IMOBILISASI ENZIM α-AMILASE DARI *Aspergillus* sp. MENGGUNAKAN ZEOLIT

(Skripsi)

Oleh

MARIA AGUSTINA SIDABUTAR
NPM 2017011043

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2024

ABSTRAK

IMOBILISASI ENZIM α-AMILASE DARI *Aspergillus* sp. MENGGUNAKAN ZEOLIT

Oleh

Maria Agustina Sidabutar

Enzim α-amilase merupakan enzim golongan hidrolase yang dapat menghidrolisis ikatan α-1,4-glikosidik. Enzim ini banyak dimanfaatkan dalam industri kimia. Penggunaan enzim dalam industri harus memenuhi beberapa kriteria khusus, di antaranya memiliki kestabilan pada kondisi suhu yang tinggi dan pH yang ekstrem, namun umumnya enzim tidak dapat bekerja secara optimum pada kondisi suhu dan pH tersebut. Sehingga perlu dilakukan peningkatan kestabilan enzim untuk mengatasi masalah ini.

Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan stabilitas enzim α-amilase dari *Aspergillus* sp. dengan imobilisasi menggunakan matriks zeolit. Untuk mencapai tujuan tersebut maka enzim α-amilase diisolasi, diproduksi, dan dimurnikan dengan metode fraksinasi menggunakan amonium sulfat, dilanjutkan dengan dialisis. Enzim hasil pemurnian diimobilisasi menggunakan zeolit sebagai matriks pendukung. Kemudian, enzim hasil pemurnian dan imobilisasi dikarakterisasi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa enzim α-amilase hasil pemurnian memiliki tingkat kemurnian sebesar 13 kali lipat dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim. Uji stabilitas termal pada enzim α-amilase hasil pemurnian selama 80 menit pada suhu 60°C menunjukkan aktivitas sisa sebesar 23% dan waktu paruh sebesar 43,32 menit, sedangkan enzim hasil imobilisasi menggunakan matriks zeolit menunjukkan aktivitas sisa sebesar 49% dan waktu paruh sebesar 78,76 menit. Enzim hasil imobilisasi mengalami peningkatkan kestabilan sebesar 1,82 kali dibandingkan enzim hasil pemurnian. Pada pemakaian berulang enzim hasil imobilisasi masih menunjukkan aktivitas sisa sebesar 35% setelah penggunaan sebanyak enam kali.

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

ABSTRACT

IMMOBILIZATION OF α-AMYLASE ENZYME FROM *Aspergillus* sp. USING ZEOLITE

By

Maria Agustina Sidabutar

The enzyme α-amylase belongs to the hydrolase group, which can hydrolyze α-1,4-glycosidic bonds. This enzyme is widely utilized in the chemical industry. The use of enzymes in industry must meet several specific criteria, including stability under high-temperature conditions and extreme pH levels. However, enzymes generally cannot function optimally under these extreme conditions. Therefore, it is necessary to enhance enzyme stability to overcome this issue. Then, the purified and immobilized enzymes were characterized.

This research aims to increase the stability of α-amylase from *Aspergillus* sp. by immobilization using a zeolite matrix. To achieve this goal, the α-amylase enzyme was isolated, produced, and purified using fractionation with ammonium sulfate, and followed by dialysis. The purified enzyme was immobilized using zeolite as a supporting matrix. Then, the purified and immobilized enzymes were characterized.

The research showed that the purified α-amylase enzyme had a purity level 13 times higher than the crude enzyme extract. Thermal stability tests on the purified α-amylase enzyme for 80 minutes at 60°C showed a residual activity of 23% and a half-life of 43.32 minutes, meanwhile, the immobilized enzyme using a zeolite matrix exhibited a residual activity of 49% and a half-life of 78.76 minutes. The immobilized enzyme showed a 1.82-fold increase in stability compared to the purified enzyme. After six repeated uses, the immobilized enzyme still retained 35% of its residual activity.

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

IMOBILISASI ENZIM α-AMILASE DARI *Aspergillus* sp. MENGGUNAKAN ZEOLIT

Oleh

MARIA AGUSTINA SIDABUTAR

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS

Pada

Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2024

Judul Penelitian	: **IMOBILISASI ENZIM α-AMILASE DARI *Aspergillus* sp. MENGGUNAKAN ZEOLIT**
Nama Mahasiswa	: Maria Agustina Sidabutar
Nomor Pokok Mahasiswa	: 2017011043
Program studi	: Kimia
Fakultas	: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

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

Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S.
NIP. 195405101988032001

2. Ketua Jurusan Kimia

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

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

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

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

Penguji
Bukan Pembimbing : **Prof. Dr. Noviany, S.Si., M.Si.** .....

2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

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

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **7 Agustus 2024**

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama	: Maria Agustina Sidabutar
NPM	: 2017011043
Jurusan	: Kimia
Fakultas	: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi	: Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya, bahwa skripsi saya berjudul : **"Imobilisasi Enzim α-Amilase Dari *Aspergillus* sp. Menggunakan Zeolit"** adalah benar karya saya sendiri, baik gagasan, hasil dan analisisnya. Selanjutnya saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya disebutkan dan terdapat kesepakatan sebelum dilakukan publikasi.

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

Bandar Lampung, 2 September 2024
Yang Menyatakan,

Maria Agustina Sidabutar
NPM. 2017011043

RIWAYAT HIDUP

Penulis bernama lengkap Maria Agustina Sidabutar, lahir di Bekasi pada tanggal 28 Agustus 2002. Penulis merupakan anak keempat dari empat bersaudara yang merupakan putri dari pasangan Bapak Arben Sidabutar dan Ibu Restima Mindawati Gultom. Penulis mulai menempuh pendidikan di SD Tiara Harapan Jaya pada tahun 2008-2014. Kemudian, melanjutkan ke SMP Flora pada tahun 2014-2017. Setelah SMP, penulis melanjutkan pendidikan ke SMA Negeri 1 Tarumajaya dan lulus pada tahun 2020. Setelah lulus SMA, penulis diterima di Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung melalui jalur SBMPTN pada tahun 2020.

Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif dalam organisasi intra kampus seperti Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) menjabat sebagai anggota Bidang Sains dan Penalaran Ilmu Kimia pada periode 2021-2022. Lalu, Koperasi Mahasiswa sebagai anggota bidang Bisnis dan Kemitraan GFMIPA pada periode 2022-2023 dan staff Usaha Koperasi Mahasiswa pada periode 2022-2023. Pada tahun 2023 penulis telah melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Watas, Kecamatan Balik Bukit, Kabupaten Lampung Barat sebagai bentuk pengabdian kepada masyarakat. Selama menjalani perkuliahan, penulis pernah menjadi asisten praktikum Biokimia untuk mahasiswa jurusan Kimia semester 5 pada tahun 2023 dan untuk mahasiswa jurusan Biologi pada tahun 2024. Pada bulan April-Juli 2023 penulis juga telah menyelesaikan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Laboratorium Biokimia yang berjudul "Penentuan Kondisi Optimum *Aspergillus* sp. Menghasilkan Enzim α-Amilase Pada Media Pati Jagung (*Zea Mays*)", setelah itu penulis mulai mengerjakan tugas akhir.

MOTTO

"Janganlah hendaknya kamu kuatir tentang apa pun juga, tetapi nyatakanlah dalam segala hal keinginanmu kepada Allah dalam doa dan permohonan dengan ucapan syukur"

Filipi 4:6

"Tetapi kamu ini, kuatkanlah hatimu, jangan lemah semangatmu, karena ada upah bagi usahamu"

2 Tawarikh 15:7

"Kita tidak bisa pandai dalam semua hal karena kita bukan makhluk yang sempurna, tetapi bukan berarti kita tidak bisa melakukan hal apapun, cobalah untuk selalu memberikan yang terbaik daripada selalu ingin tampak sempurna dan juga tetaplah bahagia"

Jeon Wonwoo (SEVENTEEN)

"Don't be so hard on yourself, it's your first time living in this world"

SEVENTEEN – Cheers To Youth

"Hidup merupakan sebuah perjalanan bukan perbandingan, maka jangan pernah bandingkan prosesmu dengan orang lain. Oleh sebab itu, sesulit apapun saat ini kamu harus bisa berdiri dari kerasnya cobaan dan bertahan dari segala keadaan"

Penulis

PERSEMBAHAN

Segala puji dan syukur kepada Tuhan Yesus Kristus, dengan ketulusan hati aku persembahkan karya ini kepada:

Kedua pahlawan terhebat dalam hidupku,
Bapak Arben Sidabutar dan Ibu Restima Mindawati Gultom, yang telah berjuang untuk mendidik dan membesarkan penulis, yang selalu memberikan kasih sayang, cinta, nasehat, dukungan baik materil maupun moril dan mendoakan keberhasilan penulis ini hingga penulis mampu menyelesaikan karya sederhana ini dan dengan adanya karya ini dapat memberikan sedikit rasa bangga di hati kalian.

Abang dan kakak-kakakku tersayang, Andre Gide Sidabutar, Tiofanny, dan Meylisa Gloria Sidabutar serta seluruh keluarga besar yang selalu mendoakan sehingga penulis dapat menyelesaikan karya ini.

Pembimbing penelitianku, Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S. dan Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S yang selalu sabar dalam membimbingku.

Seluruh sahabat dan rekan-rekan tersayang, yang selalu mendengarkan keluh kesahku, mendukung, menyemangati, berbagi pengalaman, kebahagian dan keceriaan kepada penulis.

Almamater tercinta,
"Universitas Lampung"

SANWACANA

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yesus Kristus atas berkat cintah kasih serta karunia-Nya yang melimpah sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "**Imobilisasi Enzim α-Amilase Dari *Aspergillus* sp. Menggunakan Zeolit"** ini merupakan syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dari Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Pada kesempatan ini penulis menyampaikan banyak terimakasih atas segala dukungan, doa, bantuan, dan bimbingan dari berbagai pihak selama proses studi dan juga selama proses penyusunan skripsi ini. Penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Teristimewa kepada orangtua tercinta, Bapak Arben Sidabutar dan Ibu Restima Mindawati Gultom. Penulis menyadari bahwa tiada kata yang mampu sepenuhnya menggambarkan rasa syukur ini. Terima kasih atas segalanya, terimakasih atas doa, dukungan, dan cinta yang tiada henti-hentinya kalian berikan kepada penulis. Terima kasih telah berjuang bersama penulis mengorbankan banyak waktu, tenaga, dan menjadi garda terdepan untuk penulis meraih impian. Tanpa kehadiran kalian, orangtua yang sangat luar biasa, pencapaian ini tidak mungkin terwujud, karena kalian menjadi sumber inspirasi dan kekuatan yang tidak akan bisa tergantikan bagi penulis. Penulis berharap dengan terselesaikannya skripsi ini, dapat menjadi bentuk penghormatan dan apresiasi atas segala kasih sayang yang kalian berikan.
2. Abang dan Kakak-kakakku tersayang, Andre Gide Sidabutar, Tiofanny, dan Meylisa Gloria Sidabutar, berserta keluarga besar penulis yang selalu mendukung, memberikan semangat, dan motivasi serta mendoakan penulis.

3. Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S., selaku Pembimbing I atas ketersediaannya memberikan bimbingan, ilmu, nasihat, saran serta arahan dengan penuh kesabaran dan keikhlasan tanpa lelah kepada penulis hingga penelitian dan penulisan skripsi ini bisa selesai.
4. Ibu Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S., selaku Pembimbing II atas kebaikan, bimbingan, ilmu, nasihat, saran serta arahan dengan penuh kesabaran dan keikhlasan tanpa lelah kepada penulis sampai dengan penyelesaian skripsi.
5. Ibu Prof. Dr. Noviany, M. Si., selaku penguji atas kesediaan memberikan arahan, saran, koreksi, kritik, dan nasihat yang sangat membantu penulis.
6. Ibu Dr. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si., selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing dan memberikan nasihat, saran, serta arahan selama proses perkuliahan hingga penyusunan skripsi ini.
7. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, M. Si., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
8. Ibu Dr. Mita Rilyanti, M.Si., selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
9. Seluruh dosen dan staf administrasi di Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung yang telah memberikan banyak ilmu pengetahuan dan motivasi pada penulis selama perkuliahan.
10. Mbak Della selaku PLP Laboratorium Biokimia yang telah banyak membantu penulis atas penyediaan alat di laboratorium selama penelitian ini berlangsung dan kemudahan dalam mengurus berkas.
11. Kak Stevenson Waruwu, Kak Santalum Alba, dan Kak Virginia Nuh Reza Amanda yang membimbing, membantu, dan memberi motivasi kepada penulis dalam mengerjakan penelitian sehingga dapat diselesaikan dengan cepat.
12. Teman-teman seperjuanganku (PY’20), Avi Eriyani, Rusmauli Defana Panjaitan, dan Stephani Marisca Febrianti. Terima kasih telah menjadi *partner* penelitian terbaik yang selalu ada baik dalam suka maupun duka, memberikan dukungan, semangat, serta bantuan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

13. Sahabat-sahabat “Dadakan” Aya, Avi, Carlos, Depa, Diana, Step, dan Rahmad, terima kasih atas kebersamaan, bantuan, dan dukungannya selama masa perkuliahan sampai dengan penyelesaian skripsi ini.
14. Sahabat-sahabat “Unila *Food Vlogger”* Anggun, Avi, Bunga, Deppa, Icha, Muti, Najla, Ratih, Ribka, Step, Geo, dan Rahmad yang memberikan warna selama masa perkuliahan dan penelitian ini, mendengarkan keluh kesah, memberikan dukungan, dan semangat kepada penulis.
15. Nadia Anindhita dan Siti Rafera, terima kasih atas dukungan, bantuan, dan kebersamaan, serta menjadi pendengar untuk keluh-kesah penulis.
16. Rekan-rekan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah memberikan semangat dan bantuan dalam penyusunan skripsi ini.
17. Seluruh anggota Kimia kelas B 2020 yang telah membersamai selama berlangsungnya perkuliahan di Universitas Lampung, terima kasih untuk seluruh kebersamaannya.
18. Teman-teman Kimia 2020 yang tidak dapat disebutkan satu per satu, terima kasih atas kebersamaan yang telah dilalui dalam kehidupan kampus dari awal hingga sekarang.
19. SEVENTEEN (Choi Seungcheol, Yoon Jeonghan, Hong Jisoo, Wen Junhui, Kwon Soonyoung, Jeon Wonwoo, Lee Jihoon, Kim Mingyu, Xu Minghao, Lee Seokmin, Boo Seungkwan, Choi Hansol, dan Lee Chan) yang secara tidak langsung telah menghibur dengan berbagai kontennya dan telah menemani penulis selama proses penulisan skripsi.
20. Diri saya sendiri, Maria Agustina Sidabutar terima kasih telah bertahan sejauh ini, terima kasih tetap memilih berusaha dan merayakan dirimu sendiri sampai di titik ini, walau sering kali merasa putus asa atas apa yang diusahakan dan belum berhasil, namun terima kasih tetap menjadi manusia yang selalu berusaha dan tidak lelah untuk terus mencoba. Terima kasih karena memutuskan tidak menyerah sesulit apapun proses penyusunan skripsi ini dan telah menyelesaikannya sebaik dan semaksimal mungkin, ini merupakan suatu pencapaian yang perlu diapresiasi untuk diri sendiri. Apapun kurang dan lebihmu mari tetap bahagia dan merayakan diri sendiri.

21. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu, yang telah memberikan bantuan, dukungan serta doa dalam penulisan dan penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa skripsi ini tidaklah lepas dari kekurangan namun penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat dan berguna bagi rekan-rekan khususnya mahasiswa kimia dan pembaca pada umumnya, terima kasih.

Bandar Lampung, 2 September 2024
Penulis,

Maria Agustina Sidabutar

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR TABEL ..... **xvii**

DAFTAR GAMBAR ..... **xix**

DAFTAR LAMPIRAN ..... **xx**

DAFTAR RUMUS ..... **xxi**

I. PENDAHULUAN **1**
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Tujuan Penelitian 3
1.3 Manfaat Penelitian 4

II. TINJAUAN PUSTAKA **5**
2.1 Kimia Hijau 5
2.2 Enzim 5
2.3 Mekanisme Reaksi Enzim 7
2.4 Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim 9
2.5 Kinetika Reaksi Enzim 10
2.6 Enzim Amilase 12
2.7 *Aspergillus* sp. 12
2.8 Stabilitas Enzim 14
2.8.1 Konstanta Laju Inaktivasi (k_i) 15
2.8.2 Waktu Paruh ($t_{1/2}$) 16
2.8.3 Perubahan Energi Bebas akibat Denaturasi (ΔG_i) 16
2.9 Isolasi dan Pemurnian Enzim 17
2.9.1 Sentrifugasi 17
2.9.2 Fraksinasi 17
2.9.3 Dialisis 18
2.10 Uji Aktivitas Enzim α-Amilase 18
2.10.1 Metode Fuwa 19
2.10.2 Metode Mandels 19
2.11 Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry 20
2.12 Imobilisasi 20
2.13 Zeolit 22

III. METODE PENELITIAN 24
3.1 Waktu dan Tempat 24
3.2 Alat dan Bahan 24
3.3 Prosedur Penelitian 25
3.3.1 Pembiakan Isolat *Aspergillus* sp. 25
3.3.2 Pembuatan Media Inokulum, Fermentasi, Inokulasi *Aspergillus* sp. 25
3.3.3 Isolasi Enzim α-Amilase 28
3.3.4 Fraksinasi dengan amonium sulfat [$(NH_4)_2SO_4$)] 28
3.3.4.1 Penentuan pola fraksinasi pertama 28
3.3.4.2 Penentuan pola fraksinasi kedua 30
3.3.5 Dialisis 30
3.3.6 Uji Aktivitas dan Penentuan Kadar Protein Enzim α-Amilase 31
3.3.7 Imobilisasi Enzim Hasil Pemurnian dengan Zeolit 34
3.3.8 Penentuan Suhu Optimum Enzim Hasil Imobilisasi 36
3.3.9 Penentuan Data Kinetika Enzim Hasil Imobilisasi 37
3.3.10 Penentuan Kestabilan Termal Enzim 37
3.3.11 Penentuan waktu paruh ($t_{1/2}$), Konstanta Laju Inaktivasi (k_i), dan Perumbahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i) 37

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN 39
4.1 Produksi dan Isolasi Enzim α-Amilase 39
4.2 Fraksinasi dengan Amonium Sulfat 39
4.3 Dialisis 42
4.4 Penentuan pH Pengikatan Enzim Hasil Pemurnian dengan Zeolit 43
4.5 Penentuan Suhu Optimum Enzim Hasil Pemurnian dan Hasil Imobilisasi 44
4.6 Penentuan K_M dan V_{maks} Enzim Hasil Pemurnian dan Hasil Imobilisasi 45
4.7 Penentuan Stabilitas Termal Enzim Hasil Pemurnian dan Hasil Imobilisasi 47
4.8 Konstanta Laju Inaktivasi (k_i), Penentuan Waktu Paruh ($t_{1/2}$), dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i) Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Imobilisasi 48
4.9 Pemakaian Berulang Enzim Imobilisasi 49

V. KESIMPULAN DAN SARAN 51
5.1 Kesimpulan 51
5.2 Saran 52

DAFTAR PUSTAKA 53

DAFTAR TABEL

Tabel Halaman

1. Peningkatan kestabilan termal enzim α-amilase yang diimobilisasi dengan matriks pendukung 15
2. Berbagai penelitian imobilisasi enzim dengan matriks pendukung 21
3. Rangkuman hasil pemurnian enzim α-amilase dari *Aspergillus* sp. 42
4. Nilai K_M dan V_{maks} enzim α-amilase hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks pendukung 46
5. Nilai konstanta laju inaktivasi (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan enzim hasil imobilisasi pada matriks zeolit 49
6. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-*Vis* dengan metode Fuwa (λ_{maks} 600 nm) pada ekstrak kasar enzim, hasil fraksinasi, dan hasil dialisis 59
7. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-*Vis* dengan metode Lowry (λ_{maks} 750 nm) pada ekstrak kasar enzim, hasil fraksinasi, dan hasil dialisis 60
8. Rangkuman hasil perhitungan massa $(NH_4)_2SO_4$ (gram) yang ditambahkan untuk fraksinasi dengan berbagai persentase kejenuhan 61
9. Hubungan antara persen kejenuhan amonium sulfat dengan aktivitas spesifik enzim α-amilase dari *Aspergillus* sp. 62
10. Hubungan antara persen kejenuhan amonium sulfat (0–25)% dan (25–95)% dengan aktivitas spesifik enzim α-amilase dari *Aspergillus* sp. 62
11. Hubungan antara absorbansi dan aktivitas unit enzim α-amilase dari *Aspergillus* sp. pada matriks zeolit dalam berbagai pH pengikatan 63
12. Hubungan antara suhu dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim α-amilase hasil pemurnian 64
13. Hubungan antara suhu dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim α-amilase hasil imobilisasi menggunakan zeolit 64

14. Hubungan antara konsentrasi substrat dengan absorbansi dan aktivitas unit enzim α-amilase dari *Aspergillus* sp. hasil pemurnian 65

15. Hubungan antara konsentrasi substrat dengan absorbansi dan aktivitas unit enzim α-amilase dari *Aspergillus* sp. hasil imobilisasi dengan zeolit..... 65

16. Data grafik Lineweaver-Burk enzim α-amilase dari *Aspergillus* sp. hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks zeolit 65

17. Hubungan antara absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim α-amilase hasil pemurnian dengan variasi waktu inaktivasi pada suhu 60°C..... 66

18. Hubungan antara absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim α-amilase hasil imobilisasi pada matriks zeolit dengan variasi waktu inaktivasi pada suhu 60°C..... 67

19. Data grafik laju inaktivasi termal orde satu enzim α-amilase hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks zeolit 67

20. Perhitungan waktu paruh ($t_{1/2}$) enzim hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks zeolit..... 68

21. Perhitungan nilai ΔG_i enzim hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks zeolit 70

22. Aktivitas unit dan aktivitas sisa enzim hasil imobilisasi pada matriks zeolit..... 70

23. Absorbansi BSA pada berbagai konsentrasi..... 71

24. Absorbansi glukosa pada berbagai konsentrasi..... 72

DAFTAR GAMBAR

Gambar Halaman

1. Model *lock and key* 8
2. Model induksi pas 9
3. Diagram Lineweaver-Burk..... 11
4. Jamur *Aspergillus* sp. 13
5. Struktur zeolit..... 23
6. Skema fraksinasi menggunakan amonium sulfat..... 29
7. Diagram alir penelitian..... 38
8. Grafik hubungan antara persentase kejenuhan amonium sulfat dengan aktivitas spesifik enzim α-amilase 40
9. Grafik hubungan antara persentase kejenuhan amonium sulfat fraksi (0–25) dan (25–95)% dengan aktivitas spesifik enzim α-amilase 41
10. Grafik aktivitas unit enzim α-amilase dari *Aspergillus* sp. hasil imobilisasi dalam berbagai pH 43
11. Grafik suhu optimum enzim hasil pemurnian dan hasil imobilisasi 44
12. Grafik Lineweaver-Burk untuk enzim hasil pemurnian dan hasil imobilisasi 46
13. Grafik hubungan antara stabilitas termal enzim hasil pemurnian dengan hasil imobilisasi terhadap waktu 47
14. Grafik ln (E_i/E_0) enzim α-amilase hasil pemurnian dan hasil imobilisasi 48
15. Grafik pemakaian berulang enzim hasil imobilisasi 50
16. Kurva standar BSA 71
17. Kurva standar glukosa..... 72

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran Halaman

1. Data Hasil Pengukuran Absorbansi Menggunakan Spektrofotometer UV-*Vis* 59
2. Fraksinasi Dengan Berbagai Persentase Kejenuhan 61
3. Data Penentuan Pola Fraksinasi 62
4. Data Penentuan pH Pengikatan Enzim dan Matriks Pengimobil 63
5. Data Penentuan Suhu Optimum 64
6. Data Penentuan K_M dan V_{maks} 65
7. Data Penentuan Kestabilan Termal 66
8. Data Grafik Laju Inaktivasi Termal Enzim Orde Satu 67
9. Perhitungan Waktu Paruh ($t_{1/2}$) 68
10. Perhitungan Nilai Energi Bebas Akibat Denaturasi (ΔG_i) 69
11. Data Pemakaian Berulang Enzim Hasil Imobilisasi Pada Matriks Zeolit 70
12. Kurva Standar Bovine Serum Albumin (BSA) 71
13. Kurva Standar Glukosa 72
14. Persamaan Untuk Kuantitasi Enzim Pada Saat Sebelum dan Sesudah Pemurnian 73

DAFTAR RUMUS

Rumus Halaman

1. Michaelis-Menten 11
2. Lineweaver-Burk 11
3. Aktivitas Sisa 14
4. Laju Inaktivasi Termal Enzim Orde Satu (k_i) 15
5. Waktu paruh ($t_{1/2}$) 16
6. Perubahan Energi Bebas Akibat Denaturasi (ΔG_i) 16
7. Henderson-Hesselbach 25
8. Molaritas (I) 26
9. Perhitungan Massa $(NH_4)_2SO_4$ (g) dalam 1 L Larutan 30
10. Pengenceran 31
11. Aktivitas Unit Metode Fuwa 31
12. Aktivitas Unit Metode Mandels 32
13. Molaritas (II) 34
14. Kadar Protein dengan Metode Lowry 73
15. Aktivitas Spesifik 73
16. Aktivitas Total 73
17. Protein Total 73
18. Perolehan (%) 73
19. Kemurnian 73

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Industri kimia memainkan peran vital dalam perkembangan dan kemajuan hidup manusia melalui pengembangan produk seperti obat-obatan, makanan, minuman, tekstil, dan lain-lain (Purwaningtyas, 2024). Namun, dibalik manfaat besar yang diberikan, industri kimia juga menjadi salah satu penyebab terjadinya masalah lingkungan yang serius, seperti pemanasan global, polusi udara dan air, kontaminasi tanah, dan penipisan sumber daya sehingga mengakibatkan rusaknya ekosistem dan membahayakan kesehatan manusia (Gurnule, 2022). Kimia hijau menjadi salah satu solusi yang digunakan untuk mengurangi atau menghilangkan penggunaan serta pembentukan zat berbahaya dalam produksi dan aplikasi zat kimia (Anastas *and* Warner, 1998; Ratti, 2020). Salah satu faktor penting untuk mencapai tujuan kimia hijau yaitu dengan menciptakan proses dan produk kimia yang lebih ramah lingkungan dan berkelanjutan melalui penggunaan enzim sebagai biokatalis dalam proses industri (Wu *et al*., 2021). Penggunaan enzim sebagai katalis dalam industri kimia hijau menyediakan solusi inovatif dan berkelanjutan untuk mengatasi permasalahan lingkungan yang dihadapi oleh industri kimia saat ini (Chapman *et al*., 2018).

Dalam penerapan kimia hijau, salah satu enzim yang dapat digunakan adalah enzim α-amilase. Enzim α-amilase merupakan enzim golongan hidrolase yang dapat menghidrolisis ikatan α-1,4-glikosidik pada senyawa pati menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti monosakarida (glukosa), oligosakarida (maltotriosa), atau disakarida (maltosa) (Gumelar dan Fariyanto, 2020). Enzim α-amilase dapat bersumber dari tumbuhan, hewan, dan mikroorganisme. Enzim

yang bersumber dari mikroorganisme secara umum banyak diminati oleh industri karena mempunyai beberapa kelebihan dibandingkan dari sumber lain seperti hewan dan tumbuhan (Rahmiati dkk., 2016). Enzim α-amilase yang berasal dari mikroorganisme dapat menghasilkan volume enzim yang lebih banyak, sehingga banyak dimanfaatkan sebagai enzim industri (Ningtyas dkk., 2023). Sebagai contoh, produksi amilase oleh *Bacillus licheniformis* dan *Aspergillus* sp., diproduksi sekitar 300 ton enzim murni per tahun (Purnawan dkk., 2015). Beberapa laporan menyebutkan α-amilase yang dihasilkan oleh *Aspergillus* sp. diteliti sebagai sumber yang bermanfaat untuk industri (Silva *et al*., 2011).

Secara umum enzim hanya larut dalam pelarutnya dan sulit dipisahkan setelah reaksi selesai, sehingga kemampuan untuk digunakan kembali menjadi terbatas. Harga enzim yang semakin tinggi juga menjadikan proses enzimatis tidak ekonomis ketika diaplikasikan pada skala yang besar. Selain itu, aktivitas enzim tidak stabil terhadap perubahan pH dan suhu yang ekstrem, sehingga mudah mengalami penurunan aktivitas (Angsari dan Agustini, 2020). Langkah yang dapat diambil untuk dapat mengatasi beberapa kelemahan tersebut yaitu dengan mengimobilisasi enzim pada matriks pendukung yang tidak larut di dalam air. Enzim terimobilisasi mampu mempertahankan aktivitas dan dapat digunakan secara berulang maupun proses kontinyu (Mahargyani dkk., 2017).

Salah satu metode imobilisasi yang digunakan yaitu dengan adsorpsi fisik dikarenakan metode ini dinilai menguntungkan karena tidak mengubah struktur enzim, sehingga aktivitasnya tetap terjaga dan situs aktif enzim terlindungi dari gangguan luar (Mozhaev *and* Martinek, 1984). Nisa dkk. pada tahun 2013, telah melakukan penelitian tentang imobilisasi enzim α-amilase ke dalam matriks *bacto agar* mampu mempertahankan aktivitas sisa enzim sebesar 44,83% setelah melakukan pemakaian berulang sebanyak tiga kali. Selain dapat digunakan berulang kali, penggunaan enzim imobil dalam industri mempunyai beberapa keuntungan lain, diantaranya adalah pemakaian produknya tidak terkontaminasi oleh enzim, memudahkan proses pengendalian reaksi, untuk analisis, dan dapat meningkatkan stabilitas enzim (Wang, 1979). Beberapa media pendukung yang

dapat digunakan pada proses imobilisasi enzim antara lain zeolit, bentonit, gelatin, kitin, dan kitosan.

Pemanfaatan zeolit sebagai media pendukung imobilisasi sebelumnya telah dilakukan yaitu untuk imobilisasi enzim α-amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 (Sejati, 2017) dan terbukti hasil imobilisasi dengan menggunakan zeolit dapat meningkatkan stabilitas enzim sebesar 1,64 kali dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian serta memiliki aktivitas sisa sebesar 15% setelah lima siklus penggunaan kembali enzim. Hasil serupa juga ditemukan pada penelitian Yandri *et al*. (2023) telah melakukan penelitian enzim α-amilase dari *Aspergillus fumigatus* menggunakan zeolit sehingga mengalami peningkatan kestabilan sebesar 2,38 kali dibandingkan enzim hasil pemurnian serta memiliki aktivitas sisa sebesar 13% setelah lima siklus penggunaan kembali enzim. Keberhasilan ini membuat enzim α-amilase yang diimobilisasi pada matriks zeolit menjadi bahan yang bernilai tinggi untuk digunakan dalam proses industri.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, maka dilakukanlah imobilisasi enzim α-amilase dari *Aspergillus* sp. menggunakan matriks zeolit. Zeolit digunakan sebagai senyawa pengimobilisasi enzim dikarenakan zeolit tidak larut di dalam air dan tidak merusak struktur enzim (Septiani dan Lisma, 2011). Penelitian ini, menghadirkan inovasi dengan memanfaatkan zeolit sebagai matriks pendukung untuk mengimobilisasi enzim α-amilase dari *Aspergillus* sp. Metode ini belum pernah dilakukan sebelumnya dan diharapkan dapat meningkatkan stabilitas enzim secara signifikan.

1.2 Tujuan Penelitian

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Memperoleh enzim α-amilase dari *Aspergillus* sp. dengan aktivitas dan tingkat kemurnian yang tinggi dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim.
2. Meningkatkan kestabilan enzim α-amilase dari *Aspergillus* sp. melalui imobilisasi menggunakan zeolit dibandingkan enzim hasil pemurnian.

1.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai informasi mengenai zeolit sebagai matriks pendukung untuk imobilisasi enzim α-amilase dan dapat digunakan dalam proses industri.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kimia Hijau

Kimia hijau adalah suatu konsep dalam proses kimia yang bertujuan mengurangi atau menghilangkan penggunaan serta pembentukan zat berbahaya, sehingga mencegah polusi dan meminimalkan dampak negatif terhadap kesehatan manusia dan lingkungan. Hal ini merupakan landasan yang berlaku untuk semua bidang kimia dan tidak dibatasi pada satu disiplin saja. Bidang kimia hijau berfokus terhadap keberlanjutan produk dan proses, termasuk pengurangan sumber, pencegahan limbah, dan penggunaan proses dan teknologi yang ramah lingkungan (Saleh *and* Hassan, 2021).

Anastas *and* Warner (1998) memperkenalkan Dua Belas Prinsip Kimia Hijau sebagai panduan menyeluruh untuk merancang produk dan proses kimia. Prinsip-prinsip ini mencakup seluruh tahapan proses kimia, mulai dari penggunaan bahan mentah hingga transformasi produk, mempertimbangkan efisiensi, keamanan, dan dampak lingkungan dari reagen dan produk yang dihasilkan. Beberapa prinsip tersebut meliputi pencegahan limbah, penggunaan bahan baku terbarukan, serta desain yang lebih aman dan ramah lingkungan. Prinsip-prinsip ini tidak hanya berfungsi sebagai tujuan individu, tetapi juga sebagai sistem desain terpadu yang mendukung keuntungan ekonomi sambil mempertimbangkan tanggung jawab terhadap lingkungan (Anastas *and* Eghbali, 2010).

2.2 Enzim

Enzim merupakan protein yang berperan sebagai katalis dalam proses biokimia. Enzim dapat mempercepat reaksi hingga 10^8 sampai 10^{11} kali lebih cepat dibandingkan ketika reaksi tersebut berlangsung tanpa menggunakan katalis

(Nababan dkk., 2019). Di dalam sel, enzim berperan penting dalam berbagai reaksi biokimia, antara lain konversi energi, metabolisme pertahanan sel, dan komunikasi antar sel. Enzim yang berperan dalam menguraikan karbohidrat kompleks adalah karbohidrase, amilase, dan selulase. Amilase adalah enzim yang berfungsi memecah zat pati atau karbohidrat menjadi bentuk gula sederhana. Selain itu, amilase saat ini banyak digunakan dalam berbagai proses industri (Nurfajriah dkk., 2018).

Enzim pada umumnya bekerja pada kondisi fisiologis, bekerja selektif dan spesifik, serta tidak memerlukan energi yang tinggi (Li *et al*., 2012). Enzim yang berasal dari mikroorganisme lebih banyak digunakan dibandingkan dengan yang berasal dari tumbuhan atau hewan karena mikroorganisme dapat berkembang biak dengan cepat, pertumbuhannya relatif mudah diatur, menghasilkan enzim dalam jumlah yang lebih besar sehingga lebih ekonomis untuk proses industri, dan enzim yang dihasilkan lebih stabil (Yusak, 2004).

Klasifikasi enzim dapat dibedakan sebagai berikut:

a. Menurut Apriyanto dan Rujiah (2021) enzim diklasifikasikan menjadi enam kelas berdasarkan tipe reaksinya yaitu :

1. Oksidoreduktase, yaitu enzim yang mengkatalisis reaksi oksidasi atau reduksi suatu bahan. Dalam kelompok enzim ini, yang paling utama adalah oksidase dan dehidrogenase. Oksidase dapat mengkatalisis reaksi antara substrat dan molekul oksigen, sedangkan dehidrogenase mempunyai peran dalam pengambilan atom hidrogen dari substrat.
2. Transferase, adalah enzim yang dapat mengkatalisis pemindahan bermacam-macam gugus fungsional dari suatu substansi ke substansi lainnya dan biasanya berikatan kovalen dengan enzim atau koenzim.
3. Hidrolase, adalah enzim yang dapat mengkatalisis pemecahan ikatan melalui hidrolisis dalam suatu substrat atau pemecahan substrat dengan pertolongan molekul air. Contoh enzim-enzim yang termasuk dalam golongan ini diantaranya adalah amilase, selulase, dan sebagainya.

4. Liase, adalah enzim yang dapat mengkatalisis pemecahan ikatan tanpa melalui hidrolisis. Enzim ini akan melepaskan gugus tertentu dari substratnya dan menempelkan gugus tersebut pada ikatan rangkap.
5. Isomerase, adalah enzim yang mengkatalisis perubahan dari satu bentuk isomer ke bentuk isomer lainnya, atau enzim yang dapat mengkatalisis reaksi isomerisasi.
6. Ligase, adalah enzim yang mengkatalisis penggabungan dua molekul, enzim ini mengkatalisis jenis sintesis tertentu. Proses ini melibatkan pemecahan ikatan pirofosfat dalam ATP atau senyawa yang sejenis.

b. Menurut Suryani dan Taupiqurrahman (2012) berdasarkan tempat bekerjanya enzim dapat digolongkan menjadi dua yaitu :

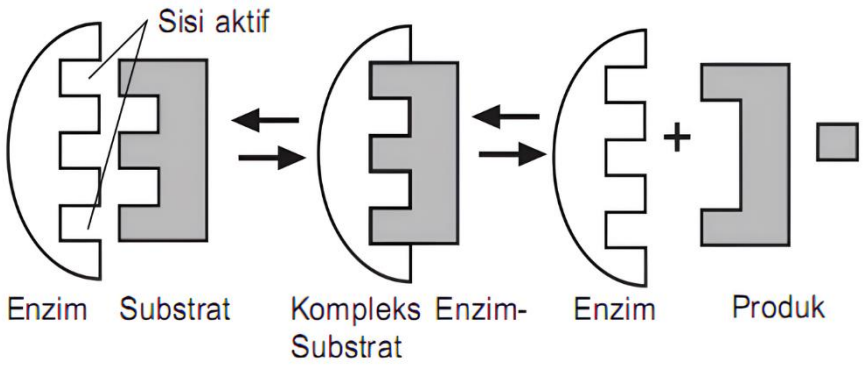
1. Endoenzim, yaitu enzim yang bekerja di dalam sel. Endoenzim merupakan enzim yang digunakan untuk proses sintesis di dalam sel dan untuk pembentukan energi (ATP) yang berguna untuk proses kehidupan sel, misal dalam proses respirasi.
2. Eksoenzim, yaitu enzim yang bekerja di luar sel. Secara umum, enzim ini berfungsi untuk mengubah substrat secara hidrolisis, untuk dijadikan molekul yang lebih sederhana dengan berat molekul (BM) lebih rendah sehingga dapat masuk melewati membran sel. Energi yang dibebaskan pada reaksi pemecahan substrat di luar sel tidak digunakan dalam proses kehidupan sel.

2.3 Mekanisme Reaksi Enzim

Dalam reaksi yang dikatalisis enzim, enzim berikatan dengan substrat membentuk kompleks. Untuk dapat bekerja pada suatu zat atau substrat harus ada hubungan atau kontak antara enzim dan substrat. Enzim memiliki ukuran yang lebih besar daripada substrat sehingga, tidak semua bagian enzim dapat berinteraksi dengan substrat. Substrat mengikat enzim melalui interaksi non-kovalen pada bagian tertentu enzim yang disebut sebagai sisi aktif (*active site*). Sisi aktif ini juga biasa disebut sebagai sisi katalitik atau sisi pengikatan substrat. Sisi aktif enzim terdiri dari asam-asam amino dengan gugus fungsional spesifik yang berfungsi untuk mengikat molekul substrat. Interaksi hanya dapat terjadi jika sisi aktif memiliki

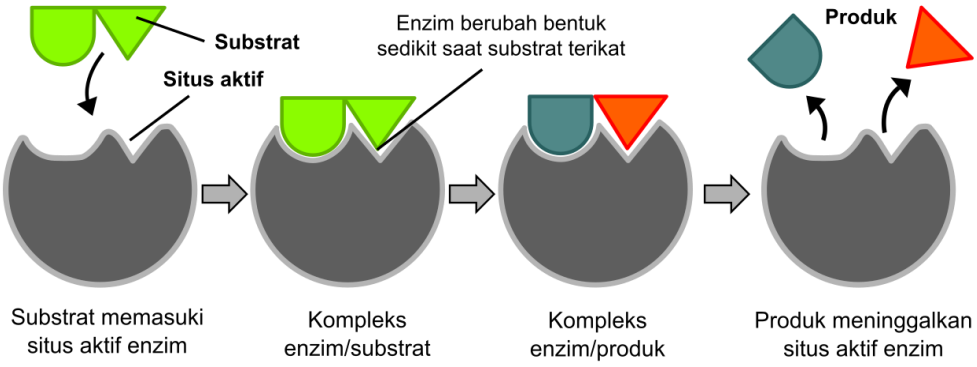
ruang yang sesuai untuk menampung substrat. Jika, substrat memiliki bentuk atau konformasi lain, maka tidak dapat berikatan dengan gugus-gugus spesifik pada sisi aktif suatu enzim, sehingga enzim tidak dapat berfungsi terhadap substrat. Menurut Ischak dkk. (2017) ada dua model yang telah dikembangkan untuk menjelaskan proses pengikatan substrat oleh enzim yaitu:

1. Model kunci dan anak kunci (*lock and key*), dikemukakan oleh Fischer. Model ini menganggap bahwa terdapat kesesuaian bentuk yang sangat mirip antara struktur substrat dan bentuk geometri dari sisi aktif enzim. Substrat mengikat pada bagian enzim yang komplementer dengan strukturunya seperti layaknya kunci yang masuk ke dalam gembok. Model lock and key dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Model *lock and key* (Ischak dkk., 2017).

2. Model induksi pas (*Induced-fit*), diajukan oleh Daniel Koshland. Model induksi pas merupakan model yang lebih fleksibel karena sisi aktif enzim tidak memiliki struktur yang kaku. Pengikatan substrat dapat menyebabkan perubahan konformasi pada sisi aktif hingga mencapai kedudukan yang tepat agar enzim dan substrat membentuk ikatan. Dengan demikian, sisi aktif enzim memiliki bentuk tiga dimensi yang berbeda sebelum dan setelah mengikat substrat. Model induksi pas dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Model induksi pas (Ischak dkk., 2017).

2.4 Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu :

a. Suhu

Suhu mempengaruhi aktivitas enzim sebagai katalis. Di luar suhu optimum aktivitas enzim menjadi menurun. Pada suhu yang terlalu rendah enzim menjadi tidak aktif, karena tidak terjadi interaksi antara molekul enzim dengan substrat. Sebaliknya, pada suhu yang terlalu tinggi interaksi yang berlebihan dapat menyebabkan struktur dari enzim akan terganggu sehingga enzim akan mengalami denaturasi, atau dapat dikatakan enzim akan kehilangan sifat alaminya (Wahyuni, 2017).

b. Derajat keasaman (pH)

Seperti protein lainnya, aktivitas enzim dipengaruhi oleh derajat keasaman lingkungan. Enzim bekerja paling baik pada pH tertentu yang disebut sebagai pH optimum. Derajat keasaman optimal enzim untuk bekerja umumnya mendekati pH netral, sekitar 6–8. Di luar rentang ini, aktivitas enzim dapat mengalami gangguan bahkan mengalami terdenaturasi. Contohnya, enzim pencernaan tripsin yang terdapat pada usus halus memiliki pH optimum 7,7. Pada pH jauh di atas nilai optimum, enzim akan terdenaturasi sehingga tidak dapat bekerja (Wahyuni, 2017).

2.5 Kinetika Reaksi Enzim

Kinetika reaksi enzim merupakan bagian yang penting dalam studi biokimia, yang berfokus kepada pemahaman mengenai kecepatan reaksi enzim dan faktor-faktor yang memengaruhinya. Memahami kinetika reaksi enzim adalah kunci untuk mengetahui bagaimana enzim berfungsi sebagai biokatalisator dan bagaimana mereka berinteraksi dengan substratnya. Mekanisme reaksi enzim melibatkan pembentukan kompleks enzim-substrat, di mana substrat berikatan dengan enzim melalui interaksi non-kovalen, membentuk kompleks yang disebut sebagai kompleks enzim-substrat. Dalam kompleks ini, enzim memfasilitasi perubahan struktur substrat untuk menghasilkan produk reaksi. Proses ini melibatkan serangkaian langkah reaksi yang terkoordinasi dengan presisi tertentu. Analisis kinetika reaksi enzim melibatkan pengukuran kecepatan reaksi dalam berbagai kondisi eksperimental, seperti mengamati perubahan konsentrasi substrat atau perubahan konsentrasi produk reaksi seiring waktu. Data kinetik ini kemudian dianalisis dan dimodelkan untuk memahami kinetika reaksi enzim dan menemukan persamaan laju reaksi yang sesuai (Fathurrohim dkk., 2023).

Dalam kinetika reaksi enzim, terdapat parameter penting yang disebut konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}). Nilai K_M adalah konsentrasi substrat tertentu pada saat enzim mencapai setengah kecepatan maksimum. Sedangkan, V_{maks} merupakan kondisi dimana kecepatan reaksi (V) tidak dapat bertambah kembali dengan bertambahnya substrat [S]. V_{maks} menjadi salah satu parameter kinetika enzim. Setiap enzim memiliki nilai V_{maks} dan K_M yang khas untuk substrat tertentu pada suhu dan pH tertentu (Kamelia dkk., 2005). Menurut Lehninger (2005), nilai K_M dan V_{maks} suatu enzim dapat dihitung menggunakan persamaan Lineweaver-Burk, yang berasal dari persamaan Michaelis-Menten dan menghasilkan suatu kurva Lineweaver-Burk yang ditunjukkan pada Gambar 3.

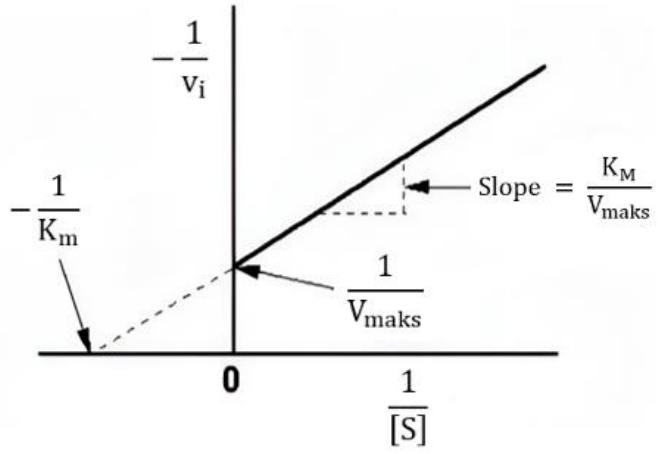
Persamaan 1 Michaelis-Menten:

$$V_o = \frac{V_{maks}\,[S]}{K_M + [S]} \qquad \text{…….. (1)}$$

Persamaan 2 Lineweaver-Burk :

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_M + [S]}{V_{maks}\,[S]}$$

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_M}{V_{maks}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}} \qquad \text{……. (2)}$$



Gambar 3. Diagram Lineweaver-Burk (Suhartono, 1989).

Peningkatan nilai K_M enzim yang diimobilisasi menunjukkan bahwa diperlukan konsentrasi substrat yang lebih tinggi untuk mencapai laju reaksi maksimum atau laju reaksi yang serupa dengan enzim murni. Perubahan konformasi pada molekul enzim dapat meningkatkan nilai K_M karena berkurangnya kemampuan pengikatan antara enzim dan substrat. Perubahan bentuk enzim disebabkan oleh perubahan kimia pada saat terjadi pengikatan kovalen enzim dengan substrat serta ukuran partikel enzim yang terlalu besar sehingga mempengaruhi difusi substrat (Suhartono, 1989).

2.6 Enzim Amilase

Amilase merupakan enzim yang sangat penting dalam industri pati untuk menghidrolisis polisakarida menjadi gula sederhana (Oktavia dkk., 2018). Amilase terdiri dari tiga jenis, yaitu :

a. α-Amilase

Enzim α-amilase merupakan enzim yang bertindak sebagai katalis dalam reaksi hidrolisis pati dalam air membentuk oligosakarida maupun monosakarida berbagai ukuran dengan konfigurasi α. Enzim α-amilase memiliki nama kimiawi, yaitu endo-1,4-α-D-*glucan glucohydrolase*. Enzim ini mampu memotong ikatan 1,4-α-glikosidik pada bagian dalam rantai amilosa dan amilopektin (Puspitasari dkk., 2019).

b. β-Amilase

Enzim β-amilase yang juga dikenal sebagai *saccharifying enzyme*, mampu dengan cepat memecah larutan pati dan menghasilkan maltosa. Enzim β-amilase mempunyai pH optimum pada pH 5,18 – 6,38 dan suhu optimum sekitar 65^{o}C. Enzim β-amilase bekerja memutus ikatan 1,4-glikosidik yang terdapat pada bagian luar pati menjadi glukosa, amilopektin, dan dekstrin (Merkuriana, 2023).

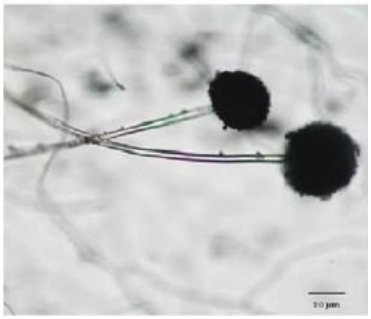
c. γ-Amilase

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

2.7 *Aspergillus* sp.

Aspergillus sp. merupakan jamur filamen sebagai lawan ragi yang bersel tunggal. Jamur ini di identifikasi di laboratorium terlihat tampak bulat seperti ragi, atau terdiri dari rantai sel yang disebut sebagai hifa. *Aspergillus* sp. berkembang biak dengan membentuk spora kecil yang dapat mudah tumbuh di udara. Kepala konidia atau tubuh *Aspergillus* sp. tumbuh dengan cepat, putih, kuning, kuning

coklat, coklat sampai hitam atau hijau. *Aspergillus* sebagian besar padat memiliki konidiofor tegak. Konidiofor berhenti dalam sebuah vesikel ditutupi dengan baik oleh lapisan phialides atau lapisan sel subtending. *Aspergillus* sp. memiliki perbedaan utama dengan *Penicillium* sp. yaitu *Aspergillus* sp. mengandung konidiofor yang tidak terpisahkan, sedangkan *Penicillium* sp. mengandung konidiofor yang terpisah (Wulansari, 2013). Pada media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), *Aspergillus* sp. dapat tumbuh cepat pada suhu ruang, membentuk koloni yang granular, berserabut dengan beberapa warna sebagai salah satu ciri identifikasi. *Aspergillus* sp. memiliki hifa yang bersekat dan bercabang, pada bagian ujung hifa terutama pada bagian yang tegak membesar merupakan konidioforanya. Konidiofora ini pada bagian ujungnya membulat menjadi fesikel, yang memiliki batang batang pendek yang disebut sebagai sterigma. Sterigma biasanya sederhana dan bisa berwarna atau tidak berwarna. Pada sterigma tumbuh konidia yang membentuk rantai yang berwarna hijau, cokelat atau hitam (Fardiaz, 1992). *Aspergillus* sp. dapat menghasilkan beberapa mikotoksin atau biasa dikenal dengan aflatoksin. Aflatoksin paling sering mengkontaminasi bahan makanan dan menyebabkan penyakit bagi manusia, serta memiliki sifat karsinogenik dan hepatotoksik (Mizana dkk., 2016). *Aspergillus* sp. dapat dimanfaatkan dalam berbagai proses industri, baik dalam industri skala besar maupun secara tradisional karena memiliki potensi sebagai penghasil enzim, salah satu di antaranya enzim amilase dengan keunggulannya, seperti kapasitas produksi massal, lebih ekonomis, waktu produksi yang lebih singkat, dan lebih stabil (Jinu, 2017). Jamur *Aspergillus* sp. dapat ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Jamur *Aspergillus* sp. (Fardiaz, 1992)**.**

2.8 Stabilitas Enzim

Enzim merupakan golongan protein, sehingga mempunyai sifat fisik dan kimia yang mirip dengan protein. Aktivitas enzim dipengaruhi oleh lingkungan, pengaruh tersebut dapat menyebabkan gangguan stabilitas enzim sehingga menjadi masalah yang sering dihadapi dalam bidang industri. Stabilitas enzim dapat diartikan sebagai kestabilan aktivitas selama penyimpanan dan penggunaan enzim tersebut, serta kestabilan terhadap senyawa yang bersifat merusak seperti pelarut tertentu (asam atau basa) dan pengaruh suhu serta pH ekstrem. Suhu yang tinggi akan meningkatkan laju reaksi. Demikian halnya dengan reaksi enzimatik, kenaikan suhu akan mempercepat laju reaksi, namun hanya batas tertentu. Suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan enzim mengalami denaturasi, hal ini yang menyebabkan laju enzimatik menjadi menurun.

Proses inaktivasi enzim pada suhu tinggi terjadi melalui dua tahap. Pertama, terjadi pembukaan parsial struktur sekunder, tersier dan kuartener enzim. Kedua, perubahan struktur primer enzim akibat adanya kerusakan asam amino tertentu oleh panas (Ahern *and* Klibanov, 1987). Pada reaksi enzimatik, sebagian besar enzim akan kehilangan aktivitas katalitiknya secara cepat dan *irreversible* pada pH yang jauh dari rentang pH optimumnya. Inaktivasi ini terjadi karena *unfolding* molekul protein akibat perubahan kesetimbangan elektrostatik dan ikatan hidrogen (Kazan *et al*., 1997). Ada dua cara yang dapat dilakukan untuk mendapatkan enzim dengan stabilitas yang tinggi, yaitu menggunakan enzim yang secara alami memiliki stabilitas ekstrem dan meningkatkan stabilitas enzim yang yang kurang stabil secara alami. Terdapat tiga cara yang dapat digunakan untuk meningkatkan stabilitas enzim yaitu dengan cara imobilisasi, modifikasi kimia, penggunaan zat aditif dan mutagenesis terarah (Mozhaev *and* Martinek, 1984). Stabilitas enzim sangat penting terutama saat diaplikasikan dalam skala industri yang bekerja pada suhu dan pH yang ekstrem (Kasipah dkk., 2013). Penggunaan kondisi ekstrem pada enzim bertujuan untuk meningkatkan laju reaksi, mengurangi kontaminan, dan mengurangi masalah viskositas. Stabilitas termal enzim dapat ditentukan berdasarkan aktivitas sisa enzim setelah diinkubasi pada

suhu yang tinggi dalam jangka waktu tertentu, yang dapat ditentukan dengan menggunakan Persamaan 3 sebagai berikut :

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

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).

Tabel 1 memuat beberapa penelitian mengenai peningkatan kestabilan dengan cara imobilisasi enzim α-amilase menggunakan beberapa matriks pendukung salah satunya adalah zeolit. Dari tabel tersebut terlihat bahwa terjadi peningkatan kestabilan termal enzim imobil dibandingkan dengan enzim bebasnya. Peningkatan kestabilan termal enzim α-amilase membuatnya dapat diaplikasikan dalam berbagai proses industri.

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

Sumber Enzim	Matriks	Suhu	Durasi	Aktivitas Sisa (%)		Ref.
				Enzim Bebas	Enzim Imobil	
A. fumigatus	Zeolit	60°C	80 min	38,75	90,40	(Yandri *et al.*, 2023)
A. fumigatus	Zeolit/kitosan	60°C	80 min	21,50	72,28	(Yandri *et al.*, 2022b)
Bacillus subtilis ITBCCB148	Zeolit	60°C	80 min	7,42	59,61	(Sejati, 2017)

Stabilitas termal enzim dapat juga dilihat dari nilai waktu paruh ($t_{1/2}$), konstanta laju inaktivasi (k_i), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i).

2.8.1 Konstanta Laju Inaktivasi (k_i)

Konstanta laju inaktivasi (k_i) merupakan nilai yang menggambarkan perubahan terhadap konsentrasi enzim selama periode inaktivasi. Penentuan konstanta laju

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

$$\ln\left(\frac{E_i}{E_o}\right) = -k_i \times t_i \quad \text{.....(4)}$$

Keterangan: k_i = konstanta laju inaktivasi termal; E_o = aktivitas sisa enzim pada t_o 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 $\ln\left(\frac{E_i}{E_o}\right)$ terhadap t_i (Kazan *et al.,* 1997; Stahl, 1999).

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

Waktu paruh ($t_{1/2}$) mengacu pada waktu dimana suatu enzim mengalami kehilangan separuh aktivitasnya, dan ini menjadi konsep yang penting untuk 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:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_i} \quad \text{.....(5)}$$

Keterangan: k_i = konstanta laju inaktivasi termal; dan $t_{½}$ = waktu paruh (Kazan *et al.,* 1997; Stahl, 1999).

2.8.3 Perubahan Energi Bebas akibat Denaturasi (ΔG_i)

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

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

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

2.9 Isolasi dan Pemurnian Enzim

Enzim dapat diisolasi secara ekstraseluler maupun intraseluler. Enzim ekstraseluler merupakan enzim yang dapat bekerja di luar sel sedangkan enzim intraseluler merupakan enzim yang dapat bekerja di dalam sel. Ekstraksi enzim ekstraseluler lebih mudah dibandingkan dengan ekstraksi enzim intraseluler disebabkan tidak memerlukan pemecahan sel dan enzim yang dikeluarkan dari sel mudah dipisahkan dari pengotor lainnya tanpa banyak tercampur dengan bahan-bahan sel lain (Sari dkk., 2022). Proses pemurnian enzim dapat dilakukan melalui beberapa metode yaitu :

2.9.1 Sentrifugasi

Sentrifugasi merupakan tahap awal dalam pemurnian enzim. Sentrifugasi merupakan proses pemisahan partikel dari larutan berdasarkan ukuran, bentuk, densitas, viskositas medium, dan kecepatan. Pada tahap ini, sentrifugasi membantu memisahkan pengotor berupa pelet dari supernatan yang mengandung enzim. Enzim yang dihasilkan melalui sentrifugasi masih berupa enzim kasar yang mengandung pengotor sehingga diperlukan pemurnian lebih lanjut. Sel-sel mikroba biasanya disedimentasikan pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit (Nangin dan Sutrisno, 2015).

2.9.2 Fraksinasi

Fraksinasi merupakan proses pengendapan protein atau enzim dengan penambahan senyawa elektrolit seperti garam amonium sulfat, natrium klorida atau natrium sulfat. Penambahan senyawa elektrolit ke dalam larutan protein dapat menyebabkan terjadinya proses pengendapan protein. Proses pengendapan protein tersebut dipengaruhi oleh kekuatan ion dalam larutan. Dengan meningkatnya kekuatan ion, kelarutan enzim akan meningkat atau disebut dengan peristiwa *salting in*. Setelah mencapai titik tertentu, kandungan garam semakin tinggi, maka kelarutan protein semakin menurun dan terjadi proses pengendapan protein. Peristiwa pengendapan protein ini disebut *salting out*. Pada kekuatan ion rendah, protein akan terionisasi sehingga interaksi antar protein akan menurun dan

kelarutan akan meningkat. Peningkatan kekuatan ion ini meningkatkan kadar air yang terikat pada ion dan jika interaksi antar ion kuat, maka kelarutannya menurun akibatnya interaksi antar protein lebih kuat dan kelarutannya menurun. Pemurnian enzim α-amilase dilakukan dengan fraksinasi menggunakan amonium sulfat (Raul *et al*., 2014).

2.9.3 Dialisis

Proses dialisis bertujuan untuk menghilangkan kadar garam amonium sulfat yang ditambahkan selama fraksinasi. Dialisis dilakukan dengan menggunakan membran selofan yang dapat dilalui oleh partikel-partikel kecil, seperti ion-ion garam, tetapi dapat menahan molekul enzim. Proses dialisis dilakukan dengan merendam membran selofan yang telah diisi larutan enzim hasil fraksi dengan larutan buffer fosfat selama 1 x 24 jam sambil diaduk dengan menggunakan *magnetic strirer* pada suhu 5^{o}C, mengingat enzim mudah terdenaturasi. Larutan buffer fosfat diganti setiap 2 jam sekali, hal ini bertujuan agar ion-ion garam yang sudah melewati membran selofan tidak kembali masuk kedalam membran dan hal ini merupakan salah satu cara untuk mempercepat pergerakan molekul. Hasil dari proses dialisis disebut sebagai fraksi amilase. Fraksi amilase ini kemudian diuji aktivitas enzim dengan metode Fuwa dan uji kadar protein totalnya dengan metode Lowry (Tazkiah dkk., 2017).

2.10 Uji Aktivitas Enzim α-Amilase

Aktivitas enzim dapat diukur dalam dua cara yaitu sebagai aktivitas unit dan aktivitas spesifik. Aktivitas unit enzim merujuk pada jumlah enzim (dalam mL) yang menghasilkan perubahan 1 µmol substrat per menit pada kondisi optimum pH dan suhu. Sementara aktivitas spesifik enzim adalah aktivitas unit enzim yang dinormalisasi terhadap jumlah protein dalam miligram. Tingkat kemurnian enzim tercermin dalam aktivitas spesifiknya; semakin tinggi nilai aktivitas spesifik maka semakin murni pula enzim yang dihasilkan. Penentuan aktivitas unit enzim dan kandungan protein dapat diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-*Vis* dengan cara mengukur absorbansinya. Untuk mengukur aktivitas unit enzim α-

amilase, metode Fuwa dan Mandels dapat digunakan (Yandri *et al*., 2018). Metode ini melibatkan pengukuran aktivitas enzim berdasarkan penurunan substrat atau pembentukan produk.

2.10.1 Metode Fuwa

Metode Fuwa aktivitas α-amilase ditentukan dengan metode Fuwa yaitu berdasarkan pengurangan jumlah substrat pati yang terhidrolisis dan menghasilkan warna biru setelah penambahan iodin. Warna tersebut akan menyerap cahaya monokromatis pada λ_{maks} 600 nm. Uji Fuwa merupakan uji yang paling spesifik untuk mengidentifikasi aktivitas enzim amilase karena waktu reaksi yang cukup singkat yaitu 10 menit inkubasi dan pati sebagai substrat. Iodin (I_2) terperangkap dalam rantai spiral substrat (amilosa) menghasilkan larutan berwarna biru pada kontrol. Enzim sejak awal sudah diinaktivasi oleh HCl sehingga substrat tetap utuh karena tidak dihidrolisis oleh enzim, maka larutan akan tetap berwarna biru. Enzim pada sampel akan mengikat substrat membentuk kompleks enzim-substrat. Kompleks tersebut akan bereaksi dengan larutan iodin membentuk larutan berwarna kuning yang dapat diukur secara spektrofotometri. Substrat yang semakin banyak dihidrolisis oleh enzim, maka warna larutan akan semakin kuning bening, hal ini dikarenakan substrat pati yang berikatan dengan iodin dan enzim semakin berkurang dan berubah menjadi produk, yaitu glukosa. Enzim juga melepas ikatan spiral antara iodin dan substrat sehingga warna menjadi kuning bening (Fuwa, 1954).

2.10.2 Metode Mandels

Aktivitas enzim α-amilase dapat dilakukan dengan menggunakan metode Mandels. Metode ini didasarkan pembentukan produk (glukosa) hasil hidrolisis substrat pati yang akan mengalami oksidasi setelah penambahan reagen DNS menghasilkan larutan berwarna merah. Warna tersebut akan menyerap cahaya monokromatis pada λ_{maks} 510 nm. Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan menggunakan kurva standar glukosa Aktivitas enzim amilase dihitung berdasarkan data kadar glukosa relatif sebagai mg glukosa yang dihasilkan oleh 1 mL kasar amilase. Semakin tinggi absorbansi sampel semakin baik aktivitasnya.

Selain digunakan sebagai uji aktivitas enzim α- amilase metode Mandels dapat juga digunakan dalam penentuan data kinetika enzim α-amilase yaitu nilai K_M, V_{maks}, $t_{1/2}$, k_i, dan ΔG_i (Mandels *et al*., 1976).

2.11 Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

Penentuan kadar protein bertujuan untuk mengetahui bahwa protein enzim masih terdapat pada tiap fraksi pemurnian (tidak hilang dalam proses pemurnian) dengan aktivitas yang atau tetap baik. Metode yang dapat digunakan untuk menentukan kadar protein adalah metode Lowry. Pengujian kadar protein dengan metode Lowry didasarkan pada pembentukan kompleks Cu^{2+} dengan ikatan peptida yang akan tereduksi menjadi Cu^{+} pada kondisi basa. Cu^{+} dan rantai samping tirosin, triptofan, dan sistein akan bereaksi dengan reagen Folin Ciocalteau. Reaksi ini secara perlahan akan mereduksi reagen tersebut menjadi heteromolibdenum menghasilkan warna hijau-kebiruan yang akan menyerap cahaya monokromatis pada λ_{maks} 750 nm. Intensitas warna yang dihasilkan tergantung pada kandungan triptofan dan tirosin (Lowry *et al*., 1951).

2.12 Imobilisasi

Imobilisasi enzim artinya enzim dibatasi atau terlokalisir sehingga enzim dapat digunakan secara kontinyu. Masalah yang menarik agar enzim diimobilisasi jika jumlah substrat sangat besar dan enzim yang digunakan mahal (Bailey *and* Ollis, 1977). Keuntungan enzim yang diimobilisasi adalah enzim dapat dipisahkan dari campuran reaksi dengan cepat, produksi hasil reaksi dapat diperoleh tanpa terkontaminasi enzim dan enzim yang diperoleh kembali dapat dipakai lagi (Pomeranz *and* Meloan, 2000).

Imobilisasi enzim dapat dianggap sebagai perubahan enzim dari larut dalam air keadaan bergerak menjadi keadaan tidak bergerak yang tidak larut. Imobilisasi mencegah difusi enzim ke dalam campuran reaksi dan mempermudah memperoleh kembali enzim tersebut dari aliran produk dengan teknik pemisahan padat atau cair yang sederhana. Kelebihan enzim imobil adalah dapat digunakan

berulang-ulang, penghentian reaksi dapat dikerjakan secara cepat dengan memindahkan enzim dari larutan reaksi. Dalam banyak hal, enzim distabilkan oleh ikatan, dalam proses ini larutan tidak terkontaminasi dengan enzim. Pada proses analitik waktu paruh panjang, kecepatan peluruhan yang dapat diramalkan dan pembuatan reagen dapat dihemat. Imobilisasi menyebabkan enzim tidak dapat bergerak bebas karena terjadi interaksi fisik atau kimia dengan bahan pendukung. Jenis bahan pendukung untuk imobilisasi ada berbagai macam. Bahan-bahan tersebut harus dipilih dengan cermat sesuai dengan metode imobilisasi dan aplikasi enzim. Hal ini dikarenakan karakteristik dari material pendukung mendapat peran yang penting dalam menentukan kinerja sistem imobilisasi. Bahan pendukung imobilisasi digolongkan dalam dua jenis yaitu organik dan anorganik. Polisakarida, protein, polistirena dan polimer lainnya termasuk dalam bahan pendukung organik sedangkan mineral alam seperti silika dan zeolit termasuk dalam pendukung anorganik (Wening dan Herdyastuti, 2021). Berbagai penelitian terkait imobilisasi enzim dengan menggunakan beberapa matriks pendukung dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Berbagai penelitian imobilisasi enzim dengan matriks pendukung.

Sumber Enzim	Jenis Enzim dan Matriks	Penggunaan Berulang	Aktivitas Sisa (%)	Referensi
Bacillus subtilis ITBCCB148	α-amilase dan zeolit	6	14	(Sejati, 2017)
A. fumigatus	α-amilase dan hibrida zeolit-kitosan	5	11	(Yandri *et al.*, 2022a)
A. fumigatus	α-amilase dan zeolit	5	13	(Yandri *et al.*, 2023)
A. fumigatus	α-amilase dan kitin	6	46	(Yandri *et al.*, 2022b)

Enzim diimobilisasi dalam bahan pendukung menggunakan metode adsorpsi fisik. Menurut Yandri dan Suhartati (2018) metode adsorpsi fisik merupakan metode imobilisasi enzim yang banyak digunakan dan termasuk metode yang dinilai cukup sederhana. Pada metode adsorpsi fisik enzim terikat pada bahan pendukung

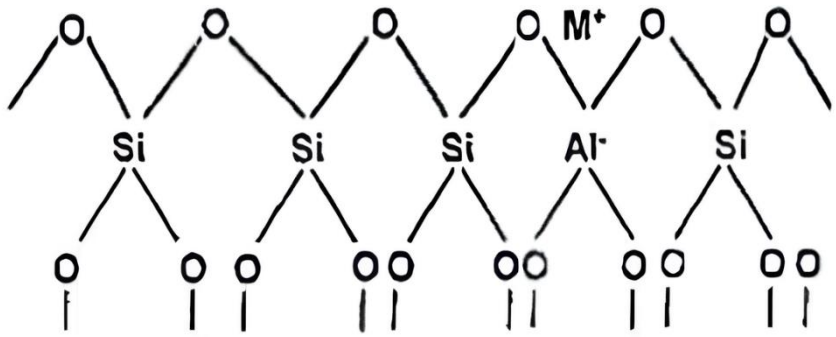
dengan hubungan ikatan non-kovalen termasuk interaksi ion atau interaksi hidrofobik, ikatan hidrogen, dan interaksi Van der Waals. Metode ini sederhana dan mudah dengan berbagai macam matriks yang sangat membantu pemurnian simultan serta imobilisasi enzim (misalnya Asparginase pada CM-selulosa) tanpa perubahan konformasi, tetapi melibatkan optimasi yang intensif karena adanya keterlibatan sejumlah faktor yang berperan dalam desorpsi enzim setelah adanya sedikit perubahan pada lingkungan (misalnya, pH, suhu, pelarut, kekuatan ion dan konsentrasi substrat yang tinggi). Metode adsorpsi dinilai menguntungkan disebabkan enzim tidak mengalami perubahan struktur sehingga aktivitasnya tetap terjaga dan situs aktif enzim terlindungi dari gangguan luar. Keberhasilan dari metode imobilisasi dipengaruhi oleh kondisi pada saat proses berlangsung disebabkan tidak semua enzim dapat diimobilisasi dengan semua matriks. Pada matriks terdapat gugus aktif spesifik yang dapat membantu terjadinya Interaksi antar bahan pendukung dengan enzim, dan jika tidak terdapat gugus aktif spesifik maka ditambahkan agen perantara. Matriks yang digunakan dalam metode adsorpsi dapat disesuaikan dengan enzim dan aplikasinya, adapun contoh matriks yang digunakan yaitu zeolit, silika, kitin, kitosan, dan sebagainya.

2.13 Zeolit

Zeolit merupakan mineral yang terdiri dari mineral aluminosilikat terhidrasi yang mengandung kation alkali atau alkali tanah dalam kerangka tiga dimensi. Zeolit mempunyai struktur $[SiO_4]^{4-}$ dan $[AlO_4]^{5-}$. Kedua struktur tersebut terhubung melalui atom oksigen dan akan membentuk struktur tiga dimensi yang memiliki rongga yang umumnya akan diisi oleh atom unsur golongan 1, golongan 2, yang dapat bergerak bebas (Anggoro, 2017). Menurut Pabalan dan Bertetti (2001) keberadaan Al^{3+} dan Si^{4+} dalam struktur zeolit menjadikan kerangka utamanya bermuatan negatif, sehingga diseimbangkan dengan logam bermuatan positif seperti Na^{+}, K^{+}, dan Ca^{2+}. Zeolit dapat dihasilkan secara alami atau buatan. Aktivasi perlu dilakukan karena ukuran rongga pada zeolit mempengaruhi pertukaran ion. Aktivasi bertujuan untuk meningkatkan kemampuan permukaan material zeolit menjadi lebih efektif sebagai penukar ion. Aktivasi dapat dilakukan secara kimia atau fisika. Aktivasi secara kimia menggunakan larutan kimia yang

bersifat asam dan basa, sedangkan secara fisika menggunakan pemanasan suhu tinggi. Aktivasi zeolit secara kimia dapat menghilangkan senyawa pengotor pada permukaan pori zeolit sehingga letak atom yang akan ditukarkan dapat teratur dimanfaatkan sebagai penukar ion, katalis, dan penyaring molekuler (Septommy dan Badriyah, 2022).

Kerangka zeolit berupa rongga yang berisi kation M^+ sebagai kation penyumbang muatan AlO_4 yang ditunjukkan pada Gambar 5.



Gambar 5. Struktur zeolit (Lesley *and* Elain, 1992).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan dari bulan Oktober 2023 sampai April 2024 di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain yaitu : alat-alat gelas, *laminar air flow* CRUMA model 9005-FL, spektrofotometer *UV-Vis* Cary Win *UV* 100, *autoclave* model S-90N, mikropipet *Eppendroff* , jarum ose, neraca analitik, gelas kimia, lemari pendingin, pembakar spiritus, sentrifuga, mikrotip, tabung sentrifuga, oven, *shaker incubator*, *waterbath*, *incubator*, pH meter, *magnetic stirrer*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, spatula, pipet tetes, penangas air, termometer, *spinbar*, *hotplate*, dan botol wadah.

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Aspergillus* sp. yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Universitas Lampung. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: PDA (Himedia), $(NH_4)_2SO_4$ (Merck), $CaCl_2$ (Merck), $MgSO_4$ (Merck), urea (Merck), $FeSO_4.7H_2O$ (Merck), KH_2PO_4 (Merck), $ZnSO_4.7H_2O$ (Merck), $CoCl_2$ (Merck), pepton (Himedia), pati (Merck), Na(K)-Tartarat (Merck), NaH_2PO_4 (Merck), Na_2HPO_4 (Merck), reagen Folin Ciocalteu (Sigma-Aldrich), pereaksi DNS (Himedia), fenol (Merck), KI (Merck), I_2 (Merck), $Na_2S_2O_3$ (Merck), HCl (Merck), Na_2CO_3 (Merck), $CuSO_4.5H_2O$ (Merck), NaOH (Merck), *Bovine Serum Albumin* (BSA), akuades, kapas sumbat, kasa, kertas saring, karet, aluminium foil, alkohol 70%,

tisu, pati singkong, kantung selofan, dan zeolit (Sigma-Aldrich) untuk matriks pendukung imobilisasi.

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 Pembiakan Isolat *Aspergillus* sp.

a. Pembuatan Media Agar Miring

Sebanyak 3,9 gram PDA dilarutkan dalam 100 mL akuades kemudian dipanaskan. Setelah itu, dituangkan hingga 5 mL ke dalam tabung reaksi. Tabung reaksi ditutup dengan sumbat kapas dan media disterilkan dalam *autoclave* pada 121°C dan 1 atm selama 15 menit. Tabung reaksi disimpan dalam posisi miring sampai media memadat (Yandri *et al*., 2022a).

b. Pembiakan *Aspergillus* sp.

Untuk melakukan pembiakan dengan diambil satu tarikan ose pada biakan murni *Aspergillus* sp., kemudian ditusuk ke dalam permukaan media agar miring. Proses ini dilakukan di dalam *laminar air flow* yang telah disterilisasi dengan sinar UV dan blower. Media agar yang telah mengandung isolat *Aspergillus* sp. dimasukkan ke dalam *incubator* selama 3-5 hari untuk inkubasi pada suhu 37°C (Yandri *et al*., 2022a).

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

a. Pembuatan buffer fosfat 0,05 M pH optimum 6,0

Media fermentasi dibuat menggunakan buffer fosfat yang merupakan kombinasi dari NaH_2PO_4 dan Na_2HPO_4. Variasi dalam proporsi antara NaH_2PO_4 dan Na_2HPO_4 akan menghasilkan perubahan pH yang dapat diestimasi melalui

persamaan Henderson-Hesselbach berikut yang dituliskan pada Persamaan 7 sebagai berikut:

$$[H^+] = K_a \left(\frac{V_{\text{asam lemah}}}{V_{\text{basa konjugasi}}} \right) \quad \text{..... (7)}$$

1) Larutan NaH_2PO_4 (Mr = 120 g/mol) 0,05 M sebanyak 1.000 mL (Stok A)
   Larutan dibuat dengan Persamaan 8 sebagai berikut:

$$M = \frac{\text{massa (g)}}{\text{Mr (g/mol)}} \text{ x } \frac{1.000}{V_{\text{pelarut}}\text{ (mL)}} \quad \text{..... (8)}$$

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

   Massa = 6,0 gram
   Untuk membuat 1000 mL larutan NaH_2PO_4 0,05 M diperlukan 6,0 g NaH_2PO_4 yang dilarutkan dengan akuades dalam labu ukur 1000 mL hingga batas meniskus, lalu dihomogenkan.

2) Larutan Na_2HPO_4 (Mr = 142 g/mol) 0,05 M sebanyak 500 mL (Stok B)
   Larutan dibuat dengan Persamaan 8. Untuk membuat 500 mL larutan Na_2HPO_4 0,05 M diperlukan 3,57 g Na_2HPO_4 yang dilarutkan dengan akuades dalam labu ukur 500 mL hingga batas meniskus, lalu dihomogenkan.

3) Larutan bufer fosfat 0,05 M sebanyak 300 mL pH 6,0
   Larutan NaH_2PO_4 (Stok A) dicampurkan dengan larutan Na_2HPO_4 (Stok B) dengan komposisi tertentu untuk mendapatkan pH 6,0. Volume Stok A dan Stok B yang dibutuhkan untuk mendapatkan larutan buffer fosfat sebanyak 300 mL dapat diperkirakan dengan Persamaan 7.

$$[H^+] = K_{a\,(NaH_2PO_4)} \left(\frac{V_{(NaH_2PO_4)}}{V_{(Na_2HPO_4)}} \right)$$

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

$$[H^+] = K_{a\ (NaH_2PO_4)} \left(\frac{V_{(NaH_2PO_4)}}{V_{total} - V_{(NaH_2HPO_4)}} \right)$$

$$10^{-6,0} = 6,3 \times 10^{-8} \left(\frac{V_{(NaH_2PO_4)}}{300 - V_{(NaH_2HPO_4)}} \right)$$

$V_{(NaH_2PO_4)} = 282,22$ mL

$V_{(Na_2HPO_4)} = 17,78$ mL

Pembuatan buffer pH 6,0 dengan persamaan di atas perlu diverifikasi akurasinya menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi.

b. Pembuatan Media Inokulum dan Fermentasi

Media inokulum dibuat sebagai media adaptasi awal pertumbuhan dan medium perkembangbiakan jamur pada media cair tanpa terjadinya produksi enzim α-amilase. Sedangkan media fermentasi dibuat sebagai medium pertumbuhan dan perkembangbiakan disertai produksi enzim α-amilase. Media inokulum yang digunakan terdiri dari 6 gram KH_2PO_4, 4,2 gram $(NH_4)_2SO_4$, 0,9 gram $MgSO_4.7H_2O$, 2,25 gram pepton, 0,9 gram urea, 0,9 gram $CaCl_2$, 0,015 gram $FeSO_4.7H_2O$, 0,0042 gram $ZnSO_4.7H_2O$, 0,006 gram $CoCl_2$, dan 2,25 gram substrat. Setelah itu, semua bahan dilarutkan dalam 300 mL buffer fosfat 0,05 M pH 6,0 dalam labu Erlenmeyer 500 mL. Kemudian dipanaskan diatas *hotplate* agar semua bahan homogen. Lalu dipindahkan sebanyak 50 mL ke dalam labu Erlenmeyer 250 mL sebagai media inokulum dan disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C, dengan tekanan 1 atm selama 15 menit (Yandri *et al*., 2022a).

c. Inokulasi *Aspergillus* sp.

Sebanyak 3 ose *Aspergillus* sp. diambil dari media agar miring ke dalam 50 mL media inokulum secara aseptis lalu dikocok dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam sedangkan media fermentasi tetap di dalam *Laminar Air Flow* (LAF) (Yandri *et al*., 2022a).

d. Produksi enzim α-Amilase

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

3.3.3 Isolasi Enzim α-Amilase

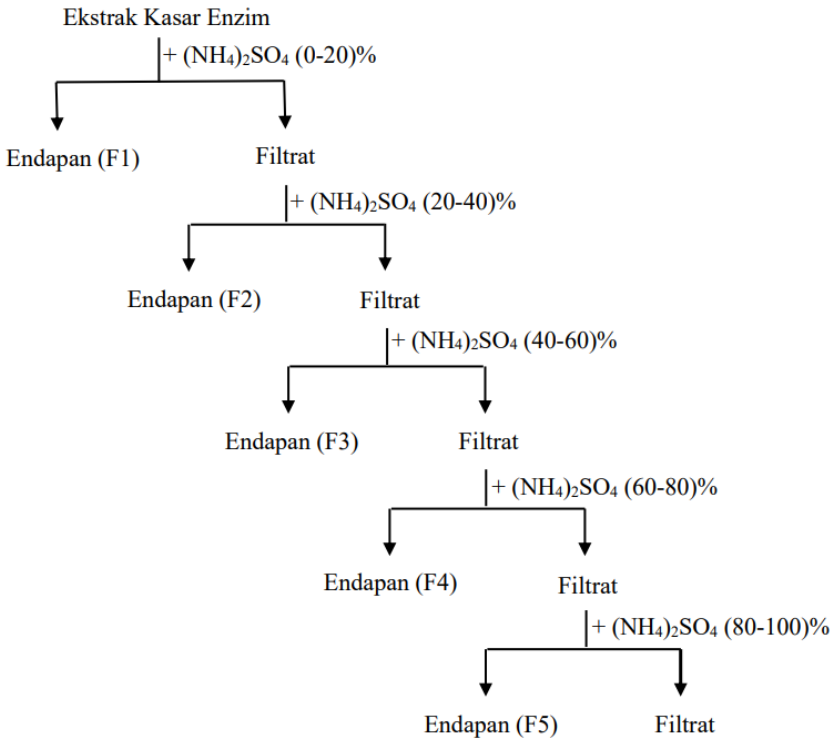
Isolasi enzim α-amilase dilakukan dengan metode sentrifugasi. Untuk memisahkan enzim dengan komponen sel lainnya digunakan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit, filtrat yang disentrifugasi akan menghasilkan dua bagian yaitu endapan (pelet) dan supernatan. Enzim yang diisolasi terdapat di supernatan dan endapan ekstraksi adalah kontaminan atau zat pengotor (Kusumasari dkk., 2023). Filtrat yang didapat merupakan ekstrak kasar enzim yang selanjutnya dapat diuji aktivitasnya menggunakan spektrofotometer UV-*Vis* dengan metode Fuwa dan mengukur kadar protein dengan metode Lowry (Yandri *et al*., 2022a).

3.3.4 Fraksinasi dengan amonium sulfat [$(NH_4)_2SO_4$)]

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

3.3.4.1 Penentuan pola fraksinasi pertama

Untuk memperoleh enzim yang murni, ekstrak kasar enzim yang telah didapatkan di fraksinasi secara bertingkat menggunakan amonium sulfat [$(NH_4)_2SO_4$]. Pada penelitian ini fraksinasi dilakukan pada urutan konsentrasi ammonium sulfat, sebagai berikut: (0–20); (20–40); (40–60), (60–80), dan (80–100)% untuk mengetahui pada fraksi mana enzim α-amilase terendapkan. Skema proses fraksinasi menggunakan amonium sulfat ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Skema fraksinasi menggunakan amonium sulfat.

Sebanyak 100 mL ekstrak kasar enzim yang diperoleh dimasukkan ke dalam gelas kimia 300 mL. Gelas kimia yang terdapat enzim ditempatkan ke dalam wadah berisi air dingin atau es batu untuk mencegah enzim terdenaturasi oleh panas selama proses pengadukan. Lalu, ditambahkan dengan garam amonium sulfat secara perlahan sambil diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* pada kecepatan yang stabil dan tidak terlalu cepat sampai garam sudah terlihat larut secara sempurna. Pengadukan yang terlalu cepat dapat membuat enzim terdenaturasi yang ditandai dengan munculnya busa. Endapan protein enzim yang didapatkan pada tiap fraksi kejenuhan amonium sulfat dipisahkan dari filtratnya dengan sentrifugasi dingin pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit dan disaring menggunakan kertas saring. Kemudian, endapan yang diperoleh dilarutkan dengan buffer fosfat 0,025 M pH 6,0. Setelah itu, filtrat yang diperoleh dari fraksi (0–20)% digunakan untuk diendapkan kembali dengan fraksi kejenuhan (20–40)%. Filtrat ini mengalami penambahan volume dari garam yang terlarut sebelumnya, sehingga perlu dihitung kembali massa ammonium sulfat

$[(NH_4)_2SO_4]$ yang diperlukan untuk mengendapkan enzim melalui Persamaan 9 sebagai berikut:

$$[(NH_4)_2SO_4]\ (\text{gram}) = \frac{\text{Volume filtrat (mL)}}{1.000\ \text{mL}}\ \text{x}\ [(NH_4)_2SO_4]\ \ (\text{g}) \qquad \ldots\ldots\ldots\ldots\ (9)$$

Scopes (1982) telah merangkum hasil perhitungan massa $(NH_4)_2SO_4$ (g) untuk ditambahkan ke dalam 1 L larutan pada suhu 0°C, yang ditunjukkan pada Tabel 6 dalam Lampiran 2. Kemudian, dilanjutkan kembali dengan prosedur yang sama hingga fraksi kejenuhan (80–100)% (Yandri *et al*., 2022a). Lalu, setelah seluruh tahap fraksinasi selesai selanjutnya, diuji aktivitasnya dengan metode Fuwa serta diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.

3.3.4.2 Penentuan pola fraksinasi kedua

Tiga atau empat fraksi dari pola fraksinasi pertama dengan aktivitas spesifik tertinggi dijadikan acuan untuk menentukan pola fraksi kedua. Pola fraksi kedua dibagi menjadi dua fraksi saja, hal ini bertujuan untuk menambah rendemen enzim sehingga pada saat proses pemurnian tidak kehilangan banyak enzim dan aktivitas enzim α-amilase yang diperoleh lebih tinggi dari aktivitas ekstrak kasar enzim (Yandri *et al.,* 2010). Prosedur ini dilakukan sama seperti proses penentuan pola fraksinasi pertama. Fraksinasi ini dilakukan setiap 1 L ekstrak kasar enzim dan diuji aktivitasnya dengan metode Fuwa serta diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.

3.3.5 Dialisis

Dalam proses dialisis endapan enzim yang telah dilarutkan dari tiap fraksi amonium sulfat dengan aktivitas spesifik tertinggi dimasukkan ke dalam membran *semipermeable* (kantung selofan) untuk menahan molekul-molekul protein, sedangkan molekul yang lebih kecil seperti garam dan air dapat melewati membran tersebut (Widowati dkk., 2020). Kemudian, didialisis dengan larutan penyangga fosfat 0,01 M pH 6,0 selama 24 jam pada suhu dingin (4°C). Selama dialisis, dilakukan pergantian buffer setiap 4–6 jam sekali agar konsentrasi ion-ion yang terdapat di dalam kantong dialisis dapat dikurangi. Proses ini dilakukan terus

menerus hingga tidak ada amonium sulfat yang tersisa. Untuk menguji adanya amonium sulfat dalam larutan penyangga fosfat dilakukan dengan menambahkan larutan $BaCl_2$. Bila terbentuk endapan putih $BaSO_4$ di luar selofan, maka ion sulfat telah berhasil dikeluarkan dari dalam selofan. Jika prosedur sudah selesai, selofan dibilas dengan akuades atau buffer fosfat dan disimpan pada suhu 4ºC untuk mencegah kontaminasi mikroba. Masa penggunaan selofan idealnya 6 bulan dan perlu dicuci secara berkala. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas dengan metode Fuwa dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.

3.3.6 Uji Aktivitas dan Penentuan Kadar Protein Enzim α-Amilase

a. Pengujian aktivitas unit enzim α-amilase metode Fuwa

1. Pembuatan pereaksi untuk pengukuran aktivitas α-amilase metode Fuwa (Fuwa, 1954).

- Pereaksi iodin: 2 gram KI dimasukkan dalam labu takar 100 mL dan dilarutkan dalam akuades 10 mL. Kemudian ditambahkan 0,2 gram I_2 dan akuades hingga tanda batas miniskus.
- Larutan pati 0,1%: 0,1 gram pati dilarutkan dengsn akuades 100 mL dalam Erlenmeyer 100 mL dan dipanaskan hingga larut.
- Larutan HCl 1 N: HCl pekat 12 N diencerkan menjadi HCl 1 N sebanyak 100 mL di dalam lemari asam menggunakan Persamaan 10 sebagai berikut:

$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$ …….. (10)

$12 \times V_1 = 1 \times 100$

$V_1 = 8{,}33$ 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.

2. Pengujian aktivitas unit enzim α-amilase metode Fuwa

Aktivitas α-amilase ditentukan dengan metode iodin (Fuwa, 1954). Metode ini berdasarkan pada pengurangan jumlah substrat (pati) yang terdeteksi dengan penambahan iodin. Metode ini merupakan metode spesifik yang digunakan untuk

mengidentifikasi aktivitas enzim α-amilase disebabkan waktu reaksi yang dipakai singkat yaitu 10 menit inkubasi dengan pati sebagai substratnya, kemudian jika absorbansi sampel yang diperoleh semakin kecil maka semakin baik aktivitas dari enzim tersebut. Sebanyak 0,25 mL enzim ditambahkan ke dalam 0,25 mL larutan pati 0,1% lalu diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 0,25 mL HCl 1N dan kemudian ditambahkan 0,25 mL pereaksi iodin dan 4 mL akuades. Setelah dihomogenkan, absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-*Vis* pada λ_{maks} 600 nm dikarenakan substrat pati yang terhidrolisis menghasilkan warna biru setelah penambahan iodin dan warna tersebut menyerap cahaya monokromatis pada panjang gelombang maksimum tersebut. Kontrol dibuat dengan cara yang sama hanya menggunakan 0,25 mL enzim yang telah diinaktivasi menggunakan HCl. Aktivitas Unit (AU) dapat ditentukan melalui Persamaan 11 sebagai berikut :

$$AU = \frac{A_{kontrol} - A_{sampel}}{A_{kontrol}} \times \frac{1}{t_{inkubasi}} \times \frac{1}{V_{enzim}} \times FP \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (11)$$

Keterangan : FP = faktor pengenceran; V = volume enzim = 0,25 mL; t = waktu inkubasi = 10 menit.

b. Pengujian aktivitas unit enzim α-amilase dengan metode Mandels

1. Pembuatan pereaksi untuk pengukuran aktivitas unit enzim α-amilase dengan metode Mandels (Mandels *et al*., 1976).

Pembuatan pereaksi untuk metode Mandels dilakukan dengan cara ditimbang sebanyak 1 gram *Dinitrosalisilic Acid* (DNS) lalu, dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL. Kemudian, ditambahkan 1 gram NaOH dan diaduk hingga larut, setelah itu ditambahkan 1 mL larutan Na(K)-tartarat 40%, 0,2 gram fenol, dan 0,05 gram $Na_2S_2O_3$. Lalu, dilarutkan dengan akuades hingga tanda batas.

2. Pengujian aktivitas unit enzim α-amilase metode Mandels

Metode ini berdasarkan glukosa yang terbentuk (Mandels *et al*., 1976). Sebanyak 0,25 mL enzim, 0,25 mL larutan pati 0,1%, lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 60°C. Kemudian ditambahkan 1 mL pereaksi DNS (*dinitrosalicylic acid*) dan dididihkan selama 10 menit pada penangas air dan dibiarkan hingga suhu ruang.

Setelah itu, ditambahkan 1,5 mL akuades dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-*Vis* pada λ_{maks} 510 nm dikarenakan panjang gelombang maksimum tersebut menyerap cahaya monokromatis yang didasarkan pembentukan produk (glukosa) hasil hidrolisis pati yang mengalami oksidasi setelah penambahan reagen DNS. Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan dengan menggunakan kurva standar glukosa. Aktivitas Unit (AU) dapat ditentukan melalui Persamaan 12 sebagai berikut :

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

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

c. Penentuan Kadar Protein dengan metode Lowry

1. Pembuatan pereaksi untuk penentuan kadar protein metode Lowry

Uji kadar protein Enzim α-amilase menggunakan metode Lowry diawali dengan pembuatan pereaksi.

- Pereaksi A : 2 gram Na_2CO_3 dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 N.
- Pereaksi B : 5 mL larutan $CuSO_4.5H_2O$ 1% ditambahkan ke dalam 5 mL larutan Na(K)-Tartarat 1%
- Pereaksi C : 2 mL pereaksi B ditambah 100 mL pereaksi A.
- Pereaksi D : reagen Folin Ciocalteau diencerkan dengan akuades 1:1.
- Larutan BSA : larutan BSA *(Bovine Serum Albumin)* dengan kadar 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm.

2. Kadar protein enzim α-amilase metode Lowry

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

perlakuan yang sama seperti sampel. Absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-*Vis* pada λ_{maks} 750 nm dikarenakan terjadinya reduksi reagen Folin Ciocalteau menjadi heteromolibdenum yang menghasilkan warna hijau-kebiruan yang menyerap cahaya monokromatis pada panjang gelombang maksimum tersebut. Untuk menentukan kadar protein enzim digunakan kurva standar BSA *(Bovine Serum Albumin)* dan perhitungan metode Lowry (Lowry *et al*., 1951).

3.3.7 Imobilisasi Enzim Hasil Pemurnian dengan Zeolit

a. Penetapan pH untuk proses pengikatan enzim α-amilase pada zeolit

Sebanyak 0,25 gram zeolit dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi, kemudian distabilkan menggunakan buffer fosfat atau buffer asetat 0,1 M dengan variasi pH 4,0; 4,5; 5 ; 5,5 ; 6 ; dan 6,5 hingga pH yang diinginkan tercapai (buffer asetat digunakan untuk pH 4,0 dan 4,5). Setelah itu, matriks dipisahkan dari supernatannya melalui sentrifugasi selama 15 menit, lalu diisi dengan 0,5 mL larutan enzim dan 1 mL buffer fosfat atau buffer asetat 0,1 M sesuai variasi pH masing-masing. Untuk memaksimalkan pengikatan, sampel diaduk selama 30 menit kemudian disentrifugasi kembali selama 15 menit. Selanjutnya, supernatan enzim dipisahkan dari matriks untuk dijadikan sebagai kontrol. Matriks-enzim ditentukan aktivitasnya dengan metode Mandels. pH buffer yang memberi aktivitas enzim tertinggi pada matriks dalam proses pengikatan enzim ditetapkan sebagai pH buffer pengikatan enzim-matriks (Yandri *et al*., 2023).

b. Pembuatan larutan buffer asetat 0,1 M

Buffer asetat terbuat dari campuran CH_3COOH dan CH3COONa.

1) Larutan CH_3COOH (Mr = 60,05 g/mol) 0,1 M

   Sebanyak 100 mL Molaritas CH_3COOH glasial ditentukan dengan menggunakan Persamaan 13 sebagai berikut:

$$M = \frac{\rho \text{ x } 10 \text{ x } \%}{Mr} \quad \text{.......} (13)$$

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

$M = 17{,}5$

Selanjutnya, larutan CH_3COOH glasial 17,5 M diencerkan menjadi 0,1 M melalui Persamaan 10. Untuk membuat 100 mL CH_3COOH 0,1 M diperlukan 0,57 mL CH_3COOH glasial yang diencerkan dengan akuades ke dalam labu ukur 100 mL hingga batas meniskus, lalu dihomogenkan.

2) Larutan CH_3COONa (Mr = 82,03 g/mol) 0,1 M
Sebanyak 100 mL Larutan dibuat dengan Persamaan 8. Berdasarkan hasil perhitungan, untuk membuat 100 mL CH_3COONa 0,1 M diperlukan 0,82 g CH_3COONa yang kemudian dilarutkan dengan akuades ke dalam labu ukur 100 mL hingga batas meniskus, lalu dihomogenkan.

3) Larutan buffer asetat 0,1 M sebanyak 100 mL dengan pH 4,5
Buffer asetat dibuat dari campuran CH_3COOH dan CH_3COONa. Untuk membuat buffer asetat dengan pH tertentu, volume CH_3COOH dan CH_3COONa yang dibutuhkan diperkirakan nilainya melalui Persamaan 7.

$$[H^+] = K_{a\,(CH_3COOH)} \left(\frac{V_{(CH_3COOH)}}{V_{(CH_3COONa)}} \right)$$

dengan keterangan: $V_{(CH_3COONa)} = V_{total} - V_{(CH_3COOH)}$

$$[H^+] = K_{a\,(CH_3COOH)} \left(\frac{V_{(CH_3COOH)}}{V_{total} - V_{(CH_3COOH)}} \right)$$

$$10^{-4,5} = 1{,}754 \text{ x } 10^{-5} \left(\frac{V_{(CH_3COOH)}}{100 - V_{(CH_3COOH)}} \right)$$

$V_{(CH_3COOH)} = 64{,}29$ mL

$V_{(CH_3COONa)} = 35{,}71$ mL

Pembuatan buffer pH 4,5 dengan persamaan di atas perlu diverifikasi akurasinya menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi (Bollag *et al.,* 1996).

c. Imobilisasi enzim α-amilase

Sebanyak 0,25 gram zeolit distabilkan menggunakan buffer pengikatan pH optimum melalui 3-4 kali pergantian buffer dengan sentrifugasi 15 menit hingga pH yang diinginkan. Sampel ini kemudian dicek menggunakan pH meter untuk validasi. Kemudian, ditambahkan 0,5 mL enzim hasil dialisis dan 0,5 mL buffer pengikatan. Sampel diaduk selama 30 menit lalu, disentrifugasi 15 menit. Supernatan dipisahkan 0,25 mL untuk dijadikan kontrol uji Mandels, lalu ke dalam matriks-enzim ditambahkan 0,75 mL substrat pati dan diinkubasi pada suhu optimum selama 30 menit. Setelah itu, enzim imobil dipisahkan dari matriksnya melalui sentrifugasi selama 15 menit. Sampel ini ditambahkan pereaksi 1 mL DNS sesuai prosedur metode Mandels (Yandri *et al*., 2023).

d. Pemakaian berulang enzim imobilisasi

Enzim imobil yang telah dipakai (direaksikan dengan substrat), kemudian dicuci kembali dengan buffer fosfat 0,1 M pH pengikatan optimum lalu disentrifugasi. 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 masing-masing. Prosedur ini dilakukan berulang selama beberapa kali (Yandri *et al*., 2023).

e. Karakterisasi enzim hasil imobilisasi

Karakterisasi enzim hasil imobilisasi meliputi: penentuan pH dan suhu optimum, penentuan data kinetika, dan penentuan kestabilan termal terhadap suhu (Yandri *et al*., 2023).

3.3.8 Penentuan Suhu Optimum Enzim Hasil Imobilisasi

Untuk menentukan suhu optimum enzim α-amilase dilakukan dengan memvariasikan suhu inkubasi, yaitu 50, 55, 60, 65, 70, dan 75^{o}C. Kemudian dilakukan pengukuran aktivitas enzim dengan metode Mandels (Yandri *et al*., 2022a).

3.3.9 Penentuan Data Kinetika Enzim Hasil Imobilisasi

Nilai Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) enzim α-amilase ditentukan dengan memvariasikan konsentrasi substrat (larutan pati) yaitu 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1,0%. Kemudian dilakukan pengukuran dengan metode Mandels. Setelah itu, data aktivitas enzim dengan konsentrasi substrat diplotkan menggunakan kurva Lineweaver-Burk untuk penentuan K_M dan V_{maks} (Yandri *et al*., 2022a).

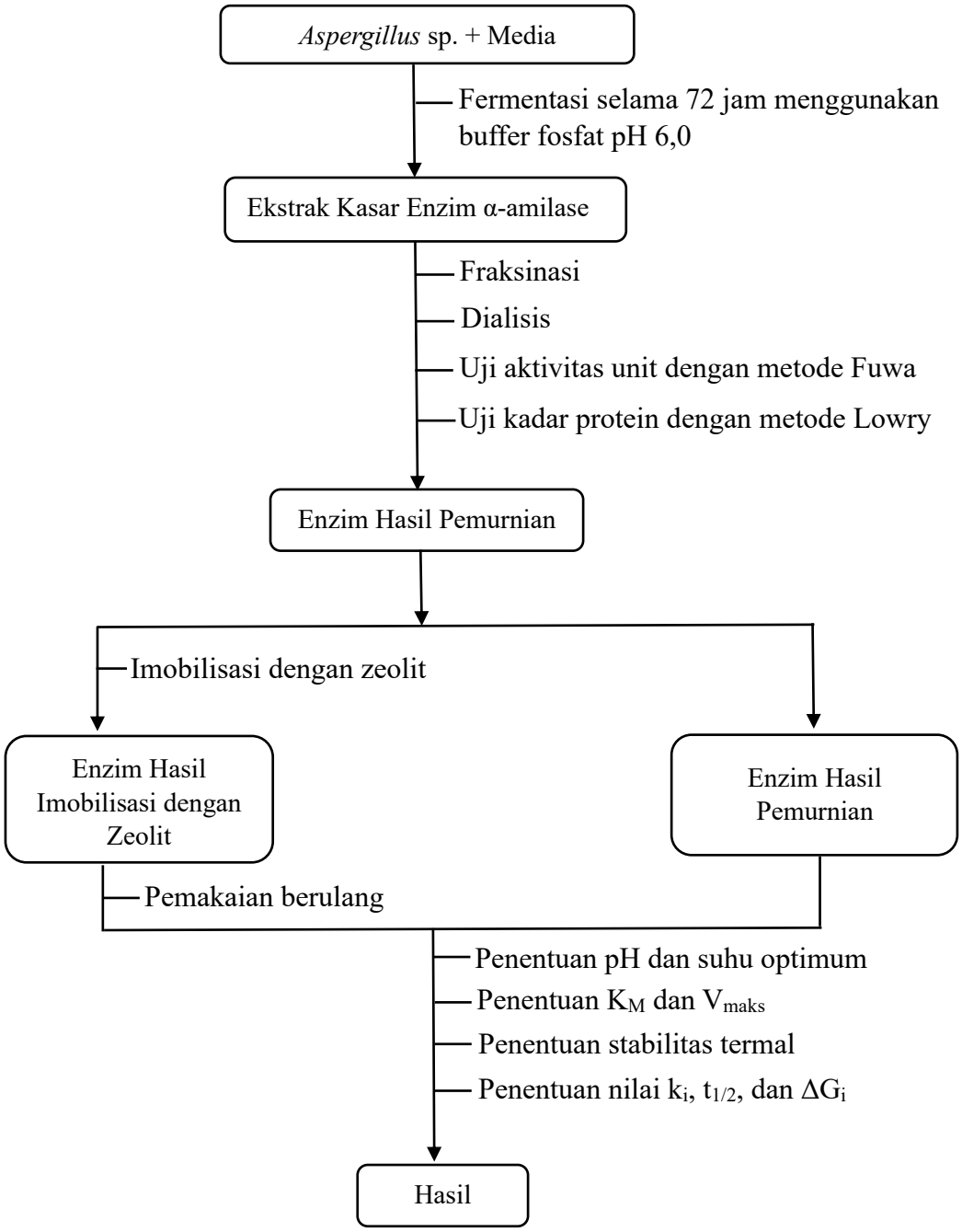
3.3.10 Penentuan Kestabilan Termal Enzim

Stabilitas termal enzim ditentukan dari aktivitas sisa enzim setelah diinaktivasi pada suhu 60^{o}C dengan memvariasikan waktu inkubasi. Pada penelitian ini, uji stabilitas termal enzim dilakukan dengan variasi waktu inkubasi 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, dan 80 menit. Kemudian, diukur aktivitas enzim dengan metode Mandels pada suhu optimum masing-masing. Data ini juga digunakan pada penentuan nilai k_i, $t_{½}$, dan ΔG_i (Yandri *et al*., 2022a).

3.3.11 Penentuan waktu paruh ($t_{1/2}$), Konstanta Laju Inaktivasi (k_i), dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i)

Penentuan nilai k_i enzim α-amilase hasil pemurnian dan hasil imobilisasi dihitung menggunakan persamaan kinetika inaktivasi orde 1 (Yandri *et al*., 2022a) melalui Persamaan 4, nilai $t_{1/2}$, dan nilai ΔG_i enzim hasil pemurnian dan hasil imobilisasi kimia ditentukan dengan menggunakan persamaan 5 dan Persamaan 6.

Secara keseluruhan, penelitian ini terangkum dalam diagram alir penelitian yang ditunjukkan dalam Gambar 7.



Gambar 7. Diagram alir penelitian.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

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 1.862,064 U/mg dan kemurniannya meningkat 14 kali lipat dibandingkan ekstrak kasar enzim.
2. Enzim α-amilase hasil pemurnian memiliki suhu optimum 60°C dan enzim α-amilase hasil imobilisasi memiliki suhu optimum 65°C.
3. Uji stabilitas enzim hasil pemurnian pada suhu 60°C selama 80 menit masih memiliki aktivitas sisa sebesar 23% sedangkan uji stabilitas enzim hasil imobilisasi pada suhu 65°C selama 80 menit memiliki aktivitas sisa sebesar 49%.
4. Enzim α-amilase hasil pemurnian memiliki K_M = 4,681 mg mL^{-1}, V_{maks} = 53,305 μmol mL^{-1}, $t_{1/2}$ = 43,32 menit, k_i = 0,016 $menit^{-1}$, dan ΔG_i = 104,658 kJ mol^{-1}, sedangkan enzim hasil imobilisasi memiliki nilai K_M = 6,02 mg mL^{-1}, V_{maks} = 48,560 μmol mL^{-1}, $t_{1/2}$ = 78,76 menit, k_i = 0,0088 $menit^{-1}$, dan ΔG_i = 106,314 kJ mol^{-1}.
5. Aktivitas sisa enzim α-amilase hasil imobilisasi pada matriks zeolit setelah pemakaian berulang selama enam kali sebesar 35%.
6. Pada penelitian yang telah dilakukan, berdasarkan nilai $t_{1/2}$, k_i, dan ΔG_i enzim hasil imobilisasi menggunakan zeolit meningkat sebanyak 1,82 kali dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka disarankan untuk penelitian selanjutnya melakukan hal sebagai berikut:

1. Pemurnian enzim lebih lanjut menggunakan kromatografi filtrasi gel agar menghasilkan enzim dengan kemurnian yang lebih tinggi.
2. Imobilisasi dengan matriks pendukung lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

Ahern, T. J. and Klibanov, A. M. 1987. Why do enzyme irreversibly inactive at high temperature. *Microbial Genetic Engineering and Enzyme Technology*. 131–136.

Anastas, P.T. and Warner, J.C. 1998. *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford University Press. Oxford.

Anastas, P.T. and Eghbali, N. 2010. Green chemistry: principles and practice. *Chem. Soc. Rev*. **39**(1):301-312.

Anggoro, D. D. 2017. *Buku Ajar Teori dan Aplikasi Rekayasa Zeolit*. UNDIP Press. Semarang.

Angsari, T. F. dan Agustini, R. 2020. Pengaruh variasi konsentrasi amilase dari kedelai *(Glycine Max L.)* dan natrium alginat sebagai matriks enzim terhadap efektivitas imobilisasi. *Unesa J. Chem*. **9**(3): 203–211.

Apriyanto, M. dan Rujiah. 2021. *Kimia Pangan Ajar*. Trussmedia Grafika. Yogyakarta.

Bahri, S., Mirzan, M., dan Hasan, M. 2012. Karakterisasi enzim amilase dari kecambah biji jagung (*Zea mays ceratina L.*). *Nat. sci.* **1**(1): 132-143.

Bailey, J. E. and Ollis, D. F. 1977. *Biochemical Engineering Fundamental, $^{2\,nd}$ ed*. Mc Graw Hill. New York.

Bollag, D. M., Rozycki, M. D., and Edelstein, S. J. 1996. *Protein Methods 2nd ed.* John Wiley and Sons, Inc. New York.

Chapman, J., Ismail, A. E., and Dinu, C. Z. 2018. Industrial applications of enzymes: recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts.* **8**(6):1-26.

Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi pangan 1*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.

Fathurrohim, M. F., Indrawati, A., Basarang, M., Fatmawati, A., Satriawan, D., Suanda, I. W., Ni'matul Murtafi'ah, Rustiah, W., Suryaningsih, N. A., Taufieq, Rahmawati, dan Fauzi, A. Z. 2023. *Mikrobiologi Lingkungan*. PT Global Eksekutif Teknologi. Padang.

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.

Gumelar, G. dan Fariyanto, D. E. 2020. Pengaruh waktu perkecambahan biji kacang hijau (*Phaseolus Radiatus L.*) terhadap produksi enzim α-amilase. *CERMIN*. **4**(1): 68-77.

Gurnule, W. B. 2022. *Science Of Environment*. Scieng Publications. Tamilnadu.

Ischak, N. I., Salimi, Y. K., dan Botutihe, D. N. 2017. *Biokimia Dasar 1*. UNG Press. Gorontalo.

Jinu, J. 2017. Amylases-bioprocess and potential applications: a review. *IJJB*. **5**(2): 41–50.

Kamelia, R., Muliawati, S., dan Dessy, N. 2005. Isolasi dan karakterisasi protease intraseluler termostabil dari bakteri *Bacillus stearothermophilus*. Seminar Nasional MIPA. Departemen Kimia. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Kasipah, C., Rismayanti, S., Ihsanawati, dan Nurachman, Z. 2013. Isolasi dan karakterisasi bakteri penghasil enzim lipase ekstraseluler dari lumpur aktif instalasi pengolahan air limbah industri tekstil. *J. Ilm. Arena Tekst*. **28**(1):1–46.

Kazan, D., Ertan, H., dan Erarslan, A. 1997. Stabilization of *Escherichia coli* penicillin g acylase agains thermal Inactivation by cross-linking with dextran dialdehyde polymers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**: 191–197.

Kusumasari, W., Indrayati, A., dan Cahyo, L. M. 2023. Aktivitas protease ekstraseluler bakteri yang diisolasi dari limbah cair industri tahu. *JIFI*. **6**(1):134-143.

Lehninger, A. L. 2005. *Dasar-Dasar Biokimia jilid 1*. Erlangga. Jakarta.

Lesley, S. and Elain, M. 1992. *Solid State Chemistry*. Chapman and Hall. London.

Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., and Wang, X. 2012. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Comp. Struct. Biotech. J.* **2**(3):1-11.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Bio. Chem*. **193**(1): 265–275.

Mahargyani, W., Raharjo, T. J., dan Haryadi, W. 2017. Imobilisasi lipase pada kitosan serbuk dengan metode pengikatan silang dan uji aktivitas transesterifikasinya. *EduChemia.* **2**(2):196-210.

Mandels, M., Andreotti, R., and Roche, C. 1976. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **6**:21-23.

Merkuriana. 2023. Pembuatan sirup beras ketan giling dengan hidrolisa enzimatis. *J. Ilm. Hijau Cendekia*. **8**(1):80–84.

Minah, F. N., Muyassaroh, Azizah, W., dan Sabrina, M. 2021. Pengaruh variasi suhu dan waktu pengeringan pada pembuatan enzim papain dari ekstrak daun pepaya. *Atmosphere.* **2**(2): 15-21.

Mizana, D., Suharti, N., dan Amir, A. 2016. Identifikasi pertumbuhan jamur *Aspergillus* sp. pada roti tawar yang dijual di kota Padang berdasarkan suhu dan lama penyimpanan. *J. Kesehat. Andalas*. **5**(2): 355–360.

Mozhaev, V. V. and Martinek, K. 1984. Structure-stability relationships in proteins: new approaches to stabilizing enzymes. *Enzyme Microb. Technol*. **6**(2):50–59.

Nababan, M., Gunam, I. B. W., dan Mahaputra Wijaya, I. M. 2019. Produksi enzim selulase kasar dari bakteri selulolitik. *J. Rekayasa Manaj. Agroindustri*. **7**(2):190-199.

Nangin, D. dan Sutrisno, A. 2015. Enzim amiase pemecah pati mentah dari mikroba : kajian pustaka. *J. Pangan dan Agroindustri*. **3**(3):1032–1039.

Ningtyas, N., Mubarik, N. R., dan Rahayuningsih, M. 2023. Penapisan dan karakterisasi amilase dari bakteri asal ekoenzim. *J. Ilmu Pertan. Indones*. **28**(3):441–448.

Nisa, K., Wuryanti, dan Taslimah. 2013. Isolasi, karakterisasi dan amobilisasi α-amilase dari *Aspergillus niger* FNCC 6018. *J. Chem Info*. **1**(1):141-149.

Nurfajriah, S., Inggraini, M., dan Ilsan, N. A. 2018. Skrinning *Rhizobakteri* mangrove *Rhizosphora* sp. penghasil amilase. *J. Mitra Kes*. **1**(1):11–15.

Oktavia, Y., Lestari, S. D., Lestari, S., Herpandi, dan Jannah, M. 2018. Optimasi waktu inkubasi produksi protease dan amilase isolat bakteri asal terasi ikan teri *Stolephorus* sp. *J. Ilmu Teknol. Kelaut. Tropis.* **10**(3): 719–725.

Pabalan, R. T. and Bertetti, F. P. 2001. Cation-exchange properties of natural zeolites. *Rev. Mineral. Geochem*. **45**(1):453–518.

Poedjiadi, A. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. UI Press. Jakarta.

Pomeranz, Y. and Meloan, C. E. 2000. *Food Analysis: Theory and Practice* 3rd ed. Aspen Publisher, Inc. Boston.

Purnawan, A., Capriyanti, Y., Kurniatin, P., Rahmani, N., dan Yopi. 2015. Optimasi produksi enzim amilase dari bakteri laut Jakarta (*Arthrobacter arilaitensis*). *J. Biol. Indon*.**11**(2): 215–224.

Purwaningtyas, E. F. 2024. *Proses Industri Kimia*. Pusat Pengembangan Pendidikan dan Penelitian Indonesia. Praya.

Puspitaningrum, R. dan Adhiyanto, C. 2016. Enzim dan Pemanfaatannya. Ghalia Indonesia. Bogor.

Puspitasari, G., Safrihatini, W., dan Umam, K. 2019. Studi kinetika reaksi dari enzim α-amilase pada proses penghilangan kanji kain kapas. *Arena Tekstil*. **34**(1):1–6.

Rahmiati, Pujianto, S., dan Kusdiyantin, E. 2016. Eksplorasi mikroba penghasil enzim-enzim hidrolitik. *Bioma*. **18**(1):14–19.

Ramadhan, B. dan Wikandari, P. R. 2021. Review Artikel: Aktivitas enzim amilase dari bakteri asam laktat (Karakteristik dan Aplikasi). *Unesa J. Chem*. **10**(2):109–120.

Ratti, R. 2020. *Industrial applications of Green Chemistry: Status, challenges and prospects*. Springer Nature. Berlin.

Raul, D., Biswas, T., Mukhopadhyay, S., Das, S. K., and Gupta, S. 2014. Production and partial purification of alpha amylase from *Bacillus subtilis* (MTCC 121) using solid state fermentation. *Biochem Res Int*. 1–5.

Robinson, P. K. 2015. Enzymes: principles and biotechnological applications. Essays Biochem. **59**: 1-41.

Saleh, H. M., and Hassan, A. I. 2021. *Introduction to green chemistry: Green Organic Reactions*. Springer Singapore. Singapore.

Sari, R. I. P., Salman, dan Erizal Zaini. 2022. Isolasi dan karakterisasi serbuk enzim bromelin dari batang nanas (*Ananas Comosus (L.) Merr*). *Medical Sains*. **7**(4): 751–758.

Scopes, R. K. 1982. *Protein Purification: Principles and Practice*. Springer. New York.

Sejati, F. 2017. Amobilisasi Enzim α-Amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dengan Menggunakan Zeolit. (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung.

Septiani, U. dan Lisma, A. 2011. Pemanfaatan zeolit alam sebagai media pendukung amobilisasi enzim α-amilase. *J. Ris. Kim*. **5**(1):79-88.

Septommy, C. dan Badriyah, L. 2022. Modifikasi zeolit alam teraktivasi asam dengan perak nitrat. *CHEESA*. **5**(1):13-19.

Silva, D. M., Batista, L. R., Rezende, E. F., Fungaro, M. H. P., Sartori, D., and Alves, E. 2011. Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section nigri using polyphasic taxonomy. *Braz. J. Microbiol*. **42**(2):761–773.

Stahl, S. 1999. *Thermophilic Microorganisms: The Biological Background for Thermophily and Thermoresistance of Enzymes in Thermostability of Enzymes*. Springer. New York.

Suhartono, M. T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Suryani, Y. dan Taupiqurrahman, O. 2012. *Mikrobiologi Dasar*. LP2M UIN SGD Bandung.

Tazkiah, N. P., Rosahdi, T. D., dan Supriadin, A. 2017. Isolasi dan karakterisasi enzim amilase dari biji nangka (*Artocarpus heterophillus*). *Al-Kimiya: J. Ilmu Kim. Terap*. **4**(1):17–22.

Wahyuni, S. 2017. *Biokimia Enzim dan Karbohidrat*. Unimal Press. Lhokseumawe.

Wang, D. I. C. 1979. *Fermentation and Enzymes Technology*. John Wiley and Sons Inc. New York.

Wening, K. W. dan Herdyastuti, N. 2021. Review: Imobilisasi enzim papain dengan silika mesopori dan karagenan sebagai bahan pendukung immobilization. *Unesa J. Chem*. **10**(3):268-279.

Widowati, E., Sari, A. M., dan Husnayaini, F. 2020. Kombinasi enzim poligalakturonase dan selulase pada klarifikasi sari buah naga super merah *(Hylocereus costaricensis)* dalam pembuatan sirup. *J. Teknol. Has. Pertan*. **11**(2):110-126.

Wu, S., Snajdrova, R., Moore, J. C., Baldenius, K., and Bornscheuer, U.T. 2021. Biocatalysis: Enzymatic synthesis for industrial applications. *Angew. Chem. Int.* **60**(1):88-119.

Wulansari, A. 2013. Penyelenggaraan Makanan dan Tingkat Kepuasan Konsumen di Kantin Zea Mays Institut Pertanian Bogor. (Skripsi). Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Yandri, Y., Suhartati, T., and Hadi, S. 2010. Purification and characterization of extracellular α-amylase enzyme from locale bacteria isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148. *Eur. J. Sci. Res*. **39**(1):64-74.

Yandri dan Suhartati, T. 2018. *Peningkatan Kestabilan Enzim*. AURA. Bandar Lampung.

Yandri, Ropingi, H., Suhartati, T., Hendri, J., Irawan, B., and Hadi, S. 2022a. The effect of zeolite/chitosan hybrid matrix for thermal-stabilization enhancement on the immobilization of *Aspergillus fumigatus* α-amylase. *Emerg. Sci. J*. **6**(3):505–518.

Yandri, Tiarsa, E. R., Suhartati, T., Irawan, B., and Hadi, S. 2022b. Immobilization and stabilization of *Aspergillus fumigatus* α-amylase by adsorption on a chitin. *Emerg. Sci. J*. **7**(1):77-89.

Yandri, Y., Ropingi, H., Suhartati, T., Irawan, B., and Hadi, S. 2023. Immobilization of α-amylase from *Aspergillus fumigatus* using adsorption method onto zeolite. *Phys. Sci. Rev*. **9**(2):909–920.

Yang, Z., Michael, D., Robert, A., Fang, X. Y., and Alan, J. R. 1996. Polyethylene glycol-induced stabilization of subtilisin. *Enzym. Microb. Technol*. **18:** 82-29.

Yusak, Y. 2004. Pengaruh suhu dan buffer asetat terhadap hidrolisis cmc oleh enzim selulase dari ekstrak *Aspergillus niger* dalam media campuran onggok dan dedak. *J. Sains Kim*. **8**(2):35–36.