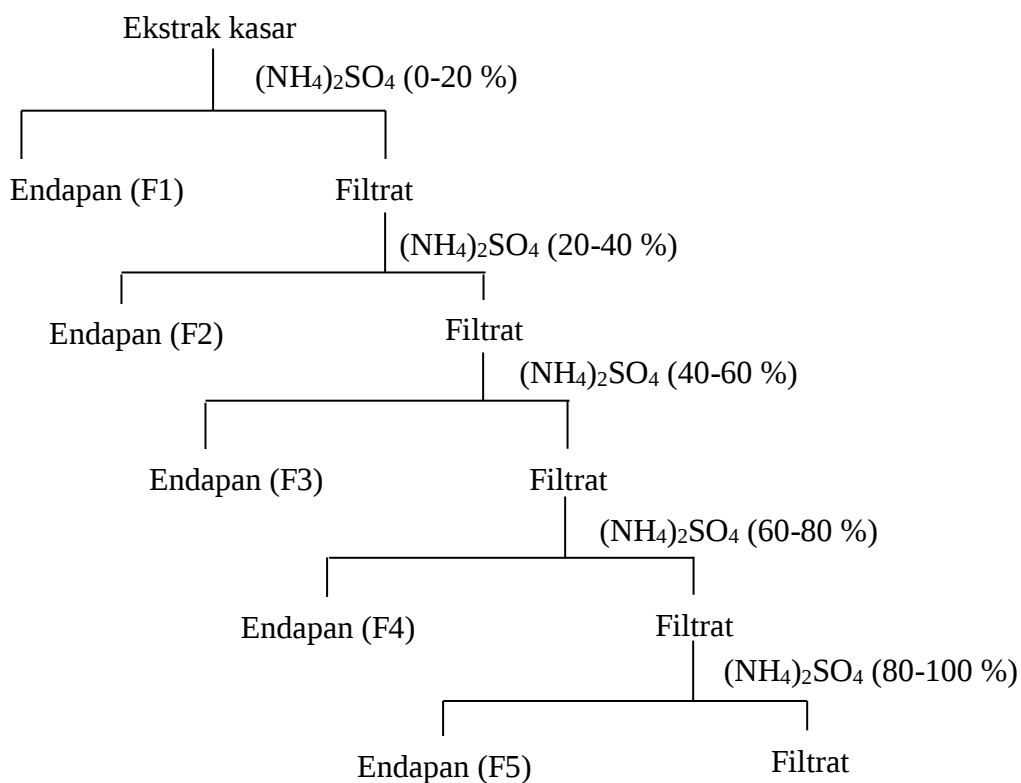
Sebanyak 2 % dari media inokulum dipindahkan ke dalam media fermentasi dengan *micropipette* secara aseptik, lalu dihomogenkan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama 72 jam.

3.3.3. Isolasi Enzim α -Amilase

Isolasi enzim dilakukan dengan metode sentrifugasi yang bertujuan untuk memisahkan ekstrak kasar enzim dengan sisa sel dan pengotor lainnya. Prinsip sentrifugasi ialah berdasarkan kecepatan sedimentasi dengan cara pemutaran. Isolasi enzim α -amilase dilakukan dengan mensentrifugasi enzim dalam tabung sentrifuge pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C . Filtrat yang diperoleh disaring menggunakan kertas saring kemudian diuji aktivitas enzim dengan metode Fuwa dan kadar proteinnya dengan metode Lowry.

3.3.4. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Ekstrak kasar enzim yang telah diperoleh kemudian dimurnikan menggunakan amonium sulfat pada berbagai derajat kejenuhan yaitu 0-20, 20-40, 40-60, 60-80, dan 80-100 %. Pertama, volume ekstrak kasar enzim diukur, lalu ditambahkan garam amonium sulfat sesuai derajat kejenuhan secara perlahan dengan bantuan *magnetic stirrer* pada suhu 4 °C. Selanjutnya pemisahan endapan protein enzim dan filtratnya menggunakan sentrifugas kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Endapan yang telah dipisahkan kemudian dilarutkan dengan larutan buffer fosfat 0,025 M pH 6 lalu diuji aktivitas dan kadar proteinya dengan metode Fuwa dan Lowry. Filtrat dari fraksi 0-20 % diendapkan kembali hingga fraksi 80-100 %. Setelah diketahui fraksi dengan aktivitas tertinggi, selanjutnya dilakukan fraksinasi kedua untuk mendapatkan enzim yang mengalami pengendapan maksimal (Yandri *et al.*, 2010). Skema fraksinasi dilihat pada Gambar 9 dan perhitungan massa garam amonium sulfat dilihat pada Tabel 1.



Gambar 9. Skema fraksinasi menggunakan amonium sulfat (Yandri *et al.*, 2020)

Tabel 1. Perhitungan massa garam amonium sulfat untuk fraksinasi dengan berbagai persentase kejenuhan (Bollag *et al.*, 1996).

[illegible]

3.3.5. Dialisis

Endapan enzim pada proses fraksinasi dengan aktivitas spesifik tertinggi dimasukkan ke dalam kantong selofan dan dilakukan proses dialisis dengan larutan buffer fosfat 0,01 M pH 6,0 selama $\pm$ 24 jam dengan suhu 4°C (Yandri *et al.*, 2021). Selama proses dialisis berlangsung, setiap 4-6 jam dilakukan pergantian larutan buffer untuk mengurangi ion-ion yang ada di dalam kantong selofan, hingga ion-ion di dalam selofan dapat diabaikan. Untuk mengetahui sisa ion-ion garam yang tersisa, dapat dilakukan dengan penambahan larutan Ba(OH)₂ atau BaCl₂ ke dalam larutan enzim. Apabila terbentuk endapan putih BaSO₄, maka di dalam larutan tersebut masih mengandung sisa ion-ion garam. Selanjutnya diukur aktivitas unit dengan metode Fuwa dan kadar protein dengan metode Lowry.

3.3.6. Uji Aktivitas Enzim α -Amilase Menggunakan Metode Mandels

a. Pereaksi *dinitrosalicylic acid* (DNS)

Dimasukkan 1 g DNS, 1 g NaOH, 0,2 g fenol, 0,05 g Na₂SO₃, 0,04 g Na-K-tartat ke dalam gelas *beaker* dan larutkan dengan 50 mL akuades.

Larutan *distirrer* hingga homogen dan pindahkan ke dalam labu takar 100 mL yang telah ditutup menggunakan aluminium foil, kemudian tambahkan akuades hingga batas meniskus.

b. Larutan substrat pati 0,1 %

Dimasukkan 0,1 g serbuk pati ke dalam labu takar 100 mL, lalu dilarutkan menggunakan akuades hingga batas meniskus dan homogenkan kemudian panaskan larutan pati menggunakan *hotplate* hingga larut. Untuk karakterisasi, substrat dilarutkan dalam buffer fosfat/asetat 0,1 M dengan masing-masing pH.

c. Uji Aktivitas dengan metode Mandels

Metode ini berdasarkan pada pembentukan glukosa dari substrat yang digunakan oleh enzim α -amilase yang ditandai dengan penambahan pereaksi *dinitrosalicylic acid* (DNS) sehingga akan menghasilkan larutan

kuning hingga merah pekat. Cara yang digunakan, yaitu sebanyak 0,25 mL enzim dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 0,25 mL substrat, diinkubasi selama 30 menit dalam *waterbath* dengan suhu 60 °C, ditambahkan 1 mL DNS, dididihkan selama 10 menit menggunakan *hotplate*, kemudian didinginkan pada suhu ruang, setelah suhunya turun ditambahkan 1,5 mL akuades. Selanjutnya sampel diuji menggunakan spektrofotometer UV-Visible panjang gelombang 510 nm. Kontrol dilakukan dengan prosedur yang sama, hanya saja dimulai dari 0,25 mL enzim yang diinkubasi terlebih dahulu selama 30 menit dengan suhu 60 °C menggunakan *waterbath* sebelum ditambahkan larutan substrat. Uji aktivitas metode Mandels diperlukan blanko sebagai larutan pembanding untuk pengukuran dengan menggunakan spektrofotometer yang dibuat dengan cara, sebanyak 2,5 mL DNS dicampurkan dengan 5 mL akuades (Mandels *et al.*, 1976).

3.3.7. Uji Kadar Protein Menggunakan Metode Lowry

Pembuatan pereaksi untuk penentuan kadar protein dilakukan sebagai berikut.

1. Pereaksi A : 2 g Na_2CO_3 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-tartat 1 %
3. Pereaksi C : 2 mL pereaksi B ditambahkan 100 mL pereaksi A
4. Pereaksi D : reagen Folin Ciocalteu's dengan akuades 1:1
5. Larutan standar : larutan Bovine Serum Albumin (BSA) dengan kadar 20, 40, 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm

Sebanyak 0,1 mL larutan enzim ditambah 0,9 mL akuades dan 5 mL pereaksi C, lalu dikocok dan didiamkan selama 10 menit. Kemudian ditambahkan 0,5 mL pereaksi D, dikocok dan didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit. Perlakuan kontrol, dilakukan dengan mengganti 0,1 mL enzim dengan 0,1 mL akuades. Uji aktivitas diukur menggunakan spektrofotometer UV-Visible panjang gelombang 750 nm. Kurva standar Bovine Serum Albumin (BSA) digunakan untuk menentukan konsentrasi protein enzim (Lowry *et al.*, 1951).

3.3.8. Uji Aktivitas Enzim Metode Fuwa

Pembuatan pereaksi untuk uji aktivitas enzim metode fuwa dilakukan sebagai berikut.

1. Pereaksi iodin : 2 g KI dilarutkan dengan 10 mL akuades menggunakan labu takar 100 mL. Lalu dimasukkan 0,2 g I₂ ke dalam labu takar dan ditambahkan akuades hingga tanda tera
2. Pati 0,1 % : 0,1 g pati dilarutkan dalam 100 mL akuades dan dipanaskan hingga larut
3. Larutan HCl 1 N : HCl pekat konsentrasi 12 N diencerkan menjadi 1 N dengan cara 8,3 mL HCl pekat dilarutkan dengan akuades 100 mL dalam labu takar

Sebanyak 0,25 mL enzim ditambahkan ke dalam 0,25 mL larutan pati 0,1 % lalu diinkubasi pada suhu 60 °C selama 10 menit. Selanjutnya reaksi dihentikan dengan penambahan HCl 1 N sebanyak 0,25 mL. Lalu ditambahkan pereaksi iodin 0,25 mL dan akuades 4 mL. Kontrol dibuat dengan prosedur yang sama, namun menggunakan 0,25 mL enzim yang telah diinaktivasi dengan HCl 1 N. Selanjutnya sampel dan kontrol diuji menggunakan spektrofotometer *UV-Visible* dengan panjang gelombang 600 nm. Pengukuran aktivitas enzim metode Fuwa atau iodin didasarkan pada pengurangan jumlah substrat (Fuwa, 1954).

3.3.9. Pembuatan Larutan Buffer

3.3.9.1. Larutan buffer asetat 0,1 M

Larutan buffer asetat terdiri dari campuran CH₃COOH dan CH₃COONa. Larutan CH₃COOH (Mr = 60,05 g/mol) ditentukan molaritasnya dengan Persamaan 3.

$$M = \frac{\rho \times 10 \times \%}{Mr} \quad (3)$$

$$M = \frac{1,05 \times 10 \times 100}{60,05}$$

$$M = 17,5$$

Selanjutnya larutan CH_3COOH glasial 17,5 M diencerkan menjadi 0,1 M dengan Persamaan 4. Pengenceran dilakukan dengan akuades ke dalam labu takar 100 mL hingga batas meniskus lalu dihomogenkan.

$$\begin{aligned}
 M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 & (4) \\
 17,5 \times V_1 &= 0,1 \times 100 \\
 V_1 &= \frac{0,1 \times 100}{17,5} \\
 V_1 &= 0,57 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

Larutan CH_3COONa ($M_r = 82,03 \text{ g/mol}$) 0,1 M 100 mL dibuat berdasarkan Persamaan 5.

$$\begin{aligned}
 M &= \frac{\text{massa (g)}}{M_r \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)} \times \frac{1000}{V_{\text{pelarut (mL)}}} & (5) \\
 0,1 \text{ M} &= \frac{\text{massa (g)}}{82,03} \times \frac{1000}{100} \\
 \text{massa} &= 0,82 \text{ g}
 \end{aligned}$$

Berdasarkan perhitungan, untuk membuat 100 mL CH_3COONa 0,1 M diperlukan 0,82 g CH_3COONa yang dilarutkan dengan akuades ke dalam labu ukur 100 mL hingga tanda tera, lalu dihomogenkan.

3.3.9.2. Larutan buffer fosfat 0,1 M

Larutan buffer fosfat dibuat dengan mencampurkan NaH_2PO_4 dan Na_2HPO_4 . Massa NaH_2PO_4 ($M_r = 120 \text{ g/mol}$) dan Na_2HPO_4 ($M_r = 142 \text{ g/mol}$) yang diperlukan dihitung dengan menggunakan Persamaan 5. Setelah perhitungan diperoleh massa NaH_2PO_4 dan Na_2HPO_4 berturut-turut sebesar 1,2 dan 1,42 g. kemudian masing-masing bahan dilarutkan dalam labu takar 100 mL dengan akuades hingga tanda tera dan dihomogenkan.

3.3.10. Penambahan Xilitol

Xilitol digunakan sebagai larutan poliol yang akan ditambahkan pada enzim hasil pemurnian dengan konsentrasi 0,5; 1; dan 1,5 M dengan perbandingan 1:1 (enzim:xilitol). Perhitungan menggunakan Persamaan 5 dengan massa molekul relatif xilitol ($C_5H_{12}O_5 = 152 \text{ g/mol}$). Selanjutnya enzim hasil penambahan poliol tersebut dikarakterisasi dengan beberapa tahapan.

3.3.11. Karakterisasi Enzim α -Amilase

a. Penentuan pH optimum

Untuk menentukan pH optimum enzim sebelum dan sesudah penambahan xilitol digunakan larutan buffer fosfat 0,1 M dengan variasi pH sebagai berikut: 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; dan 7,0. Suhu yang digunakan tetap dijaga pada 60 °C. Kemudian dilanjutkan dengan pengujian aktivitas enzim dengan metode Mandels.

b. Penentuan suhu optimum

Penentuan suhu optimum enzim hasil pemurnian dan hasil penambahan xilitol dilakukan dengan memvariasikan suhu saat inkubasi yaitu 40, 45, 50, 55, 60, 65, dan 70 °C pada pH optimum. Selanjutnya aktivitas enzim diukur dengan metode Mandels.

c. Penentuan data kinetika enzim (K_M dan V_{Maks})

Enzim α -amilase sebelum dan setelah penambahan xilitol ditentukan dari persamaan Lineweaver-Burk dengan memvariasikan konsentrasi substrat (larutan pati) yaitu 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 2; dan 1,2 % dalam buffer fosfat pada pH optimum dan suhu optimum. Kemudian dilakukan pengukuran dengan metode Mandels. Data aktivitas enzim dengan konsentrasi substrat diplotkan ke dalam kurva Lineweaver-Burk untuk penentuan K_M dan V_{Maks} .

d. Uji stabilitas termal enzim

Penentuan stabilitas termal dilakukan dengan mengukur aktivitas sisa enzim

setelah diinkaktivasi termal pada suhu 60 °C dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i). Caranya adalah dengan mengukur aktivitas enzim setelah diinkubasi selama 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, dan 100 menit (Yandri dan Wulandari, 2009). Persen aktivitas sisa enzim ditunjukkan pada Persamaan 6 (Yang *et al.*, 1996)

$$\text{Aktivitas (\%)} = \frac{E_i}{E_0} \times 100\% \quad (6)$$

Keterangan:

E_0 : aktivitas sisa enzim pada t_0 atau tanpa inaktivasi

E_i : aktivitas sisa enzim setelah diinaktivasi selama t_i

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

Waktu paruh dapat dihitung dari persamaan laju reaksi inaktivasi enzim orde satu yang ditunjukkan pada Persamaan 7.

$$t_{(1/2)} = \frac{\ln 2}{k_i} = \frac{0,693}{k_i} \quad (7)$$

Penentuan nilai konstanta laju inaktivasi termal (k_i) enzim α -amilase hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan xilitol, dilakukan menggunakan persamaan kinetika inaktivasi orde 1 ditunjukkan pada Persamaan 8.

$$\ln\left(\frac{E_i}{E_0}\right) = -k_i t \quad (8)$$

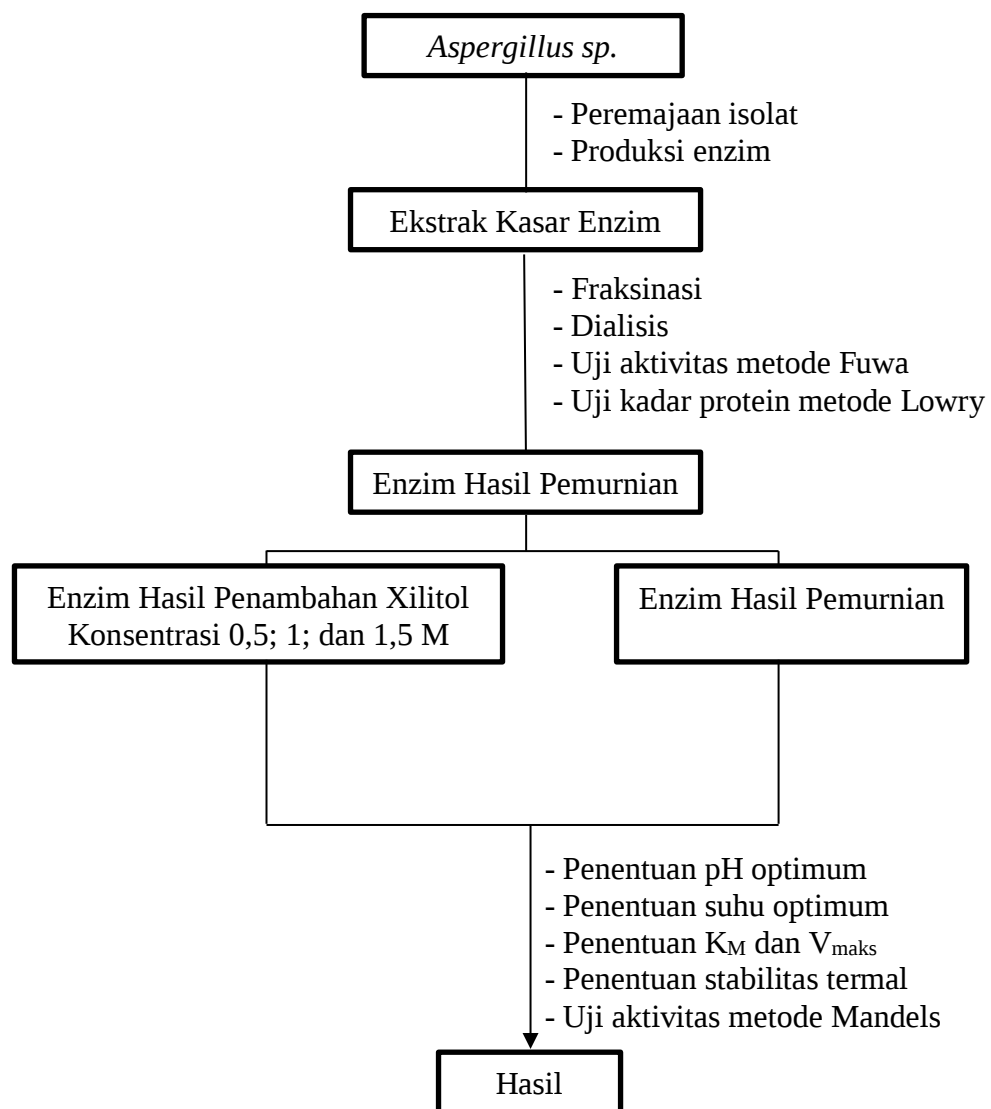
Untuk perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan xilitol dapat dilakukan dengan menggunakan Persamaan 9 (Kazan *et al.*, 1997).

$$\Delta G_i = -RT \ln \left(\frac{k_i h}{k_b T} \right) \quad (9)$$

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 Boltzman ($1,381 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$)

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



Gambar 10. Diagram alir penelitian

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

Berdasarkan hasil pembahasan penelitian, disimpulkan beberapa hal berikut:

1. Aktivitas spesifik enzim α -amilase hasil dialisis sebesar 2.500,82 U/mg dibandingkan ekstrak kasar enzim 244,6844 U/mg meningkat 10,25 kali .
2. Enzim α -amilase hasil dialisis mempunyai pH optimum 4,0; suhu optimum 50 °C; $K_M = 0,2514 \text{ mg.mL}^{-1}$; $V_{maks} = 9,3458 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$; $k_i = 0,0033 \text{ menit}^{-1}$; $t_{1/2} = 210,0446 \text{ menit}$; dan $\Delta G_i = 109,0259 \text{ kJ.mol}^{-1}$.
3. Enzim α -amilase hasil penambahan xilitol 0,5 M mempunyai pH optimum 4,0; suhu optimum 60 °C; $K_M = 0,2521 \text{ mg.mL}^{-1}$; $V_{maks} = 9,3023 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$; $k_i = 0,0025 \text{ menit}^{-1}$; $t_{1/2} = 277,2589 \text{ menit}$; dan $\Delta G_i = 109,7946 \text{ kJ.mol}^{-1}$.
4. Enzim α -amilase hasil penambahan xilitol 1 M mempunyai pH optimum 4,0; suhu optimum 65 °C; $K_M = 0,2493 \text{ mg.mL}^{-1}$; $V_{maks} = 9,2678 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$; $k_i = 0,0021 \text{ menit}^{-1}$; $t_{1/2} = 330,0701 \text{ menit}$; dan $\Delta G_i = 110,2774 \text{ kJ.mol}^{-1}$.
5. Enzim α -amilase hasil penambahan xilitol 1,5 M mempunyai pH optimum 4,0; suhu optimum 65 °C; $K_M = 0,2507 \text{ mg.mL}^{-1}$; $V_{maks} = 9,2851 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$; $k_i = 0,0017 \text{ menit}^{-1}$; $t_{1/2} = 407,7336 \text{ menit}$; dan $\Delta G_i = 110,8625 \text{ kJ.mol}^{-1}$.

5.2. Saran

Dari penelitian yang telah dilakukan, maka disarankan untuk penelitian selanjutnya meningkatkan konsentrasi zat aditif yang ditambahkan, mulai dari konsentrasi 2 M ke dalam enzim α -amilase dari *Aspergillus sp.* untuk meningkatkan stabilitas enzim.

DAFTAR PUSTAKA

- Algofar, M. A. A., Rosmansyah, H. F., Rum, I. A., Muhsinin, S., dan Fatmawati, F. 2021. Study α -amilase dari mikroba serta pemanfaatannya dalam pembuatan maltodekstrin. *Indones. Natural Res. Pharm. J.* **6**(1): 102–117.
- Ariandi. 2016. Pengenalan enzim amilase (alpha-amylase) dan reaksi enzimatisnya menghidrolisis amilosa pati menjadi glukosa. *J. Dinamika.* **7**(1): 74–82.
- Aryanika, I., Gunam, I., dan Suhendra, L. 2022. Pengaruh konsentrasi enzim amilase dan lama hidrolisis pati kasar singkong karet (*Manihot glaziovii* Muell. Arg) terhadap total gula reduksi yang dihasilkan. *J. Rekayasa. Manaj. Agroindustri.* **10**(4): 506–512.
- Bollag, D. M., Rozycki, M. D., and Edelstein, S. J. 1996. *Protein Methods 2nd Ed.* John Wiley and Sons, Inc. New York. 1-16.
- Bustos, R., Romo, C. R., and Healy, M. G. 1996. Stabilisation of trypsin like enzymes from antarcti krill: effect of polyols, polysaccharides, and proteins. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **65**. 193–199.
- Buzatu, A. R., Soler, M. A., Fortuna, S., Ozkilinc, O., Dreavă, D. M., Bîtcă, I., and Boeriu, C. G. 2024. Reactive natural deep eutectic solvents increase selectivity and efficiency of lipase catalyzed esterification of carbohydrate polyols. *Catal Today.* **426**. 1-3.
- Costa, S. A., Tzanov, T., Carneiro, A. F., Paar, A., Georg, M. G., and Cavaco, P, A. 2002. Additives studies of stabilization of native catalase using additives. *Enzyme. Microb. Tech.* **30**(3): 387–391.
- Fairus, S., Kurniawan, R., Taufana, R., dan Nugraha, A. S. 2013. Kajian pembuatan xilitol dari tongkol jagung melalui proses fermentasi. *J. Biol.* **6**(2): 91–100.
- Fransiska, D., Abdullah, A. H. D., Nurhayati, Irianto, H. E., Nissa, R. C., Sedayu, B. B., and Agusman. 2024. Impact of agar–glycerol ratios on the physicochemical properties of biodegradable seaweed films: a compositional study. *Int. J. Biol. Macromol.* **280**(3):135.

- Fuwa, H. 1954. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrat. *J.Biochem.* **41**(5): 583–603.
- Grata, K. 2020. Determining cellulolytic activity cellulolytic microorganisms. *Sciend.* **25**(1–2): 133–143.
- Haiyu, C., Yujie, F., Can, C., Shitao, Y., Liu, S., Liu, Y., and Yu, H. 2023. Construction of novel cellulase with high activity, great stability and excellent lignin-resistant for efficient enzymatic hydrolysis by hydrophilic and negatively charged modification. *Ind. Crops. Prod.* **191**(19):115.
- Harjanto, S. 2017. Perbandingan pembacaan absorbansi menggunakan spectronic 20 d+ dan spectrophotometer UV-Vis T60 dalam penentuan kadar protein dengan larutan standar BSA. *J. Kim. Sains. Apl.* **20**(3): 114–116.
- Harvey, David. 2000. *Modern Analytical Chemistry*. The McGraw-Hill Companies. USA.
- Haryani, K., Retnowati, D. S., Handayani, N. A., Dewi, W. M., dan Pamularsih, S. A. 2022. Modifikasi pati sorgum menjadi maltodekstrin secara enzimatik dengan menggunakan enzim alfa amilase dan glukosa amilase. *J. Food Technol.* **6**(1): 8–12.
- Hasan, K. 2022. Determination of protein content by spectrophotometric method and fat content by soxhlet method on purple kopek eggplant and green kopek eggplant. *J. Math. Nat. Sci. Wil.* **1**(2): 102–107.
- Hemker, A. K., Nguyen, L. T., and Salvi, D. 2023. *Effect of high-pressure technologies on enzyme activity and stability*. Academic Press. New York.
- Hidayatunnafsiyah dan Suprihartini. 2023. Identifikasi jamur *Aspergillus sp.* pada petis udang berdasarkan kemasan di pasar. *Borneo. J. Sci. Math. Educ.* **3**(2): 105–116.
- Hikmah, A. M., Luthfianto, D., Vertygo, M. S. S., Rita, R. S., Gultom, E. S., Ulfah, M., dan Tika, I. N. 2022. *Buku Ajar Biokimia Teori dan Aplikasi. Feniks Muda Sejahtera*. Sulawesi Tengah.
- Hmad, I. B., and Gargouri, A. 2024. Additives, stable and effective eco-enzyme cocktails in powder and liquid form of *stachybotrys microspora* used as detergent. *Heliyon.* **10**(3):1-12.
- Ischak, N., Salimi, Y., dan Botutihe, D. 2017. *Biokimia Dasar*. UNG Press. Gorontalo.
- Katoch, R. 2011. *Analytical Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Springer Science Business Media. London.

- Kazan., D., Ertan., H., and Erarslan, A. 1997. Stabilization of *Escherichia coli* Penicillin G acylase against thermal inactivation by cross-linking with dextran dialdehyde polymers. *Appl Microbiol Biotechnol.* **48**: 191–19 .
- Koeswara, T. T., Auli, W. N., dan Tursino, T. 2024. Perbandingan metode preparasi sampel pada penetapan kadar protein tempe kacang kedelai dengan metode biuret. *J. Ilm. Medikamento.* **10**(1): 10–21.
- Koushki, S., Askaripour, H., and Bahiraei, S. 2025. Review on strategies for enhancing stability of chondroitinase ABC in the treatment of spinal cord injury. *Discov. Appl. Sci.* **7**(219): 1–18.
- Lestari, P., Richana, N., dan Rosmimik. 2011. Karakterisasi dan studi stabilisasi α -Amilase *Bacillus licheniformis* TVII.6 menggunakan bahan aditif. *Life Sci.* **10**: 581–588.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1**(193): 265–275.
- Mandels, M., Andreotti, R., and Roche, C. 1976. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnol. Bioeng.* **6**. 21-23.
- Manjusha, W. A., Josphine, J. S., Deepa, P. K., Sujatha, S., and Rajh, A. 2023. Biosoftening of banana pseudostem fiber using cellulase and pectinase enzyme isolated from *Aspergillus niger* for textile industry. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* **3**. 4–11.
- Mawarni, N., Erdiansyah, I., dan Wardana, R. 2021. Isolasi cendawan *Aspergillus* sp. pada tanaman padi organik. *Agriprima.* **5**(1): 68–74.
- Mohammadi, M., Shareghi, B., Farhadian, S., Momeni, L., and Saboury, A. A. 2022. The interaction of xilitol with carboxypeptidase a: the influence of xilitol on enzyme structure and activity. *J. Mol. Struct.* **1250**(3): 131-877.
- Nero, G., Kivirand, K., Othman, S. Ben, and Rinken, T. 2022. Amperometric method for the determination of cellulase activity and its optimization using response surface method. *J. Anal. Sci. Tehnol.* **13**(21):13-21.
- Niketa, Y., Deepak, C., Meena, B., and Pannuru, V. 2023. Assessing the compatibility of choline-based deep eutectic solvents for the structural stability and activity of cellulase: Enzyme sustain at high temperature. *Int. J. Biol. Macromol.* **294**(3): 125.
- Noviyanti, T., Ardiningsih, P., dan Rahmalia, W. 2012. Pengaruh temperatur terhadap aktivitas enzim protease dari daun sansakng (*Pycnarrhena cauliflora diels*). *J. Kimia. Khatulistiwa.* **1**(1): 31–34.
- Pauline M. Doran. 1995. *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press.

- Pratiwi, D. I. 2023. Pengaruh penambahan xilitol terhadap kestabilan enzim α -amilase dari *Aspergillus fumigatus*. (Skripsi) Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Purwanto, M. G. M. 2016. The role and efficiency of ammonium sulphate precipitation in purification process of papain crude extract. *Procedia Chem.* **18**. 127-131.
- Rafika, Armah, Z., Naim, N., Pratama, R., dan Khaeriatussa'ada. 2022. Perbandingan pertumbuhan *Candida albicans* pada media potato dextrose agar (PDA) dan chrom agar candida (CAC). *J. Medik. Ilm. Kesehat.* **7**(2):1-11.
- Rahayu, R., Haryani, S., dan Yuliani, S. 2023. Perbandingan pati modifikasi heat moisture treatment, asetilasi, dan kombinasi ganda. *J. Ilm. Mahasiswa Pertanian.* **8**(3): 394–401.
- Rahmi, H., Hariyanti, A. R. P., dan Wulandari, D. 2020. Analisis hasil fraksinasi protease dan lipase yang berasal dari saluran pencernaan udang vaname *Litopenaeus vannamei*. *J. Biotek. Biosains. Indones.* **7**. 194–202.
- Ramadhan, B., dan Wikandari, P. 2021. Aktivitas enzim amilase dari bakteri asam laktat (karakteristik dan aplikasi). *Unesa J. Chem.* **10**(2): 109–120.
- Ratnayani, K., Laksmiwati, A. A. I. A. M., dan Sudiarto, M. 2015. Penentuan laju reaksi maksimal (V_{maks}) dan konstanta Michaelis-Menten (K_M) enzim lipase pankreas pada substrat minyak kelapa, minyak sawit, dan minyak zaitun. *J. Chem.* **9**(1): 93–97.
- Riawati, S., dan Yandri. 2012. Studi pengaruh penambahan gliserol terhadap stabilitas enzim selulase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148. Prosiding SNSMAIP III-2012: 526–531.
- Risnoyatiningsih, S. 2011. Hidrolisis pati ubi jalar kuning menjadi glukosa secara enzimatis. *J. Teknol. Kim.* **5**(2): 417–424.
- Sahnoun, M., Bejar, S., Triki, M. A., Sayari, A., and Kammoun, R. 2012. Production, purification, and characterization of two α -amylase isoforms from a newly isolated *Aspergillus oryzae* strain s2. *Pro. Biochem.* **42**.18–25.
- Sari, A., Kusdiyantini, E., dan Rukmi, M. 2017. Produksi selulase oleh kapang *Aspergillus sp.* hasil isolasi dari limbah pengolahan sagu (*Metroxylon sp.*) dengan variasi konsentrasi inokulum pada fermentasi terendam statis. *J. Biol.* **6**(1):11-20.
- Selvia, R., Wuryanti, dan Sriatun. 2013. Isolasi dan karakterisasi kitinase dari isolat jamur akuatik kitinolitik berasal dari kupu-kupu (*Lepidoptera*). *J. Sci. Appl. Chem.* **16**(3): 97–101.

- Shimizu, T., Korehisa, T., Imanaka, H., and Ishida, N. 2017. Characteristics of proteinaceous additives in stabilizing enzymes during freeze thawing and drying. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **81**(4): 687–697.
- Sivaramakrishna, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Soccol, C., and Pandey, A. 2006. α -amylases from microbial sources. *Food. Tech. Biotech.* **44**(2): 173– 184.
- Souza, P. M. De, and Magalhães, P. De O. E. 2010. Application of microbial amylase in industry. *J. Microbiol.* **41**. 850–861.
- Suhartati, T. 2017. *Dasar-Dasar Spektrofotometri UV-Vis dan Spektrofotometri Massa Untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik*. AURA. Bandar Lampung.
- Suryani, Y. dan Taupiqurrahman, O. 2021. *Mikrobiologi Dasar*. LP2M UIN SGD. Bandung.
- Suryani, Y., Taupiqurrahman, O., dan Kulsum, Y. 2020. *Mikologi*. Freeline Cipta Granesia. Padang.
- Tazkiah, N., Rosahdi, T., dan Supriadin, A. 2017. Isolasi dan karakterisasi enzim amilase dari biji nangka (*Artocarpus heterophyllus*). *Al-Kimiya*. **4**(1): 4–9.
- Wahyuni, S. 2017. *Biokimia Enzim dan Karbohidrat*. Unimal Press. Lhokseumawe.
- Wibowo, S., Yuliatmo, R., Maryani, T., dan Pahlawan, I. 2021. *Enzyme For Leather*. Sepadan Putra Mandiri. Yogyakarta.
- Widowati, E., Sari, A. M., dan Husnayaini, F. 2020. Kombinasi enzim poligalakturonase dan selulase pada klarifikasi sari buah naga super merah (*Hylocereus costaricensis*) dalam pembuatan sirup. *J. Teknol. Has. Pert.* **11**(2): 110–126.
- Yandri, A. S. dan Suhartati, T. 2018. *Peningkatan Kestabilan Enzim*. Anugrah Utama Raharja. Bandar Lampung.
- Yandri, A. S. dan Wulandari, P. 2009. Pengaruh penambahan sorbitol terhadap stabilitas termal enzim amilase dari *Rhizopus oryzae*. *J. Sains MIPA*. **15**(2): 111–118.
- Yandri, Nadila, N., Suhartati, T., Satria, H., dan Hadi, S. 2020. Peningkatan kestabilan enzim α -amilase dengan penambahan gliserol. *Analit.* **5**(2): 143–154.

- Yandri, Suhartati, T., dan Hadi, S. 2010. Purification and characterization of extracellular α -amilase enzyme from locale bacteria isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148. *Eur. J. Sci. Res.* **39**(1): 64-74.
- Yandri, Witazora, Z., Suhartati, T., Satria, H., dan Hadi, S. 2021. Production , purification and characterization of the α -amylase from local bacteria isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148. *J. Phys. Conf. Ser.* **1751**(3): 1-9.
- Yang, Z., Domach, M., Auger, R., Yang, F. X., and Russell, A. 1996. Polyethylene glycol- induced stabilization of subtilisin enzyme microb. *Enzyme. Microb. Technol.* **18**. 82–89.
- Zhang, H., Wang, S., Yao, Y., Qi, K., Yu, C., Liu, Q., and Zhou, J. 2024. Preparation and recovery performance of modified cellulase with pH sensitive separation properties. *Ind.Crops Prod.* **222**(2).119.