

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

(Skripsi)

Oleh

**AZIZA'UL MA'RIFAH
2117011050**



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

ABSTRAK

PENGARUH PENAMBAHAN POLIETILEN GLIKOL (PEG) 4000 TERHADAP KESTABILAN ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus sp.*

Oleh

AZIZA'UL MA'RIFAH

Pemanfaatan enzim dalam dunia industri membutuhkan kriteria khusus, salah satunya stabilitas tinggi. Semakin tinggi stabilitas suatu enzim, maka semakin baik enzim bekerja pada suhu dan pH ekstrem. Untuk memperoleh enzim dengan stabilitas tinggi, perlu dilakukan peningkatan kestabilan enzim.

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk meningkatkan kestabilan enzim α -amilase dari jamur *Aspergillus sp.* dengan metode penambahan zat aditif Polietilen Glikol (PEG) 4000. Tahapan penelitian ini meliputi produksi dan isolasi enzim, pemurnian enzim melalui fraksinasi dan dialisis, serta penambahan zat aditif PEG 4000. Selanjutnya enzim hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan PEG 4000 dikarakterisasi.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa enzim α -amilase hasil pemurnian memiliki kemurnian lebih tinggi sebesar 10 kali lipat dibandingkan ekstrak kasar enzim, ditunjukkan dengan nilai aktivitas spesifik ekstrak kasar enzim sebesar 287,62 U/mg, sedangkan enzim hasil pemurnian sebesar 2870,13 U/mg. pH optimum enzim hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan PEG 4000 adalah 3,5. Suhu optimum enzim hasil pemurnian sebelum penambahan PEG 4000 adalah 45 °C. Suhu optimum enzim hasil pemurnian setelah penambahan PEG 4000 12, 18, dan 24 % adalah 50 °C. Berdasarkan uji stabilitas termal pada suhu 60 °C selama 100 menit diperoleh aktivitas sisa enzim hasil pemurnian sebelum penambahan PEG 4000 sebesar 58,92 % dengan waktu paruh 126,018 menit. Sedangkan enzim hasil pemurnian setelah penambahan PEG 4000 12, 18, dan 24 % berturut-turut menunjukkan aktivitas sisa sebesar 68,56; 74,58; dan 78,78 %, dengan waktu paruh 187,324; 216,593; dan 301,347 menit. Kemurnian enzim hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan PEG 4000 12, 18, dan 24 % meningkat secara berturut-turut sebesar 1,49; 1,72; dan 2,4 kali lipat.

Kata kunci: α -amilase, *Aspergillus sp.*, stabilitas enzim, PEG 4000

ABSTRACT

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

By

AZIZA'UL MA'RIFAH

The use of enzymes in industry requires specific criteria, one of which is high stability. The higher the stability of an enzyme, the better it performs at extreme temperatures and pH levels. To obtain enzymes with high stability, it is necessary to improve enzyme stability.

This study was conducted with the aim of enhancing the stability of α -amylase enzymes from the fungus *Aspergillus sp.* using the addition of the additive Polyethylene Glycol (PEG) 4000. The research stages included enzyme production and isolation, enzyme purification through fractionation and dialysis, and the addition of PEG 4000. The purified enzyme before and after the addition of PEG 4000 was then characterized.

The results of this study indicate that the purified α -amylase enzyme has a purity 10 times higher than that of the crude enzyme extract, as evidenced by the specific activity value of the crude enzyme extract being 287.62 U/mg, while the purified enzyme is 2870.13 U/mg. The optimal pH of the purified enzyme before and after the addition of PEG 4000 is 3.5. The optimal temperature of the purified enzyme before the addition of PEG 4000 is 45 °C. The optimal temperature of the purified enzyme after the addition of PEG 4000 at 12, 18, and 24 % is 50 °C. Based on thermal stability testing at 60 °C for 100 minutes, the residual activity of the purified enzyme before the addition of PEG 4000 was 58.92% with a half-life of 126.018 minutes. Meanwhile, the purified enzyme after adding PEG 4000 at 12, 18, and 24 % showed residual activity of 68.56; 74.58; and 78.78 %, respectively, with half-lives of 187.324, 216.593, and 301.347 minutes. The purity of the purified enzyme before and after the addition of PEG 4000 at 12, 18, and 24 % increased by 1.49, 1.72, and 2.4 times, respectively.

Keywords: α -amylase, *Aspergillus sp.*, enzyme stability, PEG 4000

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

Oleh

**AZIZA'UL MA'RIFAH
2117011050**

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS**

Pada

**Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Lampung**



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

Judul Penelitian : PENGARUH PENAMBAHAN POLIETILEN
GLIKOL (PEG) 4000 TERHADAP
STABILITAS ENZIM α -AMILASE DARI
Aspergillus sp.

Nama Mahasiswa : Aei'za'ul Ma'rifah

Nomor Pokok Mahasiswa : 2117011050

Program Studi : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



1. Komisi Pembimbing

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

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

2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA

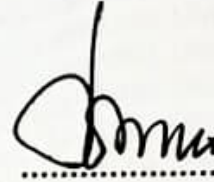
A blue ink signature of Prof. Dr. Mita Rilyanti, written over a circular official stamp.

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

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

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



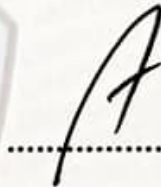
.....

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



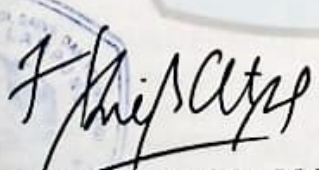
.....

Anggota : Dra. Aspita Laila, M.S.



.....

2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 10 Juli 2025

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Aziza'ul Ma'rifah
Nomor Pokok Mahasiswa : 2117011050
Program Studi : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi penulis yang berjudul **"Pengaruh Penambahan Polietilen Glikol (PEG) 4000 terhadap Stabilitas Enzim α -Amilase dari *Aspergillus sp.*"** adalah karya penulis sendiri. Penulis tidak melakukan penjiplakan (plagiarisme) atas karya penulis lain dengan cara yang tidak sesuai dengan tata etika ilmiah yang berlaku. Hak intelektual karya ilmiah ini penulis serahkan kepada Universitas Lampung dan penulis tidak keberatan jika data skripsi ini di kemudian hari dipergunakan oleh pihak dosen atau prodi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama penulis dicantumkan.

Atas pernyataan ini, apabila di kemudian hari ditemukan adanya ketidakbenaran maka penulis bersedia menerima sanksi hukum yang berlaku.

Bandar Lampung, 28 Juli 2025
buat Pernyataan,



Aziza'ul Ma'rifah
NPM 2117011050

RIWAYAT HIDUP

Nama penulis adalah Aziza'ul Ma'rifah. Penulis lahir di Lampung Timur pada tanggal 5 September 2002. Penulis adalah anak pertama dari tiga bersaudara.

Penulis resmi menjadi mahasiswa Jurusan Kimia FMIPA Unila pada tanggal 21 Agustus 2021 melalui jalur UTBK SBMPTN. Selama menjadi mahasiswa penulis melaksanakan kuliah sambil aktif berorganisasi. Penulis menjadi anggota bidang Sains dan Penalaran Ilmu Kimia (SPIK) Himaki FMIPA Unila periode 2022 dan Anggota Biro Kemuslimahan ROIS FMIPA Unila periode 2022. Kemudian pada tahun 2023 penulis menjabat sebagai Sekretaris Bidang SPIK Himaki FMIPA Unila periode 2023 dan Anggota Bidang Education Chemistry English Club (CEC) periode 2023-2024. Pada tahun 2024 penulis diberi amanah sebagai Ketua Komisi 1 Bidang Legislasi Dewan Perwakilan Mahasiswa (DPM) FMIPA Unila periode 2024 dan Sekretaris Umum CEC periode 2024-2025.

Pada tahun 2023, penulis melaksanakan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Laboratorium Biokimia, Universitas Lampung, dengan judul “Penentuan Kondisi Optimum *Aspergillus* sp. Menghasilkan Enzim Selulase pada Media Carboxymethyl Cellulose (CMC)”. Kemudian penulis melaksanakan penelitian pada bulan Desember 2024 hingga Mei 2025, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Pengaruh Penambahan Polietilen Glikol (PEG) 4000 terhadap Stabilitas Enzim α -Amilase dari *Aspergillus* sp.”.

MOTTO

“For indeed, with hardship [will be] ease. Indeed, with hardship [will be] ease.”

Q.S Al-Insyirah (94):5-6

PERSEMBAHAN



Dengan segala kerendahan hati, kupersembahkan karya ini

Kepada

Kedua orangtuaku

Bapak Supratman dan Ibu Ginarsih

Adik Luthfia Zahra dan Adik Zayn Yusuf Albiruni

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

Prof. Sutopo Hadi, M.Sc., Ph.D.

Dra. Aspita Laila, M.S.

Almamater Tercinta

SANWACANA

Alhamdulillahirabbil'alamiin, segala puji bagi Allah SWT yang telah melimpahkan rahman dan rahim-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Penambahan Polietilen Glikol (PEG) 4000 terhadap Stabilitas Enzim α -amilase dari *Aspergillus sp.*”. Selawat dan salam senantiasa selalu tercurah kepada suri teladan manusia Rasulullah Muhammad SAW, yang insyaAllah kita nantikan syafa'at beliau di hari kiamat. Aamiin.

Penulis menyadari bahwa proses pengerjaan penelitian dan penulisan skripsi ini tak lepas dari rintangan. Namun hal tersebut dapat terlewati berkat kasih sayang Allah SWT yang tiada habisnya, serta dukungan, pengarahan, dan bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini sebagai wujud rasa hormat, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Keluarga inti penulis, Bapak Supratman, Ibu Ginarsih, Adik Luthfia Zahra dan Adik Zayn Yusuf Albiruni, yang telah memberikan doa dan dukungan kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini, diiringi dengan sehat, sakit dan senang susahnyanya.
2. Mbah Putri Tulasih dan Maniyem dan Mbah Kakung Sujani dan Sungkono yang selalu mendukung, mendoakan, dan menyayangi penulis apapun yang terjadi hingga skripsi ini selesai.
3. Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S., selaku dosen pembimbing I, yang telah dengan sabar membimbing, mengarahkan, mendukung, dan meluangkan waktu serta tenaganya dalam proses pengerjaan penelitian dan penulisan skripsi ini.
4. Bapak Prof. Sutopo Hadi, M.Sc., Ph.D., selaku dosen pembimbing II, yang telah membimbing penulis dalam menyelesaikan penulisan skripsi ini.

5. Ibu Dra. Aspita Laila, M.S., selaku dosen pembahas yang telah memberikan perhatian ketika penulis sedang tidak dalam kondisi yang baik, dan memberi dukungan hingga akhirnya penulis bisa menyelesaikan skripsi ini.
6. Ibu Prof. Dr. Ilim, M.S., selaku pembimbing akademik penulis, yang telah dengan sabar membimbing dan mempermudah urusan akademik penulis, hingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
7. Ibu Prof. Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si., sebagai Ketua Jurusan Kimia Universitas Lampung.
8. Bapak dan Ibu dosen Kimia FMIPA Universitas Lampung atas segala bimbingan, arahan, dan dedikasinya yang telah diberikan kepada penulis.
9. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
10. A.Whisnu Shakthi Al Ghozali, terima kasih untuk perannya sebagai mesin pendukung yang tak pernah berhenti bekerja dan senantiasa terbarukan suku cadangnya sehingga dapat bekerja optimal.
11. Yandri's Research '21: Sajiddah Talfah, S.Si., Harry Firmanda, S.Si., dan Misbakhul Anam, S.Si., yang telah menjadi tim kompak dan saling melengkapi, serta kebersamaan sejak Praktik Kerja Lapangan, penelitian, hingga skripsi ini selesai.
12. Kembara Kembar Nakal: Aviana Hanifah Lutfi, S.Si., Hanna Luthfia Maghfiroh, S.Si., Rima Soraya Permata Sari, S.Si., dan Rika Sapitri, S.Si., yang telah menemani penulis sejak awal perkuliahan hingga menyelesaikan skripsi ini.
13. 15 Manusia Kuat: Abe, Amel, Alya, Hafiz, Fildza, Govindo, Andra, Vira, Trie, Talfa, Radit, dan Fera.
14. Tetangga-tetangga di Asrama Putri Ayu: Hanna, Avi, Rika, Ayu, Vanes, Nadira, Erwanda, Tyas, Hasma, dan Caca.
15. Kakak-kakak PY: Stephani, Defa, Maria, Avi, dan Virginia, yang telah membantu proses penelitian hingga penulisan skripsi.
16. *Special mention* kepada orang-orang yang kusayangi dan selalu kurasakan dukungannya: Kak Muti, Jojo, Nabila, Eka, Dias, Aling, dan Dimas. Terima

kasih atas waktu dan cerita-cerita yang telah kita tukar sepanjang perjalanan penulis menempuh perkuliahan.

17. Semua pihak yang telah membantu dan mendukung dalam penyelesaian skripsi ini.

Semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Bandar Lampung, 28 Juli 2025

Penulis

Aziza'ul Ma'rifah

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR RUMUS	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
I. PENDAHULUAN.....	2
1.1 Latar Belakang.....	2
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
1.3 Manfaat Penelitian.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Enzim	4
2.1.1 Mekanisme Enzim	5
2.2 Enzim Amilase	6
2.3 Jamur <i>Aspergillus sp.</i>	8
2.4 Senyawa Poliol	9
2.5 Polietilen Glikol-4000	10
2.6 Isolasi dan Pemurnian Enzim	11
2.6.1 Sentrifugasi	11
2.6.2 Fraksinasi dengan Amonium Sulfat.....	12
2.6.3 Dialisis	12
2.7 Uji Aktivitas Enzim α -Amilase	13
2.7.1 Metode Fuwa	13
2.7.2 Metode Mandels	14
2.8 Metode Lowry	14
2.9 Kinetika Reaksi Enzim	15
2.10 Stabilitas Enzim.....	16
2.10.1 Stabilitas Terhadap Suhu	17
2.10.2 Stabilitas Terhadap pH.....	17
III. METODE PENELITIAN	18

3.1 Waktu dan Tempat.....	18
3.2 Alat dan Bahan	18
3.2.1 Alat.....	18
3.2.2 Bahan	19
3.3 Prosedur Penelitian	19
3.3.1 Tahap Preparasi.....	19
3.3.2 Pembiakan Isolat <i>Aspergillus sp.</i>	20
3.3.3 Pembuatan Media Inokulum dan Fermentasi, Inokulasi <i>Aspergillus sp.</i> dan Produksi Enzim α -amilase.....	20
3.3.4 Isolasi Enzim α -Amilase dari <i>Aspergillus sp.</i>	21
3.3.5 Fraksinasi dengan Amonium Sulfat.....	22
3.3.6 Dialisis	23
3.3.7 Uji Aktivitas Enzim α -Amilase dengan Metode Fuwa.....	24
3.3.8 Uji Aktivitas Enzim α -Amilase dengan Metode Mandels	25
3.3.9 Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry	25
3.3.10 Penambahan Polietilen Glikol (PEG) 4000	26
3.3.11 Karakterisasi Enzim α -amilase Sebelum dan Setelah Penambahan Polietilen Glikol (PEG) 4000 dengan Variasi Konsentrasi 12, 18, dan 24 %	26
3.3.12 Penentuan Konstanta Laju Inaktivasi (k_i), Paruh Waktu ($t_{1/2}$), dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i)	28
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	30
4.1 Jamur <i>Aspergillus sp.</i>	30
4.2 Enzim α -Amilase	30
4.2 Pemurnian Enzim α -Amilase.....	31
4.2.1 Fraksinasi	31
4.2.2 Dialisis	33
4.3 Karakterisasi Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Setelah Penambahan Polietilen Glikol (PEG) 4000	34
4.3.1 Penentuan pH Optimum Enzim Hasil Pemurnian Dan Enzim Setelah Penambahan Polietilen Glikol (PEG) 4000.....	35
4.3.2 Penentuan Suhu Optimum Enzim Hasil Pemurnian Dan Enzim Setelah Penambahan Polietilen Glikol (PEG) 4000.....	36
4.3.3 Penentuan K_M dan V_{maks} Enzim Hasil Pemurnian Dan Enzim Setelah Penambahan Polietilen Glikol (PEG) 4000.....	37
4.3.4 Stabilitas Termal Enzim Hasil Pemurnian Sebelum Dan Setelah Penambahan Polietilen Glikol (PEG) 4000.....	38
4.3.5 Perubahan Konstanta Laju Inaktivasi (k_i), Waktu Paruh ($t_{1/2}$), dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i) Enzim Hasil Pemurnian Sebelum Dan Setelah Penambahan PEG 4000 Konsentrasi 12, 18, dan 24 %	39
V. SIMPULAN DAN SARAN	43
5.1 Simpulan.....	43
5.2 Saran	44
DAFTAR PUSTAKA.....	45

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Pemurnian enzim α -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i>	34
2. Nilai K_M dan V_{maks} enzim hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan PEG 4000 dengan konsentrasi 12, 18, dan 24 %	38
3. Perubahan konstanta laju inaktivasi termal (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan PEG 4000 dengan konsentrasi 12, 18, dan 24 %	40
4. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode Fuwa (λ_{maks} 600 nm) pada ekstrak kasar enzim, hasil fraksinasi, dan hasil dialisis	52
5. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode Lowry (λ_{maks} 750nm) pada ekstrak kasar enzim, hasil fraksinasi, dan hasil dialisis.....	53
6. Hubungan antara persen kejenuhan amonium sulfat dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i>	54
7. Hubungan antara persen kejenuhan amonium sulfat (0-10)% dan (10-95)% dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i>	54
8. Hubungan antara pH dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim α -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i> hasil dialisis	55
9. Hubungan antara pH dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas spesifik enzim α -amilase hasil penambahan PEG 4000 12 %	55
10. Hubungan antara pH dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas spesifik enzim α -amilase hasil penambahan PEG 4000 18 %	55
11. Hubungan antara pH dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas spesifik enzim α -amilase hasil penambahan PEG 4000 24 %	56

12. Hubungan antara suhu dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim α -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i> hasil dialisis	57
13. Hubungan antara suhu dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim α -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i> hasil penambahan PEG 4000 12 %.....	57
14. Hubungan antara suhu dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim α -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i> hasil penambahan PEG 4000 18 %.....	58
15. Hubungan antara suhu dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim α -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i> hasil penambahan PEG 4000 24 %	58
16. Hubungan antara konsentrasi substrat dengan absorbansi dan aktivitas unit enzim α -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i> hasil dialisis.	59
17. Hubungan antara konsentrasi substrat dengan absorbansi dan aktivitas unit enzim α -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i> hasil penambahan PEG 4000 12 %	59
18. Hubungan antara konsentrasi substrat dengan absorbansi dan aktivitas unit enzim α -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i> hasil penambahan PEG 4000 18 %	59
19. Hubungan antara konsentrasi substrat dengan absorbansi dan aktivitas unit enzim α -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i> hasil penambahan PEG 4000 24 %.....	60
20. Hubungan antara aktivitas unit, aktivitas sisa, dan laju inaktivasi termal ($\ln E_i/E_0$) enzim α -amilase hasil dialisis dengan variasi waktu inaktivasi pada suhu 60 °C	61
21. Hubungan antara aktivitas unit, aktivitas sisa, dan laju inaktivasi termal ($\ln E_i/E_0$) enzim α -amilase hasil penambahan PEG 4000 12 % dengan variasi waktu inaktivasi pada suhu 60 °C	61
22. Hubungan antara aktivitas unit, aktivitas sisa, dan laju inaktivasi termal ($\ln E_i/E_0$) enzim α -amilase hasil penambahan PEG 4000 18 % dengan variasi waktu inaktivasi pada suhu 60 °C.....	62
23. Hubungan antara aktivitas unit, aktivitas sisa, dan laju inaktivasi termal ($\ln E_i/E_0$) enzim α -amilase hasil penambahan PEG 4000 24 % dengan variasi waktu inaktivasi pada suhu 60 °C	62
24. Data grafik laju termal inaktivasi termal orde satu enzim α -amilase hasil dialisis dan penambahan PEG 4000 12, 18, dan 24 %	63
25. Perhitungan waktu paruh ($t_{1/2}$) enzim hasil dialisis dan hasil penambahan PEG 4000 12, 18, dan 24 %	64
26. Absorbansi BSA pada berbagai konsentrasi.....	67

27. Absorbansi glukosa pada berbagai konsentrasi.....	68
---	----

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Mekanisme kerja enzim: (a) <i>Lock and key</i> ; (b) <i>Induced-fit</i>	6
2. <i>Aspergillus sp.</i> (Ariyono, 2014).	9
3. Struktur kimia PEG 4000	10
4. Skema fraksinasi	22
5. Diagram alir penelitian.....	29
6. Isolat <i>Aspergillus sp.</i>	30
7. Hubungan antara tingkat kejenuhan amonium sulfat (0-15), (15-30), (30-45), (45-60), (60-75), dan (75-90) % terhadap aktivitas spesifik (U/mg) enzim α -amilase	32
8. Hubungan antara pola fraksinasi (0-10)% dan (10-95)% garam amonium sulfat terhadap aktivitas spesifik (U/mg) enzim α -amilase	33
9. pH optimum enzim hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan PEG 4000 konsentrasi 12, 18, dan 24 %	35
10. Suhu optimum enzim hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan PEG 4000 konsentrasi 12, 18, dan 24 %	36
11. Grafik <i>Lineweaver-Burk</i> enzim hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan PEG 4000 konsentrasi 12, 18, dan 24 %.....	37
12. Hubungan antara stabilitas termal terhadap aktivitas sisa (%) enzim hasil pemurnian dan setelah penambahan PEG 4000 dengan konsentrasi 12, 18, dan 24 %	39
13. Hubungan $\ln(E_i/E_o)$ enzim α -amilase sebelum dan setelah penambahan PEG dengan konsentrasi 12, 18, dan 24 % untuk penentuan k_i , $t_{1/2}$. dan ΔG_i	40

14. Absorbansi BSA pada berbagai konsentrasi.....	67
15. Kurva standar glukosa.....	68

DAFTAR RUMUS

Persamaan	Halaman
1. Michaelis-Menten.	15
2. Lineweaver-Burk.....	16
3. Aktivitas sisa metode Mandels.....	28
4. Waktu paruh.	28
5. Konstanta laju reaksi.....	28
6. Perubahan energi akibat denaturasi.....	29
7. Aktivitas unit metode Fuwa.	52
8. Kadar protein.....	53
9. Aktivitas spesifik metode Fuwa.	54
10. Aktivitas unit metode Mandels.	56
11. Aktivitas sisa metode Fuwa.....	57
12. Regresi linear.....	60

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Data Hasil Pengukuran Absorbansi Menggunakan Spektrofotometer UV-Visible.	52
2. Data Penentuan Pola Fraksinasi.	54
3. Penentuan pH optimum.	55
4. Penentuan suhu optimum	57
5. Penentuan K_M V_{maks}	59
6. Data Penentuan Kestabilan Termal	61
7. Data Grafik Laju Termal Inaktivasi Termal Orde Satu.	63
8. Perhitungan Waktu Paruh ($t_{1/2}$).	63
9. Perhitungan Perubahan Energi Bebas Akibat Denaturasi (ΔG_i).	64
10. Kurva Standar <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA)	67
11. Kurva Standar Glukosa.	68

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Enzim dikenal sebagai biokatalisator atau jenis protein yang bertindak sebagai katalis atau senyawa yang meningkatkan laju reaksi kimia pada makhluk hidup. Suatu enzim dapat mempercepat reaksi sebanyak 10^8 hingga 10^{11} kali lebih cepat dibandingkan ketika reaksi berlangsung tanpa melibatkan katalis (Nababan dkk., 2019). Industri telah memberlakukan penerapan metode enzimatik yang mengalami perkembangan dalam industri sejak tahun 1960-an. Dalam bidang industri enzim menempati posisi penting dan paling dicari karena penggunaannya yang hemat energi dan ramah lingkungan (Santoso dan Dayatmo, 2015). Enzim diketahui dapat mendorong proses *green chemistry* karena efisiensi, biodegradabilitas, dan spesifitasnya tinggi. Enzim juga membantu meningkatkan kualitas produk, meningkatkan efisiensi, meningkatkan keamanan, mengurangi biaya produksi, dan meminimalisir kerusakan lingkungan (Spohner *et al.*, 2015).

Enzim yang banyak diproduksi karena manfaatnya salah satunya enzim amilase. Amilase dikenal sebagai enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis ikatan dalam pati untuk menghasilkan dekstrin, oligosakarida, maltosa, dan D-glukosa. Amilase dapat dihasilkan dari hewan, jamur, dan sumber tanaman (Wang, 2024). Enzim amilase dikelompokkan menjadi α -amilase, β -amilase, dan γ -amilase.

Di antara ketiga kelompok amilase tersebut, α -amilase adalah enzim yang paling banyak diproduksi karena α -amilase memiliki mekanisme kerja yang lebih cepat dan efisien dibandingkan β -amilase dan γ -amilase. Ia dapat memecah berbagai ikatan dalam molekul pati secara acak, yang memungkinkan produksi gula sederhana terjadi lebih cepat. Fungsi enzim α -amilase ini sangat bermanfaat dalam

berbagai bidang terutama industri makanan dan kesehatan. (Purnawan dkk., 2015).

Amilase dapat diproduksi dari hewan, tumbuhan, hingga bakteri. Namun produksi enzim amilase dalam sektor industri lebih didominasi oleh jamur dan bakteri, karena sumbernya mudah didapatkan (Vogel and May, 2019). Spesies *Aspergillus sp.* adalah kelompok jamur yang terbukti memiliki potensi besar dalam menghasilkan enzim α -amilase yang berguna bagi kepentingan industri skala besar maupun kecil, karena kapasitas produksi yang lebih ekonomis dan waktu produksi yang lebih singkat (Jinu, 2017). Selain tahap produksinya yang efisien, penggunaan enzim α -amilase dari *Aspergillus sp.* juga memberikan solusi efisien dalam bidang industri dan juga menawarkan pengembangan teknologi yang lebih ramah lingkungan.

Umumnya enzim relatif tidak stabil, biaya isolasi tinggi, dan hanya dapat digunakan sekali pakai. Stabilitas enzim berperan sebagai parameter penting dalam menentukan kelayakan pada penggunaannya dan nilai ekonominya. Selain itu enzim yang stabil dapat digunakan pada suhu tinggi, yang dapat menguntungkan pada laju reaksi, kelarutan reaktan, dan mengurangi risiko kontaminasi mikroba. Upaya peningkatan stabilitas enzim dapat dilakukan dengan berbagai cara diantaranya imobilisasi dan modifikasi kimia, rekayasa molekuler, dan penambahan bahan aditif (Kustyawati dkk., 2013). Penambahan zat aditif merupakan metode yang paling mudah dan ekonomis dibandingkan dengan metode imobilisasi dan modifikasi molekuler.

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan upaya peningkatan stabilitas enzim α -amilase dengan penambahan zat aditif diantaranya sorbitol (Yandri dkk., 2020), gliserol (Yandri dkk., 2020), dan polietilen glikol (PEG) 6000 (Assegaf, 2017). Berdasarkan penelitian tersebut diperoleh hasil yang menunjukkan bahwa penambahan zat aditif tertentu dapat meningkatkan stabilitas enzim α -amilase. Pada penelitian ini secara berurutan dilakukan isolasi, pemurnian, dan penambahan zat aditif polietilen glikol (PEG) 4000 pada enzim α -amilase dari fungi *Aspergillus sp.*, dengan harapan diperoleh peningkatan kestabilan enzim

setelah dilakukan penambahan zat aditif daripada sebelum dilakukan penambahan, seperti yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya.

1.2 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Memperoleh enzim α -amilase dari *Aspergillus sp.* dengan aktivitas dan kemurnian yang tinggi
- b. Memperoleh kestabilan enzim α -amilase dari *Aspergillus sp.* dengan penambahan PEG 4000.

1.3 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Memperoleh enzim α -amilase dengan stabilitas tinggi
- b. Memberikan informasi mengenai pengaruh penambahan PEG 4000 terhadap stabilitas enzim α -amilase dari *Aspergillus sp.*
- c. Memberikan informasi tentang nilai aktivitas, suhu optimum, K_M , V_{Maks} , k_i , $t_{1/2}$, dan ΔG_i enzim amilase hasil pemurnian dan hasil penambahan PEG 4000.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Enzim

Enzim adalah molekul protein kompleks yang dihasilkan oleh sel hidup dan bekerja sebagai katalisator dalam berbagai reaksi kimia dalam tubuh. Reaksi yang tidak melibatkan katalisator seringkali menghasilkan produk dengan spesifitas rendah bahkan tidak spesifik, sedangkan reaksi yang melibatkan katalisator menghasilkan produk yang spesifik tergantung dari spesifitas substrat yang diberikan (Prihanto dkk., 2018). Industri telah memberlakukan penerapan metode enzimatik yang mengalami perkembangan dalam industri sejak tahun 1960-an. Dalam bidang industri enzim menempati posisi penting dan paling dicari karena penggunaannya yang hemat energi dan ramah lingkungan (Santoso dkk., 2011). Riset-riset enzimologi telah mengungkapkan tentang beberapa keunggulan enzim dibandingkan dengan katalis kimia lain, antara lain:

a. Enzim sangat efisien

Enzim mampu mempercepat reaksi dengan faktor 10^8 hingga 10^{10} dibandingkan dengan reaksi tanpa katalisator.

b. Bekerja dalam kondisi yang sedang (tidak ekstrem)

Enzim bekerja pada kisaran pH netral dan dalam temperature antara 20-40 °C.

c. Bersifat *biodegradable* (dapat terurai secara biologis), dan ramah lingkungan

Enzim merupakan bagian dari system kehidupan yang bersifat alami. Bila terdegradasi menghasilkan berbagai asam amino yang “terserap” kembali oleh alam.

d. Dapat digunakan berulang-ulang

Karena enzim tidak mengalami perubahan yang permanen selama katalisis.

Sifat-sifat enzim yang unggul tersebut mendorong para peneliti untuk memanfaatkannya dalam kehidupan manusia (Sutrisno, 2017).

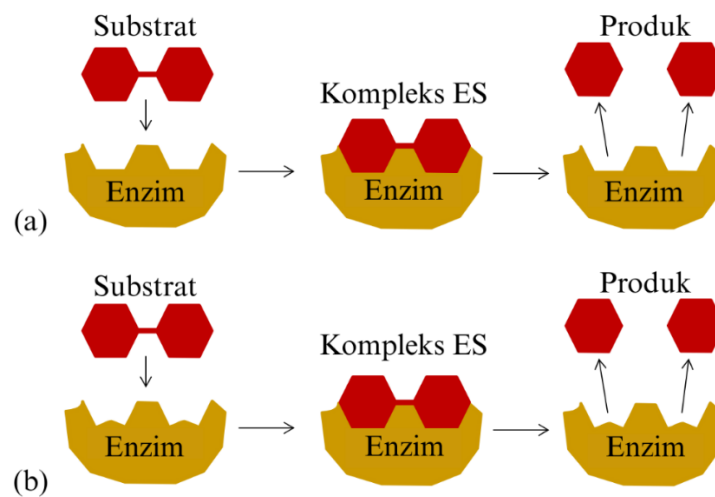
Terdapat enam kategori utama enzim: oksidoreduktase, transferase, hidrolase, lyase, isomerase, dan ligase. Masing-masing kategori melakukan jenis reaksi umum tetapi mengkatalisis banyak reaksi spesifik yang berbeda dalam kategorinya masing-masing. Beberapa enzim yang disebut apoenzim, tidak aktif sampai mereka terikat pada kofaktor yang mengaktifkan enzim tersebut. Kofaktor dapat berupa ion logam misalnya Zn atau senyawa organik yang menempel, baik secara kovalen maupun nonkovalen pada enzim. Kompleks kofaktor dan apoenzim disebut holoenzim. Enzim adalah protein yang terdiri dari asam amino yang dihubungkan bersama dalam satu atau lebih rantai polipeptida. Urutan asam amino dalam rantai polipeptida ini disebut struktur primer. Hal ini, pada gilirannya, menentukan struktur tiga dimensi enzim, termasuk bentuk situs aktifnya. Struktur sekunder suatu protein menggambarkan struktur rantai polipeptida terlokalisasi, misalnya heliks α atau lembaran β (Theodore and William, 2023).

2.1.1 Mekanisme Enzim

Enzim mengkatalisis suatu reaksi secara spesifik, hanya reaksi dan substrat tertentu yang dapat bekerja dengan fungsi katalisis suatu enzim tertentu. Enzim memiliki sisi aktif yang bertanggung jawab atas fungsi pengarahannya, pengikatan, dan proses katalisis yang tidak dapat ditemukan dalam jenis protein pada umumnya. Sisi aktif enzim memiliki struktur celah yang terbentuk oleh sisa asam amino pada rantai polipeptida enzim. Sebelum substrat diuraikan atau diikat, substrat perlu masuk ke dalam celah tersebut. Substrat yang memasuki celah tersebut harus memenuhi syarat-syarat tertentu antara lain kesesuaian dengan bentuk celah dan memiliki bagian yang labil agar dapat diikat atau diuraikan (Martoharsono, 2006).

Cara kerja enzim menghasilkan produk konkret dijelaskan dengan dua metode yaitu metode *lock and key* atau kunci dan gembok dan metode *induced-fit*. Teori

kunci dan gembok dikemukakan oleh Fisher, menggambarkan kerja spesifik enzim terhadap substrat tertentu melalui model kunci dan gembok. Menurut teori tersebut enzim memiliki bentuk geometris khusus yang hanya cocok dengan substrat tertentu. Teori kedua yaitu *induced-fit*, dikemukakan oleh Koshland yang menyatakan bahwa enzim memiliki tingkat fleksibilitas yang tinggi. Ketika molekul substrat berikatan dengan enzim, substrat akan menginduksi sisi aktif enzim untuk mengikat dan mengkatalisis reaksi (Kuddus, 2019). Mekanisme kerja enzim dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Mekanisme kerja enzim: (a) *Lock and key*; (b) *Induced-fit* (Kuddus, 2019).

2.2 Enzim Amilase

Enzim amilase merupakan enzim yang mampu mengkatalisis proses hidrolisa pati untuk menghasilkan molekul lebih sederhana seperti glukosa, maltosa, dan dekstrin (Nangin dan Sutrisno, 2015). Amilase memiliki kemampuan memecah ikatan glukosida pada polimer pati. Penggunaan amilase dilaporkan mengalami peningkatan setiap tahunnya, hingga permintaan akan enzim golongan amilase mencapai sekurang-kurangnya 23 % dari keseluruhan pasar enzim (Vaseekaran *et al.*, 2010). Seiring dengan perkembangan teknologi dan penemuan baru,

kelompok enzim amilase semakin bertambah antara lain α -amilase, β -amilase, dan γ -amilase (Aiyer, 2005). Di antara ketiga kelompok amilase tersebut, α -amilase adalah enzim yang paling banyak diproduksi karena α -amilase memiliki mekanisme kerja yang lebih cepat dan efisien dibandingkan β -amilase dan γ -amilase. Ia dapat memecah berbagai ikatan dalam molekul pati secara acak, yang memungkinkan produksi gula sederhana terjadi lebih cepat. Hal ini sangat penting dalam sistem pencernaan manusia yang memerlukan penguraian karbohidrat secara cepat untuk penyerapan nutrisi (Purnawan dkk., 2015).

Enzim α -amilase adalah salah satu kategori endoamilase yang bekerja dengan memutus ikatan α -1,4-glikosidik dalam struktur amilosa atau amilopektin. Produk akhir dari degradasi dari amilosa atau amilopektin adalah oligosakarida dengan berbagai variasi panjang rantai. α -amilase berfungsi memutus rantai pati secara acak, menghasilkan glukosa, maltose, maltoriosa, dan alfa-limit dekstrin.

Beberapa α -amilase memiliki sifat termotabil dan holotoleran sehingga cocok digunakan dalam industri yang memerlukan stabilitas pada suhu tinggi dan di lingkungan dengan kandungan garam tinggi (Far *et al.*, 2020). Enzim amilase akan memecah substrat pati melalui tiga tahapan utama yaitu gelatinisasi, likuifikasi, dan sakarifikasi (Kaneko *et al.*, 2015). Pada tahap gelatinisasi, pati yang awalnya padat dan tidak larut dalam air akan mengalami perubahan struktur akibat pemanasan. Granula pati akan menyerap air dan membengkak, membentuk gel yang kental. Setelah pati mengalami gelatinisasi, enzim amilase khususnya α -amilase akan bertindak. Enzim ini menghidrolisis ikatan glikosidik dalam pati, memecahnya menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana seperti dekstrin dan oligosakarida. Proses ini menyebabkan gel pati menjadi cair atau likuid. Pada tahap terakhir, enzim lain seperti glukamilase (amiloglukosidase) akan menghidrolisis dekstrin dan oligosakarida lebih lanjut menjadi glukosa dan maltose (Suhendrayatna dkk., 2023).

2.3 Jamur *Aspergillus sp.*

Jamur *Aspergillus* adalah spesies jamur kontaminan bersifat kosmopolitan yang mudah menyebarluas karena spora jamur yang dapat disebarkan melalui udara sehingga mudah tumbuh pada bahan-bahan pangan atau produksi hasil pertanian. Adapun dampak kesehatan yang dapat disebabkan oleh jamur *Aspergillus* diantaranya adalah demam, radang, sesak nafas, batuk-batuk, nyeri dada dan sendi, menggigil serta sakit kepala (Hasanah, 2017). *Aspergillus* merupakan salah satu mikroorganisme eukariot yang dapat menyebar luas dan berlimpah di alam. *Aspergillus* diketahui dapat menghasilkan enzim yang dapat membantu aktivitas biodegradatif, yaitu fermentasi makanan dan proses industri lainnya industri makanan, konversi biomasa, pengolahan limbah, dan produksi bahan kimia. salah satu enzim yang dihasilkan dari *Aspergillus* adalah enzim amilase dengan berbagai keunggulannya, seperti kapasitas produksi massal yang lebih ekonomis, waktu yang lebih singkat, dan lebih stabil (Jinu, 2017).

Cendawan *Aspergillus sp.* merupakan salah satu jenis cendawan yang menguntungkan dalam dunia pertanian, salah satunya yaitu dapat dimanfaatkan sebagai agensia hayati. Cendawan *Aspergillus sp.* mampu menghasilkan metabolit sekunder. Metabolit sekunder merupakan senyawa metabolit primer yang telah melalui tahap biosintetik (Murniasih, 2003). *Aspergillus sp.* merupakan tipe cendawan yang bersifat aerobik. Cendawan *Aspergillus sp.* juga memiliki potensi untuk melarutkan unsur fosfat dalam tanah dengan mensekresikan asam-asam organik, seperti asam format, asetat, propionat, laktat, glikolat, fumarat, dan suksinat sehingga dapat dimanfaatkan oleh tanaman dan juga dapat menjaga serta meningkatkan kualitas tanah (Mawarni *et al.*, 2021). Jamur *Aspergillus sp.* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. *Aspergillus sp.* (Ariyono, 2014).

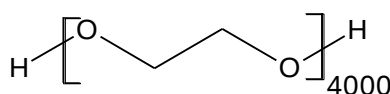
Cendawan *Aspergillus sp.* biasanya mudah ditemui di lahan-lahan dengan kualitas tanah yang baik, misalnya tanah dengan kadar bahan organik yang tinggi. Berdasarkan hal tersebut budidaya tanaman secara organik tentunya sangat berpotensi untuk menjaga kualitas tanah serta menopang ketersediaan mikroorganisme menguntungkan di dalam tanah, salah satunya yaitu cendawan *Aspergillus sp.* Cendawan memang dapat diisolasi lebih banyak pada lahan yang menerapkan sistem pertanian organik. Isolasi cendawan yang dilakukan pada lahan dengan sistem pertanian organik menghasilkan 47 spesies cendawan dengan total 60 koloni, termasuk di dalamnya adalah cendawan *Aspergillus sp.* (Ariyono, 2014).

2.4 Senyawa Poliol

Poliol atau polialkohol adalah suatu senyawa yang mempunyai gugus hidroksil lebih dari satu (Park *et al.*, 2022). Kestabilan enzim dapat ditingkatkan dengan berbagai cara seperti modifikasi kimia, imobilisasi, dan penambahan zat aditif. Dari ketiga cara tersebut, penambahan zat aditif adalah cara yang paling mudah dan ekonomis. Beberapa aditif yang diketahui dapat mempertahankan kestabilan enzim diantaranya adalah gula (sukrosa dan laktosa), alkohol polihidrat (poliol), garam-garam (amonium disulfida), dan macam-macam polimer (Coste *et al.*, 2015).

2.5 Polietilen Glikol-4000

Polietilena merupakan polimer sintetik hasil rekayasa. Polimer umumnya dikelompokkan berdasarkan perilaku mekanik dan struktur rantai molekulnya. Salah satu contoh jenis polimer termoplastik adalah polietilena yang merupakan polimer yang memiliki sifat-sifat termoplastik karena struktur rantainya yang linear, bercabang (*branched*), atau sedikit bersambung (*cross linked*). Polimer dengan jenis tersebut bersifat lunak dan kental (*viscous*) saat dipanaskan dan menjadi keras dan kaku (*rigid*) saat didinginkan (Saputro dkk., 2012). Polietilen glikol (PEG) 4000 adalah polimer yang sering digunakan dalam sediaan farmasi dan kosmetik sebagai pelarut, pembawa, dan penstabil sediaan. PEG 4000 juga digunakan dalam penelitian untuk berbagai aplikasi, seperti deteksi ion merkuri dan studi stabilitas enzim (Kurniawati dan Zulkarnain, 2012). PEG memiliki kemampuan larut yang baik dalam air dan asam secara struktur kimia karena terdapat gugus hidroksil primer pada ujung rantai polieter yang mengandung oksietilen ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$). Polietilen glikol atau PEG teraktivasi merupakan reagen yang banyak digunakan sebagai zat pemodifikasi enzim. PEG teraktivasi mengandung gugus reaktif yang dihubungkan langsung dengan gugus fungsi dalam enzim (Yang *et al.*, 1996). Struktur kimia PEG dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Struktur kimia PEG 4000.

PEG merupakan polimer etilen oksida dan air yang dibuat dengan berbagai variasi panjang rantainya. PEG terdapat dalam berbagai macam berat molekul diantaranya 200, 400, 600, 1000, 1500, 1540, 3350, 4000, dan 6000. Pemberian nomor didasarkan pada berat molekul. Pada variasi lebih dari 1000 secara fisik PEG berupa padatan lilin putih. Semakin besar nilai berat molekul PEG, maka semakin padat wujudnya dan sebaliknya. PEG memiliki beberapa keunggulan antara lain fisiologi inert, tidak terhidrolisis, tidak mendukung pertumbuhan

jamur, stabil, dan juga dapat mengikat pigmen. PEG juga memiliki titik lebur yang sangat tinggi yaitu 580 °F (Leuner *and* Dressman, 2000).

2.6 Isolasi dan Pemurnian Enzim

Isolasi dan pemurnian enzim adalah proses penting dalam biokimia yang bertujuan untuk memisahkan enzim dari sumbernya dan meningkatkan kemurnian agar dapat digunakan dalam berbagai aplikasi, seperti penelitian dan industri. Proses ini umumnya melibatkan beberapa tahap yang saling terkait. Berdasarkan letak kerjanya, enzim dikelompokkan menjadi enzim intraseluler dan enzim ekstraseluler. Enzim intraseluler umumnya berfungsi di dalam sel dan terletak di dalam sel itu sendiri, sedangkan enzim ekstraseluler dilepaskan dari dalam sel ke lingkungan sekitarnya untuk memecah polimer dalam lingkungan tersebut (Maier *et al.*, 2000).

Enzim α -amilase adalah jenis enzim ekstraseluler yang dapat dilepaskan dari sel mikroba melalui proses sentrifugasi tanpa memerlukan pemecahan sel (Faatih, 2009). Tahap isolasi dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan enzim dari makromolekul lain yang berasal dari dalam sel mikroba seperti asam nukleat, karbohidrat, dan protein (Okafor *and* Okeke, 2018). Pemurnian enzim bertujuan untuk memisahkan enzim yang diinginkan dari zat pengotor yang tidak diinginkan. Metode yang umum digunakan dalam tahap pemurnian enzim adalah fraksinasi dan dialisis.

2.6.1 Sentrifugasi

Sentrifugasi dilakukan untuk memisahkan enzim dari sisa sel yang telah hancur sehingga ekstrak kasar enzim didapatkan. Sentrifugasi dilakukan pada suhu rendah serta campuran yang berisi enzim ditambahkan larutan buffer yang berguna untuk menjaga agar pH enzim stabil. Setelah sentrifugasi selesai, enzim hasil isolasi berada pada fasa cair (Rahmi dkk., 2020). Sentrifus merupakan alat

untuk memutar sampel pada kecepatan tinggi. Perputaran ini akan memaksa partikel yang lebih berat terkumpul ke dasar tabung sentrifus. Sentrifus bekerja dengan menggunakan prinsip sedimentasi di mana percepatan sentripetal yang menyebabkan zat padat untuk memisahkan sepanjang arah radial (bagian bawah tabung). Oleh objek yang sama ringan massanya akan cenderung bergerak ke atas (Bunjevac *et al.*, 2018). Umumnya sel-sel mikroba akan mengalami pengendapan pada kecepatan 5000 rpm selama 15-20 menit (Santos *et al.*, 2015).

2.6.2 Fraksinasi dengan Amonium Sulfat

Fraksinasi adalah proses pemisahan fraksi yang terkandung dalam suatu larutan berdasarkan perbedaan karakteristiknya (Yuliasih, 2010). Fraksinasi enzim amilase umumnya dilakukan dengan teknik fraksinasi menggunakan metode *salting out* (pengendapan) yang melibatkan garam amonium sulfat berkonsentrasi tinggi. Hal ini menyebabkan peningkatan kekuatan ion garam yang kemudian berinteraksi dengan air dan mengendapkan enzim (Iswendi, 2010). Setiap fraksi dan enzim amilase kasar diuji aktivitasnya menggunakan metode Fuwa. Keunggulan dari dilakukannya metode fraksinasi menggunakan amonium sulfat adalah jarang didapati peristiwa denaturasi enzim, terjadi peningkatan stabilitas enzim, dan biaya penelitian yang lebih ekonomis (Golunski *et al.*, 2017).

2.6.3 Dialisis

Dialisis adalah teknik pemurnian enzim yang memanfaatkan difusi ion-ion garam melalui membran semipermeabel seperti kantong selofan. Kantong selofan memiliki berbagai ukuran pori. Ukuran pori yang dipilih disesuaikan dengan ukuran ion dalam sampel. Proses dialisis terjadi karena adanya perbedaan tekanan osmotik antara cairan di kedua sisi membran. Ion-ion garam berdifusi dari area dengan tekanan osmotik tinggi ke area dengan tekanan osmotik lebih rendah (Bollag *et al.*, 1996). Dialisis dilakukan setelah tahap fraksinasi. Larutan enzim

yang telah melalui tahap fraksinasi memiliki ion-ion garam dengan tekanan osmotik yang lebih tinggi dibandingkan dengan larutan buffer yang memiliki konsentrasi rendah sepanjang proses dialisis (Bollag *et al.*, 1996).

Akibatnya ion-ion garam berdifusi keluar membran, sedangkan molekul air dari larutan buffer dengan tekanan osmotik yang lebih rendah akan bergerak ke dalam membran. Sehingga enzim tertahan di dalam membran karena ukurannya yang lebih besar daripada pori-pori membran, sementara ion-ion garam yang lebih kecil berhasil melewati pori-pori membran. Untuk menghindari denaturasi enzim, dialisis baik dilakukan pada suhu antara 2-4 °C (Bollag *et al.*, 1996). Dialisis dihentikan ketika semua garam amonium sulfat telah keluar dari membran. Untuk mengetahui hal tersebut dilakukan pengujian menggunakan larutan BaCl₂ dan HCl (Wardani dan Nindita, 2012).

2.7 Uji Aktivitas Enzim α -Amilase

Aktivitas enzim α -amilase dapat ditentukan menggunakan metode uji Fuwa dan Mandels. Metode Fuwa digunakan pada tahap isolasi dan pemurnian, sedangkan metode Mandels dilakukan untuk menentukan data kinetika dan sebagai metode karakterisasi enzim (Yandri dkk., 2020). Semakin tinggi tingkat aktivitas spesifik suatu enzim menjadi indikator semakin meningkatnya kemurnian enzim (Novak and Havlicek, 2016).

2.7.1 Metode Fuwa

Metode Fuwa adalah teknik untuk mengukur aktivitas enzim α -amilase dengan cara menghitung jumlah pati yang terhidrolisis, yang menghasilkan perubahan warna menjadi biru setelah penambahan iodine. Perubahan warna ini akan menyerap cahaya pada panjang gelombang maksimum sekitar 600 nm. Uji Fuwa dianggap sebagai metode yang sangat spesifik untuk mengidentifikasi aktivitas enzim amilase karena waktu reaksi yang singkat, sekitar 10 menit inkubasi, dan

penggunaan pati sebagai substrat. Pada kontrol, iodine (I_2) akan terikat pada rantai spiral pati (amilosa) dan menghasilkan larutan berwarna biru. Enzim yang telah diinaktivasi dengan HCl sebelumnya memastikan substrat tetap utuh dan tidak terhidrolisis, sehingga larutan tetap berwarna biru. Pada sampel, enzim akan membentuk kompleks dengan substrat, membentuk kompleks enzim-substrat yang kemudian bereaksi dengan larutan iodine, menghasilkan larutan berwarna kuning yang dapat diukur menggunakan spektrofotometer. Semakin banyak pati yang terhidrolisis, semakin terang warna kuning larutan, karena pati yang berikatan dengan iodine dan enzim semakin berkurang dan berubah menjadi produk, yaitu glukosa. Selain itu, enzim akan melepaskan ikatan spiral antara iodine dan pati, menyebabkan warna larutan menjadi kuning cerah (Fuwa, 1954).

2.7.2 Metode Mandels

Metode Mandels dilakukan dengan prinsip pembentukan gula pereduksi diantaranya glukosa yang kemudian mengalami oksidasi oleh asam 2-hidroksi-3,5-dinitrosalisilat (DNS), menghasilkan larutan berwarna merah jingga. Warna tersebut menyerap cahaya pada panjang gelombang maksimum 510 nm (Eveleigh *et al.*, 2009).

2.8 Metode Lowry

Metode Lowry bertujuan untuk menentukan kadar protein dalam suatu sampel. Metode ini merupakan pengembangan dari metode Biuret dan melibatkan reaksi kompleks antara ion tembaga (Cu^{2+}) dengan protein dalam suasana alkali, yang kemudian menghasilkan warna biru yang dapat diukur secara spektrofotometri. Dalam metode ini ion Cu^{2+} bereaksi dengan ikatan peptida pada enzim (protein) yang mengandung rantai samping tirosin atau triptofan. Ion Cu^{2+} membentuk kompleks protein lalu tereduksi menjadi Cu^+ dalam suasana alkalis. Kemudian kompleks Cu^+ dan protein berinteraksi dengan reagen Folin Ciocalteu's phenol.

Protein secara bertahap mengurangi reagen tersebut, membentuk senyawa heteromolibdenum yang menghasilkan warna hijau kebiruan. Warna tersebut memiliki penyerapan cahaya pada panjang gelombang maksimum 750 nm. Intensitas warna yang terbentuk tergantung pada jumlah tirosin dan triptofan yang ada dalam sampel protein (Lowry *et al.*, 1951).

2.9 Kinetika Reaksi Enzim

Kinetika enzim adalah salah satu cabang enzimologi yang membahas faktor-faktor yang mempengaruhi kecepatan reaksi enzimatik, salah satunya adalah konsentrasi substrat. Apabila konsentrasi substrat (S) sangat rendah, sebagian besar molekul enzim (E) bebas, dan apabila konsentrasi substrat (S) meningkat, keterlibatan molekul enzim dalam pembentukan kompleks enzim-substrat (ES) juga meningkat. Jika konsentrasi substrat terus meningkat, akan tercapai suatu titik di mana hampir semua molekul enzim ditempati oleh substrat. Pada titik ini, enzim menjadi jenuh dengan substrat. Jika melebihi jumlah enzim, akan tercapai *steady state*, keadaan di mana laju reaksi tidak akan meningkat lagi

(Blanco *and* Blanco, 2017).

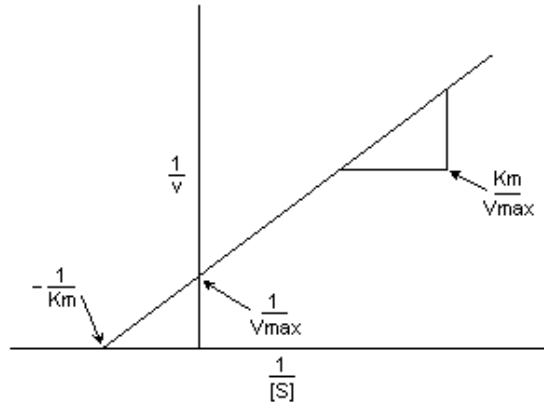
Setiap enzim memiliki nilai K_M dan V_{Maks} yang berbeda dengan substrat spesifik pada suhu dan pH tertentu (Kamelia dkk., 2005). Nilai K_M yang kecil menunjukkan bahwa kompleks enzim-substrat sangat efisien dengan afinitas tinggi terhadap substrat, sedangkan jika nilai K_M suatu enzim besar maka enzim tersebut memiliki afinitas rendah terhadap substrat (Page, 1997). Nilai K_M suatu enzim dapat diperoleh dari persamaan Michaelis-Menten (Persamaan 1) yang kemudian menghasilkan suatu diagram Lineweaver-Burk (Persamaan 2) berikut: Persamaan 1. Michaelis-Menten.

$$V_0 = \frac{V_{Maks} [S]}{K_M + [S]} \dots\dots\dots (1)$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M [S]}{V_{Maks} + [S]}$$

Persamaan 2. Lineweaver-Burk.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{Maks}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{Maks}} \dots\dots\dots (2)$$



Grafik *Lineweaver-Burk* (Suhartono, 1989).

2.10 Stabilitas Enzim

Stabilitas enzim adalah keadaan stabil aktivitas enzim selama penyimpanan dan penggunaan penyimpanan enzim tersebut, serta kestabilan terhadap senyawa yang bersifat merusak seperti pelarut tertentu (asam atau basa), oleh pengaruh suhu kondisi-kondisi non fisiologis lainnya (Kazan *et al.*, 1997). Stabilitas enzim merupakan sifat penting yang harus dimiliki oleh enzim sebagai biokatalis. Enzim memiliki kestabilan yang lebih baik dibandingkan dengan katalis sintetik karena enzim berspesifitas tinggi, yang artinya bekerja secara spesifik (hanya bisa mengkatalis substrat tertentu), reaksinya tidak menghasilkan produk samping yang tidak diinginkan, produktif, produk akhirnya tidak terkontaminasi sehingga mengurangi biaya pemurnian, dan mengurangi efek kerusakan pada lingkungan (Chaplin *and* Bucke, 1990). Terdapat dua cara yang dapat dilakukan untuk mendapatkan enzim dengan stabilitas tinggi, yaitu menggunakan enzim yang mempunyai stabilitas ekstrem alami dan mengusahakan peningkatan stabilitas enzim yang secara alami atau kurang stabil. Faktor-faktor yang mempengaruhi stabilitas enzim antara lain seperti pH, suhu, kofaktor, dan kehadiran surfaktan (Eijnsink *et al.*, 2005).

2.10.1 Stabilitas Terhadap Suhu

Hampir semua enzim memiliki aktivitas optimum pada temperatur sekitar 30 °C dan denaturasi dimulai pada temperatur 45 °C (Winarno, 2002). Pada suhu yang terlalu rendah kemantapan enzim, tetapi aktivitasnya rendah. Sedangkan pada suhu yang terlalu tinggi aktivitas enzim tinggi, tetapi kemantapannya rendah. Daerah suhu saat kemantapan dan aktivitas enzim cukup besar disebut suhu optimum (Wirahadikusuma, 2001).

Proses inaktivasi enzim pada suhu tinggi berlangsung dalam dua tahap yaitu:

- a. Adanya pembukaan partial (*Partial unfolding*) struktur sekunder, tersier dan atau kuartener molekul enzim.
- b. Perubahan struktur primer enzim karena adanya kerusakan asam amino tertentu oleh panas (Ahern *and* Klibanov, 1987).

2.10.2 Stabilitas Terhadap pH

Perubahan struktur primer enzim karena adanya kerusakan asam amino tertentu oleh panas (Ahern *and* Klibanov, 1987). Semua reaksi enzim dipenuhi oleh pH medium tempat reaksi terjadi (Suhartono, 1989). Diperkirakan perubahan keaktifan pH lingkungan disebabkan terjadinya perubahan ionisasi enzim, substrat, atau kompleks enzim substrat. Enzim menunjukkan aktivitas optimum pada kisaran pH optimum enzim dengan stabilitas yang tinggi (Winarno, 2002).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober sampai dengan bulan Mei 2025 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung yang berlokasi di Jl. Prof. Dr. Ir. Soemantri Brodjonegoro No. 1, Gedong Meneng, Kec. Rajabasa, Kota Bandar Lampung, Lampung 35141.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Adapun alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, jarum ose, pembakar spirtus, *autoclave* Gea L5-35L EDAM 63, neraca analitik Lucky DJ-V220A, inkubator Precistern P1 Selecta, *laminar air flow* (LAF) Crumair 9005-FL, *orbital shaker* Kang Jian KJ-201BD dan Daihan Labtech, sentrifuga Cole Parmer, mikropipet Eppendorf, mikrotip, tabung sentrifuga, pot urin, pH meter Metrohm, *magnetic stirrer* Stuart, *waterbath* Memmert W 350, lemari pendingin, dan spektrofotometer UV-*Vis* Shimadzu 7280.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah PEG-4000, *Potato Dextrose Agar*/PDA (Himedia™), pati singkong (Pak Tani), *starch* (Merck™), KH_2PO_4 (Merck™), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck™), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck™), Na_2SO_3 (Merck™), Na_2CO_3 (Merck™), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (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™), akuades, buffer fosfat (NaH_2PO_4 (Merck™) dan Na_2HPO_4 (Merck™), pereaksi iodin (I_2/KI), HCl pekat (Merck™), NaOH (Merck™), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck™), Na/K tartarat (Merck™), Folin Ciocalteu's phenol (Merck™), larutan *Bovine Serum Albumin* (BSA), D-glukosa (Merck™), asam-hidroksi-3,5-dinitrosalisilat/DNS (Sigma-Aldrich™), fenol (Merck™), pepton (Himedia™), urea (Himedia™), alkohol 70 %, es batu, aluminium foil, kertas, tisu, spirtus, plastik wrap, kantong selofan, karet gelang, kertas saring, kapas sumbat, dan kasa.

3.3 Prosedur Penelitian

Prosedur kerja dalam penelitian ini dilakukan dengan seksama, cermat, dan memperhatikan faktor keselamatan kerja. Adapun prosedur kerja pada penelitian ini terbagi menjadi beberapa subbagian.

3.3.1 Tahap Preparasi

Peralatan gelas yang akan digunakan dicuci bersih, dikeringkan, dan disterilisasi agar alat-alat terhindar dari kontaminasi mikroba yang tidak diinginkan. Sterilisasi alat dilakukan dengan menggunakan *autoclave* pada suhu $121\text{ }^\circ\text{C}$, 1 atm, selama 15 menit.

3.3.2 Pembiakan Isolat *Aspergillus sp.*

3.3.2.1 Pembuatan media agar miring

Pembuatan media agar miring dilakukan dengan menimbang sebanyak 3,9 gram PDA, kemudian dilarutkan 0,1 gram pati dalam 100 mL akuades, lalu dipanaskan sambil diaduk hingga larut sempurna. Kemudian media dituang sebanyak 5 mL ke dalam beberapa tabung reaksi. Tabung reaksi ditutup dengan sumbat kapas, alumunium foil, kertas dan karet, serta dimasukkan ke dalam plastik tahan panas, lalu disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C, tekanan 1 atm, selama 15 menit. Setelah itu media diletakkan pada bidang miring selama 24 jam pada kondisi aseptis sampai mengeras (Nwagu *and* Okolo, 2011).

3.3.2.2 Pembiakan *Aspergillus sp.*

Pembiakan jamur *Aspergillus sp.* dilakukan dengan mengambil tiga ose biakan murni *Aspergillus sp.* lalu dimasukkan ke dalam media agar miring dengan cara ditusuk. Media agar yang telah mengandung isolat diinkubasi selama beberapa hari dalam inkubator pada suhu 37 °C. Pembiakan ini dilakukan secara aseptis di dalam *Laminar Air Flow* (LAF) yang telah disterilisasi oleh sinar UV (Yandri *et al.*, 2010).

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

3.3.3.1 Pembuatan media inokulum dan fermentasi

Media inokulum dan media fermentasi dibuat dari bahan-bahan yang sama, menandakan mengandung nutrisi yang sama, yaitu: 2,0 % KH_2PO_4 ; 1,40 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,75 % pati; 0,75 % pepton; 0,30 % urea; 0,30 % CaCl_2 ; 0,30 % MgSO_4 ; 0,005 % $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,002 % CoCl_2 ; 0,0014 % $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Deb *et*

al., 2013). Media inokulum dibuat dalam 50 mL buffer fosfat 0,05 M pH 6, sedangkan media fermentasi dibuat sebanyak 250 mL buffer fosfat 0,05 M pH 6 pada labu Erlenmeyer berukuran dua kali volume larutan (500 mL) untuk memberi ruang aerob. Setelah itu, media dipanaskan hingga mendidih, lalu labu Erlenmeyer ditutup sumbat kapas, aluminium foil, dan kertas. Kemudian, media disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121 °C, 1 atm, selama 15 menit. Setelah itu, media didiamkan dalam kondisi aseptis 12 jam dalam LAF untuk menghindari kontaminasi.

3.3.3.2 Inokulasi *Aspergillus sp.*

Inokulasi dilakukan secara aseptis di dalam *Laminar Air Flow* (LAF) Sebanyak 3 tarikan ose isolat *Aspergillus sp.* dari media agar miring dipindahkan ke dalam 50 mL media inokulum. Kemudian media inokulum diinkubasi sambil dikocok menggunakan *shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam pada suhu ruang (Deb *et al.*, 2013).

3.3.3.3 Produksi enzim α -amilase

Produksi enzim α -amilase dilakukan dengan memindahkan media inokulum sebanyak 2% dari jumlah media fermentasi ke dalam media fermentasi lalu diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm pada suhu ruang selama 72 jam (Yandri *et al.*, 2022).

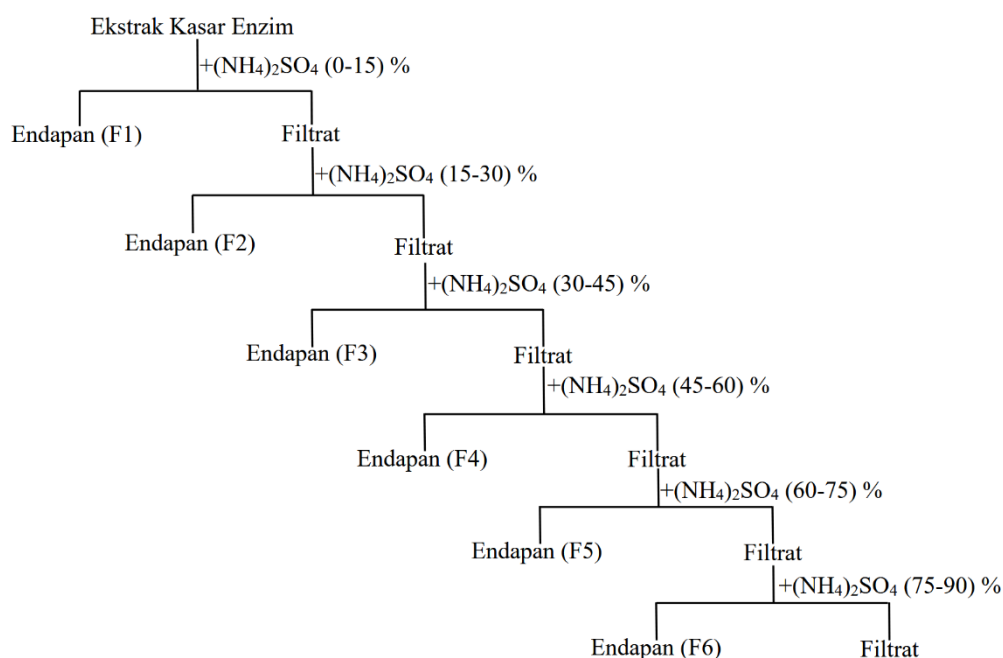
3.3.4 Isolasi Enzim α -Amilase dari *Aspergillus sp.*

Isolasi enzim α -amilase dilakukan dengan sentrifugasi hasil fermentasi pada suhu 4 °C pada kecepatan 15 menit pada kecepatan 5000 rpm. Sentrifugasi dalam suhu dingin dilakukan agar enzim tidak terdenaturasi. Supernatan (filtrat) dipisahkan

dari pellet (endapan pengotor). Supernatan yang diperoleh adalah ekstrak kasar enzim. Ekstrak kasar enzim α -amilase kemudian ditentukan nilai aktivitasnya dengan metode Fuwa dan metode Mandels, serta diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.

3.3.5 Fraksinasi dengan Amonium Sulfat

Ekstrak kasar enzim yang diperoleh dimurnikan dengan metode fraksinasi menggunakan garam amonium sulfat dari berbagai derajat kejenuhan, yakni (0-15), (15-30), (30-45), (45-60), (60-75), dan (75-90) %. Filtrat yang didapat dari fraksi (0-15) % digunakan untuk diendapkan kembali dengan fraksi kejenuhan (15-30) % dengan prosedur yang sama hingga tingkat kejenuhan (75-90) %. Skema fraksinasi dengan amonium sulfat ditunjukkan dalam Gambar 4 berikut.



Gambar 4. Skema fraksinasi.

Fraksinasi dilakukan dengan memasukkan sebanyak 100 mL ekstrak kasar enzim ke dalam gelas kimia. Gelas kimia yang digunakan diletakkan dalam wadah berisi air dingin untuk mencegah terjadinya denaturasi enzim oleh panas selama dilakukan pengadukan. Pengadukan dilakukan dengan kecepatan yang stabil.

Pengadukan yang dilakukan terlalu cepat dapat memicu terjadinya denaturasi enzim yang dapat ditandai dengan munculnya busa. Kemudian ditambahkan padatan garam amonium sulfat dengan konsentrasi (0-15) % secara perlahan selama 5-10 menit ke dalam larutan ekstrak kasar enzim. Secara umum garam akan larut dalam waktu 20-30 menit. Namun pada konsentrasi tinggi, garam sulit larut sehingga membutuhkan waktu lebih lama untuk larut sempurna. Selanjutnya larutan hasil fraksinasi disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit dalam suhu dingin. Endapan yang diperoleh dipisahkan dari filtratnya menggunakan kertas saring. Endapan tersebut kemudian dilarutkan dengan buffer fosfat pH 6 pada konsentrasi pH 6 pada konsentrasi 0,025 M untuk menstabilkan pH enzim dari pengaruh sedikit pengasaman selama melarutkan garam. Selanjutnya filtrat yang didapat dari fraksi (0-15) % digunakan untuk diendapkan kembali dengan fraksi kejenuhan (15-30)% dengan prosedur yang sama hingga fraksi kejenuhan (75-90) % (Yandri *et al.*, 2022).

3.3.6 Dialisis

Enzim hasil fraksinasi dengan aktivitas yang tinggi dimurnikan melalui dialisis. Dialisis dilakukan dengan memasukkan enzim ke dalam kantong selofan, lalu direndam dalam buffer fosfat pH 6 konsentrasi 0,01 M dan diaduk dengan magnetic stirrer selama 24 jam. Buffer fosfat diganti secara berkala setiap 4-6 jam sekali agar konsentrasi ion dalam kantong selofan dapat dikurangi. Proses pergantian buffer ini dilakukan secara kontinu hingga konsentrasi ion dalam kantong selofan dapat diabaikan. Untuk memastikan bahwa sudah tidak ada lagi ion-ion garam dalam kantong selofan, dilakukan uji dengan menambahkan larutan $\text{Ba}(\text{OH})_2$ atau BaCl_2 di luar selofan (Wardani dan Nindita, 2012). Jika terbentuk endapan putih BaSO_4 artinya masih terdapat ion sulfat dalam kantong. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas dengan metode Fuwa dan metode Mandels, serta dilakukan uji kadar proteinnya dengan metode Lowry.

3.3.7 Uji Aktivitas Enzim α -Amilase dengan Metode Fuwa

3.3.7.1 Pembuatan reagen Fuwa

Reagen Fuwa terdiri dari pereaksi iodin, larutan substrat pati, dan larutan HCl konsentrasi 1 N.

1) Pembuatan pereaksi iodin

Sebanyak 2 gram KI dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan dilarutkan dengan sedikit akuades. Kemudian dalam larutan tersebut ditambahkan 0,2 gram I_2 . Setelah itu ditambahkan akuades hingga batas meniskus labu ukur. Larutan dikocok hingga I_2 larut sempurna ditandai dengan terbentuknya larutan berwarna jingga kemerahan.

2) Pembuatan larutan substrat pati 0,1 %

Sebanyak 1 gram pati (*soluble starch*) dilarutkan dalam 100 mL akuades, kemudian dipanaskan sambil diaduk hingga larut.

3) Pembuatan larutan HCl 0,1 N

HCl pekat 12 N diencerkan menjadi HCl 1N sebanyak 100 mL, dengan menambahkan 8,33 mL HCl pekat dengan akuades hingga batas meniskus pada labu ukur 100 mL.

3.3.7.2 Uji aktivitas enzim α -Amilase

Sebanyak 0,25 mL ekstrak kasar enzim ditambahkan dengan 0,25 mL pati 0,1 % dalam tabung reaksi. Kemudian diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 60 °C selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan 0,25 mL HCl 1 N untuk menghentikan reaksi, lalu ditambahkan 0,25 mL pereaksi iodin dan 10 mL akuades. Kontrol dibuat dengan cara yang sama namun hanya menggunakan 0,25 mL enzim yang telah diinaktivasi dengan menggunakan HCl. Larutan dikocok hingga homogen kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) 600 nm.

3.3.8 Uji Aktivitas Enzim α -Amilase dengan Metode Mandels

3.3.8.1 Pembuatan pereaksi *dinitrosalicylic acid* (DNS)

Dimasukkan 1 gram DNS, 1 gram NaOH, 0,2 gram fenol, 0,05 gram Na₂SO₃, 1 mL Na-K tartrat 40 % ke dalam gelas ukur 250 mL dan larutkan dengan 50 mL akuades. Larutan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen dan pindahkan ke dalam labu takar 100 mL yang telah ditutup menggunakan aluminium foil, kemudian tambahkan akuades hingga batas meniskus.

3.3.8.2 Uji aktivitas enzim amilase

Uji aktivitas enzim α -amilase dengan metode Mandels dilakukan dengan menambahkan 0,25 mL enzim dan 0,25 mL pati 0,1 % dalam tabung reaksi. Kemudian diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 60 °C selama 30 menit. Setelah 30 menit ditambahkan reagen DNS, lalu dididihkan selama 10 menit menggunakan penangas air. Selanjutnya didiamkan pada suhu ruang dan ditambahkan dengan 1,5 mL akuades. Kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-*Vis* pada λ_{maks} 510 nm.

3.3.9 Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

3.3.9.1 Pembuatan pereaksi

1. Pereaksi A: 2 gram Na₂CO₃ dalam 100 mL NaOH 0,1 N.
2. Pereaksi B: 5 mL CuSO₄·5H₂O 1 % ditambahkan ke dalam 5 mL larutan Na/K-tartarat 1 %.
3. Pereaksi C: 2 mL pereaksi B ditambahkan ke dalam 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 (Lowry *et al.*, 1951).

3.3.9.2 Penentuan kadar protein

Sebanyak 0,1 mL enzim ditambahkan dengan 0,9 mL akuades. Kemudian direaksikan dengan 5 mL pereaksi C dan dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruang. Lalu cepat ditambahkan 0,5 mL pereaksi D, diaduk dengan sempurna, dan didinginkan selama 30 menit pada suhu ruang. Pada kontrol, 0,1 mL enzim diganti dengan 0,1 mL akuades, dengan perlakuan yang sama dengan sampel. Kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometer Uv-Vis pada λ_{maks} 750 nm. Lalu digunakan kurva standar *Bovine Serum Albumin* (BSA) dan perhitungan metode Lowry untuk menentukan kadar protein.

3.3.10 Penambahan Polietilen Glikol (PEG) 4000

Pada ekstrak kasar enzim yang telah dimurnikan, ditambahkan larutan polietilen glikol (PEG) 4000 dengan konsentrasi 12, 18, dan 24 % dengan perbandingan 1:1. Penambahan dilakukan dengan melarutkan 0,125 mL enzim dengan 0,125 mL polietilen glikol (PEG) 4000 dalam tabung reaksi.

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

Karakterisasi dilakukan dengan penentuan pH optimum, suhu optimum, kinetika enzim (K_M dan V_{maks}), dan uji stabilitas termal enzim.

3.3.11.1 Penentuan pH optimum

pH optimum ditentukan dengan memvariasikan pH buffer asetat/fosfat dengan variasi pH 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; dan 7. Kemudian aktivitas enzim diuji dengan metode Mandels.

3.3.11.2 Penentuan suhu optimum

Untuk mengetahui suhu optimum enzim α -amilase hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan polietilen glikol (PEG) 4000, dapat dilakukan dengan memvariasikan suhu pada saat inkubasi dengan variasi suhu 40, 45, 50, 55, 60, 65, dan 70 °C. Kemudian aktivitas enzim diuji dengan metode Mandels.

3.3.11.3 Penentuan kinetika enzim (K_M dan V_{maks})

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

3.3.11.4 Uji stabilitas termal enzim

Stabilitas termal enzim ditentukan dengan mengukur aktivitas sisa enzim setelah inkubasi selama periode waktu 100 menit pada suhu optimum hasil penentuan sebelumnya dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) dengan mengukur

aktivitas enzim setelah inkubasi selama 0,10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, dan 100 menit.

Persamaan 3. Aktivitas sisa

$$\text{Aktivitas (\%)} = \frac{E_i}{E_0} \times 100 \% \dots\dots\dots (3)$$

Keterangan:

E_0 = Aktivitas sisa enzim pada t_0 atau tanpa inaktivasi

E_i = Aktivitas sisa enzim setelah diinaktivasi selama t_i

(Yang *et al.*, 1996).

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

Waktu paruh dapat dihitung dari persamaan laju reaksi inaktivasi enzim orde satu (Persamaan 4), seperti berikut:

Persamaan 4. Waktu paruh.

$$t_{(1/2)} = \frac{\ln 2}{k_i} = \frac{0,693}{k_i} \dots\dots\dots (4)$$

Penentuan nilai konstanta laju inaktivasi (k_i) termal enzim α -amilase hasil pemurnian sebelum dan sesudah penambahan PEG 4000 dilakukan dengan persamaan kinetika inaktivasi orde satu (Persamaan 5), yaitu:

Persamaan 5. Konstanta laju reaksi.

$$\ln\left(\frac{E_i}{E_0}\right) = -k_i t \dots\dots\dots (5)$$

Penentuan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian sebelum dan penambahan PEG 4000 dilakukan dengan persamaan perubahan energi akibat denaturasi (Persamaan 6), berikut:

Persamaan 6. Perubahan energi akibat denaturasi.

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

Keterangan:

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

T = Suhu absolut (K)

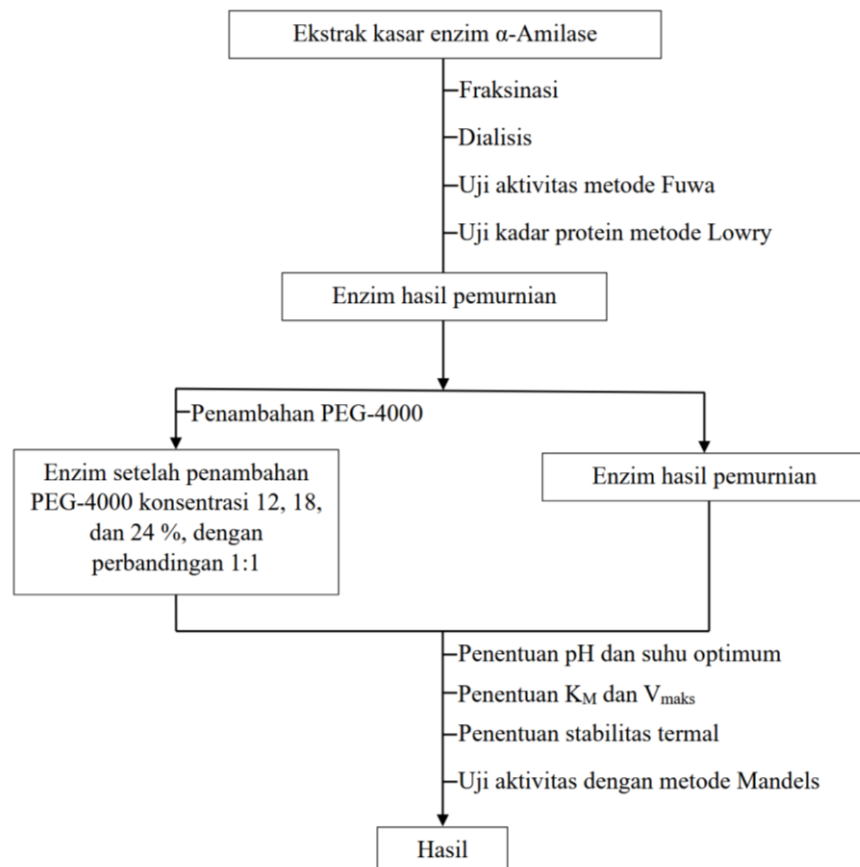
k_i = Konstanta laju inaktivasi termal

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

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

(Kazan *et al.*, 1997).

Secara keseluruhan, penelitian ini terangkum dalam diagram alir yang ditunjukkan pada Gambar 5.



Gambar 5. Diagram alir penelitian.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Berdasarkan pembahasan yang telah diuraikan dapat diperoleh kesimpulan sebagai berikut.

1. Enzim α -amilase hasil pemurnian memiliki aktivitas spesifik lebih tinggi sebesar 2870,13 U/mg, sedangkan ekstrak kasar enzim memiliki aktivitas spesifik sebesar 287,62 U/mg.
2. pH optimum enzim α -amilase hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan PEG 4000 dengan variasi konsentrasi 12, 18, dan 24 % adalah 3,5.
3. Suhu optimum enzim α -amilase hasil pemurnian sebelum penambahan PEG 4000 adalah 45 °C, dan mengalami pergeseran ke suhu 50 °C setelah penambahan PEG 4000 dengan variasi konsentrasi 12, 18, dan 24 %.
4. Enzim α -amilase hasil pemurnian sebelum penambahan PEG 4000 memiliki V_{maks} sebesar 18,7969 $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$, dengan K_M sebesar 8,2951 mg mL^{-1} substrat, sedangkan enzim α -amilase hasil pemurnian setelah penambahan PEG 4000 dengan variasi konsentrasi 12, 18, dan 24 % memiliki V_{maks} sebesar 18,5528; 18,0831; dan 17,094 $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$ dengan nilai K_M berturut-turut adalah 8,4601; 9,0725; dan 9,4547 mg mL^{-1} substrat.
5. Stabilitas enzim α -amilase hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan PEG 4000 dengan variasi konsentrasi 12, 18, dan 24 % mengalami peningkatan berturut-turut sebesar 1,49; 1,72; dan 2,4 kali lipat.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, disarankan agar penelitian selanjutnya menggunakan variasi konsentrasi PEG 4000 yang lebih tinggi mengetahui semakin tinggi konsentrasi PEG 4000 yang ditambahkan pada enzim, semakin meningkat pula stabilitas enzim α -amilase. Kemudian disarankan agar menjaga kestabilan suhu dan pH optimum selama isolasi hingga karakterisasi sehingga enzim tidak mengalami denaturasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahern, T. J. and Klivanov, A. M. 1987. *Why Are Enzymes Irreversibly Inactive at Highest Temperatures: Biotec I Microbial Genetic Engineering and Enzyme Technology*. Gustav Fiscger. Stuttgart. Germany.
- Aiyer, P. V. 2005. Amylases and their applications. *African J. Biotechnol.*, **4**(13): 1525–152.
- Ariyono, R. Q., Syamsuddin, D., dan Lilik, S. 2014. Keanekaragaman jamur endofit daun kangkung darat (*Ipomoea reptans* poir) Pada lahan pertanian organik dan konvensional. *Jurnal HPT*. **2**(1):19–28.
- Assegaf, S. 2017. Peningkatan kestabilan enzim α -amilase dari *Rhizopus oligosporus* dengan penambahan Polietilen Glikol (PEG) 6000. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Bandar Lampung. 33-35.
- Blanco, A. and Blanco, G. 2017. *Medical Biochemistry*. Academic Press. USA.
- Bollag, D. M., Rozycki, M. D., and Edelstein, S. J. 1996. *Protein Methods 2nd ed.* John Willey and son, Inc. New York.
- Bunjevaca, A., Gabaj, N.A., Miler, M., Horvat, A. 2018. Preanalytics of urine sediment examination: effect of relative centrifugal force, tube type, volume of sample and supernatant removal. *Biochem Med*. **1**(1): 1-8.
- Chaplin, M., F. and Bucke, C. 1990. *Enzyme Technology*. Cambridge University Press. Great Britain.
- Coste, S.,Sellemi, H., Barre, M., Retoux, R., Ben Ali, A., and Lacorre, P. 2015. Synthesis by the polyol process and ionic conductivity of nanostructured La₂Mo₂O₉ powders. *J. Alloy. Compd.* **653**: 422–433.
- Deb, P., Talukdar, S. A., Mohsina, K., Sarker, P. K., and Sayem, S. A. 2013. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. *SpringerPlus*. **2**(154): 1–12.
- Eijnsink, G. H., Sirgit, G., Torben, V., and Bertus van de Burg. 2005. Directed evolution of enzyme stability. *Biomol. Eng.* **23**: 21-30.

- Eveleigh, D. E., Mandels, M., Andreotti, R., and Roche, C. 2009. Measurement of saccharifying cellulose. *Biotechnol. Biofuel.* **2**(21): 1–8.
- Faatih, M. 2009. Isolasi dan digesti DNA kromosom. *J. Penelit. Sains Teknol.* **10** (1): 61–67.
- Far, B. E., Ahmadi, Y., Khosroushahi, A. Y., and Dilmaghani, A., 2020. Microbial alpha-amylase production: Progress, challenges, and perspectives. *Adv Pharm. Bull.* **10**(3): 350–358.
- Fuwa, H. 1954. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylase as the substrate. *J. Biochem.* **41**(5): 583–603.
- Golunski, S., Silva, M. F., Marques, C. T., Rosseto, V., Kaizer, R. R., Mossi, A. J., Rigo, D., Dallago, R. M., Luccio, M. D., and Treichel, H. 2017. Purification of inulinases by changing the ionic strength of the medium and precipitation with alcohols. *An. Acad. Bras. Cienc.* **89**(1): 57–63.
- Hasanah, Uswatun. 2017. Mengenal aspergillosis, infeksi jamur genus *Aspergillus*. *Jurnal Keluarga Sehat Sejahtera (JKKS).* **15**(2): 76–86.
- Iswendi. 2010. Penentuan aktivitas amilase dari umbi bengkuang (*Pachyrrizus arosus* L. Urb) hasil ekstraksi dengan etanol dan ammonium sulfat. *J. Saintek.* **2**(2): 94–98.
- Jinu, J. 2017. Amylases-bioprocess and potential applications. *Int. J. Bioinform. Biol. Sci.* **5**(2): 41–50
- Kamelia, R. M., Sindumarta, dan Natalia, D. 2005. Isolasi dan Karakterisasi Protease Intraseluler Termotabil dari Bakteri *Bacillus stearothermophilus* RPI. Seminar Nasional MIPA. Departemen Kimia MIPA, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Kaneko, K., Thommes, M., Neimark, V. A., Olivier, J. P., Rodroquez, R., Rouquerol, J., and Sing, K. S. W. 2015. Physisorption of gases with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution. *IUPAC Technical Report, Pure Appl. Chem.* 1051-1069.
- Kazan, D., Ertan, H., and Erarslan, A. 1997. Stabilization of *Escherchia coli* penicilin g acylase against thermal inactivation by cross-linking with dextran dialdehyde polymers. *J. Microbiol. Biotechnol.* **48**(1): 191-197.
- Koushki, S., Askaripour, H., and Bahirae, 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.

- Kuddus, M. 2019. *Enzymes in Food Biotechnology*. Department of Biochemistry. Hail.
- Kurniawati, T., dan Zulkarnain, A., K. 2012. Pengaruh penambahan polietilen glikol 400 terhadap absorpsi piroksikam secara in situ. *Jur. Farm.* **8**(1): 127-132.
- Kustyawati, M. E., Sari, M., dan Haryati, T. 2013. Efek fermentasi dengan *Saccharomyces cerevisiae* terhadap karakteristik biokimia tapioka. *Agritech.* **33**(3): 281–287.
- Leuner, C. and Dressman, J. 2000. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersion. *Euro. J. Pharm. Biopharm.* **50**(2000): 470-60.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**(1): 265–275.
- Maier, R., Pepper, I., and Gerba, C.P. 2000. *Environmental Microbiology*. Academic Press. London.
- Martoharsono, S. 2006. *Biokimia 1*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Mawarni, N., Erdiansyah, I., dan Wardana, R. 2021. Isolasi cendawan *Aspergillus* sp. Pada tanaman padi organik. *J. Microbiol.* **5**(1): 68-74.
- Murniasih, T. 2003. Metabolit sekunder dari spons sebagai bahan obat-obatan. *Jurnal Oseana.* **28**(3): 27–33.
- Nababan, M., Gunam, I., dan Wijaya, I. 2019. Produksi enzim selulase kasar dari bakteri selulolitik. *Jur.l Rek. Agroind..* **7**(2): 190-199.
- Nangin, D., dan Sutrisno, A.. 2015. Enzim amilase pemecah pati mentah dari mikroba: kajian pustaka. *Jur. Pangan dan Agroind.* **3**(3): 1032-1039.
- Novák, P. and Havlíček, V. 2016. *Protein Extraction and Precipitation. Proteomic Profiling and Analytical Chemistry (Second Edition)*. Elsevier. Amsterdam.
- Nwagu, T. N. and Okolo, B. N. 2011. Growth profile and amylolytic activity of thermophilic fungus *Aspergillus fumigatus* isolated from soil. *Asian J. Biotech.* **3**(1): 46–57.
- Okafor, N. and Okeke, B. C. 2018. *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology Second Edition*. CRC Press Taylor and Francis Group. Boca Raton.
- Page, D., S. 1997. *Prinsip-Prinsip Biokimia*. Erlangga. Jakarta.

- Park, C. K., Lee, J. H., Kim, I. S., Kim, S. H. 2022. Castor oil-based polyols with gradually increasing functionalities for biopolyurethane synthesis. *J. Appl. Polym. Sci.* **137**(4): 1–11.
- Prihanto, A. A., Timur, H. D. L., Jaziri, A. A., Nurdiani, R., dan Pradarameswari, K. A. 2018. Isolasi dan identifikasi bakteri endofit magrove *Sonneratia alba* penghasil enzim gelatinase dari pantai sendang biru, malang, jawa timur. *Ind. J. of Halal.* **1**(1): 31-42.
- Purnawan, A., Capriyanti, Y., Kurniatin, P., dan Rahmani, N. (2015). Optimasi produksi enzim amilase dari bakteri laut jakarta (*Arthrobacter arilaitensis*). *Ind. J. Biol.* **11**(2): 215–224.
- Rahmi, H., Hariyanti, A., Rina, P., dan Wulandari, D. 2020. Analisis hasil fraksinasi protease dan lipasae yang berasal dari saluran pencernaan udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). *J. Biotek. Biosains. Ind.* **7**(2): 194-202.
- Santos, A. S., Rosa, N., Souza, M., Philippsen, H. K., and Medeiros, E. 2015. Thermal-stability of enzyme activity and its application in the hydrolysis of starchy residue from mandioca processing. *Int. J. Sci. Res.* **4**(10): 681–684.
- Santoso, A., Intan, K. T., dan Silaban, R. 2011. Studi persepsi masyarakat terhadap peran enzim dalam pembuatan susu terfermentasi. *Jur. Pend. Kim.* **3**(1): 31-41.
- Santoso, H., H dan Dayatmo, D. 2015. Pembuatan bioethanol dari limbah ampas pati aren dengan metode hidrolisis enzimatis menggunakan enzim ligninolitik dari jamur pelapuk putih. *Jurnal Konversi.* **4**(2):43-52.
- Saputro, D. F., Widiarto, S., dan Yuwono, S. D. 2019. Studi pendahuluan pembuatan dan karakterisasi plastik ramah lingkungan dari campuran polistirena-poli asam laktat. Prosiding SNSMAIP III. 388-392.
- Spohner, S.C., Czeremka, P., 2016. Heterologous expression of *Aspergillus terreus* fructosyl transferase in *Kluyveromyces lactis*. *New Biotechnol.* **33**(1): 473-479.
- Suhartono, M.T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Bioteknologi ITB. Bogor.
- Suhendrayatna, Syaubari, Al-Farisi, S., dan Satria, M. 2023. Pembuatan gula cair dari pati ubi jalar putih dengan menggunakan hidrolisis enzimatis. *Jur. Inovasi Rumah Ramah Lingkungan.* **4**(2): 7-11.
- Sutrisno, A. 2017. *Teknologi Enzim*. UB Press. Malang.

- Theodore, L. and William, L. 2023. *Biochemistry, Proteins Enzymes*. StatPearls Publishing. Treasure Island.
- Vaseekaran, S., Balakumar, S. dan Arasaratnam, V. 2011. Isolation and identification of a bacterial strain producing thermostable α -amylase. *Trop Agric Res*. **22**(1): 1.
- Vogel, A. and May, O. 2019. *Industrial Enzyme Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. Weiheim.
- Wang, S., Zhang, H., Yao, Y., Qi, K., Yu, C., Liu, Q., and Zhou, J. 2024. Preparation and recovery performance of modified cellulase with pH sensitive separation properties. *S. Ind. Crops Prod*. **222**(2):1-10.
- Wardani, A. K. dan Nindita, L. O. 2012. Purifikasi dan karakterisasi protease dari bakteri hasil isolasi dari whey tahu. *J. Teknol Pertan*. **13**(3): 149–156.
- Winarno, F., G. 2002. *Kimia Pangan dan Gizi*. Gedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Wirahadikusuma, M. 2001. *Biokimia: Protein, Enzim, dan Asam Nukleat*. ITB Press. Bandung.
- Witazora, Y., Yandri, Y., Suhartati, T., Satria, H., and Hadi, S. 2021. Effect of glutaraldehyde addition on the stability of the α -amylase from *Bacillus subtilis* ITBCCB148. *J. Phys.: Conf. Ser*. **1751**(1): 1-9.
- Yandri, A. S., Suhartati, T., and Hadi, S. 2010. Purification and characterization of extracellular α -amilase enzyme from locale bacteria isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148. *Eur. J. Sci. Res*. **39**(1): 64–74.
- Yandri, Y., Ropingi, H., Suhartati, T., Hendri, J., Irawan, B., and Hadi, S. 2022. The effect of zeolyte/chitosan hybrid matrix for thermal-stabilization enhancement on the immobilization of *Aspergillus fumigatus* α -amylase. *ESJ*. **6**(3): 505-518.
- Yandri, Y., Suhartati, T., Hadi, S., and Herasari, D. 2011. The chemical modification of protease isolated from local bacteria *Bacillus subtilis* ITBCCB148 with nitrophenolcarbonate polyethylene glycol (NPC-PEG). *Mod. Appl. Sci. Res*. **5**(4): 253-258.
- Yandri, Y., Tiarsa, E. R., Suhartati, T., Satria, H., Irawan, B., and Hadi, S. 2022. The stability improvement of α -amylase enzyme from *Aspergillus fumigatus* by immobilization on a bentonite matrix. *Biochem. Res. Int*. **5**(1): 1–7.
- Yandri, Y., Wahyuningsih, F., Suhartati, T., Satria, H., dan Hadi, S. 2020. Peningkatan kestabilan enzim α -amilase dengan penambahan sorbitol. Prosiding Seminar Nasional Kimia. Surabaya.

- Yandri, Y., Nadila, N., Suhartati, T., Satria, H., dan Hadi, S. 2020. *Peningkatan Kestabilan Enzim α -Amilase Dengan Penambahan Gliserol*. Seminar Nasional. Surabaya.
- Yang, Z., Domach, M., Auger, R., Yang, F. X., and Russell, A. J. 1996. Polyethylene glycol-induced stabilization of subtilisin. *Enzyme Microb. Technol.* **18**(2): 35-36.
- Yuliasih, I. 2010. Pengaruh proses fraksinasi pati sagu terhadap karakteristik fraksi amilosanya. *J. Teknik Industri Pertanian.* **17**(1): 29-36.