

**IMOBILISASI ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus* sp.
MENGUNAKAN BENTONIT**

(Skripsi)

Oleh

**STEPHANI MARISCA FEBRIANTI
NPM 2017011061**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2024**

ABSTRAK

IMOBILISASI ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus* sp. MENGUNAKAN BENTONIT

Oleh

Stephani Marisca Febrianti

Kestabilan enzim menjadi faktor penting dalam proses industri karena dibutuhkan enzim yang dapat bekerja pada pH dan suhu ekstrem serta memiliki masa pakai yang lama agar lebih ekonomis dan dapat mengurangi biaya produksi. Namun, umumnya, enzim tidak dapat bekerja secara optimal pada pH dan suhu tersebut. Oleh karena itu, perlu dilakukan peningkatan kestabilan enzim untuk mengatasi masalah ini.

Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan kestabilan enzim α -amilase dari *Aspergillus* sp. dengan imobilisasi menggunakan matriks bentonit. Tahapan penelitian meliputi produksi dan isolasi enzim, pemurnian enzim melalui fraksinasi menggunakan amonium sulfat dan dialisis, serta imobilisasi enzim hasil pemurnian menggunakan matriks bentonit. Selanjutnya, baik enzim hasil pemurnian maupun enzim hasil imobilisasi dikarakterisasi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa enzim hasil pemurnian memiliki peningkatan kemurnian 11 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim. Uji stabilitas termal pada suhu 60°C selama 80 menit untuk enzim hasil pemurnian menunjukkan aktivitas sisa sebesar 23% dengan waktu paruh sebesar 39,38 menit, sedangkan enzim hasil imobilisasi dengan matriks bentonit menunjukkan aktivitas sisa sebesar 47% dengan waktu paruh sebesar 76,17 menit, pada kondisi yang sama. Kestabilan enzim hasil imobilisasi memiliki peningkatan sebesar 1,93 kali dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Aktivitas sisa enzim hasil imobilisasi setelah pemakaian berulang sebanyak enam kali menunjukkan nilai sebesar 48%.

Kata kunci: α -amilase, *Aspergillus* sp., imobilisasi, bentonit

ABSTRACT

IMMOBILIZATION OF α -AMYLASE FROM *Aspergillus* sp. USING BENTONITE

By

Stephani Marisca Febrianti

Enzyme stability is a crucial factor in industrial processes because enzymes need to function at extreme pH and temperature levels and have a long lifespan to be more economical and reduce production costs. However, enzymes generally cannot function optimally at these pH and temperature conditions. Therefore, it is necessary to enhance the stability of enzymes to address this issue.

This research aims to enhance the stability of α -amylase enzyme from *Aspergillus* sp. through the immobilization using a bentonite matrix. The research stages include enzyme production and isolation, enzyme purification through ammonium sulfate fractionation and dialysis, and immobilization of the purified enzyme using a bentonite matrix. Subsequently, both the purified enzyme and the immobilized enzyme are characterized.

The research results show that the purified enzyme had an 11-fold increase in purity compared to the crude extract. Thermal stability tests at 60°C for 80 minutes showed that the purified enzyme retained 23% residual activity with a half-life of 39.38 minutes, while the immobilized enzyme with bentonite retained 47% residual activity with a half-life of 76.17 minutes. The stability of the immobilized enzyme increased by 1.93 times compared to the purified enzyme. The immobilized enzyme retained 48% residual activity after six repeated uses.

Keywords: α -amylase, *Aspergillus* sp., immobilization, bentonite

**IMOBILISASI ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus* sp.
MENGUNAKAN BENTONIT**

Oleh

**STEPHANI MARISCA FEBRIANTI
NPM 2017011061**

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
2024**

Judul Skripsi : **IMOBILISASI ENZIM α -AMILASE DARI
Aspergillus sp. MENGGUNAKAN BENTONIT**

Nama Mahasiswa : Stephani Marisca Febrianti

Nomor Pokok Mahasiswa : 2017011061

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing



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



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

2. Ketua Jurusan Kimia



Dr. Mita Rilyanti S.Si., M.Si
NIP. 19720530 200003 2 001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

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



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

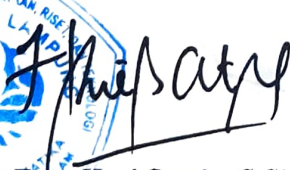


Anggota : **Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si.**



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam




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

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **8 Agustus 2024**

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Stephani Marisca Febrianti
Nomor Pokok Mahasiswa : 2017011061
Program Studi : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi penulis yang berjudul **“Imobilisasi Enzim α -Amilase dari *Aspergillus* sp. Menggunakan Bentonit”** adalah karya penulis sendiri dan penulis tidak melakukan penjiplakan (*plagiarism*) 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 Agustus 2024
Pembuat Pernyataan,



METERAI
TEMPEL
79CF4ALX286724156

Stephani Marisca Febrianti
NPM 2017011061

RIWAYAT HIDUP

Nama penulis adalah Stephani Marisca Febrianti. Penulis lahir di Tangerang pada tanggal 10 Februari 2003. Penulis adalah anak kedua dari tiga bersaudara, anak dari Bapak Stevanus Sutejo dan Ibu Marlina Asda.

Penulis memulai pendidikan di TK Umum Nabila pada tahun 2007. Setelah itu, penulis melanjutkan ke SDS Bhinneka dan lulus pada tahun 2014. Selanjutnya, penulis bersekolah di SMP Negeri 2 Pasarkemis dan lulus pada tahun 2017. Setelah SMP, penulis melanjutkan ke SMA Negeri 13 Kabupaten Tangerang dan lulus pada tahun 2020. Setelah lulus SMA, penulis melanjutkan studi ke Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Lampung. Penulis menyelesaikan pendidikan sarjananya pada tahun 2024.

Selama menjadi mahasiswa, Penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) pada bulan Januari–Februari 2023 di Desa Tugu Ratu, Kecamatan Suoh, Lampung Barat. Penulis juga pernah menjadi asisten praktikum Biokimia, jurusan Kimia, FMIPA Universitas Lampung pada Tahun 2023.

Pada tahun 2024, penulis menyelesaikan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Laboratorium Biokimia, Universitas Lampung, dengan judul “Penentuan Kondisi Optimum *Aspergillus* sp. Menghasilkan Enzim α -Amilase pada Media Pati Beras (*Oryza sativa*)”. Kemudian sebagai bentuk aplikasi bidang ilmu di dunia kerja, penulis telah menyelesaikan Skripsi yang berjudul “Imobilisasi Enzim α -Amilase dari *Aspergillus* sp. Menggunakan Bentonit”.

MOTTO

“Be strong and courageous. Do not be afraid or terrified because of them, for the LORD your God goes with you; He will never leave you nor forsake you.”

Deuteronomy 31:6

"However, as it is written: 'What no eye has seen, what no ear has heard, and what no human mind has conceived'—the things God has prepared for those who love Him."

1 Corinthians 2:9

"Whoever conceals their sins does not prosper, but the one who confesses and renounces them finds mercy."

Proverbs 28:13

“When God is willing, my steps are surely safe”

PERSEMBAHAN

Dengan segala kerendahan hati, kupersembahkan karya ini

Kepada

Kedua orang tuaku

Stevanus Sutejo dan Marlena Asda

My siblings: **Christian Agus Pradana (†) and Kevin Adi Pamungkas**

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

Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S.

dan **Almamater tercinta.**

SANWACANA

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas berkat dan rahmat-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul **"Imobilisasi Enzim α -Amilase dari *Aspergillus* sp. Menggunakan Bentonit"**.

Pada sanwacana ini, penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada pihak-pihak yang telah memberikan dukungan, bimbingan, dan bantuan selama proses penyusunan skripsi ini:

1. Keluarga inti penulis: Ayah Stevanus Sutejo, Ibu Marlana Asda, Kaka Christian Agus Pradana (†), dan Adik Kevin Adi Pamungkas.
2. Mbah kakung Dasam, Mbah putri Rasilah, Om Budi, Tante Liana, Mas Iyan, Om Oni, Tante Mima dan keluarga, Mbah Agus dan keluarga, Mbah Ratinah, dan keluarga besar Asmantika.
3. Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S. dan Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S., selaku Komisi Pembimbing Skripsi.
4. Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si. selaku Pembahas Skripsi.
5. Dra. Aspita Laila, M.S. selaku Pembimbing Akademik.
6. Dr. Mita Rilyanti S.Si., M.Si. selaku Kaprodi Kimia, FMIPA, Universitas Lampung.
7. Segenap Tenaga Pendidik dan Kependidikan Jurusan Kimia dan Prodi Kimia, FMIPA, Universitas Lampung.
8. Tim Satu Komisi Pembimbing S1: Rusmauli Defana Panjaitan, Maria Agustina Sidabutar, dan Avi Eriyani.
9. Tim Satu Komisi Pembimbing S2: Stevenson Waruwu, Kartika Dewi Rachmawati, dan Santalum Alba.
10. Kakak Tingkat Satu Bimbingan Penelitian: Virginia Nuh Reza Amanda, Ayu Ranja Saputri, dan Kania Nur Aisyah.

11. Saudara dan Saudari Terkasih: Ade Maria Ulfa, Enjel Septi Vebrina, Martin Ompusunggu, Andreas Irfan Limbong, Kartika Hagai, Naomi Amelia, dan Melvina Virginia.
12. Dadakan Grup: Nurdiana, Rusmauli Defana Panjaitan, Maria Agustina Sidabutar, Avi Eriyani, Carlos Daniel, Rahmadtullah, dan Hinaya Gita Viebriyanti.
13. Unila *Food Vlogger*: Rusmauli Defana Panjaitan, Bunga Mega Nurlinda, Erlisa Aulia, Nadia Anindhita, Maria Agustina Sidabutar, Avi Eriyani, Najla Shauma Zahra, Anggun Nadhifahmia Azizah, Mutiara Septia Nurokhim, Geo Alfriza Gaghana, Rahmadtullah, Ribka Angelina Gultom, dan Ratih Nurhidayati.
14. Rekan Studi di Prodi Kimia Angkatan 2020 terutama Kelas B.
15. Semua pihak yang telah membantu dan mendukung dalam penyelesaian skripsi ini.

Semoga skripsi ini dapat berguna dan bermanfaat.

Bandar Lampung, 28 Agustus 2024
Penulis,

Stephani Marisca Febrianti

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR.....	xviii
DAFTAR RUMUS	xx
DAFTAR LAMPIRAN	xxi
I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	4
1.3 Manfaat Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Enzim	5
2.1.1 Mekanisme Enzim.....	6
2.2 Enzim α -Amilase.....	7
2.3 <i>Aspergillus</i> sp.....	8
2.4 Isolasi dan Pemurnian Enzim.....	9
2.4.1 Sentrifugasi.....	10
2.4.2 Fraksinasi dengan Amonium Sulfat	10
2.4.3 Dialisis.....	11
2.5 Uji Aktivitas Enzim α -Amilase.....	13
2.5.1 Metode Fuwa.....	13
2.5.2 Metode Mandels	14
2.6 Metode Lowry	14
2.7 Kinetika Reaksi Enzim.....	15
2.8 Kestabilan Enzim	16
2.8.1 Kestabilan Termal	17
2.8.2 Konstanta Laju Inaktivasi Termal (k_i).....	17
2.8.3 Waktu Paruh ($t_{1/2}$).....	18
2.8.4 Perubahan Energi Bebas Akibat Denaturasi (ΔG_i).....	18
2.9 Imobilisasi Enzim	19
2.10 Bentonit.....	20
2.11 Analisis Spektroskopi Ultraviolet-Visible (UV-Vis).....	21

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 Tahapan Persiapan.....	24
3.3.1.1 Pembuatan media agar miring	24
3.3.1.2 Pembuatan media inokulum dan fermentasi.....	25
3.3.1.3 Pembuatan larutan buffer fosfat 0,05 M pH optimum 6.....	25
3.3.1.4 Pembuatan reagen Fuwa	26
3.3.1.5 Pembuatan reagen Mandels	27
3.3.1.6 Pembuatan pereaksi Lowry	28
3.3.2 Peremajaan Isolat <i>Aspergillus</i> sp.....	28
3.3.3 Inokulasi <i>Aspergillus</i> sp.	28
3.3.4 Produksi Enzim α -Amilase.....	29
3.3.5 Isolasi Enzim α -Amilase dari <i>Aspergillus</i> sp.	29
3.3.6 Fraksinasi dengan Amonium Sulfat	29
3.3.6.1 Penentuan pola fraksinasi	29
3.3.6.2 Pemurnian dengan fraksinasi.....	33
3.3.7 Dialisis.....	33
3.3.7.1 Preparasi kantong selofan	33
3.3.7.2 Penempatan cuplikan enzim	33
3.3.7.3 Dialisis enzim	34
3.3.8 Uji Aktivitas Unit (AU) Enzim α -Amilase Metode Fuwa	35
3.3.9 Uji Aktivitas Unit (AU) Enzim α -Amilase Metode Mandels	35
3.3.9.1 Pembuatan kurva standar glukosa	35
3.3.9.2 Uji aktivitas	36
3.3.10 Uji Kadar Protein Metode Lowry.....	36
3.3.10.1 Pembuatan kurva standar BSA	36
3.3.10.2 Penentuan kadar protein	37
3.3.11 Imobilisasi Enzim α -Amilase Menggunakan Bentonit	37
3.3.11.1 Penentuan pH Buffer pengikatan enzim-matriks.....	37
3.3.11.2 Imobilisasi enzim.....	38
3.3.12 Karakterisasi Enzim α -Amilase Hasil Pemurnian dan Enzim Imobil	38
3.3.12.1 Penentuan suhu optimum	38
3.3.12.2 Penentuan K_M dan V_{maks}	39
3.3.12.3 Penentuan kestabilan termal enzim	40
3.3.12.4 Penentuan konstanta laju inaktivasi (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi bebas akibat denaturasi (ΔG_i)	40
3.3.12.5 Pemakaian berulang enzim imobil	41

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	43
4.1 Enzim α -Amilase dari <i>Aspergillus</i> sp.....	43
4.2 Fraksi Enzim dengan Amonium Sulfat	43
4.3 Dialisis	46
4.4 pH Optimum Enzim Hasil Pemurnian	47
4.5 pH Buffer Pengikatan Enzim Hasil Pemurnian dengan Matriks Bentonit	48
4.6 Suhu Optimum Enzim Hasil Pemurnian dan Hasil Imobilisasi pada Matriks Bentonit	49
4.7 Nilai K_M dan V_{maks} Enzim Hasil Pemurnian dan Hasil Imobilisasi pada Matriks Bentonit	51
4.8 Kestabilan Termal Enzim Hasil Pemurnian dan Hasil Imobilisasi pada Matriks Bentonit	52
4.9 Konstanta Laju Inaktivasi Termal (k_i), Waktu Paruh ($t_{1/2}$), dan Perubahan Energi Bebas Akibat Denaturasi (ΔG_i) Enzim Enzim Hasil Pemurnian dan Hasil Imobilisasi pada Matriks Bentonit	53
4.10 Pemakaian Berulang Enzim Hasil Imobilisasi pada Matriks Bentonit	55
V. SIMPULAN DAN SARAN	57
5.1 Simpulan	57
5.2 Saran.....	58
DAFTAR PUSTAKA	59

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Peningkatan kestabilan termal enzim α -amilase yang diimobilisasi dengan matriks bentonit	8
2. Berbagai penelitian imobilisasi enzim dengan matriks bentonit.....	20
3. Rangkuman hasil perhitungan massa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (gram) yang ditambahkan untuk fraksinasi dengan berbagai persentase kejenuhan	32
4. Rangkuman hasil pemurnian enzim α -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp.	47
5. Nilai K_M dan V_{maks} enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks bentonit.....	52
6. Nilai k_i , $t_{1/2}$, dan ΔG_i enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks bentonit.....	54
7. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode Fuwa (λ_{maks} 600 nm) pada ekstrak kasar enzim, hasil fraksinasi, dan hasil dialisis	67
8. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode Lowry (λ_{maks} 750 nm) pada ekstrak kasar enzim, hasil fraksinasi, dan hasil dialisis	69
9. Hubungan antara persentase kejenuhan amonium sulfat dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp.	70
10. Hubungan antara persentase kejenuhan amonium sulfat (0–25)% dan (25–85)% dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp.....	70
11. Hubungan antara absorbansi dan aktivitas unit enzim α -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp. hasil pemurnian dalam berbagai pH.....	71
12. Hubungan antara absorbansi dan aktivitas unit enzim α -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp. pada matriks bentonit dalam berbagai pH pengikatan	72
13. Hubungan antara suhu dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim α -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp. hasil pemurnian	72

14. Hubungan antara suhu dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim α -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp hasil imobilisasi pada matriks bentonit	72
15. Hubungan antara konsentrasi substrat dengan absorbansi dan aktivitas unit enzim α -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp. hasil pemurnian.....	73
16. Hubungan antara konsentrasi substrat dengan absorbansi dan aktivitas unit enzim α -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp. hasil imobilisasi pada matriks bentonit	73
17. Data grafik Lineweaver-Burk α -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp. hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks bentonit	73
18. Hubungan antara absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim α -amilase hasil pemurnian dengan variasi waktu inaktivasi termal pada suhu 60°C	74
19. Hubungan antara absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim α -amilase hasil imobilisasi pada matriks bentonit dengan variasi waktu inaktivasi termal pada suhu 60°C.....	75
20. Data grafik laju inaktivasi termal orde satu enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks bentonit selama inaktivasi termal pada suhu 60°C.....	75
21. Perhitungan waktu paruh ($t_{1/2}$) enzim hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks bentonit.....	76
22. Perhitungan nilai ΔG_i enzim hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks bentonit	78
23. Hubungan antara absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim hasil imobilisasi pada matriks bentonit saat pemakaian berulang	78
24. Absorbansi BSA pada berbagai konsentrasi	79
25. Absorbansi glukosa pada berbagai konsentrasi.....	80

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Mekanisme kerja enzim: (a) <i>Lock and key</i> (b) <i>Induced-fit</i>	7
2. <i>Aspergillus</i> sp.	9
3. Reaksi antara DNS dengan glukosa	14
4. Grafik Lineweaver-Burk	16
5. Struktur bentonit	21
6. Skema fraksinasi dengan amonium sulfat.....	30
7. Ilustrasi metode fraksinasi ekstrak kasar enzim dengan amonium sulfat	31
8. Diagram alir penelitian.....	42
9. Grafik hubungan antara persentase kejenuhan amonium sulfat dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp.....	44
10. Grafik hubungan antara persentase kejenuhan amonium sulfat (0–25)% dan (25–85)% dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp.....	45
11. Grafik aktivitas unit enzim α -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp. hasil pemurnian dalam berbagai pH	47
12. Grafik aktivitas unit enzim α -amilase hasil pemurnian pada matriks bentonit dalam berbagai pH buffer pengikatan.....	49
13. Grafik Suhu optimum enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks bentonit	50
14. Grafik Lineweaver-Burk enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks bentonit	51
15. Grafik kestabilan termal enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks bentonit	53
16. Grafik laju inaktivasi termal orde satu enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks bentonit	54
17. Grafik pemakaian berulang enzim hasil imobilisasi pada matriks bentonit.....	55

18. Kurva standar BSA	79
19. Kurva standar glukosa.....	80

DAFTAR RUMUS

Rumus	Halaman
1. Michaelis-Menten	16
2. Lineweaver-Burk.....	16
3. Aktivitas Sisa	17
4. Laju Inaktivasi Termal Enzim Orde Satu.....	18
5. Waktu Paruh.....	18
6. Perubahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i)	18
7. Molaritas	25
8. Pembuatan Buffer.....	26
9. Pengenceran	26
10. Perhitungan Massa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	31
11. Aktivitas Unit Metode Fuwa	35
12. Aktivitas Unit Metode Mandels	36
13. Kadar Protein	81
14. Aktivitas Spesifik.....	81
15. Aktivitas Total.....	81
16. Protein Total.....	81
17. Hasil (%)	81
18. <i>Purity</i>	81

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Data Hasil Pengukuran Absorbansi Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis	67
2. Data Pola Fraksinasi.....	70
3. Data pH Optimum Enzim Hasil Pemurnian.....	71
4. Data pH Pengikatan Enzim dan Matriks Pengimobil	72
5. Data Suhu Optimum.....	72
6. Data K_M dan V_{maks}	73
7. Data Kestabilan Termal.....	74
8. Data Grafik Laju Inaktivasi Termal Enzim Orde Satu.....	75
9. Perhitungan Waktu Paruh ($t_{1/2}$)	76
10. Perhitungan Perubahan Energi Bebas Akibat Denaturasi (ΔG_i)	77
11. Data Pemakaian Berulang Enzim Hasil Imobilisasi pada Matriks Bentonit	78
12. Kurva Standar <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA)	79
13. Kurva Standar Glukosa	80
14. Persamaan Untuk Kuantitasi Enzim Pada Saat Sebelum dan Sesudah Pemurnian	81

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Industri kimia telah menjadi pendorong utama dalam kemajuan ekonomi, terutama dalam industri farmasi, kosmetik, dan makanan, yang berkontribusi pada peningkatan kualitas hidup manusia (Naulina dkk., 2023). Namun, ironisnya, seiring dengan kontribusi positifnya, industri juga menjadi penyebab utama masalah lingkungan yang mengkhawatirkan. Mulai dari polusi udara dan pencemaran air hingga lonjakan emisi gas rumah kaca, dampak negatif industri terhadap lingkungan semakin nyata. Industri kimia konvensional sering kali menghasilkan limbah berbahaya dan bahan sampingan yang mengancam ekosistem (Wójcik-Jurkiewicz *et al.*, 2021). Untuk mengatasi masalah ini, diperlukan solusi inovatif dan berkelanjutan yang dapat mengurangi dampak negatif terhadap lingkungan. Kimia hijau muncul sebagai pendekatan yang menjanjikan dengan menekankan penggunaan bahan dan proses yang ramah lingkungan, penghematan energi, dan pengurangan limbah (Mukherjee, 2021). Salah satu strategi utama dalam kimia hijau adalah penerapan biokatalis, seperti enzim, dalam proses industri (Sheldon *and* Brady, 2022). Enzim menawarkan alternatif yang efisien dan ramah lingkungan sebagai katalis dalam berbagai aplikasi industri, memberikan solusi berkelanjutan untuk tantangan lingkungan yang dihadapi industri saat ini (Henahan *et al.*, 2023).

Enzim α -amilase merupakan salah satu enzim yang sangat penting dalam industri, berfungsi sebagai biokatalisator yang menghidrolisis ikatan α -1,4-glikosidik pada pati menjadi gula sederhana, seperti glukosa, maltosa, dan dekstrin (Vogel *and* May, 2019). Enzim α -amilase dapat diisolasi dari mikroba, seperti bakteri dan

jamur (Hidayat dkk., 2016; Suganthi *et al.*, 2011). Spesies *Aspergillus* sp. merupakan kelompok jamur yang terbukti memiliki potensi besar sebagai penghasil enzim α -amilase, yang sangat berguna dalam berbagai kepentingan industri, baik skala besar maupun konvensional, karena kapasitas produksi yang lebih ekonomis dan waktu produksi yang singkat (Jinu, 2017). Penggunaan enzim α -amilase dari *Aspergillus* sp. tidak hanya memberikan solusi efisien dalam dunia industri, tetapi juga membawa potensi untuk pengembangan teknologi yang lebih ramah lingkungan.

Pemanfaatan enzim sebagai katalis dalam industri telah berkembang pesat karena kemampuannya dalam meningkatkan efisiensi proses, mengurangi limbah, dan menghasilkan produk berkualitas tinggi. Namun, enzim memiliki beberapa kelemahan yang perlu diperhatikan, seperti umur simpan yang pendek, stabilitas yang rendah, dan sensitivitas tinggi terhadap berbagai kondisi proses industri (Razzaghi *et al.*, 2018). Kestabilan enzim adalah faktor penting dalam penggunaan katalis di industri karena proses ini sering memerlukan kondisi ekstrem yang bisa membuat enzim mengalami penurunan aktivitas. Pada suhu tinggi atau pH ekstrem, aktivitas enzim dapat menurun secara signifikan atau bahkan dapat mengalami denaturasi (Mesbah *and* Sarmiento, 2016; Silvaa *et al.*, 2018). Selain itu, pemanfaatan enzim terbatas pada satu kali proses saja, hal ini tentu mengakibatkan tingginya biaya bagi pelaku industri untuk memasok kebutuhan enzim (Bal *et al.*, 2016; Littlechild, 2015).

Upaya untuk meningkatkan stabilitas enzim terus dilakukan dengan tujuan menghasilkan proses industri yang lebih efisien dan ekonomis (Silvaa *et al.*, 2018). Stabilitas enzim sangat penting dalam aplikasi industri kimia, dan untuk mencapainya, dapat diterapkan metode imobilisasi. Penggunaan enzim imobil akan memberikan keuntungan, seperti mengurangi biaya pengeluaran enzim dalam industri, memperpanjang masa simpan enzim, memudahkan pengendalian kondisi reaksi selama proses produksi, meningkatkan kemurnian enzim dan produk, serta mempermudah pemisahan enzim dari reaktor (Zdarta *et al.*, 2018). Salah satu teknik imobilisasi yang menarik perhatian adalah melalui adsorpsi fisik. Keunggulan dari teknik ini adalah tidak memerlukan bahan kimia berbahaya

sehingga lebih aman dan ramah lingkungan. Selain itu, metode adsorpsi dinilai cukup menguntungkan karena tidak mengubah struktur enzim sehingga aktivitasnya tetap terjaga dan situs aktif enzim terlindungi dari gangguan luar (Jesionowski *et al.*, 2014; Alnadari *et al.*, 2020). Dalam penelitian yang dilakukan oleh Yandri *et al.* pada tahun 2018, imobilisasi enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 menggunakan matriks bentonit mampu meningkatkan kestabilan enzim hingga dua kali dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian serta memiliki aktivitas sisa enzim sebesar 40% setelah lima kali pemakaian berulang enzim. Hasil serupa juga ditemukan pada imobilisasi enzim α -amilase dari *Aspergillus fumigatus* pada matriks bentonit yang menunjukkan peningkatan kestabilan hingga tiga kali dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian serta memiliki aktivitas sisa enzim sebesar 55% setelah enam kali pemakaian berulang enzim (Tiarsa, 2022). Yandri *et al.* (2022) melaporkan bahwa enzim α -amilase dari *A. fumigatus* yang diimobilisasi menggunakan matriks bentonit menunjukkan peningkatan kestabilan hingga tiga kali dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian serta memiliki aktivitas sisa enzim sebesar 42% setelah enam kali pemakaian berulang enzim. Keberhasilan ini menjadikan enzim α -amilase yang telah diimobilisasi pada matriks bentonit menjadi bahan yang berharga untuk berbagai aplikasi industri.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya maka dilakukanlah imobilisasi enzim α -amilase melalui adsorpsi fisik yang berasal dari *Aspergillus* sp., sebagai sumber penghasil enzim, menggunakan matriks bentonit sebagai matriks pendukung. Penggunaan bentonit dalam penelitian ini dikarenakan bahan ini tidak terlarut dalam air, memiliki luas permukaan yang besar, dan ramah lingkungan (Sedaghat *et al.*, 2009). Penelitian ini menghadirkan inovasi melalui penggunaan matriks bentonit untuk imobilisasi enzim α -amilase dari *Aspergillus* sp. karena belum pernah dilakukan sebelumnya, dengan harapan dapat meningkatkan kestabilan enzim.

1.2 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memperoleh enzim α -amilase dari *Aspergillus* sp. dengan aktivitas dan kemurnian yang tinggi dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim.
2. Memperoleh enzim α -amilase dari *Aspergillus* sp. yang memiliki kestabilan lebih tinggi dibandingkan enzim hasil pemurnian melalui metode imobilisasi dengan penggunaan matriks bentonit menggunakan parameter penurunan nilai k_i serta peningkatan nilai $t_{1/2}$ dan ΔG_i .

1.3 Manfaat Penelitian

Penelitian diharapkan dapat digunakan sebagai informasi mengenai peningkatan kestabilan enzim α -amilase dari *Aspergillus* sp. dengan imobilisasi menggunakan bentonit sebagai matriks pendukung serta kemampuannya untuk dapat dilakukan secara berulang, sehingga lebih ekonomis dalam upaya mengurangi biaya pada proses industri.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Enzim

Enzim merupakan jenis protein yang memiliki bagian aktif untuk memfasilitasi aktivitas katalitik sebagai biokatalisator (Wirahadikusumah, 2001). Dibandingkan dengan katalis sintetik, enzim memiliki kelebihan, seperti enzim bekerja secara selektif dan spesifik, tidak menghasilkan produk samping yang tidak diinginkan, mudah diproduksi, ramah lingkungan, serta dapat digunakan berulang melalui proses imobilisasi (Sirisha *et al.*, 2016). Enzim kini menempati posisi penting dalam industri karena sifatnya yang ramah lingkungan. Penggunaan enzim mampu mengurangi konsumsi energi, penggunaan pelarut, serta dampak negatif terhadap lingkungan dalam proses produksi industri kimia (Jegannathan *and* Nielsen, 2013; Mufarrikha dkk., 2014).

Enzim merupakan jenis protein yang memiliki bagian aktif untuk memfasilitasi aktivitas katalitik sebagai biokatalisator. Kemampuan enzim untuk bertindak sebagai biokatalisator berkaitan dengan struktur tiga dimensi (tersier) atau susunan subunit (kuarterner) dari protein tersebut. Struktur tersier dan kuarterner protein terjadi melalui proses lipatan α -helix, lembaran β -sheet, dan struktur acak lainnya dari rantai polipeptida, membentuk struktur globular yang kompleks. Lipatan struktur protein ini disebabkan oleh terbentuknya ikatan kovalen seperti ikatan peptida dan ikatan disulfida yang diperkuat oleh interaksi non-kovalen, seperti ikatan hidrogen antarpeptida, ikatan hidrogen rantai samping, ikatan ionik (COO^- dan NH_3^+), ikatan hidrofobik (CH_3 dengan CH_3), serta gaya Van der Waals. Gaya Van der Waals timbul karena adanya tarikan antara inti atom dan elektron dari atom lainnya. Selain itu, ikatan non-kovalen juga berperan penting dalam menjaga stabilitas enzim. Enzim mempercepat laju reaksi kimia dengan

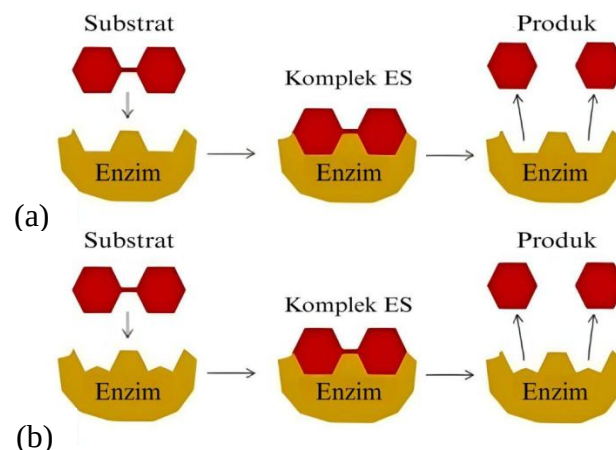
menurunkan energi aktivasi (E_a) sehingga keadaan transisi menjadi lebih rendah. Ketika enzim dan substrat bergabung maka akan terbentuk kompleks yang menurunkan energi aktivasi (Wirahadikusumah, 2001).

Enzim mencapai puncak aktivitas katalitiknya pada suhu dan pH tertentu yang disebut kondisi optimum (Poedjiadi, 2007). Peningkatan suhu akan meningkatkan energi kinetik molekul, sehingga mempercepat laju reaksi. Sisi aktif enzim bekerja secara optimal saat diinkubasi pada suhu optimum karena energi aktivasi yang dibutuhkan sudah tercapai. Namun, suhu yang terlalu tinggi dapat memutus ikatan hidrogen dan hidrofobik yang menjaga stabilitas konformasi enzim, mengakibatkan perubahan konformasi yang mengganggu sisi aktif dan menyebabkan denaturasi serta kehilangan aktivitas katalitik. Sebaliknya, pada suhu yang terlalu rendah, aktivitas katalitik enzim menurun karena ikatan hidrogen pada residu asam amino di sisi aktif menjadi terlalu rapat, menghalangi interaksi sisi aktif dengan substrat. Pada tingkat pH yang sangat asam atau basa, ikatan non-kovalen yang mempertahankan struktur tiga dimensi enzim dapat terputus. Hal ini dapat menyebabkan perubahan bentuk sisi aktif sehingga dapat menghambat kemampuan enzim untuk berinteraksi dengan substrat (Wirahadikusumah, 2001).

2.1.1 Mekanisme Enzim

Enzim memiliki spesifitas dalam mengkatalisis suatu reaksi, hanya reaksi dan substrat tertentu yang dapat diubah oleh enzim. Enzim memiliki sisi aktif yang merupakan bagian khusus yang bertanggung jawab atas fungsi pengarah, pengikatan, dan proses katalisis yang tidak ditemui pada protein pada umumnya. Sisi aktif enzim biasanya memiliki struktur celah yang terbentuk oleh sisa asam amino pada rantai polipeptida enzim. Sebelum substrat diuraikan atau diikat, substrat harus masuk ke dalam celah tersebut. Substrat yang memasuki celah harus memenuhi beberapa persyaratan, seperti sesuai dengan bentuk celah dan memiliki bagian yang labil agar dapat diikat atau diuraikan (Martoharsono, 2006).

Kuddus (2019) menyatakan bahwa cara kerja enzim dalam menghasilkan produk padat dijelaskan melalui dua model, yaitu model kunci dan gembok (*lock and key*) serta model *induced-fit*. Teori pertama, yang dikemukakan oleh Fisher, adalah model kunci dan gembok yang menggambarkan spesifisitas enzim terhadap substrat tertentu. Menurut teori ini, enzim memiliki bentuk geometris khusus yang cocok dengan substratnya. Teori kedua, yang dikemukakan oleh Koshland, adalah model *induced-fit* 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 seperti pada Gambar 1.



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

2.2 Enzim α -Amilase

Enzim α -amilase termasuk dalam kategori endoamilase yang bekerja memutus ikatan α -1,4-glikosidik di dalam struktur amilosa atau amilopektin. Produk akhir dari degradasi amilosa atau amilopektin oleh enzim α -amilase adalah oligosakarida dengan panjang rantai yang bervariasi. α -amilase berfungsi memutus rantai pati secara acak, menghasilkan glukosa, maltosa, maltotriosa, dan alfa-limit dekstrin. Beberapa α -amilase memiliki sifat termostabil dan halotoleran sehingga cocok digunakan dalam industri yang memerlukan stabilitas pada suhu tinggi dan di lingkungan dengan kandungan garam tinggi (Far *et al.*, 2020).

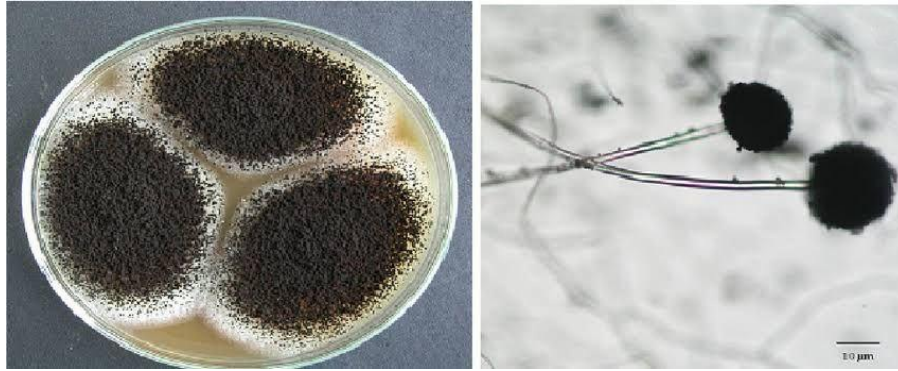
Tabel 1 memuat beberapa penelitian terhadap pengaruh imobilisasi enzim α -amilase menggunakan matriks bentonit. Dari tabel tersebut terlihat bahwa terjadi peningkatan kestabilan termal enzim imobil dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Peningkatan kestabilan termal enzim α -amilase membuatnya dapat digunakan dalam berbagai aplikasi industri.

Tabel 1. Peningkatan kestabilan termal enzim α -amilase yang diimobilisasi dengan matriks bentonit.

Sumber Enzim	Matriks	Suhu (°C)	Durasi (menit)	Aktivitas Sisa (%)		Referensi
				Enzim hasil pemurnian	Enzim Imobil	
<i>A. fumigatus</i>	Bentonit-Kitosan	60	80	7	60	(Yandri <i>et al.</i> , 2023)
<i>A. fumigatus</i>	Bentonit	60	80	29	56	(Yandri <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bacillus subtilis</i> ITBCCB148	Bentonit	60	100	12	43	(Yandri <i>et al.</i> , 2018)

2.3 *Aspergillus* sp.

Aspergillus merupakan salah satu mikroorganisme eukariot yang memiliki penyebaran luas dan melimpah di alam. *Aspergillus* diketahui mempunyai enzim yang dapat memfasilitasi aktivitas biodegradatif, yaitu memfermentasi makanan dan proses industri lainnya, seperti industri minuman, konversi biomasa, pengolahan limbah, dan produksi bahan kimia. Mikroorganisme ini dapat digunakan dalam berbagai kepentingan industri, baik industri skala besar maupun secara tradisional karena memiliki potensi sebagai penghasil enzim, salah satunya adalah enzim amilase dengan keunggulannya, seperti kapasitas produksi masal lebih ekonomis, waktu produksi yang lebih singkat, dan lebih stabil (Jinu, 2017). *Aspergillus* spp. merupakan salah satu kelompok mikroorganisme penghasil α -amilase, amiloglukosidase, transglukosidase, dan beberapa enzim lainnya (Naiola, 2002; Martin *et al.*, 2019). Gambar 2 memperlihatkan *Aspergillus* sp. dalam penelitian Güçlü *et al.* (2010).



Gambar 2. *Aspergillus* sp. (Güçlü *et al.*, 2010).

Menurut Fardiaz (1992), klasifikasi dari *Aspergillus* sp. adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Fungi
Divisi	: Amastigomycota
Kelas	: Deutromycetes
Ordo	: Moniliales
Famili	: Moniliaceae
Genus	: <i>Aspergillus</i>
Spesies	: <i>Aspergillus</i> sp.

2.4 Isolasi dan Pemurnian Enzim

Enzim dapat dikelompokkan menjadi dua jenis berdasarkan letak kerjanya, yaitu enzim intraseluler dan ekstraseluler. Enzim intraseluler biasanya digunakan di dalam sel dan terletak di dalam sel di dalam sel itu sendiri, sementara enzim ekstraseluler dilepaskan dari sel ke lingkungan sekitarnya untuk memecah polimer dalam lingkungan tersebut (Maier *et al.*, 2000). Sebagai contoh, enzim α -amilase merupakan jenis enzim ekstraseluler yang dapat dilepaskan dari sel mikroba melalui proses sentrifugasi tanpa memerlukan pemecahan sel. Prinsip dasar sentrifugasi adalah memisahkan zat berdasarkan berat molekulnya dengan menggunakan gaya sentrifugal sehingga zat yang lebih berat akan terletak di bagian bawah, sedangkan zat yang lebih ringan akan terletak di bagian atas. (Faatih, 2009). Tahap isolasi dilakukan untuk memisahkan enzim dari makromolekul lain yang berasal dari dalam sel mikroba seperti asam nukleat,

karbohidrat, dan protein (Okafor *and* Okeke, 2018). Sedangkan pemurnian enzim bertujuan untuk memisahkan enzim yang diinginkan dari zat pengotor yang tidak diinginkan. Beberapa metode yang umum digunakan dalam tahap pemurnian yaitu fraksinasi dan dialisis.

2.4.1 Sentrifugasi

Sentrifugasi merupakan langkah pertama dalam proses pemurnian enzim. Prinsip kerja alat sentrifugasi adalah memisahkan molekul dari sel atau organel subselular berdasarkan konsep bahwa partikel yang tersuspensi di dalam wadah akan mengendap ke dasar wadah karena adanya gaya gravitasi. Ini bertujuan untuk memisahkan komponen berdasarkan berat molekulnya (Panjaitan dkk., 2021). Umumnya, sel-sel mikroba akan mengalami pengendapan pada kecepatan 5.000 rpm selama 15–20 menit (Santos *et al.*, 2015). Proses sentrifugasi menghasilkan endapan yang mengandung kotoran dan supernatan yang merupakan ekstrak kasar enzim. Untuk mencegah denaturasi enzim karena pelepasan panas, sentrifugasi dilakukan pada suhu rendah, sekitar 2–4°C (Bollag *et al.*, 1996; Rahmadina dan Febriani, 2017).

2.4.2 Fraksinasi dengan Amonium Sulfat

Pemurnian enzim bertujuan untuk memisahkan enzim yang diinginkan dari senyawa yang tidak diinginkan. Enzim yang dalam bentuk kasar atau sudah dimurnikan sebagian bisa digunakan untuk tujuan komersial, sementara enzim yang hampir murni atau sudah murni digunakan dalam riset atau produk analitik. Untuk keperluan riset, enzim sering dipelajari untuk memahami aktivitas, struktur, dan fungsinya. Jumlah protein yang telah dimurnikan tidak hanya tergantung pada bahan awal yang digunakan tetapi juga pada proses pemurnian karena protein dapat hilang di setiap tahap pemurnian. Selain itu, beberapa penelitian melaporkan bahwa sekitar 5–10% atau lebih dari hasil pemurnian masih mengandung kontaminasi oleh protein lain. Oleh karena itu, diperlukan tahap pemurnian yang lebih lanjut untuk meningkatkan kemurnian sampel (Wingfield, 2015).

Pemisahan enzim amilase sering kali dilakukan dengan teknik fraksinasi menggunakan metode *salting out* (pengendapan) yang melibatkan penambahan garam amonium sulfat dalam konsentrasi tinggi. Hal ini menyebabkan peningkatan kekuatan ion garam yang kemudian berinteraksi dengan air dan mengendapkan enzim (Iswendi, 2010). Setiap fraksi dan enzim amilase kasar kemudian diuji untuk aktivitasnya menggunakan metode Fuwa. Keunggulan dari pendekatan pemurnian ini dengan menggunakan amonium sulfat adalah jarang terjadi denaturasi enzim, peningkatan stabilitas enzim, dan biaya yang lebih rendah (Golunski *et al.*, 2017).

Amonium sulfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ memiliki beberapa keunggulan, seperti tingkat kelarutan yang tinggi dalam air, tidak memengaruhi aktivitas enzim, molaritas yang tinggi dalam kondisi jenuh sehingga efektif dalam pengendapan, efek penstabil terhadap enzim, suhu pelarutannya yang rendah sehingga panas yang dihasilkan mudah hilang, cocok digunakan pada berbagai rentang pH, larutan pekatnya mampu mencegah pertumbuhan bakteri, sebagian besar protein terlindungi dari denaturasi dalam larutan amonium sulfat, dan memiliki kerapatan yang cukup rendah dalam larutan jenuhnya (sekitar $1,235 \text{ g/cm}^3$ pada 20°C), sehingga tidak mengganggu sedimentasi protein saat proses sentrifugasi (Scopes, 1982).

Menurut penelitian Yandri *et al.* (2022), aktivitas unit enzim α -amilase yang dihasilkan dari *A. fumigatus* setelah fraksinasi mencapai 345,57 U/mL, melebihi aktivitas unit dari ekstrak kasar yang hanya sebesar 100,37 U/mL dan juga adanya peningkatan aktivitas spesifik dari 472,88 U/mg menjadi 3.970,08 U/mg yang menunjukkan peningkatan kemurnian sebesar 8 kali.

2.4.3 Dialisis

Dialisis adalah teknik pemurnian enzim yang memanfaatkan difusi ion-ion garam melalui membran semipermeabel seperti kantong selofan. Kantong selofan ini memiliki beragam ukuran pori. Ukuran pori yang dipilih disesuaikan dengan ukuran ion dalam sampel. Proses dialisis terjadi karena perbedaan tekanan

osmotik antara cairan di kedua sisi membran, yang mana ion-ion garam berdifusi dari area dengan tekanan osmotik tinggi ke area dengan tekanan osmotik lebih rendah (Bollag *et al.*, 1996).

Larutan enzim yang telah mengalami fraksinasi memiliki ion-ion garam dengan tekanan osmotik yang lebih tinggi dibandingkan dengan larutan buffer yang memiliki konsentrasi rendah selama proses dialisis. Akibatnya, ion-ion garam akan berdifusi keluar dari membran, sementara molekul air dari larutan buffer dengan tekanan osmotik yang lebih rendah akan bergerak ke dalam membran. Enzim akan tertahan di dalam membran karena ukurannya yang lebih besar daripada pori-pori membran, sedangkan ion-ion garam yang lebih kecil dapat lewat melalui pori-pori membran. Untuk mencegah denaturasi enzim, penting untuk menjalankan proses dialisis pada suhu antara 2–4°C (Bollag *et al.*, 1996). Dialisis dihentikan bila semua garam amonium sulfat telah keluar dari membran dengan mengujinya menggunakan larutan BaCl₂ dan HCl (Wardani dan Nindita, 2012). Bila masih ada ion sulfat dalam kantong maka akan terbentuk endapan putih BaSO₄. Semakin banyak endapan yang terbentuk maka semakin banyak ion sulfat yang ada dalam kantong. Berdasarkan penelitian Yandri *et al.* (2022), aktivitas enzim α -amilase dari *A. fumigatus* setelah dialisis mencapai 179,68 U/mL, yang lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas ekstrak kasarnya sebesar 100,37 U/mL.

Untuk mencapai keseimbangan osmotik, diperlukan percepatan dalam pergerakan molekul (Bollag *et al.*, 1996), yang dapat dilakukan melalui metode berikut:

- 1) Mengganti secara berkala larutan buffer yang memiliki konsentrasi rendah.
- 2) Memperluas luas permukaan membran, misalnya dengan memperbesar ukuran kantong selofan.
- 3) Mengaduk larutan buffer menggunakan *stir bar*.

Selanjutnya dilakukan uji aktivitas dengan metode Mandels pada λ_{maks} 510 nm dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry pada λ_{maks} 750 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

2.5 Uji Aktivitas Enzim α -Amilase

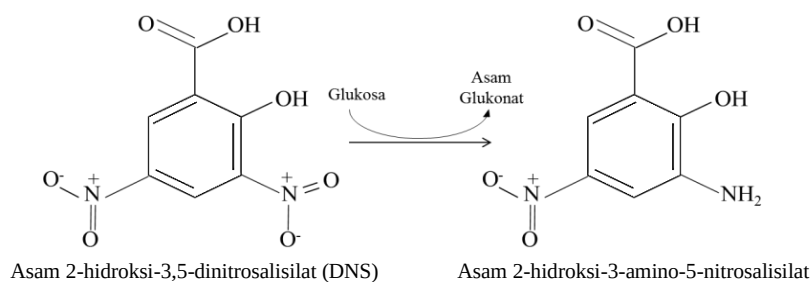
Aktivitas enzim α -amilase dapat diidentifikasi melalui pengujian menggunakan metode Fuwa dan Mandels. Metode Fuwa digunakan dalam tahap isolasi dan pemurnian enzim α -amilase, sementara metode Mandels digunakan untuk menentukan data kinetika dan melakukan karakterisasi enzim (Yandri dkk., 2020). Tingkat aktivitas spesifik yang semakin tinggi dari suatu enzim dapat menjadi indikator peningkatan tingkat kemurnian enzim tersebut (Novák and Havlíček, 2016).

2.5.1 Metode Fuwa

Metode Fuwa merupakan cara untuk mengukur aktivitas enzim α -amilase dengan menghitung jumlah pati yang terhidrolisis dan menghasilkan perubahan warna menjadi biru setelah iodin ditambahkan. Perubahan warna ini akan menyerap cahaya pada panjang gelombang maksimum sekitar 600 nm. Uji Fuwa dianggap sebagai uji yang paling spesifik dalam mengidentifikasi aktivitas enzim amilase karena membutuhkan waktu reaksi yang singkat, hanya sekitar 10 menit inkubasi dan menggunakan pati sebagai substrat. Dalam kontrol, iodin (I_2) akan terikat pada rantai spiral substrat (amilosa) dan menghasilkan larutan berwarna biru. Enzim telah dinonaktifkan oleh HCl sebelumnya sehingga substrat tetap utuh dan tidak dihidrolisis oleh enzim, yang berarti larutan akan tetap berwarna biru. Pada sampel, enzim akan membentuk kompleks dengan substrat, membentuk kompleks enzim-substrat. Kompleks ini kemudian akan bereaksi dengan larutan iodin, menghasilkan larutan berwarna kuning yang dapat diukur secara spektrofotometri. Semakin banyak substrat yang dihidrolisis oleh enzim, warna larutan akan semakin kuning cerah. Hal ini disebabkan karena substrat pati yang berikatan dengan iodin dan enzim semakin berkurang, berubah menjadi produk, yaitu glukosa. Selain itu, enzim akan melepaskan ikatan spiral antara iodin dan substrat, menyebabkan warna larutan menjadi kuning cerah (Fuwa, 1954).

2.5.2 Metode Mandels

Metode Mandels didasarkan pada pembentukan gula pereduksi, seperti glukosa, yang kemudian mengalami oksidasi oleh asam 2-hidroksi-3,5-dinitrosalisilat (DNS), menghasilkan larutan dengan warna merah kejinggaan. Warna ini menyerap cahaya pada panjang gelombang maksimum 510 nm (Eveleigh *et al.*, 2009; Mandels *et al.*, 1976). Glukosa dikategorikan sebagai gula pereduksi karena memiliki gugus aldehida yang dapat mudah mengalami oksidasi dan berubah menjadi gugus karboksil. Bentuk hemiasetal siklik dari aldosa (termasuk glukosa) memiliki kecenderungan untuk mengalami oksidasi karena dapat berubah menjadi bentuk rantai aldehida yang terbuka. DNS berperan sebagai agen pengoksidasi, mengalami reduksi dari gugus nitro menjadi gugus amina, membentuk senyawa asam 2-hidroksi-3-amino-5-nitrosalisilat. Pada saat yang sama, glukosa akan mengalami oksidasi menjadi asam glukonat (Miller, 1959) seperti yang diperlihatkan dalam Gambar 3.



Gambar 3. Reaksi antara DNS dengan glukosa.

2.6 Metode Lowry

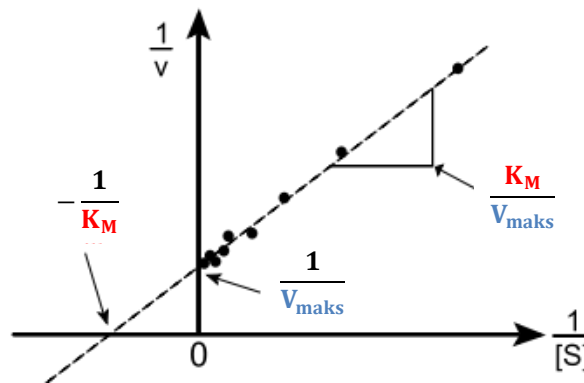
Penentuan kadar protein bertujuan untuk memastikan keberadaan enzim (protein) dalam sampel setelah proses pemurnian dengan aktivitas yang optimal. Evaluasi kandungan protein dilakukan berdasarkan pada kurva standar *Bovine Serum Albumin* (BSA) karena BSA mengandung asam amino seperti tirosin dan triptofan yang umumnya ditemukan pada sebagian besar protein. Asam-asam amino tersebut memiliki ikatan konjugasi yang mengalami transisi elektronik pada panjang gelombang maksimum 280 nm (Boyer, 2012). 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 dengan protein dan selanjutnya tereduksi menjadi Cu^+ dalam suasana alkalis. Kemudian, kompleks Cu^+ -protein berinteraksi dengan reagen *folin-ciocalteu's phenol*. Protein secara bertahap mengurangi reagen tersebut, membentuk senyawa heteromolibdenum yang menghasilkan warna hijau-kebiruan. Warna ini 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).

2.7 Kinetika Reaksi Enzim

Dalam kinetika reaksi enzim, parameter yang penting adalah konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}), yang menggambarkan mekanisme reaksi enzimatik untuk satu substrat tunggal. Enzim (E) berikatan dengan substrat (S) dan mengubahnya menjadi produk (P). Studi kinetika enzim memperhatikan proses bagaimana enzim berinteraksi dengan substrat untuk menghasilkan produk (Shahib, 2005). Laju reaksi (V) yang dikatalisis oleh enzim akan meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi substrat [S] sampai mencapai titik di mana penambahan konsentrasi substrat [S] tidak lagi meningkatkan laju awal reaksi. Pada saat semua enzim dalam keadaan terikat dengan substrat [ES], laju reaksi akan mencapai titik maksimum (V_{maks}). Keadaan ketika V tidak dapat meningkat lagi dengan peningkatan konsentrasi [S] disebut sebagai kecepatan maksimum (V_{maks}). V_{maks} adalah salah satu parameter dalam kinetika enzim. Hubungan antara konsentrasi substrat dan kecepatan reaksi enzimatik dinyatakan sebagai K_M (tetapan Michaelis-Menten). Nilai K_M merupakan konsentrasi substrat yang dibutuhkan oleh suatu enzim agar menghasilkan kecepatan reaksi setengah dari kecepatan maksimumnya ($V = \frac{1}{2} V_{\text{maks}}$) (Shuler and Kargi, 2002).

Nilai K_M dapat ditentukan dengan mengekstrapolasikan data eksperimental ke dalam grafik persamaan Lineweaver-Burk, seperti pada Gambar 4.



Gambar 4. Grafik Lineweaver-Burk (Suhartono, 1989).

Persamaan Lineweaver-Burk merupakan persamaan kebalikan berganda yang linier dari Persamaan 1 Michaelis-Menten sebagai berikut:

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

Persamaan 2 Lineweaver-Burk:

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

Kenaikan K_M pada enzim yang terimobilisasi menunjukkan bahwa afinitas enzim terhadap substrat menurun sehingga kinerja enzim dalam mengubah substrat tidak optimal. Molekul enzim yang terikat pada matriks imobil tidak bisa bergerak secara bebas sehingga menghambat interaksi enzim dengan molekul substrat. Interaksi elektrostatis antara substrat dan matriks imobil juga dapat berkontribusi pada penurunan nilai K_M (Robinson, 2015).

2.8 Kestabilan Enzim

Kestabilan enzim merujuk pada kemampuan enzim untuk mempertahankan aktivitas dan strukturnya dalam kondisi fisiologis selama penggunaan dan penyimpanannya. Stabilitas enzim mencakup kestabilan terhadap suhu dan pH. Hal ini menjadi sangat penting terutama dalam aplikasi industri yang beroperasi pada kondisi suhu dan pH ekstrem. Penggunaan kondisi ekstrem ini dimaksudkan untuk meningkatkan laju reaksi, mengurangi kontaminan, dan mengatasi masalah

viskositas. Stabilitas termal enzim ditentukan dari aktivitas enzim yang tersisa setelah diinkubasi selama periode tertentu.

Kestabilan enzim juga dapat tercermin dalam penilaian kestabilan termal, yaitu waktu paruh ($t_{1/2}$), perubahan energi bebas akibat denaturasi (ΔG_i), dan konstanta laju inaktivasi (k_i). Peningkatan nilai $t_{1/2}$ mengindikasikan bahwa enzim imobil membutuhkan waktu yang lebih lama untuk kehilangan aktivitasnya dan peningkatan nilai ΔG_i pada enzim yang diimobilisasi menunjukkan bahwa struktur konformasional enzim menjadi lebih *folding* dari semula yang menyebabkan struktur enzim menjadi lebih kaku dan kurang fleksibel. Ini mengakibatkan peningkatan energi yang diperlukan untuk mendenaturasi enzim tersebut. Sebaliknya, penurunan nilai k_i terjadi karena enzim yang kurang fleksibel dalam larutan air, mengurangi kemungkinan terjadinya ketidakterlipatan (*unfolding*) protein sehingga meningkatkan stabilitas enzim (Yandri dan Wulandari, 2009).

2.8.1 Kestabilan Termal

Kestabilan termal enzim dapat ditentukan dengan melihat aktivitas sisa enzim setelah terpapar suhu tinggi dalam jangka waktu tertentu yang dapat ditentukan dengan menggunakan Persamaan 3 sebagai berikut:

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

Keterangan: E_0 = aktivitas sisa enzim pada t_0 atau tanpa inaktivasi; E_i = aktivitas sisa enzim setelah diinaktivasi selama waktu t_i (Yang *et al.*, 1996).

2.8.2 Konstanta Laju Inaktivasi Termal (k_i)

Konstanta laju inaktivasi (k_i) adalah nilai yang mencerminkan perubahan konsentrasi enzim selama periode inaktivasi.

Penentuan konstanta laju inaktivasi termal (k_i) bergantung pada persamaan laju inaktivasi termal enzim orde satu yang dapat dituliskan sebagai Persamaan 4, yaitu:

$$\ln\left(\frac{E_i}{E_0}\right) = -k_i \times t_i \dots\dots\dots (4)$$

Keterangan: k_i = konstanta laju inaktivasi termal; E_0 = aktivitas sisa enzim pada t_0 atau tanpa inaktivasi; E_i = aktivitas sisa enzim setelah diinaktivasi selama waktu t_i ; dan t_i = waktu inaktivasi. Nilai k_i merupakan *slope* grafik laju inaktivasi termal enzim orde satu antara data $\ln\left(\frac{E_i}{E_0}\right)$ terhadap t_i (Kazan *et al.*, 1997; Stahl, 1999).

2.8.3 Waktu Paruh ($t_{1/2}$)

Waktu paruh ($t_{1/2}$) mengacu pada periode waktu pada saat enzim kehilangan separuh aktivitasnya, dan ini adalah konsep yang penting dalam mengukur stabilitas enzim (Kazan *et al.*, 1997). Perhitungan waktu paruh biasanya ditentukan pada persamaan laju inaktivasi termal enzim orde satu yang ditunjukkan dengan Persamaan 5 seperti berikut:

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

Keterangan: k_i = konstanta laju inaktivasi termal; dan $t_{1/2}$ = waktu paruh (Kazan *et al.*, 1997; Stahl, 1999).

2.8.4 Perubahan Energi Bebas Akibat Denaturasi (ΔG_i)

Energi bebas akibat denaturasi (ΔG_i) adalah energi bebas yang dibutuhkan untuk mengubah enzim dari keadaan awal menjadi keadaan terdenaturasi. Penentuan nilai ΔG_i dapat dihitung menggunakan persamaan termodinamika yang ditunjukkan pada Persamaan 6 sebagai berikut:

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

Keterangan: R = konstanta gas ideal ($8,315 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$); T = suhu inaktivasi termal (K); k_i = konstanta laju inaktivasi termal; h = konstanta Planck ($6,625 \times 10^{-34} \text{ J.detik}$); dan k_B = konstanta Boltzman ($1,381 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$) (Kazan *et al.*, 1997).

Menurut studi yang dilakukan oleh Yandri *et al.* (2022), enzim α -amilase yang mengalami imobilisasi pada matriks bentonit menunjukkan penurunan nilai k_i , peningkatan $t_{1/2}$, dan kenaikan ΔG_i dibandingkan dengan enzim yang telah dimurnikan. Peningkatan $t_{1/2}$ menandakan bahwa enzim imobil memerlukan lebih banyak waktu sebelum mengalami inaktivasi, mengindikasikan tingkat kestabilan yang lebih tinggi. Penurunan nilai k_i dan peningkatan ΔG_i pada enzim imobil disebabkan oleh sifatnya yang menjadi semakin kaku serta terjadinya penambahan lipatan (*folding*) pada enzim yang menyebabkan peningkatan kestabilan enzim secara keseluruhan (Kazan *et al.*, 1997; Yandri dan Suhartati, 2018).

2.9 Imobilisasi Enzim

Imobilisasi enzim adalah proses pengikatan enzim secara fisik pada suatu matriks yang tidak larut dalam air. Keuntungan teknik imobilisasi, seperti meningkatkan stabilitas enzim, mempermudah pengendalian kondisi reaksi, memungkinkan penggunaan enzim secara berulang, dan meningkatkan kemurnian enzim serta produk yang dihasilkan (Sirisha *et al.*, 2016). Imobilisasi dapat dikelompokkan dalam tiga kategori, yaitu metode pengikatan pada pembawa (*carrier-binding*), metode silang-ikatan (*cross-linking*), dan metode perangkapan (*entrapment*).

Dalam metode ini, enzim diadsorpsi pada bahan pendukung melalui pembentukan ikatan meliputi ikatan hidrogen, gaya Van der Waals, interaksi ionik, hidrofobik, dan kadang-kadang pengikatan afinitas (Gorecka and Jastrzebska, 2011). Metode ini relatif mudah dilakukan, tidak merusak struktur enzim, dan biasanya tidak menyebabkan penurunan signifikan dalam aktivitas enzim (Sedaghat *et al.*, 2009; Alnadari *et al.*, 2020). Namun, ikatan antara enzim dan matriks pada metode ini cenderung lemah dan sensitif terhadap perubahan pH. Fluktuasi pH atau kekuatan ion dapat menyebabkan lepasnya enzim dari matriks. Enzim dan matriks dapat dipisahkan kembali melalui proses filtrasi atau sentrifugasi. Keberhasilan penggunaan metode ini bergantung pada ukuran dan luas permukaan dari matriks yang digunakan. Contoh bahan pendukung yang digunakan dalam metode ini adalah silika, bentonit, emas, zeolit, kitosan, selulosa, dan lain sebagainya

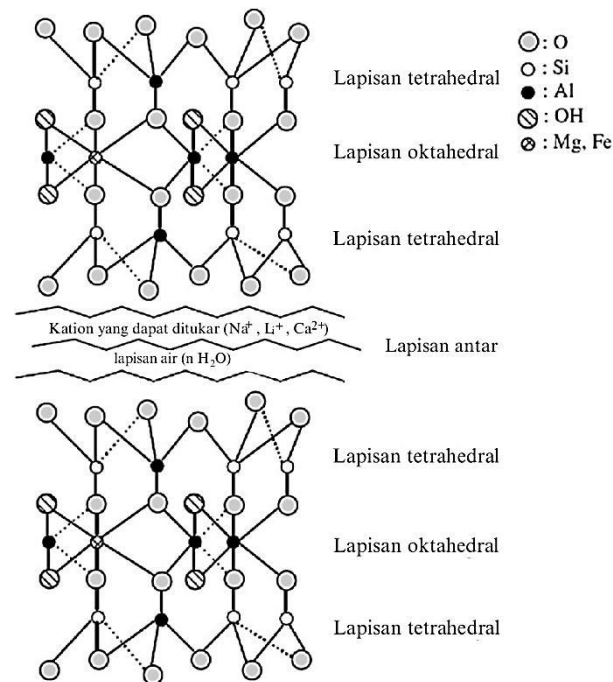
merupakan contoh dari metode pengikatan (*carrier-binding*) menggunakan adsorpsi fisik (Jesionowski *et al.*, 2014). Berbagai penelitian terkait imobilisasi enzim dengan menggunakan matriks bentonit dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Berbagai penelitian imobilisasi enzim dengan matriks bentonit

Sumber Enzim	Jenis Enzim dan Matriks	Penggunaan Berulang	Aktivitas Sisa (%)	Referensi
<i>A. fumigatus</i>	α -amilase dan bentonit-kitosan	6	48	(Yandri <i>et al.</i> , 2023)
<i>A. fumigatus</i>	α -amilase dan bentonit	6	42	(Yandri <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bacillus subtilis</i> ITBCCB148	α -amilase dan bentonit	5	40	(Yandri <i>et al.</i> , 2018)
Hati sapi	katalase dan kitosan-bentonit	20	70	(Kaushal <i>et al.</i> , 2018)
<i>Trichoderma viride</i>	xilanase dan bentonit	5	60	(Lailah <i>et al.</i> , 2017)

2.10 Bentonit

Bentonit merupakan material anorganik jenis mineral lempung dari kelompok smektit dengan tipe struktur ditetrahedral yang disebut juga golongan mineral montmorillonit. Berdasarkan hasil analisis *X-Ray Fluorescence* (XRF) pada penelitian, komposisi kimia bentonit dapat mengandung SiO_2 , Al_2O_3 , Na_2O , Fe_2O_3 , CaO , MgO , dan K_2O (Saeed *et al.*, 2020). Imobilisasi enzim menggunakan bentonit dilakukan melalui metode *carrier binding* secara adsorpsi fisik dan melibatkan pertukaran kation pada lapisan *interlayer* bentonit dengan RNH_3^+ yang berasal dari enzim. Enzim akan diadsorpsi pada permukaan matriks melalui interaksi ionik, interaksi hidrofobik, ikatan hidrogen, gaya Van der Waals, dan terkadang juga melalui pengikatan afinitas (Rosmanansari dkk., 2013; Gorecka and Jastrzebska, 2011). Struktur bentonit dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Struktur bentonit (Shaikh *et al.*, 2017).

Pemilihan bentonit sebagai bahan pendukung untuk imobilisasi enzim didasarkan pada beberapa pertimbangan utama. Pertama, bentonit tidak larut dalam air dan memiliki kapasitas tukar ion yang besar. Kedua, pH bentonit berkisar antara 4–7 (pH asam), sesuai dengan pH optimum enzim seperti α -amilase. Selain itu, bentonit mengandung kation bivalen seperti Ca^{2+} yang dapat membantu dalam menstabilkan enzim. Kemudian, bentonit dianggap murah dan tersedia di alam jumlah yang cukup di alam, termasuk di Indonesia. Selain itu, bentonit juga memiliki stabilitas mekanik dan termal yang baik, memiliki permukaan partikel yang luas sehingga dapat menahan jumlah enzim yang besar, tidak mengganggu reaksi enzimatik yang diinginkan, bersifat rigid, stabil, dan tidak beracun (Sedaghat *et al.*, 2009).

2.11 Analisis Spektroskopi Ultraviolet-Visible (UV-Vis)

Spektrofotometri UV-Vis adalah ilmu yang mempelajari interaksi radiasi elektromagnetik sinar UV-Vis dengan molekul atau atom dalam suatu substansi kimia. Pengukuran interaksi ini dilakukan menggunakan perangkat yang disebut

spektrofotometer. Prinsip dasar analisis spektrofotometri UV-Vis pada senyawa organik adalah bahwa senyawa tersebut mampu menyerap sinar ultraviolet dan sinar tampak yang mengakibatkan elektron-elektron dalam ikatan dan non-ikatan senyawa tersebut menjadi terstimulasi dari keadaan dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi. Absorpsi sinar UV-Vis direkam sebagai spektrum yang mencatat panjang gelombang dan absorbansi, yang berkorelasi dengan jumlah elektron dalam senyawa yang tertangkap oleh radiasi tersebut. Rentang spektrum absorpsi UV-Vis berkisar antara 220 hingga 800 nm. Spektrofotometri UV-Vis dapat diterapkan pada sampel yang memiliki atau tidak memiliki warna (Day dan Underwood, 2001). Biasanya, senyawa yang menyerap sinar UV tidak akan berwarna, sedangkan senyawa berwarna cenderung menyerap sinar tampak.

Secara umum, spektroskopi UV-Vis digunakan untuk mengukur konsentrasi protein dan enzim. Sebuah metode pengukuran sederhana, cepat, dan ekonomis berbasis UV-Vis telah dikembangkan untuk menentukan konsentrasi protein atau enzim yang mengatasi beberapa kelemahan teknik tradisional. Metode ini telah terbukti efektif dalam mengukur konsentrasi protein dan enzim seperti serum albumin bovine, insulin, lipase, dan peroksidase. Dalam proses pengukuran ini, metode tersebut memperhitungkan faktor-faktor seperti agregasi, konsentrasi buffer, dan karakteristik standar yang dapat mempengaruhi ketepatan pengukuran. Spektroskopi UV-Vis juga dimanfaatkan dalam studi kinetika enzim dan interaksi afinitas antara enzim dan substratnya. Metode ini memungkinkan pengukuran yang akurat terhadap kecepatan reaksi enzim, memberikan informasi tentang kecepatan reaksi, dan tingkat afinitas enzim terhadap substratnya (Lassalle *et al.*, 2011; Yandri *et al.*, 2018).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober 2023 sampai April 2024, bertempat di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Analisis spektrofotometri UV-Vis dilakukan di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah inkubator (Precistern P Selecta™), neraca analitik (Ainsworth AA-160 Denver Instrument Company™), *autoclave* (S-90-N Electric Steroclave™), *Laminar Air Flow* (9005-FL Crumair™), *shaker incubator* (Environ Shaker-Lab Line™), spektrofotometer UV-Vis (Cary 100™), *waterbath* (Mettler W 350™), *centrifuge* (Fisher Scientific 225 Centrifuge™), tabung sentrifugasi, mikropipet 100–1000 µL (Eppendorf™), oven (T60 Heraeus™), pH meter (MetroHM™ 827), *magnetic stirrer*, jarum ose, pembakar Bunsen, penangas, *freezer*, spatula, termometer, batang pengaduk, pipet tetes, tabung reaksi, rak tabung reaksi, labu Erlenmeyer (50–2000 mL), *beaker glass* (100–1000 mL), gelas ukur (5–1000 mL), labu ukur (5 mL–500 mL), corong gelas, dan *hot plate*.

Mikroorganisme penghasil α -amilase yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Aspergillus* sp. yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Bahan-bahan yang digunakan adalah bentonit (Sigma-Aldrich™), *Potato Dextrose Agar*/PDA (Himedia™), pati (amilum), tepung tapioka (Pak Tani Gunung™), 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 iodine (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 2-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 pH universal, kertas saring, kapas sumbat, dan kasa.

3.3 Prosedur Penelitian

Prosedur kerja dalam penelitian ini terbagi menjadi beberapa subbagian yang dilakukan dengan cermat, seksama, dan tetap memperhatikan faktor keselamatan kerja.

3.3.1 Tahapan Persiapan

Peralatan gelas yang digunakan dicuci bersih, dikeringkan, dan disterilisasi agar alat-alat terhindar dari kontaminasi mikroba yang tidak diinginkan. Sterilisasi alat dilakukan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C , 1 atm, selama 15 menit

3.3.1.1 Pembuatan media agar miring

Pembuatan media agar miring dilakukan dengan diambil sebanyak 3,9 gram PDA dan 0,1 gram pati jagung dilarutkan dalam 100 mL akuades, lalu dipanaskan sambil diaduk sesekali hingga larut sempurna. Media segera dituang 5 mL ke beberapa tabung reaksi. Tabung reaksi ditutup sumbat kapas, aluminium *foil*, dan kertas. Selanjutnya, media disterilisasi pada suhu 121°C , 1 atm, selama 15 menit dalam *autoclave*. Kemudian, tabung reaksi diletakkan pada bidang miring selama 24 jam pada kondisi aseptis sampai agar mengeras (Nwagu and Okolo, 2011).

3.3.1.2 Pembuatan media inokulum dan fermentasi

Media inokulum dan media fermentasi terdiri dari jenis nutrisi yang sama, yaitu: 2,0% KH_2PO_4 ; 1,40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,75% pati singkong; 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; Goto *et al.*, 1998). 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 (Veerdonk *et al.*, 2017). 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.

3.3.1.3 Pembuatan larutan buffer fosfat 0,05 M pH optimum 6

- 1) Larutan NaH_2PO_4 ($M_r = 120$ gram/mol) 0,05 M sebanyak 1.000 mL (Stok A)

Larutan dibuat dengan Persamaan 7 sebagai berikut:

$$M = \frac{\text{massa (g)}}{M_r \text{ (g/mol)}} \times \frac{1.000}{V_{\text{pelarut}} \text{ (mL)}} \dots\dots\dots (7)$$

$$0,05 = \frac{\text{massa (g)}}{120} \times \frac{1.000}{1.000}$$

$$\text{Massa} = 6 \text{ gram}$$

Untuk membuat 1.000 mL larutan NaH_2PO_4 0,05 M diperlukan 6 gram

NaH_2PO_4 yang dilarutkan dengan akuades dalam labu ukur 1.000 mL hingga batas meniskus, lalu dihomogenkan.

- 2) Larutan Na_2HPO_4 ($M_r = 142$ g/mol) 0,05 M sebanyak 1.000 mL (Stok B)

Larutan dibuat dengan Persamaan 7. Untuk membuat 1.000 mL larutan Na_2HPO_4 0,05 M diperlukan 7,14 gram Na_2HPO_4 yang dilarutkan dengan akuades dalam labu ukur 1.000 mL hingga batas meniskus, lalu dihomogenkan.

- 3) Larutan buffer fosfat 0,05 M sebanyak 1.000 mL pH 6

Larutan NaH_2PO_4 (Stok A) dicampurkan dengan larutan Na_2HPO_4 (Stok B) dengan komposisi tertentu untuk mendapatkan pH 6. Volume Stok A dan

Stok B yang dibutuhkan untuk mendapatkan larutan buffer fosfat sebanyak 1.000 mL dapat diperkirakan dengan Persamaan 8.

$$[H^+] = K_a (NaH_2PO_4) \left(\frac{V_{(NaH_2PO_4)}}{V_{(Na_2HPO_4)}} \right) \dots\dots\dots (8)$$

dengan keterangan: $V_{(Na_2HPO_4)} = V_{total} - V_{(NaH_2PO_4)}$

$$[H^+] = K_a (NaH_2PO_4) \left(\frac{V_{(NaH_2PO_4)}}{V_{total} - V_{(NaH_2PO_4)}} \right)$$

$$10^{-6,0} = 6,3 \times 10^{-8} \left(\frac{V_{(NaH_2PO_4)}}{1.000 - V_{(NaH_2PO_4)}} \right)$$

$$V_{(NaH_2PO_4)} = 940,73 \text{ mL}$$

$$V_{(Na_2HPO_4)} = 59,27 \text{ mL}$$

Pembuatan buffer pH 6 dengan persamaan di atas perlu diverifikasi akurasiya menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi.

3.3.1.4 Pembuatan reagen Fuwa (Fuwa, 1954)

1) Pereaksi Iodin

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

2) Larutan substrat pati 0,1%

Sebanyak 0,05 gram pati (*starch soluble*) dilarutkan dalam 50 mL akuades kemudian dipanaskan sambil sesekali diaduk hingga larut.

3) Larutan HCl 1 N

HCl pekat 12 N diencerkan menjadi HCl 1 N sebanyak 100 mL di dalam lemari asam menggunakan Persamaan 9 sebagai berikut:

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2 \dots\dots\dots (9)$$

$$12 \times V_1 = 1 \times 100$$

$$V_1 = 8,33 \text{ mL}$$

Untuk membuat 100 mL larutan HCl 1 N diperlukan 8,33 mL HCl 12 N yang diencerkan dengan akuades sampai batas meniskus dalam labu ukur 100 mL yang kemudian dihomogenkan.

4) Pengenceran sampel

Jika absorbansi sampel enzim $<0,1$ artinya sampel terlalu pekat maka perlu dilakukan pengenceran. Konsentrasi awal enzim nilainya dianggap satu. Jika dibutuhkan 2 mL sampel uji dengan faktor pengenceran 10 kali, maka dihitung dengan Persamaan 9. Untuk membuat 2 mL larutan enzim pengenceran 10 kali diperlukan 200 μ L enzim pekat yang diencerkan dengan 1.800 μ L buffer dalam tabung reaksi, lalu dihomogenkan dengan bantuan *vortex*.

3.3.1.5 Pembuatan reagen Mandels (Eveleigh *et al.*, 2009; Mandels *et al.*, 1976)

1) Pereaksi DNS sebanyak 100 mL dibuat dengan tahapan sebagai berikut:

- DNS sebanyak 1 gram dilarutkan dengan 20 mL akuades.
- NaOH sebanyak 1 gram dan Fenol sebanyak 0,2 gram dilarutkan dengan 20 mL akuades.
- Na_2SO_3 sebanyak 0,05 gram dilarutkan dengan 10 mL akuades.
- Na/K-*tartrate* sebanyak 0,4 gram dilarutkan dengan 10 mL akuades.
- Seluruh zat di atas dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, lalu ditambahkan akuades hingga batas meniskus.

2) Larutan substrat pati 0,1%

Sebanyak 0,05 gram pati (*starch soluble*) dilarutkan dalam 50 mL akuades, lalu dipanaskan sambil sesekali diaduk hingga larut. Untuk karakterisasi enzim imobil, substrat dilarutkan dalam buffer fosfat/asetat 0,1 M pH pengikatan masing-masing matriks dengan nilai K_M masing-masing sebagai konsentrasi substrat pati optimum.

3) Larutan deret standar glukosa

- Larutan stok 1 mg/mL

Glukosa sebanyak 0,10 gram dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, lalu dilarutkan dengan akuades hingga batas meniskus dan dihomogenkan.

- Larutan deret standar glukosa (0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40; 0,45; 0,50 mg/mL)

Larutan dibuat dari larutan stok dengan Persamaan 9 dalam 5 mL.

3.3.1.6 Pembuatan pereaksi Lowry (Bollag *et al.*, 1996; Lowry *et al.*, 1951)

- 1) Pereaksi A: 2,0 gram Na_2CO_3 dilarutkan ke 100 mL NaOH 0,1 N.
- 2) Pereaksi B: campuran larutan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% dengan larutan Na/K *tartrate* 1% (1:1).
- 3) Pereaksi C: 2,0 mL pereaksi B + 100 mL pereaksi A.
- 4) Pereaksi D: campuran reagen *folin ciocalteu's phenol* dengan akuades (1:1).
- 5) Larutan deret standar *Bovine Serum Albumin* (BSA) dengan konsentrasi 20, 40, 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm.

3.3.2 Peremajaan Isolat *Aspergillus* sp.

Peremajaan dilakukan secara aseptis dalam *Laminar Air Flow* (LAF) yang telah disterilisasi oleh sinar UV. Setelah agar miring mengeras dan dipastikan bebas kontaminan, isolat *Aspergillus* sp. diambil satu tarikan ose, lalu ditusukkan ke dalam media agar miring. Media agar yang telah mengandung isolat diinkubasi selama beberapa hari dalam inkubator pada suhu 37°C (Yandri *et al.*, 2010).

3.3.3 Inokulasi *Aspergillus* sp.

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

3.3.4 Produksi Enzim α -Amilase

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

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

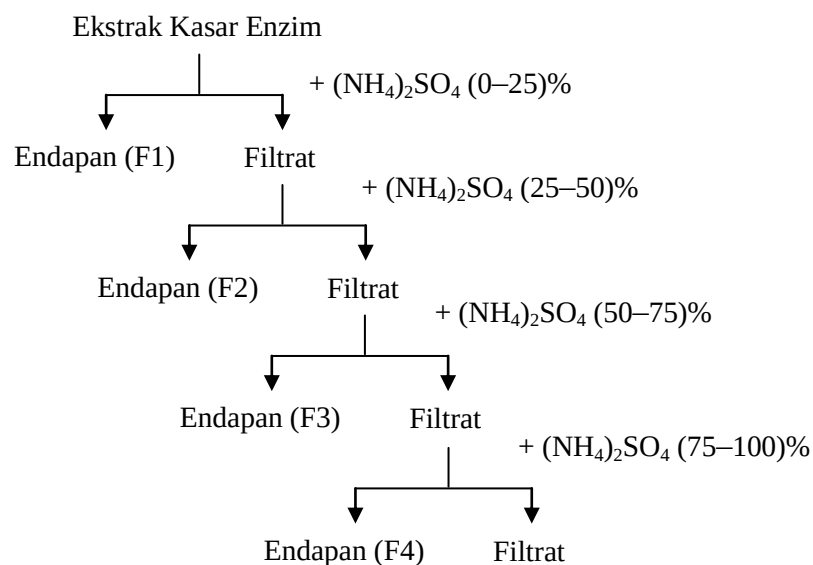
Hasil fermentasi disentrifugasi dingin selama 15–20 menit dengan kecepatan 5.000 rpm. Selama prosedur isolasi berlangsung, enzim perlu dijaga dalam kondisi dingin, sekitar 2–4°C, agar tidak terdenaturasi. Supernatan (filtrat) dipisahkan dari *pellet* (endapan pengotor) dan bulir-bulir jamur yang tidak hancur sempurna melalui filtrasi menggunakan kertas saring. Bulir-bulir jamur dapat diperas untuk mengeluarkan enzim. Supernatan yang diperoleh adalah ekstrak kasar enzim. Ekstrak kasar enzim α -amilase ditentukan nilai aktivitasnya dengan metode Fuwa pada λ_{maks} 600 nm dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry pada λ_{maks} 750 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

3.3.6 Fraksinasi dengan Amonium Sulfat

Langkah fraksinasi merupakan langkah awal dalam melakukan pemurnian enzim. Adapun langkah yang dilakukan adalah sebagai berikut:

3.3.6.1 Penentuan pola fraksinasi

Ekstrak kasar enzim yang telah diperoleh selanjutnya diendapkan dari larutannya dengan amonium sulfat ((NH₄)₂SO₄) pada berbagai persentase kejenuhan, yaitu (0–25), (25–50), (50–75), dan (75–100)%. Selanjutnya, filtrat yang didapat dari fraksi (0–25)% digunakan untuk diendapkan kembali dengan fraksi kejenuhan (25–50)% dengan prosedur yang sama hingga tingkat kejenuhan (75–100)%. Skema fraksinasi dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Skema fraksinasi dengan amonium sulfat.

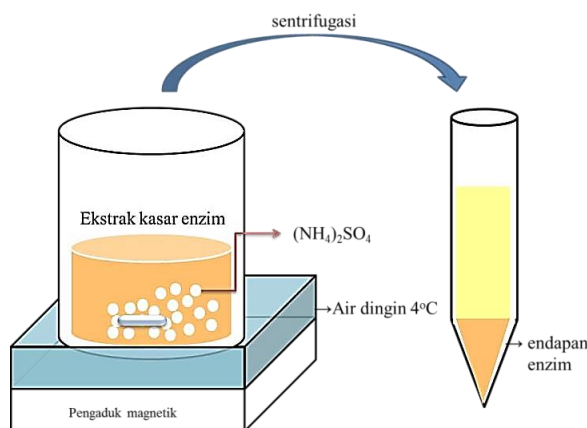
Sebanyak 100 mL ekstrak kasar enzim dimasukkan ke dalam gelas beker berukuran 300mL. Gelas kimia sampel ditempatkan dalam wadah berisi air dingin atau es batu untuk mencegah enzim terdenaturasi oleh panas selama pengadukan. Larutan mulai diaduk pada pengaduk magnetik dengan kecepatan yang stabil dan tidak terlalu cepat. Pengadukan yang terlalu cepat memicu denaturasi enzim yang ditandai oleh munculnya busa. Padatan garam amonium sulfat dengan konsentrasi (0–25)%, ditambahkan secara perlahan dalam waktu 5–10 menit ke dalam larutan. Umumnya garam akan larut selama 20–30 menit. Garam mulai sulit larut saat penambahan garam konsentrasi tinggi bahkan membutuhkan waktu beberapa jam. Pengadukan dihentikan ketika garam sudah terlihat larut sempurna. Larutan hasil fraksinasi disentrifugasi dingin pada kecepatan 5.000 rpm selama 15 menit. Endapan yang diperoleh, lalu dipisahkan dari filtratnya menggunakan kertas saring. Endapan dilarutkan dengan buffer fosfat pH 6 pada konsentrasi 0,025 M untuk menstabilkan pH enzim dari pengaruh sedikit pengasaman selama melarutkan garam. Buffer ditambahkan 1–2 kali volume endapan (Bollag *et al.*, 1996).

Filtrat dari tahap fraksi (0–25)% difraksinasi kembali pada urutan persen kejenuhan (25–50)% dengan prosedur yang sama. Filtrat ini mengalami penambahan volume dari garam yang terlarut sebelumnya, sehingga perlu dihitung kembali massa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang diperlukan untuk mengendapkan enzim, melalui Persamaan 10 sebagai berikut:

$$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \text{ (gram)} = \frac{\text{Volume filtrat (mL)}}{1.000 \text{ mL}} \times (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \text{ (gram)} \dots\dots\dots (10)$$

Scopes (1982) telah merangkum hasil perhitungan massa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g) untuk ditambahkan ke dalam 1 L larutan pada suhu 0°C , yang ditunjukkan pada Tabel 3.

Prosedur untuk setiap fraksi berikutnya sama seperti di atas. Setelah seluruh tahap selesai, selanjutnya akan dilakukan uji aktivitas dengan metode Fuwa pada λ_{maks} 600 nm dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry pada λ_{maks} 750 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hasil uji ini dibuat grafik pola fraksinasi antara fraksi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ terhadap aktivitas spesifik enzim. Ilustrasi metode fraksinasi amonium sulfat dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Ilustrasi metode fraksinasi ekstrak kasar enzim dengan amonium sulfat.

Tabel 3. Rangkuman hasil perhitungan massa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (gram) yang ditambahkan untuk fraksinasi dengan berbagai persentase kejenuhan.

		Konsentrasi Akhir Amonium Sulfat																			
Konsentrasi Awal Amonium Sulfat	%	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	0	27	56	84	113	144	176	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761
	5		27	56	85	115	146	179	212	246	282	319	357	397	439	481	526	572	621	671	723
	10			28	57	86	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685
	15				28	58	88	119	151	185	219	255	292	331	371	413	456	501	548	596	647
	20					29	59	89	121	154	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609
	25						29	60	91	123	157	191	227	265	304	344	386	429	475	522	571
	30							30	61	92	126	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
	35								30	61	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
	40									31	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457
	45										31	64	97	132	169	206	245	286	329	373	419
	50											32	65	99	135	172	210	250	292	335	381
	55												33	66	101	138	175	215	256	298	343
	60													33	67	103	140	179	219	261	305
	65														34	69	105	143	183	224	266
	70															34	70	107	146	186	228
	75																35	72	110	149	190
	80																	36	73	112	152
	85																		37	75	114
	90																			37	76
	95																				38

Sumber: (Bollag *et al.*, 1996).

3.3.6.2 Pemurnian dengan fraksinasi

Tiga atau empat fraksi dari pola fraksinasi pertama dengan aktivitas spesifik tertinggi dijadikan acuan untuk penentuan pola fraksi kedua. Pola fraksi kedua hanya dibagi menjadi dua fraksi saja. Hal ini bertujuan untuk menambah rendemen enzim sehingga tidak kehilangan banyak enzim dari proses pemurnian dan aktivitas enzim α -amilase yang diperoleh lebih tinggi dari pada aktivitas ekstrak kasar enzim (Yandri *et al.*, 2010). Prosedur ini sama dengan penentuan pola fraksinasi pertama. Fraksinasi dilakukan setiap 1 L ekstrak kasar enzim. Selanjutnya akan dilakukan uji aktivitas dengan metode Fuwa pada λ_{maks} 600 nm dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry pada λ_{maks} 750 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis .

3.3.7 Dialisis

Enzim hasil fraksinasi dengan aktivitas yang tinggi kemudian dimurnikan melalui dialisis. Tahap ini berfungsi untuk menghilangkan garam amonium sulfat dari hasil fraksinasi yang dapat mengganggu proses imobilisasi.

3.3.7.1 Preparasi kantong selofan

Kantong selofan dicuci dengan buffer fosfat 0,01 M pH 6 untuk menghilangkan zat-zat pengotor dan pastikan tidak ada kebocoran. Kantong selofan dipotong sesuai kebutuhan, yakni panjangnya tiga kali volume enzim agar proses difusi lebih optimal karena volume enzim hasil dialisis umumnya akan bertambah dua kali semula. Salah satu ujung selofan diikat perlahan agar selofan tidak rusak (Tiarsa, 2022).

3.3.7.2 Penempatan cuplikan enzim

Sebanyak 25 mL enzim hasil fraksinasi dimasukkan perlahan ke dalam kantong selofan menggunakan pipet tetes. Udara dalam kantong selofan dikeluarkan sehingga selofan tidak mengembung. Ujung selofan kemudian diikat pada batang pengaduk. Kantong selofan digantungkan pada gelas kimia yang ukurannya disesuaikan dengan tinggi selofan. Gelas kimia ditempatkan dalam

wadah berisi air dingin atau es batu untuk mencegah denaturasi enzim. Selama prosedur dialisis berlangsung, enzim perlu dijaga dalam kondisi dingin agar tidak terdenaturasi. Larutan mulai diaduk pada pengaduk magnetik dengan kecepatan yang stabil dan tidak terlalu cepat. Selofan sebaiknya tidak sampai menyentuh dasar gelas kimia agar tidak terganggu posisinya oleh *stir bar* (Tiarsa, 2022). Kemudian, buffer fosfat 0,01 M pH 6 dimasukkan ke dalam gelas kimia sampai seluruh cuplikan enzim dalam selofan terendam seluruhnya.

3.3.7.3 Dialisis enzim

Enzim didialisis selama 24 jam pada suhu dingin sambil diaduk dengan pengaduk magnetik untuk mempercepat pertukaran ion sulfat (SO_4^{2-}) dalam kantong selofan. Selain itu, dilakukan pergantian buffer selama 4–6 jam untuk memperbaharui larutan buffer yang sudah mengandung banyak ion sulfat sehingga proses pertukaran ion dapat terus berlangsung dan konsentrasi ion sulfat dalam selofan dapat dikurangi lebih optimal. Hal tersebut sebagai langkah untuk mencapai kesetimbangan osmotik. Jika prosedur sudah selesai, selofan dibilas dengan akuades atau buffer fosfat dan disimpan pada suhu 4°C untuk mencegah kontaminasi mikroba. Masa penggunaan selofan idealnya 6 bulan dan perlu dicuci secara berkala. Selanjutnya, enzim hasil dialisis ditentukan nilai aktivitasnya dengan metode Fuwa dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry. Enzim hasil dialisis ini selanjutnya digunakan untuk proses imobilisasi (Bollag *et al.*, 1996). Untuk menguji adanya amonium sulfat dalam larutan penyangga fosfat dilakukan dengan menggunakan larutan BaCl_2 dan HCl (Wardani dan Nindita, 2012). Bila masih ada ion sulfat dalam kantong maka akan terbentuk endapan putih BaSO_4 . Semakin banyak endapan yang terbentuk, maka semakin banyak ion sulfat yang ada dalam kantong. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas dengan metode Fuwa pada λ_{maks} 600 nm dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry pada λ_{maks} 750 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

3.3.8 Uji Aktivitas Unit (AU) Enzim α -Amilase Metode Fuwa (Fuwa, 1954)

Tabung sampel dan kontrol dipersiapkan. Pada tabung sampel, 0,25 mL enzim ditambahkan 0,25 mL larutan pati 0,1%. Pada tabung kontrol, 0,25 mL enzim ditambahkan 0,25 mL HCl 1 N. Keduanya diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit. Setelah inkubasi, pada sampel ditambahkan 0,25 mL HCl 1 N dan pada kontrol ditambahkan 0,25 mL larutan pati 0,1%. Kemudian, kedua tabung sama-sama ditambahkan 0,25 mL pereaksi iodine dan 4 mL akuades, lalu dihomogenkan. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} yang dicari terlebih dahulu. Nilai dari λ_{maks} yaitu di kisaran 600 nm (Fuwa, 1954). Pengukuran dilakukan segera agar sampel tidak rusak. Sesuai prinsip berkurangnya substrat dari metode Fuwa, maka seharusnya $A_{\text{kontrol}} > A_{\text{sampel}}$ dengan rentang absorbansi antara 0,2–0,7 (Yoo *et al.*, 1987). Rumus dasar aktivitas unit ditunjukkan dengan Persamaan 11, yaitu:

$$AU = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{kontrol}}} \times \frac{1}{V_{\text{enzim}}} \times 2 \times FP \dots\dots\dots (11)$$

Keterangan:

(A_{kontrol} = absorbansi kontrol; A_{sampel} = absorbansi sampel; FP = faktor pengenceran; V = volume enzim = 0,25 mL).

3.3.9 Uji Aktivitas Unit (AU) Enzim α -Amilase Metode Mandels

Langkah-langkah yang dilakukan pada penentuan aktivitas unit dengan metode Mandels adalah sebagai berikut:

3.3.9.1 Pembuatan kurva standar glukosa

Blanko yang digunakan adalah campuran pereaksi DNS dan akuades (1:2) mL. Blanko ini digunakan untuk setiap uji Mandels. Larutan deret standar glukosa dimasukkan ke dalam kuvet sampel secara bertahap dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} yang dicari terlebih dahulu. Nilai dari λ_{maks} yaitu di kisaran 510 nm (Mandels *et al.*, 1976). Data absorbansi terhadap konsentrasi glukosa diplotkan ke dalam grafik linier. Nilai *intercept* dan *slope* kurva standar glukosa digunakan dalam penentuan kadar glukosa pada sampel.

3.3.9.2 Uji aktivitas (Eveleigh *et al.*, 2009; Mandels *et al.*, 1976)

Uji aktivitas dimulai dengan persiapan tabung untuk sampel dan kontrol. Pada tabung sampel, sebanyak 0,25 mL enzim ditambahkan 0,25 mL larutan pati 0,1%. Setelah itu, diinkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit. Pada tabung kontrol, pati ditambahkan setelah inkubasi. Kemudian, kedua tabung sama-sama ditambahkan 1 mL pereaksi DNS, lalu dididihkan selama 10 menit. Selanjutnya, sampel didinginkan pada suhu ruang, lalu ditambahkan 1,5 mL akuades. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} . Kadar glukosa sampel ditentukan berdasarkan kurva standar glukosa. Sesuai prinsip terbentuknya produk dari metode Mandels, maka seharusnya $A_{\text{kontrol}} < A_{\text{sampel}}$.

Aktivitas unit dihitung melalui Persamaan 12 sebagai berikut:

$$AU = \frac{(A_{\text{sampel}} - A_{\text{kontrol}}) - b}{a} \times \frac{1}{V_{\text{enzim}}} \times \frac{1}{t_{\text{inkubasi}}} \times \frac{1.000 \times FP}{Mr_{\text{produk}}} \dots\dots\dots (12)$$

Keterangan:

(FP = faktor pengenceran; V = volume enzim = 0,25 mL; t = waktu inkubasi = 30 menit; Mr produk = massa relatif molekul glukosa = 180 gram/mol; b dan a = *intercept* dan *slope* kurva standar glukosa).

3.3.10 Uji Kadar Protein Metode Lowry

Langkah-langkah yang dilakukan pada penentuan kadar protein dengan metode Lowry adalah sebagai berikut:

3.3.10.1 Pembuatan kurva standar BSA

Blanko yang digunakan adalah akuades. Larutan deret standar BSA (20, 40, 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm) yang telah diberi pereaksi Lowry dimasukkan ke dalam kuvet sampel secara bertahap dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} yang dicari terlebih dahulu. Nilai dari λ_{maks} yaitu di kisaran 750 nm (Lowry *et al.*, 1951). Data absorbansi terhadap konsentrasi BSA diplotkan ke dalam grafik linier. Nilai *intercept* dan *slope* kurva standar BSA digunakan dalam penentuan kadar protein sampel.

3.3.10.2 Penentuan kadar protein (Bollag *et al.*, 1996; Lowry *et al.*, 1951)

Tabung sampel dan kontrol dipersiapkan. Pada tabung sampel, sebanyak 0,1 mL enzim dilarutkan dalam 0,9 mL akuades. Untuk kontrol, 0,1 mL enzim diganti oleh 0,1 mL akuades. Kemudian, kedua tabung ditambahkan 5 mL pereaksi C, lalu dikocok dan dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruang. Setelah itu, keduanya ditambahkan 0,5 mL pereaksi D, lalu dikocok dan dibiarkan selama 30 menit pada suhu ruang. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} 750 nm (Lowry *et al.*, 1951).

3.3.11 Imobilisasi Enzim α -Amilase Menggunakan Bentonit

Imobilisasi enzim dilakukan melalui metode adsorpsi fisik, dengan prosedur sebagai berikut:

3.3.11.1 Penentuan pH Buffer pengikatan enzim-matriks

Sebanyak 0,25 gram serbuk bentonit dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi lalu distabilkan menggunakan 5 mL buffer fosfat 0,1 M dengan variasi pH, yaitu 5; 5,5; 6; 6,5; dan 7, hingga tiga kali pergantian hingga pH pengikatan tercapai. Setelah itu, matriks dipisahkan dari larutannya melalui sentrifugasi selama 15 menit lalu ditambahkan 0,5 mL enzim hasil dialisis dan 1 mL buffer fosfat 0,1 M sesuai variasi pH. Untuk memaksimalkan pengikatan, sampel diinkubasi pada suhu 4°C selama 30 menit, lalu disentrifugasi 15 menit. Supernatan diambil 0,25 mL untuk dijadikan kontrol uji Mandels yang dimasukkan pada tabung terpisah kemudian pati ditambahkan setelah inkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit. Sementara itu, ke dalam matriks-enzim ditambahkan 0,75 mL substrat pati dan diinkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit. Setelah itu, dipisahkan dari matriksnya melalui sentrifugasi selama 30 menit. Supernatan diambil 0,5 mL sebagai sampel uji Mandels (enzim imobil). Sampel dan kontrol, yang telah dilakukan inkubasi sebelumnya, masing-masing ditambahkan 1 mL pereaksi DNS lalu dididihkan selama 10 menit. Selanjutnya, sampel dan kontrol didinginkan pada suhu ruang, lalu ditambahkan 1,5 mL akuades (Yandri *et al.*, 2023). Absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} 510 nm.

3.3.11.2 Imobilisasi enzim

Imobilisasi enzim dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 0,25 gram serbuk bentonit dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi lalu distabilkan menggunakan 5 mL buffer fosfat 0,1 M melalui tiga kali pergantian buffer hingga pH pengikatan tercapai. Setelah itu, matriks dipisahkan dari larutannya melalui sentrifugasi selama 15 menit lalu ditambahkan 0,5 mL enzim hasil dialisis dan 1 mL buffer fosfat 0,1 M sesuai pH pengikatan. Untuk memaksimalkan pengikatan, sampel diinkubasi pada suhu 4°C selama 30 menit, lalu disentrifugasi 15 menit. Supernatan diambil 0,25 mL untuk dijadikan kontrol uji Mandels yang dimasukkan pada tabung terpisah kemudian pati ditambahkan setelah inkubasi pada suhu optimum selama 30 menit. Sementara itu, ke dalam matriks-enzim ditambahkan 0,75 mL substrat pati dan diinkubasi pada suhu optimum selama 30 menit. Setelah itu, dipisahkan dari matriksnya melalui sentrifugasi selama 30 menit. Supernatan diambil 0,5 mL sebagai sampel uji Mandels (enzim imobil). Sampel dan kontrol, yang telah dilakukan inkubasi sebelumnya, masing-masing ditambahkan 1 mL pereaksi DNS lalu dididihkan selama 10 menit. Selanjutnya, sampel dan kontrol didinginkan pada suhu ruang, lalu ditambahkan 1,5 mL akuades (Yandri *et al.*, 2023). Absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} 510 nm.

3.3.12 Karakterisasi Enzim α -Amilase Hasil Pemurnian dan Enzim Imobil

Enzim hasil pemurnian yang digunakan adalah enzim hasil dialisis yang diencerkan 10 kali yang dihitung melalui Persamaan 9, sedangkan enzim imobil adalah enzim hasil dialisis yang telah melalui tahap imobilisasi pada matriks bentonit.

3.3.12.1 Penentuan suhu optimum

Penentuan suhu optimum enzim hasil pemurnian dilakukan pada variasi suhu inkubasi dalam uji Mandels, yaitu: 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, dan 80°C selama 30 menit (Yandri *et al.*, 2018). Penentuan suhu optimum enzim imobil dilakukan pada variasi suhu inkubasi, yaitu 50, 55, 60, 65, 70, 75, dan 80°C,

selama 30 menit, dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 0,25 gram serbuk bentonit dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi lalu distabilkan menggunakan 5 mL buffer fosfat 0,1 M melalui tiga kali pergantian buffer hingga pH pengikatan tercapai. Setelah itu, matriks dipisahkan dari larutannya melalui sentrifugasi selama 15 menit lalu ditambahkan 0,5 mL enzim hasil dialisis dan 1 mL buffer fosfat 0,1 M sesuai pH pengikatan. Untuk memaksimalkan pengikatan, sampel diinkubasi pada suhu 4°C selama 30 menit, lalu disentrifugasi 15 menit. Supernatan diambil 0,25 mL untuk dijadikan kontrol uji Mandels yang dimasukkan pada tabung terpisah kemudian pati ditambahkan setelah inkubasi pada suhu optimum selama 30 menit. Sementara itu, ke dalam matriks-enzim ditambahkan 0,75 mL substrat pati dan diinkubasi pada suhu optimum selama 30 menit. Setelah itu, dipisahkan dari matriksnya melalui sentrifugasi selama 30 menit. Supernatan diambil 0,5 mL sebagai sampel uji Mandels (enzim imobil). Sampel dan kontrol, yang telah dilakukan inkubasi sebelumnya, masing-masing ditambahkan 1 mL pereaksi DNS lalu dididihkan selama 10 menit. Selanjutnya, sampel dan kontrol didinginkan pada suhu ruang, lalu ditambahkan 1,5 mL akuades (Yandri *et al.*, 2018; Yandri *et al.*, 2023). Absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} 510 nm. Suhu inkubasi yang memberi aktivitas enzim tertinggi ditetapkan sebagai suhu optimum enzim.

3.3.12.2 Penentuan K_M dan V_{maks}

Parameter kinetika, konstanta Michaelis (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}), ditentukan melalui studi pengaruh konsentrasi pati sebagai substrat terhadap enzim hasil pemurnian melalui uji Mandels pada variasi konsentrasi pati berikut: 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1,0% (Robinson, 2015). Penentuan K_M dan V_{maks} enzim imobil pada variasi konsentrasi pati 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1,0% dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 0,25 gram serbuk bentonit dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi lalu distabilkan menggunakan 5 mL buffer fosfat 0,1 M melalui tiga kali pergantian buffer hingga pH pengikatan tercapai. Setelah itu, matriks dipisahkan dari larutannya melalui sentrifugasi selama 15 menit lalu ditambahkan 0,5 mL enzim hasil dialisis dan 1 mL buffer fosfat 0,1 M pH pengikatan. Untuk memaksimalkan pengikatan, sampel diinkubasi pada suhu 4°C

selama 30 menit, lalu disentrifugasi 15 menit. Supernatan diambil 0,25 mL untuk dijadikan kontrol uji Mandels yang dimasukkan pada tabung terpisah kemudian pati pada masing-masing variasi ditambahkan setelah inkubasi pada suhu optimum selama 30 menit. Sementara itu, ke dalam matriks-enzim ditambahkan 0,75 mL substrat pati pada masing-masing variasi dan diinkubasi pada suhu optimum selama 30 menit. Setelah itu, dipisahkan dari matriksnya melalui sentrifugasi selama 30 menit. Supernatan diambil 0,5 mL sebagai sampel uji Mandels (enzim imobil). Sampel dan kontrol, yang telah dilakukan inkubasi sebelumnya, masing-masing ditambahkan 1 mL pereaksi DNS lalu dididihkan selama 10 menit. Selanjutnya, sampel dan kontrol didinginkan pada suhu ruang, lalu ditambahkan 1,5 mL akuades (Yandri *et al.*, 2018; Yandri *et al.*, 2023).

Absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} 510 nm. Data $\frac{1}{v}$ terhadap $\frac{1}{[S]}$ diplotkan ke dalam grafik Lineweaver-Burk. Nilai K_M dan V_{maks} ditentukan dari grafik tersebut berdasarkan Persamaan 2. Nilai K_M ditetapkan sebagai konsentrasi substrat optimum pada prosedur selanjutnya.

3.3.12.3 Penentuan kestabilan termal enzim

Kestabilan termal enzim hasil pemurnian dan enzim imobil ditentukan dari aktivitas sisa enzim setelah diinaktivasi pada suhu 60°C selama variasi waktu inaktivasi berikut: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, dan 80 menit (Santos *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 1996). Aktivitas enzim α -amilase diuji dengan metode Mandels pada suhu optimum masing-masing. Data ini juga digunakan pada penentuan nilai k_i , $t_{1/2}$, dan ΔG_i .

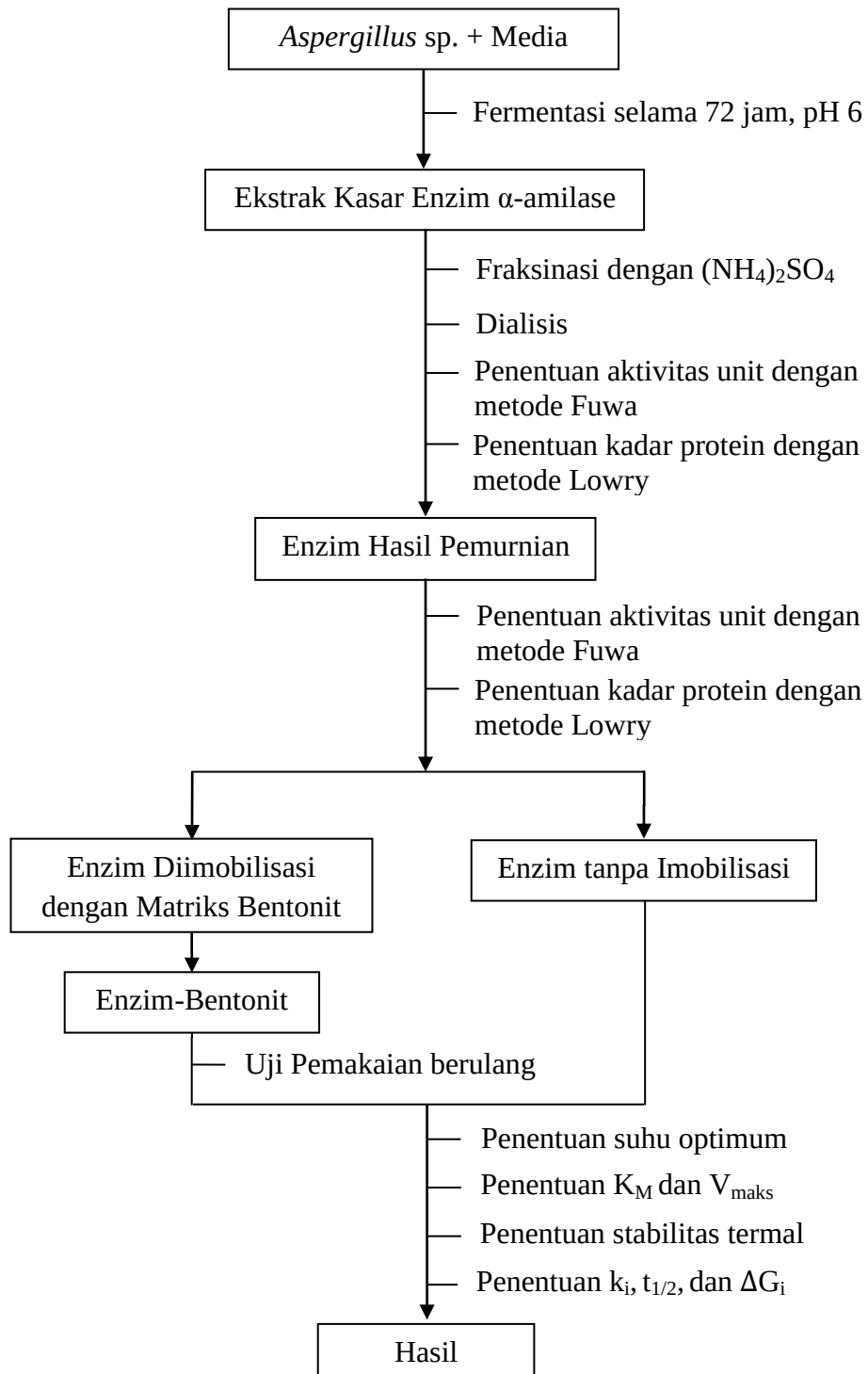
3.3.12.4 Penentuan konstanta laju inaktivasi (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi bebas akibat denaturasi (ΔG_i)

Penentuan nilai k_i didasarkan pada Persamaan 4, nilai $t_{1/2}$ ditentukan dengan menggunakan Persamaan 5, sedangkan nilai ΔG_i ditentukan melalui Persamaan 6.

3.3.12.5 Pemakaian berulang enzim imobil

Enzim imobil yang telah direaksikan dengan substrat untuk sekali pemakaian dicuci kembali dengan buffer awal melalui sentrifugasi. Supernatan diambil 0,25 mL sebagai kontrol. Kemudian, enzim imobil direaksikan dengan 0,75 mL substrat baru melalui prosedur imobilisasi yang sama. Aktivitas enzim α -amilase diuji dengan metode Mandels pada suhu optimum enzim. Prosedur ini dilakukan berulang beberapa kali (Yandri *et al.*, 2023).

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



Gambar 8. Diagram alir penelitian.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Aktivitas spesifik enzim α -amilase hasil pemurnian sampai dengan tahap dialisis yang berasal dari *Aspergillus* sp. adalah 1.520,88 U/mg dan kemurniannya meningkat 11 kali dibandingkan ekstrak kasar enzim dengan perolehan 73,31%.
2. Enzim α -amilase hasil pemurnian memiliki pH optimum pada pH 5,5, suhu optimum 55°C, $V_{maks} = 23,23 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$, $K_M = 5,02 \text{ mg mL}^{-1}$ substrat, $k_i = 0,0176 \text{ menit}^{-1}$, $t_{1/2} = 39,38 \text{ menit}$, dan $\Delta G_i = 104,39 \text{ kJ mol}^{-1}$.
3. Enzim α -amilase hasil imobilisasi pada matriks bentonit memiliki pH optimum pada pH 5,5, suhu optimum 60°C, $V_{maks} = 21,62 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$, $K_M = 6,10 \text{ mg mL}^{-1}$, $k_i = 0,0091 \text{ menit}^{-1}$, $t_{1/2} = 76,17 \text{ menit}$, dan $\Delta G_i = 106,22 \text{ kJ mol}^{-1}$.
4. Uji stabilitas termal pada enzim α -amilase hasil pemurnian pada suhu 60°C selama 80 menit menunjukkan aktivitas sisa sebesar 23%, sedangkan enzim hasil imobilisasi dengan matriks bentonit menunjukkan aktivitas sisa sebesar 47% pada kondisi yang sama.
5. Imobilisasi enzim α -amilase pada matriks bentonit mampu meningkatkan kestabilan berturut-turut sebesar 1,93 kali berdasarkan perbandingan waktu paruh ($t_{1/2}$) terhadap enzim α -amilase hasil pemurnian.
6. Aktivitas sisa enzim α -amilase hasil imobilisasi pada matriks bentonit setelah enam kali pemakaian berulang sebesar 48%.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan maka disarankan untuk penelitian selanjutnya melakukan hal sebagai berikut:

1. Pemurnian enzim lebih lanjut dengan metode tambahan, seperti kromatografi filtrasi gel, untuk mendapatkan enzim dengan kemurnian lebih tinggi selain pengendapan amonium sulfat dan dialisis.
2. Imobilisasi dengan menggunakan berbagai jenis matriks lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Alnadari, F., Xue, Y., Zhou, L., Hamed, Y. S., Taha, M., and Foda, M. F. 2020. Immobilization of β -glucosidase from *Thermatoga maritima* on chitin-functionalized magnetic nanoparticle via a novel thermostable chitin-binding domain. *Sci. Rep.* **10**(1663): 1–12.
- Asgari, M. and Sundararaj, U. 2018. Silane functionalization of sodium montmorillonite nanoclay: The effect of dispersing media on intercalation and chemical grafting. *Appl. Clay Sci.* **153**: 228–238.
- Bal, E., Pinar, O., Kazan, D., Ozturk, H. U., and Sayar, A. 2016. Immobilization of α -amylase from *Bacillus subtilis* SDP1 isolated from the rhizosphere of *Acacia cyanophylla* Lindey. *Electron J. Biol.* **12**(2): 115–121.
- Baysal, Z., Bulut, Y., Yavuz, M., and Aytekin, C. 2014. Immobilization of α -amylase via adsorption onto bentonite/chitosan composite: Determination of equilibrium, kinetics, and thermodynamic parameters. *Starch.* **66**(5–6): 484–490.
- Bollag, D. M., Rozycki, M. D., and Edelstein, S. J. 1996. *Protein Methods 2nd ed.* John Willey and son, Inc. New York.
- Boyer, R. F. 2012. *Biochemistry Laboratory: Modern Theory and Techniques Second Edition.* Pearson Education, Inc. Indianapolis.
- Day, R. A dan Underwood, A. L. 2001. *Analisa Kimia Kuantitatif Edisi Keempat.* Erlangga. Jakarta.
- 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.
- 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.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan I*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Fuwa, H. 1954. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylase as the substrate. *J. Biochem.* **41**(5): 583–603.
- 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.
- Gorecka, E. and Jastrzebska, M. 2011. Immobilization techniques and biopolymer carriers. *Biotechnol. Food Sci.* **75**(1): 65–68.
- Henehan, G. T., Ryan, B. J., Eser, B. E., Li, N., Guo, Z., and Kinsella, G. K. 2023. Editorial: Green chemistry biocatalysis. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **11**: 1–3.
- Hidayat, N., Putri, A. I., dan Sumarsih, S. 2016. *Mikologi Industri*. Universitas Brawijaya Press. Malang.
- Iswendi. 2010. Penentuan aktivitas amilase dari umbi bengkuang (*Pachyrrhizus arosus* L. Urb) hasil ekstraksi dengan etanol dan ammonium sulfat. *J. Saintek.* **2**(2): 94–98.
- Jegannathan, K. R. and Nielsen, P. H. 2013. Environmental assessment of enzyme use in industrial production – A literature review. *J. Clean. Prod.* **42**: 228–240.
- Jesionowski, T., Zdarta, J., and Krajewska, B. 2014. Enzyme immobilization by adsorption: A review. *Adsorption.* **20**(5): 801–821.
- Jinu, J. 2017. Amylases-bioprocess and potential applications: A review. *Int. J. Bioinform. Biol. Sci.* **5**(2): 41–50.
- Kaushal, J., Seema, S., Singh, G., and Arya, A. K. 2018. Immobilization of catalase onto chitosan and chitosan-bentonite complex: A comparative study. *Biotechnol. Rep.* **18**(e00258): 1–7.
- Kazan, D., Ertan, H., and Erarslan, A. 1997. Stabilization of *Escherichia coli* penicillin G acylase against thermal inactivation by cross-linking with dextran dialdehyde polymers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**(2): 191–197.
- Kuddus, M. 2019. *Enzymes in Food Biotechnology*. Department of Biochemistry. Hail.

- Lailah, N., Prasetyawan, S., and Srihardyastutie, A. 2017. In vitro and in silico study of immobilized xylanase from *Trichoderma viride* using bentonite matrices activated with HCl. *J. Pure App. Chem. Res.* **6**(2): 150–159.
- Lassalle, V. L., Pirillo, S., Rueda, E., and Ferreira, M. L. 2011. An accurate UV/visible method to quantify proteins and enzymes: Impact of aggregation, buffer concentration and the nature of the standard. *Curr. Top Anal. Chem.* **8**: 83–93.
- Littlechild, J. 2015. Enzymes from extreme environments and their industrial applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **3**(161): 1–9.
- 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.
- Mandels, M., Andreotti, R., and Roche, C. 1976. Measurement of saccharifying cellulose. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **6**: 21–33.
- Martin, M. F., Okpo, E. A., and Andy, I. E. 2019. Microbial amylases: A review. *Int. J. Sci.* **22**: 174–179.
- Martoharsono, S. 2006. *Biokimia 1*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Mei, S., Hana, P., Wua, H., Shib, J., Tanga, L., and Jianga, Z. 2018. One-pot fabrication of chitin-shellac composite microspheres for efficient enzyme immobilization. *J. Biotech.* **266**: 1–8.
- Mesbah, N. M. and Sarmiento, F. 2016. Editorial: Enzymes from extreme environments. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **4**(24): 1–2.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**(3): 426–428.
- Mufarrikha, I., Roosdiana, A., dan Prasetyawan, S. 2014. Optimasi kondisi produksi pektinase dari *Aspergillus niger*. *Kim. Stud. J.* **2**(1): 393–399.
- Mukherjee, P. 2021. Green chemistry – a novel approach towards sustainability. *J. Chil. Chem. Soc.* **66**(1): 5075–5080.
- Naiola, E. 2002. Karakterisasi dan optimasi media produksi amilase dari *Aspergillus niger* dan *Aspergillus clavatus*. *Ber. Biol.* **6**(3): 415–421.

- Naulina, R. Y., Stiawan, E., Nendissa, S. J., Nendissa, D. M., Sari, D. A., Ariyanti, D., Sulisty, A. B., Siahaya, A. N., Fatnah, N., Rahim, H., Rosmawati, A., Khurniyati, M. I., dan Fahmi, A. 2023. *Kimia Industri*. Wiina Media Utama. Bandung.
- 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.
- Panjaitan, B., Harahap, S., Lumbantobing, K. N., dan Romadhon, S. 2021. Rancang bangun pewaktu centrifuge dengan tampilan seven segment berbasis mikrokontroler AT89S51. *J. Darma Agung.* **29**(2): 298–307.
- Planchot, V. and Colonna, P. 1995. Purification and characterization of extracellular alpha-amylase from *Aspergillus fumigatus*. *J. Cer. Sci.* **272**(1): 97–109.
- Poedjiadi, A. 2007. *Dasar-Dasar Biokimia Edisi Revisi*. UI Press. Jakarta.
- Rahmadina, R. dan Febriani, H. 2017. *Biologi Sel: Unit Terkecil Penyusun Tubuh Makhluk Hidup*. CV. Selemba Papyrus. Surabaya.
- Razzaghi, M., Homaei, A., and Mosaddegh, E. 2018. Protease stabilizing process of ZnS nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* **112**: 509–515.
- Robinson, P. K. 2015. Enzymes: Principles and biotechnological applications. *Essays Biochem.* **59**: 1–41.
- Rosmanansari, N. S. D., Roosdiana, A., dan Sutrisno, S. 2013. Optimasi amobilisasi pektinase dari *Bacillus subtilis* menggunakan bentonit. *J. Kim. Student.* **1**(2): 243–249.
- Saeed, M., Munira, M., Nafees, M., Shah, A., Ullah, H., and Waseem, A. 2020. Synthesis, characterization, and applications of silylation based grafted bentonites for the removal of Sudan dyes: Isothermal, kinetic, and thermodynamic studies. *Micro. Meso. Mater.* **291**: 1387–1811.
- 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 starch residue from *Mandioca* processing. *Int. J. Sci. Res.* **4**(10): 681–684.

- Scopes, R. K. 1982. *Protein Purification: Principles and Practice*. Springer. New York.
- Sedaghat, M. E., Ghiaci, M., Aghaei, H., and Soleimanian, S. 2009. Enzyme immobilization. Part 3: Immobilization of α -amylase on Na-bentonite and modified bentonite. *J. Clay*. **46**(1): 125–130.
- Shahib, N. 2005. *Biologi Molekular Medik I*. Unpad Press. Bandung.
- Shaikh, S. M. R., Nasser, M. S., Hussein, I., Benamor, A., Onaizi, S. A., and Qiblawey, H. 2017. Influence of polyelectrolytes and other polymer complexes on the flocculation and rheological behaviors of clay minerals: a comprehensive review. *Sep. Purif. Technol.* **187**: 137–161.
- Sheldon, R. A. and Brady, D. 2022. Green chemistry, biocatalysis, and the chemical industry of the future. *Chemsuschem*. **15**(9): 1–20.
- Shuler, M. L. and Kargi, F. 2002. *Bioprocess Engineering Basic Concepts 2nd Edition*. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs.
- Silvaa, C., Martinsa, M., Jing, S., Fu, J., and Cavaco-Pauloa, A. 2018. Practical insights on enzyme stabilization. *Crit. Rev. Biotechnol.* **38**(3): 335–350.
- Sirisha, V. L., Jain, A., and Jain, A. 2016. Enzyme immobilization: An overview on methods, support material, and applications of immobilized enzymes. *Adv. Food Nutr. Res.* **2016**(79): 179–211.
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Soccol, C. R., and Pandey, A. 2006. α -amylases from microbial sources – an overview on recent developments. *Food Technol. Biotechnol.* **44**(2): 173–184.
- Stahl, S. 1999. *Thermophilic Microorganisms: The Biological Background for Thermophily and Thermoresistance of Enzymes in Thermostability of Enzymes*. Springer. New York.
- Suganthi, R., Benazir, J. F., Santhi, R., Ramesh, K. V, Hari, A., Meenakshi, N., Nidhiya, K.A., Kavitha, G., and Lakshmi, R. 2011. Amylase production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation using agroindustrial wastes. *Inter. J. Eng. Sci. Technol.* **3**(2): 1756–1763.
- Suhartono, M. T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Tiarsa, E. R. 2022. Studi Komparatif: Peningkatan Kestabilan Enzim α -amilase dari *Aspergillus fumigatus* Menggunakan Metode Amobilisasi Pada Material Kitin, Bentonit, dan Hibrida Kitin-Bentonit.(Tesis). Universitas Lampung. Lampung.

- Veerdonk, F. L. V. D., Gresnigt, M. S., Romani, L., Netea, M. G., and Latge, J. 2017. *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**(11): 661–674.
- Vogel, A. and May, O. 2019. *Industrial Enzyme Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. Weiheim.
- 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.
- Wingfield, P. T. 2015. Overview of the purification of recombinant proteins. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **80**: 6.1.1–6.1.35.
- Wirahadikusumah, M. 2001. *Biokimia: Protein, Enzim, dan Asam Nukleat*. ITB Press. Bandung.
- Wójcik-Jurkiewicz, M., Masztalerz, M., Lew, G., Lulek, A., and Sadowska, B. 2021. The impact of chemical companies on the environment and local communities in the aspect of business model. *Eur. Res. Stud.* **24**(2): 548–563.
- 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, A. S. dan Wulandari, P. 2009. Pengaruh penambahan sorbitol terhadap stabilitas termal enzim α -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. *Anal. Environ. Chem.* **5**(2): 143–154.
- Yandri dan Suhartati, T. 2018. *Peningkatan Kestabilan Enzim*. CV Anugrah Utama Raharja. Bandar Lampung.
- Yandri, Y., Ropingi, H., Suhartati, T., Irawan, B., and Hadi, S. 2023. Immobilization of *Aspergillus fumigatus* α -amylase via adsorption onto bentonite/chitosan for stability enhancement. *Emerg. Sci. J.* **7**(5): 1811–1826.
- Yandri, Y., Suhartati, T., Yuwono, S. D., Qudus, H. I., Tiarsa, E. R., and Hadi, S. 2018. Immobilization of α -amylase from *Bacillus subtilis* ITBCCB148 using bentonite. *Asian J. Microbiol. Biotech. Env. Sci.* **20**(2): 487–492.
- 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.* **2022**: 1–7.

- Yang, Z., Michael, D., Robert, A., Fang, X. Y., and Alan, J. R. 1996. Polyethylene glycol-induced stabilization of subtilisin. *Enzym. Microb. Technol.* **18**: 82–89.
- Yoo, Y. J., Hong, J., and Hatch, R. T. 1987. Communications to the editor comparison of α -amylase activities from different assay methods. *Biotech. Bioeng.* **30**: 147–151.
- Zdarta, J., Meyer, A. S, Jesionowski, T., and Pinelo, M. A. 2018. A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility. *Catalyst.* **8**(92): 1–27.