

**IMOBILISASI ENZIM  $\alpha$ -AMILASE DARI *Aspergillus* sp.  
MENGUNAKAN KITIN**

**(Skripsi)**

**Oleh**

**RUSMAULI DEFANA PANJAITAN  
NPM 2017011079**



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

## **ABSTRAK**

### **IMOBILISASI ENZIM $\alpha$ -AMILASE DARI *Aspergillus* sp. MENGUNAKAN KITIN**

**Oleh**

**Rusmauli Defana Panjaitan**

Enzim  $\alpha$ -amilase merupakan enzim yang umum digunakan dalam proses industri kimia, seperti industri makanan, farmasi, dan tekstil. Pada proses industri dibutuhkan enzim yang stabil yaitu enzim yang mampu bekerja secara optimum pada suhu dan pH yang ekstrem, namun enzim tidak dapat bekerja secara optimum pada suhu dan pH yang ekstrem sehingga perlu dilakukan peningkatan kestabilan enzim.

Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan kestabilan enzim  $\alpha$ -amilase dari *Aspergillus* sp. menggunakan matriks kitin. Untuk mencapai tujuan tersebut, maka enzim  $\alpha$ -amilase diproduksi, diisolasi, dimurnikan dengan metode fraksinasi menggunakan amonium sulfat dan dialisis. Enzim hasil pemurnian diimobilisasi menggunakan matriks kitin, selanjutnya dilakukan karakterisasi terhadap enzim hasil pemurnian dan enzim hasil imobilisasi.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa enzim hasil pemurnian meningkat kemurniannya sebesar 9 kali lebih tinggi dari ekstrak kasar enzim. Uji stabilitas termal pada suhu 60°C selama 80 menit pada enzim hasil imobilisasi memiliki aktivitas sisa sebesar 49 % dan waktu paruh sebesar 82,52 menit sedangkan enzim hasil pemurnian sebesar 24 % dan waktu paruh sebesar 42,27 menit. Hasil ini menunjukkan bahwa enzim yang telah diimobilisasi mengalami peningkatan kestabilan sebesar dua kali lipat dibandingkan enzim hasil pemurnian. Pada pemakaian berulang, enzim hasil imobilisasi masih memiliki aktivitas sisa sebesar 47 % setelah penggunaan sebanyak enam kali.

Kata kunci:  $\alpha$ -amilase, *Aspergillus* sp., imobilisasi, kitin.

## ABSTRACT

### IMMOBILIZATION OF THE ENZYME $\alpha$ -AMYLASE FROM *Aspergillus* sp. USING CHITIN

By

**Rusmauli Defana Panjaitan**

The  $\alpha$ -amylase enzyme is an enzyme commonly used in chemical industrial processes, such as the food, pharmaceutical, and textile industries. In industrial processes, stable enzymes are needed, namely enzymes that can work optimally at extreme temperatures and pH, but enzymes cannot work optimally at extreme temperatures and pH, so it is necessary to increase enzyme stability.

This research aims to increase the stability of the  $\alpha$ -amylase enzyme from *Aspergillus* sp. using a chitin matrix. To achieve this goal, the  $\alpha$ -amylase enzyme was produced, isolated, purified by fractionation method using ammonium sulfate and dialysis. The purified enzyme was immobilized using a chitin matrix, then characterization was carried out on the purified enzyme and the immobilized enzyme.

The results of this study showed that the purity of the purified enzyme increased by 9 times compared to the crude extract of the enzyme. Thermal stability test at 60°C for 80 minutes showed that the immobilized enzyme had a residual activity of 49% and a half-life of 82.52 minutes, while the purified enzyme was 24% and a half-life of 42.27 minutes. These results show that the immobilized enzyme has a two-fold increase in stability compared to the purified enzyme. With repeated use, the immobilized enzyme still has residual activity of 47% after six uses.

Keywords:  $\alpha$ -amylase, *Aspergillus* sp., immobilization, chitin.

**IMOBILISASI ENZIM  $\alpha$ -AMILASE DARI *Aspergillus* sp.  
MENGUNAKAN KITIN**

**Oleh**

**RUSMAULI DEFANA PANJAITAN**

**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  $\alpha$ -AMILASE DARI  
*Aspergillus sp.* MENGGUNAKAN KITIN**

Nama : Rusmauli Defana Panjaitan

NPM : 2017011079

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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

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

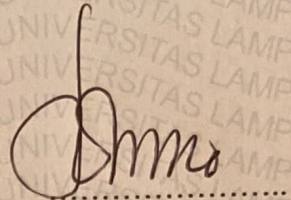
2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA

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

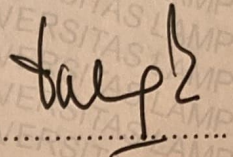
**MENGESAHKAN**

**1. Tim Penguji**

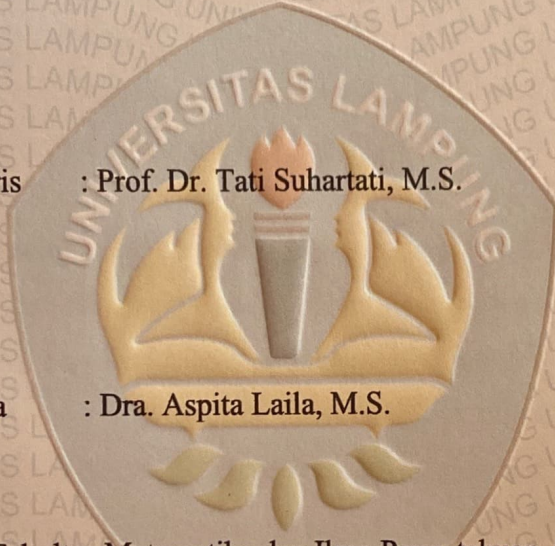
**Ketua** : Prof. Dr., Ir. Yandri A.S., M.S.



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



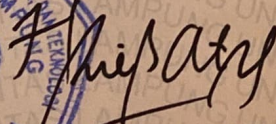
**Anggota** : Dra. Aspita Laila, M.S.



**2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



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



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

## SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Rusmauli Defana Panjaitan  
NPM : 2017011079  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini saya menyatakan dengan sungguh-sungguh bahwa skripsi saya yang berjudul "**Imobilisasi Enzim  $\alpha$ -Amilase Dari *Aspergillus* sp. Menggunakan Kitin**" adalah hasil karya saya sendiri, tanpa adanya karya orang lain kecuali yang telah disebutkan dalam daftar pustaka. Selain itu, saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data dalam skripsi tersebut digunakan oleh program studi untuk keperluan publikasi, selama nama saya dicantumkan dalam publikasi tersebut sesuai dengan kesepakatan bersama.

Demikianlah surat ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Bandar Lampung, 20 Agustus 2024



nyatakan,

Rusmauli Defana Panjaitan  
NPM. 2017011079

## RIWAYAT HIDUP



Penulis bernama Rusmauli Defana Panjaitan, penulis lahir di Medan pada tanggal 02 Oktober 2002, sebagai anak pertama dari empat bersaudara, putri dari pasangan Bapak Binner Edianto Panjaitan dan Ibu Dame Saragih. Penulis memulai pendidikan formal di SDN 060820 Medan pada tahun 2008 dan menyelesaikannya pada tahun 2014. Selanjutnya, penulis melanjutkan pendidikan ke SMPN 8 Medan pada tahun 2014 hingga tahun 2017. Penulis melanjutkan pendidikan menengah atas di SMAS Anugerah Harapan Bangsa Medan pada tahun 2017 dan lulus pada tahun 2020.

Pada tahun 2020, penulis melanjutkan studi di Universitas Lampung melalui jalur SBMPTN tahun 2020. Selama menempuh pendidikan di Universitas Lampung, penulis pernah aktif dalam kegiatan organisasi sebagai pengurus aktif HIMAKI FMIPA Universitas Lampung pada tahun 2021-2022. Penulis pernah menjadi asisten praktikum mata kuliah Biokimia Program Studi Kimia dan Biologi Murni. Penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) pada tahun 2023 di Desa Sukadana, Kecamatan Pulau Pisang, Kabupaten Pesisir Barat selama 40 hari. Penulis melakukan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung. Kemudian sebagai bentuk aplikasi bidang ilmu di dunia kerja, penulis telah menyelesaikan Skripsi yang berjudul “Imobilisasi Enzim  $\alpha$ -Amilase Dari *Aspergillus* sp. Menggunakan Kitin”



## **MOTTO**

*“Don't worry, I am with you. Don't be afraid, I am your God. I will make you strong and help you. I will support you with my right hand that brings victory”*

**-Isaiah 41:10**

“Karena masa depan sungguh ada, dan harapanmu tidak akan hilang. Sebab Aku ini mengetahui rancangan-rancangan apa yang ada pada-Ku mengenai kamu, demikianlah firman Tuhan, yaitu rancangan damai sejahtera dan bukan rancangan kecelakaan, untuk memberikan kepadamu hari depan yang penuh harapan.”

**-Amsal 23:18; Yeremia 29:11**

“Jika anda berpusat pada kedamaian dan memikirkan pikiran yang baik dan penuh kasih, anda akan menarik ide dan perasaan yang sama kembali kepada anda. Ingat, pikiran seperti magnet yang sangat kuat.”

**-James Van Praagh**

“Bahwa hidup harus menerima, penerimaan yang indah. Bahwa hidup harus dimengerti, pengertian yang benar. Bahwa hidup harus memahami pemahaman yang tulus.”

**-Tere Liye**

“Kunci hidup tenang itu hanya bersandar kepada Tuhan, karena jika bersandar kepada Tuhan maka kita memiliki kemurahan dan kerendahan hati, kasih dan damai, dan perasaan serta pikiran yang positif.”

**-Penulis**

## *PERSEMBAHAN*

**Dengan rasa bersyukur kepada Tuhan Yesus Kristus, skripsi ini  
kupersembahkan kepada:**

**Bapak Binner Edianto Panjaitan dan Ibu Dame Saragih.** Kedua orang tuaku yang selalu memberikan doa yang tiada hentinya untukku, mendukungku dalam perkuliahan hingga penyusunan skripsi ini, serta selalu mencintaiku dan menyayangiku.

**Mika Berliani Panjaitan, Anggi Maria Panjaitan, dan Josua Febrian Panjaitan.** Adik-adikku yang memotivasiku untuk menjadi orang yang baik agar bisa menjadi contoh yang baik untuk adik-adikku.

**Prof. Dr., Ir. Yandri A.S., M.S., Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S., Dra. Aspita Laila, M.S.** Dosen pembimbing dan penguji yang telah membimbing dan memberikan saran serta masukan untuk tercapainya skripsi ini.

**Bapak dan Ibu Dosen Kimia FMIPA Unila.** Dosen yang telah memberikan ilmu selama diperkuliahan.

**Sahabat dan teman-teman seperjuangan,** yang selalu mendukung, memberi keceriaan, serta selalu memberi semangat kepadaku.

**Almamaterku tercinta,  
“Universitas Lampung”**

## SANWACANA

Puji syukur penulis ucapkan kepada Tuhan Yesus Kristus, atas segala kasih dan berkat-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “**Imobilisasi Enzim  $\alpha$ -Amilase dari *Aspergillus* sp. Menggunakan Kitin**”. Dalam menyelesaikan skripsi ini, penulis tidak dapat terlepas dari bimbingan dan dukungan dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Binner Panjaitan dan Ibu Dame Saragih yang telah mendoakan, mendidik, mendukung, dan selalu mencintai penulis dengan kasih sayang yang tulus dan pengorbanan yang tidak ternilai bagi penulis. Penulis mengucapkan terima kasih banyak untuk segala hal yang diberikan kepada penulis.
2. Bapak Prof. Dr., Ir. Yandri A.S., M.S. dan Ibu Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S. selaku dosen pembimbing penulis yang begitu baik dan sabar dalam membimbing, memotivasi, dan memberikan semangat kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Terima kasih penulis sampaikan kepada Bapak dan Ibu yang sudah membantu sehingga penulis bisa lulus tepat waktu.
3. Ibu Dra. Aspita Laila, M.S. selaku dosen penguji penulis, terima kasih telah memberikan saran dan masukan hingga tercapainya skripsi ini.
4. Bapak Dr. Eng. Suripto Dwi Yuwono, S.Si., M.T. selaku dosen pembimbing akademik penulis, terima kasih telah membantu urusan perkuliahan penulis.

5. Ibu Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si, selaku Ketua Jurusan kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
6. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, M.Si., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung
7. Laboran Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung, Mba Della Ramadhani. Terima kasih untuk bantuan yang telah diberikan kepada penulis di Laboratorium Biokimia selama penulis melakukan praktik kerja lapangan hingga penelitian.
8. Adik-adik penulis: Mika Berliani Panjaitan, Anggi Maria Panjaitan, Josua Febrian Panjaitan yang selalu memberikan dukungan dan doa kepada penulis.
9. Angely Lim, Christiani Gracia Lumansik, Stephani Marisca Febrianti, selaku sahabat-sahabat penulis. Terima kasih untuk doa dan dukungan kalian, terima kasih juga sudah mau menjadi pendengar untuk cerita senang maupun sedih penulis dan selalu ada untuk penulis.
10. Grace Feronika Siregar, Chyntia Basa Nainggolan, selaku *bestie* penulis. Terima kasih untuk doa dan dukungan kalian. Febriyanti Angelina, selaku adik penulis selama di Bandar Lampung. Terima kasih untuk segala dukungan yang diberikan kepada penulis.
11. Stephani Marisca, Maria Agustina Sidabutar, Avi Eriyani, selaku teman seperjuangan penulis dalam menyelesaikan penelitian. Terima kasih untuk dukungan dan kerja samanya selama ini.
12. Teman Keliling Kantin: Ribka Angelina Gultom, Bunga Mega Nurlinda, Anggun Nadhifamia Azizah, Mutiara Septia Nurokhim, Erlisa Aulia, Ratih Nurhidayati, Najla Shauma Zahra, Stephani, Maria, Avi, Rahmadtullah dan Geo Alfriza Gaghana. Terima kasih untuk kalian semua yang telah kebersamai penulis, terima kasih karena telah berbagi canda dan tawa dengan penulis, bertukar cerita mengenai pengalaman serta hal *random* lainnya, nonton bersama, makan bersama, belajar bersama, terima kasih telah mendukung penulis serta telah menghibur penulis.
13. Teman Grup Dadakan: Nurdiana, Carlos Daniel, Hinaya Gita, Stephani, Maria, Avi, Rahmad. Terima kasih telah kebersamai penulis sedari

14. kuliah *offline* hingga kini. Teman sedari kuliah offline: Nadia Anindhita, terima kasih atas kebersamaanya dan telah berbagi canda dan tawa, serta bermain bersama penulis.
15. Teman Grup Wak tejo Squad/ Grup Helow: Debi Debora Sembiring, Misye Cristiany Siagian, Laura Sianipar, Febrina Togatorop, dan teman-teman kost pondok indah lainnya. Terima kasih sudah melewati berbagai cerita, canda dan tawa dengan penulis dari awal penulis datang ke Bandar Lampung.
16. Kak Stevenson Waruwu, Kak Virginia Nuh Reza Amanda, Kak Santa selaku kakak tingkat seperbimbingan penulis yang telah berbaik hati dengan bersedia membantu penulis dalam penelitian hingga penyelesaian tugas akhir serta terima kasih untuk doa dan dukungannya.
17. Teman-teman kristen penulis di FMIPA. Terima kasih pernah mengisi hari penulis dengan canda dan tawa. Sophia Yanti, terima kasih sudah mendukung serta berbagi keluh kesah dengan penulis selama menyelesaikan skripsi ini.
18. Teman-teman kimia angkatan 20 terutama teman-teman kelas B, terima kasih atas dukungan dan motivasi yang diberikan selama perkuliahan.
19. Seluruh pihak yang memberikan dukungan dan doa kepada penulis dalam perkuliahan hingga penyusunan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, terima kasih.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih jauh dari kata sempurna, namun penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan wawasan dan ilmu yang bermanfaat bagi yang membacanya.

Bandar Lampung, 20 Agustus 2024  
Penulis

**Rusmauli Defana Panjaitan**

## DAFTAR ISI

|   | Halaman      |
|---|--------------|
| <b>DAFTAR TABEL</b> .....                             | <b>xvi</b>   |
| <b>DAFTAR GAMBAR</b> .....                            | <b>xviii</b> |
| <b>DAFTAR RUMUS</b> .....                             | <b>xix</b>   |
| <b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....                          | <b>xx</b>    |
| <b>I. PENDAHULUAN</b> .....                           | <b>1</b>     |
| 1.1 Latar Belakang .....                              | 1            |
| 1.2 Tujuan Penelitian .....                           | 3            |
| 1.3 Manfaat Penelitian .....                          | 3            |
| <b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....                     | <b>4</b>     |
| 2.1 Kimia Hijau .....                                 | 4            |
| 2.2 Enzim .....                                       | 4            |
| 2.2.1 Klasifikasi Enzim .....                         | 5            |
| 2.2.2 Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim .....  | 6            |
| 2.2.3 Mekanisme Kerja Enzim .....                     | 7            |
| 2.2.4 Kinetika Reaksi Enzim .....                     | 9            |
| 2.2.5 Stabilitas Enzim .....                          | 10           |
| 2.3 Enzim Amilase .....                               | 11           |
| 2.4 <i>Aspergillus</i> sp. ....                       | 12           |
| 2.5 Isolasi dan Pemurnian Enzim .....                 | 13           |
| 2.6 Uji Aktivitas Enzim $\alpha$ -Amilase .....       | 14           |
| 2.7 Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry ..... | 15           |
| 2.8 Imobilisasi Enzim .....                           | 16           |
| 2.9 Kitin .....                                       | 17           |
| <b>III. METODE PENELITIAN</b> .....                   | <b>18</b>    |
| 3.1 Waktu dan Tempat .....                            | 18           |
| 3.2 Alat dan Bahan .....                              | 18           |
| 3.3 Prosedur Penelitian .....                         | 19           |
| 3.3.1 Pemiakan Isolat <i>Aspergillus</i> sp. ....     | 19           |
| 3.3.2 Pembuatan Media Inokulum dan Fermentasi .....   | 19           |
| 3.3.3 Isolasi Enzim $\alpha$ -Amilase .....           | 21           |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.3.4 Pemurnian Enzim $\alpha$ -Amilase .....  | 22        |
| 3.3.5 Uji Aktivitas dan Penentuan Kadar Protein Enzim $\alpha$ -Amilase .....  | 23        |
| 3.3.6 Imobilisasi Enzim .....  | 26        |
| 3.3.7 Karakterisasi Enzim Amilase .....  | 28        |
| 3.3.8 Penentuan Waktu Paruh ( $t_{1/2}$ ), Konstanta Laju Inaktivasi ( $k_i$ ),<br>dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi ( $\Delta G_i$ ) .....           | 29        |
| <b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>   | <b>31</b> |
| 4.1 Produksi Enzim $\alpha$ -Amilase dari <i>Aspergillus</i> sp. ....  | 31        |
| 4.2 Fraksinasi dengan Amonium Sulfat .....   | 31        |
| 4.3 Dialisis .....   | 33        |
| 4.4 Penentuan pH Bufer Pengikatan Enzim dan Kitin.....   | 35        |
| 4.5 Penentuan Suhu Optimum Enzim Hasil Pemurnian dan<br>Enzim Imobilisasi Pada Matriks Kitin. ....   | 35        |
| 4.6 Penentuan $K_M$ dan $V_{maks}$ Enzim Hasil Pemurnian dan<br>Enzim Hasil Imobilisasi Pada Kitin .....   | 36        |
| 4.7 Penentuan Kestabilan Termal Enzim Hasil Pemurnian dan<br>Enzim Hasil Imobilisasi .....   | 38        |
| 4.8 Penentuan Konstanta Laju Inaktivasi Termal ( $k_i$ ), Waktu Paruh ( $t_{1/2}$ ),<br>dan Perubahan Energi Bebas Akibat Denaturasi ( $\Delta G_i$ )..... | 39        |
| 4.9 Pemakaian Berulang Enzim Hasil Imobilisasi .....   | 40        |
| <b>V. SIMPULAN DAN SARAN .....</b>   | <b>42</b> |
| 5.1 Simpulan .....   | 42        |
| 5.2 Saran.....   | 43        |
| <b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>  | <b>44</b> |

## DAFTAR TABEL

| Tabel  | Halaman |
|--|---------|
| 1. Peningkatan kestabilan termal enzim $\alpha$ -amilase yang diimobilisasi dengan material kitin.....   | 11      |
| 2. Berbagai penelitian imobilisasi enzim dengan kitin .....  | 16      |
| 3. Rangkuman hasil pemurnian enzim $\alpha$ -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp. ....  | 34      |
| 4. Nilai $K_M$ dan $V_{maks}$ enzim $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dan hasil imobilisasi .....  | 37      |
| 5. Nilai $k_i$ , $t_{1/2}$ , dan $\Delta G_i$ enzim hasil pemurnian dan enzim hasil imobilisasi .....  | 40      |
| 6. Hubungan antara persen kejenuhan amonium sulfat dengan aktivitas spesifik enzim $\alpha$ -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp. ....                        | 50      |
| 7. Hubungan antara persen kejenuhan amonium sulfat (0-25) % dan (25-90) % dengan aktivitas spesifik enzim $\alpha$ -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp. .... | 50      |
| 8. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode Fuwa ( $\lambda_{maks}$ 600 nm).....                                   | 50      |
| 9. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode Lowry ( $\lambda_{maks}$ 750 nm).....                                  | 52      |
| 10. Aktivitas unit enzim $\alpha$ -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp. pada matriks kitin dalam berbagai pH pengikatan.....                                  | 53      |
| 11. Hubungan antara suhu dengan aktivitas unit dan aktivitas sisa enzim $\alpha$ -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp. hasil pemurnian. ....                  | 54      |
| 12. Hubungan antara suhu dengan aktivitas unit dan aktivitas sisa enzim $\alpha$ -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp. hasil imobilisasi pada kitin .....     | 54      |
| 13. Hubungan antara konsentrasi substrat dengan aktivitas unit enzim $\alpha$ -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp. hasil pemurnian .....                     | 55      |
| 14. Hubungan antara konsentrasi substrat dengan aktivitas unit enzim $\alpha$ -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp. hasil imobilisasi pada kitin.....         | 55      |
| 15. Data grafik Lineweaver-Burk enzim $\alpha$ -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp. hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada kitin. ....                   | 56      |



|   |    |
|---|----|
| 16. Hubungan antara aktivitas unit, aktivitas sisa, dan laju inaktivasi termal enzim $\alpha$ -amilase hasil pemurnian selama inaktivasi termal pada suhu 60°C. ....              | 56 |
| 17. Hubungan antara aktivitas unit, aktivitas sisa, dan laju inaktivasi termal enzim $\alpha$ -amilase hasil imobilisasi pada kitin selama inaktivasi termal pada suhu 60°C ..... | 57 |
| 18. Data grafik laju inaktivasi termal orde satu enzim $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks kitin selama inaktivasi termal pada suhu 60°C.....    | 57 |
| 19. Perhitungan waktu paruh ( $t_{1/2}$ ) enzim hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada kitin. ....  | 58 |
| 20. Perhitungan nilai $\Delta G_i$ enzim hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada kitin .....   | 60 |
| 21. Aktivitas unit dan aktivitas sisa enzim hasil imobilisasi pada kitin saat pemakaian berulang .....  | 60 |
| 22. Absorbansi BSA pada berbagai konsentrasi. ....  | 61 |
| 23. Absorbansi glukosa pada berbagai konsentrasi. ....  | 62 |

## DAFTAR GAMBAR

| Gambar   | Halaman |
|--|---------|
| 1. Model <i>lock and key</i> .....   | 8       |
| 2. Teori kunci gembok dan teori induksi .....  | 8       |
| 3. Kurva Lineweaver-Burk.....  | 9       |
| 4. Struktur kitin .....  | 17      |
| 5. Skema fraksinasi dengan amonium sulfat.....   | 22      |
| 6. Diagram alir immobilisasi enzim $\alpha$ -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i><br>menggunakan kitin .....  | 30      |
| 7. Grafik hubungan antara persen kejenuhan amonium sulfat dengan<br>aktivitas spesifik enzim $\alpha$ -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i> .....                               | 32      |
| 8. Grafik hubungan antara persentase kejenuhan amonium sulfat (0-25) %<br>dan (25-90) % dengan aktivitas spesifik enzim $\alpha$ -amilase dari<br><i>Aspergillus sp.</i> ..... | 33      |
| 9. Grafik Aktivitas unit enzim $\alpha$ -amilase hasil immobilisasi pada matriks kitin<br>dalam berbagai pH pengikatan.....  | 35      |
| 10. Grafik penentuan suhu optimum enzim hasil pemurnian dan enzim<br>immobilisasi .....  | 36      |
| 11. Kurva Lineweaver-Burk enzim $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dan<br>hasil immobilisasi.....   | 37      |
| 12. Grafik penentuan kestabilan termal enzim $\alpha$ -amilase hasil pemurnian<br>dan enzim hasil immobilisasi .....   | 38      |
| 13. Grafik laju inaktivasi termal orde satu enzim $\alpha$ -amilase<br>hasil immobilisasi.....   | 39      |
| 14. Grafik pemakaian berulang enzim hasil immobilisasi pada matriks kitin .....  | 41      |
| 15. Kurva standar BSA .....  | 61      |
| 16. Kurva standar glukosa.....   | 62      |

## DAFTAR RUMUS

| Rumus   | Halaman |
|---|---------|
| 1. Henderson-Hasselbach.....                            | 19      |
| 2. Perhitungan Massa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ..... | 20      |
| 3. Pengenceran .....                                    | 23      |
| 4. Aktivitas Unit Metode Fuwa.....                      | 24      |
| 5. Aktivitas Unit Metode Mandels .....                  | 25      |
| 6. Molaritas .....                                      | 26      |
| 7. Aktivitas Sisa .....                                 | 29      |
| 8. Perhitungan Nilai $k_i$ dan $t_{1/2}$ .....          | 29      |
| 9. Perhitungan Nilai $\Delta G_i$ .....                 | 29      |
| 10. Kadar Protein dengan metode Lowry .....             | 63      |
| 11. Aktivitas Spesifik.....                             | 63      |
| 12. Aktivitas Total.....                                | 63      |
| 13. Protein Total.....                                  | 63      |
| 14. Perolehan (%).....                                  | 63      |
| 15. Kemurnian.....                                      | 63      |

## DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran  | Halaman |
|---|---------|
| 1. Penentuan Pola Fraksinasi .....  | 50      |
| 2. Data Pengikatan pH Enzim Hasil Pemurnian dan Kitin .....   | 53      |
| 3. Penentuan Suhu Optimum Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Imobilisasi Pada Kitin.....         | 54      |
| 4. Penentuan $K_M$ dan $V_{maks}$ Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Imobilisasi Pada Kitin..... | 55      |
| 5. Penentuan Kestabilan Termal Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Imobilisasi Pada Kitin.....    | 56      |
| 6. Data Grafik Laju Inaktivasi Termal Enzim Orde Satu.....  | 57      |
| 7. Perhitungan Perubahan Energi Bebas akibat Denaturasi ( $\Delta G_1$ ) .....                      | 58      |
| 8. Data Pemakaian Berulang Enzim Hasil Imobilisasi Pada Kitin .....                                 | 60      |
| 9. Kurva Standar Bovine Serum Albumin (BSA).....  | 61      |
| 10. Kurva Standar Glukosa .....   | 62      |
| 11. Persamaan Untuk Kuantitasi Enzim Pada Saat Sebelum dan Sesudah Pemurnian .....                  | 63      |

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Industri kimia yang berkembang pesat membawa dampak positif karena dapat meningkatkan pertumbuhan ekonomi dan meningkatkan kualitas hidup manusia. Namun, industri kimia juga memiliki dampak yang negatif karena dapat menyebabkan berbagai masalah lingkungan seperti polusi udara dan air, emisi gas rumah kaca, kontaminasi tanah, dan penipisan sumber daya alam yang berbahaya terhadap kesehatan manusia dan ekosistem (Godbole *et al.*, 2023). Untuk mengurangi dampak negatif yang disebabkan oleh industri kimia maka perlu menerapkan prinsip kimia hijau. Salah satu prinsip kimia hijau yang dapat diterapkan yaitu menggunakan enzim sebagai biokatalis dalam proses industri kimia karena sifatnya yang ramah lingkungan serta sumbernya yang melimpah, sehingga mudah diperoleh dan lebih ekonomis (Baharuddin *et al.*, 2021).

Enzim  $\alpha$ -amilase merupakan enzim yang umum digunakan dalam proses industri kimia, seperti industri makanan, farmasi, dan tekstil. Enzim  $\alpha$ -amilase mampu menghidrolisis amilum dan menghasilkan gula sederhana seperti glukosa. Enzim  $\alpha$ -amilase dapat dihasilkan oleh makhluk hidup, seperti hewan, tumbuhan, dan mikroorganisme. Produksi enzim  $\alpha$ -amilase dari mikroorganisme lebih disukai dibandingkan dari hewan dan tumbuhan karena mikroorganisme dapat menghasilkan enzim dalam jumlah yang banyak dan mudah untuk diisolasi (Ningsih dkk., 2012). Salah satu mikroorganisme yang dapat dimanfaatkan untuk menghasilkan enzim  $\alpha$ -amilase adalah jamur *Aspergillus* karena mampu menghasilkan enzim  $\alpha$ -amilase dengan waktu produksi yang cepat dan tidak

bergantung pada musim, sehingga lebih menguntungkan untuk kebutuhan industri (Mariyanto dkk., 2022). Namun, enzim ini tidak mampu bekerja secara optimum pada suhu dan pH yang ekstrem (More *et al.*, 2001).

Dalam dunia industri kimia, enzim diharapkan mampu bekerja secara optimum pada suhu dan pH yang ekstrem (Susanti dan Fidia, 2017). Salah satu upaya untuk meningkatkan kestabilan enzim adalah dengan menggunakan metode imobilisasi enzim. Selain dapat meningkatkan kestabilan enzim, metode imobilisasi enzim juga mampu menghasilkan enzim yang dapat digunakan secara berulang dan mudah untuk dipisahkan dari larutan produksi. Keunggulan enzim hasil imobilisasi ini membuatnya menjadi salah satu bahan berharga di dalam dunia industri kimia (Sutrisno, 2017). Dalam metode imobilisasi enzim membutuhkan material pendukung yang sesuai, salah satunya yaitu matriks tersebut tidak larut dalam air. Pemilihan matriks pengimobil yang sesuai memiliki peran penting untuk meningkatkan kestabilan enzim (Yandri dan Suhartati, 2018).

Pada penelitian ini menggunakan kitin sebagai material pendukung organik dalam proses imobilisasi enzim. Kitin secara signifikan mampu meningkatkan kestabilan enzim (Yandri *et al.*, 2023). Pada penelitian yang telah dilakukan oleh Yandri *et al.* pada tahun 2023, imobilisasi enzim  $\alpha$ -amilase dari *Aspergillus fumigatus* menggunakan matriks kitin mampu meningkatkan kestabilan enzim sebesar 1,5 kali lebih tinggi dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian serta masih memiliki aktivitas sisa sebesar 46 % setelah digunakan secara berulang sebanyak 6 kali. Telah dilaporkan juga dalam penelitian Yandri *et al.* pada tahun 2021 bahwa imobilisasi enzim  $\alpha$ -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 menggunakan matriks kitin mampu meningkatkan kestabilan enzim sebesar 11 kali lebih tinggi dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian serta masih memiliki aktivitas sisa sebesar 63 % setelah digunakan secara berulang sebanyak 5 kali. Selain itu, kitin juga memiliki kelebihan lainnya, yaitu mudah didapatkan dari sumber yang melimpah seperti cangkang krustasea (udang, kepiting, dan lobster), yang merupakan limbah dari industri makanan laut (Oktarina dkk., 2017). Berdasarkan hal tersebut maka dilakukan penelitian imobilisasi enzim  $\alpha$ -amilase dari *Aspergillus* sp. dengan matriks kitin menggunakan metode adsorpsi

fisik, yang belum pernah dilakukan sebelumnya, dengan harapan terjadi peningkatan kestabilan enzim hasil imobilisasi dibandingkan dengan enzim hasil pemurniannya.

## 1.2 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memperoleh enzim  $\alpha$ -amilase dari *Apergillus* sp. dengan aktivitas unit dan tingkat kemurnian yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim.
2. Memperoleh enzim hasil imobilisasi yang memiliki kestabilan lebih tinggi dibandingkan enzim hasil pemurnian.

## 1.3 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memberikan informasi mengenai peningkatan kestabilan enzim  $\alpha$ -amilase yang berasal dari *Aspergillus* sp. menggunakan metode imobilisasi pada kitin yang dapat digunakan dalam industri kimia.
2. Memberikan informasi tentang nilai aktivitas, suhu optimum,  $K_M$ ,  $V_{maks}$ ,  $k_i$ ,  $t_{1/2}$ , dan  $\Delta G_i$  enzim  $\alpha$ -amilase dari *Aspergillus* sp. hasil pemurnian dan hasil imobilisasi sebagai salah satu literatur penelitian selanjutnya.

## **II. TINJAUAN PUSTAKA**

### **2.1 Kimia Hijau**

Kimia hijau merupakan proses kimia yang memiliki tujuan untuk mengurangi atau menghilangkan penggunaan atau pembentukan zat berbahaya dengan misi mengurangi dampak negatif produk dan proses kimia terhadap kesehatan manusia dan lingkungan. Prinsip kimia hijau mencakup pencegahan limbah, penggunaan bahan baku yang dapat diperbaharui, dan pengembangan desain yang lebih aman dan ramah lingkungan. Prinsip tersebut bertujuan untuk menjaga tanggung jawab terhadap lingkungan (Anastas *and* Eghbali, 2010).

### **2.2 Enzim**

Enzim adalah katalisator organik (biokatalisator) yang dihasilkan oleh sel. Sebagai biokatalisator enzim memiliki fungsi untuk mempercepat reaksi kimia, dan setelah reaksi berlangsung, tidak terjadi perubahan jumlah pada enzim sehingga jumlah enzim sebelum dan setelah reaksi adalah tetap. Enzim memiliki spesifitas yang tinggi terhadap reaktan yang direaksikan dan terhadap jenis reaksi yang dikatalisis (Suryani dan Taupiqurrahman, 2021). Dalam perannya sebagai katalisator, enzim mampu mengatur reaksi tertentu sehingga dalam keadaan normal tidak terjadi penyimpangan hasil reaksi. Karena enzim dapat mengkatalisator reaksi tanpa harus mengubah struktur reaksi tersebut, sehingga enzim sering disebut sebagai biokatalisator (Rachmawaty dan Madihah, 2013). Enzim bersifat katalitik karena dapat mengkatalisis semua reaksi yang berlangsung dalam sel makhluk hidup dengan cara menurunkan energi aktivasi, enzim bersifat sangat spesifik (Sutrisno, 2017).



Enzim yang berasal dari mikroorganisme lebih sering digunakan dibandingkan dengan enzim dari tanaman atau hewan karena enzim yang diperoleh dari mikroorganisme dapat berkembang biak dengan cepat, pertumbuhannya relatif mudah diatur, dan menghasilkan enzim dalam jumlah yang besar, dan enzim yang dihasilkan lebih stabil. Hal ini membuat penggunaan enzim mikroba lebih hemat biaya untuk industri (Yusak,2004).

### 2.2.1 Klasifikasi Enzim

Sistem pengklasifikasian enzim yang disetujui oleh *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* 192 BIOMOLEKUL SEL (IUBMB) adalah berdasarkan reaksi yang dikatalisisnya. Pada sistem ini enzim dibagi menjadi 6 *class* utama yaitu sebagai berikut :

- a. Oksidoreduktase merupakan enzim yang berperan untuk mengkatalisis reaksi oksidasi-reduksi. Kebanyakan enzim ini secara umum disebut sebagai *dehydrogenase*.
- b. Transferase berperan untuk mengkatalisis reaksi transfer gugus fungsi. Pada reaksi transfer gugus sebagian molekul substrat biasanya berikatan kovalen dengan enzim atau koenzimnya. Kelompok enzim ini adalah kinase, enzim yang mengkatalisis transfer gugus *phosphoryl* dari ATP.
- c. Hidrolase berperan untuk mengkatalisis reaksi hidrolisis. Enzim ini termasuk kelas khusus transferase dengan air sebagai akseptor dari gugus yang ditransfer.
- d. Liase berperan untuk mengkatalisis reaksi lisis dari substrat yang menghasilkan ikatan ganda pada reaksi nonhidrolitik, non oksidasi, dan eliminasi.
- e. Isomerase berperan untuk mengkatalisis perubahan struktur dalam molekul tunggal (reaksi isomerisasi) karena reaksi ini hanya mempunyai satu substrat dan satu produk. Sehingga reaksi enzimatik ini disebut reaksi yang paling sederhana.
- f. Ligase berperan untuk mengkatalisis reaksi penggabungan dua substrat. Ligase biasanya dirujuk sebagai sintease (Azhar, 2016).

Adapun penggolongan enzim berdasarkan tempat kerjanya adalah sebagai berikut:

a. Endoenzim

Endoenzim disebut sebagai enzim intraseluler yang merupakan enzim yang bekerja di dalam sel. Umumnya enzim yang digunakan untuk proses sintesis di dalam sel dan untuk pembentukan energi (ATP) yang berperan penting dalam proses kehidupan sel, seperti dalam proses respirasi.

Endoenzim penting karena mereka mengontrol banyak proses biokimia dalam sel, membantu mengatur reaksi-reaksi kimia yang terjadi di dalamnya. Proses-proses ini sangat penting untuk kelangsungan hidup sel dan organisme secara keseluruhan.

b. Eksoenzim

Eksoenzim disebut sebagai enzim ekstraseluler, yang merupakan enzim yang bekerja di luar sel. Umumnya enzim tersebut berfungsi untuk mencernakan substrat secara hidrolisis untuk mengubahnya menjadi molekul yang lebih sederhana (Fifendy dan Biomed, 2017).

### **2.2.2 Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim**

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu sebagai berikut:

a. pH

pH memiliki pengaruh besar terhadap aktivitas enzim. pH optimum merupakan pH enzim untuk mencapai aktivitas maksimumnya, dengan perubahan pH lingkungan akan mempengaruhi efektivitas enzim yang membentuk kompleks enzim substrat. Selain mempengaruhi struktur ion pada enzim, pH rendah atau pH tinggi dapat juga menyebabkan terjadinya proses denaturasi yang akan mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim (Arivo dan Annissatussholeha, 2017).

b. Suhu

Enzim memiliki suhu tertentu yang meningkatkan aktivitasnya hingga mencapai kondisi optimal. Ketika suhu naik hingga mencapai suhu

optimum, kecepatan reaksi enzim juga meningkat karena bertambahnya energi kinetik (Tazkiah dkk., 2017). Sehingga menambah intensitas tumbukan antara substrat dan enzim. Namun, peningkatan suhu lebih lanjut dapat menurunkan aktivitas enzim karena enzim mengalami denaturasi. Enzim dapat mengalami perubahan konformasi pada suhu yang terlalu tinggi, sehingga substrat terhambat dalam memasuki sisi aktif enzim (Yusriah dan Kuswytasari, 2013).

c. Aktivator dan Inhibitor

Aktivator adalah suatu zat yang berperan dalam mengaktifkan dan meningkatkan kerja enzim sedangkan inhibitor adalah zat yang dapat menghambat kerja enzim. Inhibitor reversibel berikatan dengan enzim secara *reversible* sehingga dapat dilepas kembali dengan proses dialisis sehingga aktivitas enzim kembali. Inhibitor *irreversible* berikatan kuat dengan enzim sehingga tidak dapat dilepaskan dengan cara dialisis (Awaliatul, 2011).

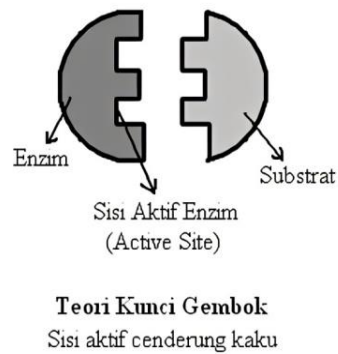
### 2.2.3 Mekanisme Kerja Enzim

Mekanisme kerja enzim mempunyai sifat yang spesifik yang berlaku terhadap jenis reaksi yang dikatalisis (spesifisitas reaksi) dan juga sifat dari reaktan (substrat) yang terlibat. Adapun model sisi aktif pada interaksi/kompleks enzim-substrat terdiri dari:

a. Model *Lock and key*

Model ini umumnya disebut dengan model “Gembok dan Kunci” dalam teori nya menjelaskan adanya kespesifikan suatu enzim. Senyawa yang tidak sesuai bentuknya atau muatannya dengan tapak aktif, tidak dapat terikat pada tapak aktif. Hubungan timbal balik enzim dengan substrat terlibat dalam akselerasi sisi aktif pada enzim dan lokus ikatan pada substrat untuk menghasilkan produk. Kesesuaian bentuk ruang antara substrat dengan sisi aktif dari enzim menyebabkan terbentuknya reaksi antara substrat dengan enzim. Substrat yang memiliki daerah polar (-)

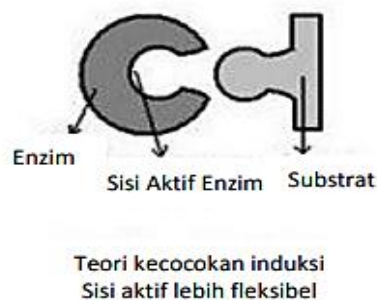
atau (+) dan nonpolar (H, hidrofobik) dilekatkan pada tapak aktif yang komplementer (bentuk maupun muatannya) dengan substrat (Susanti dan Fidia, 2017). Model *lock and key* dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Model *lock and key*.

b. Teori *induced-fit* (ketetapan induksi)

Teori ini menjelaskan bahwa sisi aktif pada mulanya belum sesuai dengan substrat, namun setelah substrat menempel pada bagian tertentu dari sisi aktif akan menginduksi sisi aktif untuk menyesuaikan bentuknya dengan substrat. Menurut teori ini, sisi aktif tidak bersifat kaku, tetapi lebih fleksibel. Sisi aktif enzim terus berubah konformasinya sampai substrat berikatan sempurna dengan enzim (Susanti dan Fidia, 2017). Teori tersebut ditunjukkan pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Teori kunci gembok dan teori induksi (Shahib, 2005).

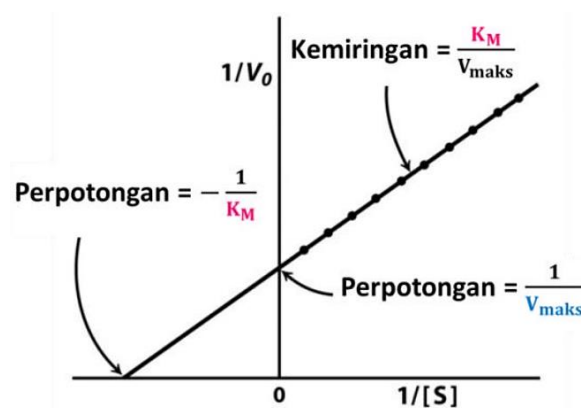
### 2.2.4 Kinetika Reaksi Enzim

Kinetika reaksi yang dikatalisis oleh enzim (ketergantungan kecepatan reaksi dari kondisi reaksi) ditentukan terutama oleh sifat-sifat dari katalisator, sehingga reaksi enzimatik lebih kompleks daripada kinetika reaksi yang tidak terkatalisis.

Berdasarkan postulat Michaelis dan Menten ternyata diperoleh bukti bahwa pada reaksi enzimatik terdapat kompleks tersebut enzim-substrat. Michaelis dan Menten berpendapat bahwa reaksi terdiri dari beberapa fase, yaitu:

1. Pembentukan kompleks Enzim-substrat (ES)
2. Modifikasi dari substrat membentuk Produk (P) yang masih terikat dengan
3. Enzim (Susanti dan Fidia, 2017).

Berdasarkan persamaan Michaelis-Menten, konstanta Michaelis-Menten ( $K_M$ ) merupakan konstanta yang menunjukkan afinitas enzim terhadap substrat. Bila konsentrasi substrat sangat tinggi ( $[S] > K_M$ ) sehingga seluruh enzim terikat pada substrat membentuk kompleks enzim-substrat, maka laju reaksi akan menjadi maksimum, atau disebut  $V_{maks}$ . Kebalikan dari persamaan Michaelis-Menten ini disebut persamaan Lineweaver-Burk (Robinson, 2015). Grafik Lineweaver-Burk dapat dilihat pada Gambar 3.



**Gambar 3.** Kurva Lineweaver-Burk.

### 2.2.5 Stabilitas Enzim

Stabilitas enzim dan stabilitas adalah sifat penting enzim dalam aplikasinya sebagai biokatalis. Stabilitas enzim dapat diartikan sebagai kestabilan aktivitas enzim selama penyimpanan, penggunaan, dan kestabilan terhadap senyawa tertentu (asam dan basa) serta pengaruh temperatur dan pH ekstrem (Susanti dan Fidia, 2017). Semakin tinggi kekuatan penstabil enzim, maka enzim akan semakin stabil (Rahayu, 2000). Untuk menentukan stabilitas enzim dilakukan uji stabilitas termal untuk mengetahui kestabilan konformasi struktur enzim terhadap waktu pemanasan dan perubahan kondisi lingkungan akibat proses reaksi yang dapat mengakibatkan terjadinya proses denaturasi enzim secara perlahan (Murty *and* Muniswaran, 2002).

Suhu dan pH merupakan faktor yang sangat mempengaruhi stabilitas enzim, pada suhu yang terlalu rendah stabilitas enzim tinggi namun aktivitasnya rendah, sedangkan pada suhu yang terlalu tinggi aktivitas enzim tinggi namun kestabilannya rendah. Peningkatan suhu eksternal secara umum akan meningkatkan kecepatan reaksi kimia enzim, tetapi kenaikan suhu yang terlalu tinggi akan menyebabkan terjadinya denaturasi enzim yaitu berubahnya struktur protein enzim, terutama perubahan pada ikatan ionik dan ikatan hidrogennya sehingga menyebabkan terjadinya penurunan kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim tersebut (Saropah dkk., 2012). Enzim memiliki rentang pH dan suhu optimum tertentu untuk reaksi enzimatik, mempertahankan stabilitas pH optimum enzim terhadap pengaruh perubahan keasaman atau kebasaan lingkungan menjadi sangat penting, karena pada pH yang jauh dari rentang pH optimumnya tersebut sebagian besar enzim akan kehilangan aktivitas katalitiknya (inaktivasi) secara cepat dan *irreversible* (Yandri dan Ibadurrahman, 2011). Sedikit perubahan pH akan menyebabkan perubahan besar pada reaksi yang dikatalis enzim. Perubahan pH akan menyebabkan denaturasi pada protein penyusun enzim itu sendiri (Murray *et al.*, 2003). Beberapa penelitian mengenai peningkatan kestabilan dengan cara imobilisasi enzim  $\alpha$ -amilase menggunakan matriks kitin dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Peningkatan kestabilan termal enzim  $\alpha$ -amilase yang diimobilisasi dengan material kitin.

| Sumber Enzim             | Matriks        | Suhu | Durasi | Aktivitas Sisa (%) |              | Ref.                          |
|--------------------------|----------------|------|--------|--------------------|--------------|-------------------------------|
|                          |                |      |        | Enzim Bebas        | Enzim Imobil |                               |
| <i>Bacillus Subtilis</i> | Kitin          | 60°C | 80 min | 15,50              | 76,26        | (Yandri <i>et al.</i> , 2021) |
| <i>A. fumigatus</i>      | Kitin          | 60°C | 80 min | 28                 | 39           | (Yandri <i>et al.</i> , 2023) |
| <i>A. fumigatus</i>      | Bentonit/Kitin | 60°C | 80 min | 28                 | 70           | (Tiarsa <i>et al.</i> , 2022) |

### 2.3 Enzim Amilase

Enzim amilase merupakan enzim yang mampu menghidrolisis amilum dan menghasilkan glukosa. Enzim amilase dapat dihasilkan oleh semua makhluk hidup untuk mengkatalis reaksi biokimia, sehingga reaksi-reaksi tersebut dapat berlangsung lebih cepat. Enzim amilase untuk kebutuhan industri diekstraksi dari berbagai jenis sel makhluk hidup, tetapi pada saat ini enzim lebih banyak diekstraksi dari berbagai jenis mikroorganisme, sebab mikroorganisme menghasilkan enzim yang dapat dimanfaatkan manusia dalam jumlah dan jenis yang sangat bervariasi. Selain itu, mikroorganisme dapat dikultur untuk memperoleh enzim yang dihasilkan (Ningsih dkk., 2012). Amilase adalah enzim yang mengkatalis hidrolisis dari  $\alpha$ -1,4-glikosidik polisakarida untuk menghasilkan dekstrin, oligosakarida, maltosa, dan D-glukosa. Amilase bisa berasal dari hewan, jamur, dan sumber tanaman. Pankreatin dan pankrelipase mengandung amilase yang berasal dari pankreas hewan, pankreas biasanya babi. Amilase juga berasal dari *malt barley* dan jamur *Aspergillus oryzae* (Wang and Sun, 2009).

Enzim  $\alpha$ -amilase adalah endoamilase yang membelah ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosidik rantai amilosa atau amilopektin untuk menghasilkan produk (Martinez *et al.*, 2015).  $\alpha$ -amilase terdapat dalam saliva dan pankreas. Enzim ini menghidrolisis ikatan  $\alpha$ -1-4 glikosidik yang terdapat dalam amilum dan disebut endoamilase

sebab enzim ini memecah bagian dalam atau bagian tengah molekul amilum (Poedjiadi dan Supriyanti, 2006). Enzim  $\alpha$ -amilase mengkatalisis pemutusan ikatan  $\alpha$ -D-(1,4)-glukosidik pada pati, glikogen, dan oligosakarida menghasilkan dekstrin, oligosakarida, maltosa, dan D-glukosa (Ariandi, 2016). Mekanisme kerja enzim  $\alpha$ -amilase terdiri dari dua tahap, yaitu : tahap pertama degradasi amilosa menjadi maltosa dan maltotriosa yang terjadi secara acak. Tahap kedua terjadi pembentukan glukosa dan maltosa sebagai hasil akhir dan tidak acak. Keduanya merupakan kerja enzim  $\alpha$ -amilase pada molekul amilosa. Pada molekul amilopektin kerja  $\alpha$ -amilase akan menghasilkan glukosa, maltosa serta oligosakarida yang terdiri dari empat atau lebih glukosa yang mengandung ikatan  $\alpha$ -1,6-glikosidik (Winarno, 2010).

#### **2.4 *Aspergillus* sp.**

*Aspergillus* sp. merupakan jamur yang dapat tumbuh dengan cepat, memproduksi hifa yang memiliki sekat dan cabang, khususnya yang membesar di bagian ujung tegaknya, adalah tempat di mana konidiofor terutama terbentuk. Pada bagian ujung konidiofora ini membulat menjadi fesikel, yang memiliki batang batang pendek yang disebut sebagai sterigmata. Pada sterigmata tumbuh konidia yang membentuk rantai yang berwarna hijau, coklat atau hitam *Aspergillus* sp. berkembang biak melalui pembentukan spora kecil yang dapat dengan mudah tumbuh di udara. Kepala konidia atau tubuh *Aspergillus* sp. tumbuh dengan cepat, berwarna putih, kuning atau coklat sampai hitam atau hijau. Sebagian besar *Aspergillus* sp. memiliki konodiofor tegak (Wulansari,2013).

*Aspergillus* sp. bisa dimanfaatkan dalam berbagai proses industri, baik dalam skala besar maupun secara tradisional, karena memiliki potensi untuk menghasilkan enzim, termasuk enzim amilase. Enzim ini memiliki keunggulan seperti kemampuan untuk diproduksi secara besar, biaya yang lebih efisien, waktu produksi yang lebih singkat, dan tingkat stabilitas yang lebih tinggi. (Jinu,2017). *Aspergillus* sp. terdapat dimana saja dan dapat tumbuh pada semua substrat. Pertumbuhannya akan terhambat bila bahan dalam koloninya berkelompok dan



berkembang dengan konidiospora, konidiospora terbentuk secara bebas dan ujungnya menggebu, konidia berangkai-rangkai dan bentuknya bulat, serta termasuk dalam divisi deuteromycota (Irianto, 2013).

## 2.5 Isolasi dan Pemurnian Enzim

Tahapan dalam isolasi dan pemurnian enzim adalah sebagai berikut :

### a. Sentrifugasi

Sentrifugasi merupakan suatu teknik pengendapan yang dilakukan untuk memisahkan endapan dari suatu suspensi. Prinsip sentrifugasi adalah dilakukannya pemisahan substansi yang didasarkan oleh berat jenis molekul dengan cara memberikan gaya sentrifugal, sehingga substansi yang lebih berat akan berada di dasar, sedangkan substansi yang lebih ringan akan berada di atas (Faatih, 2009). Faktor-faktor yang mempengaruhi sentrifugasi antara lain kecepatan, waktu, dan suhu. Semakin tinggi kecepatan sentrifugasi maka semakin sedikit pula waktu yang dibutuhkan untuk melakukan suatu putaran, hubungan tersebut berdasarkan dari hubungan yang berbanding terbalik antara suatu kecepatan dengan waktu gerak melingkar suatu sentrifugasi (Magnette *et al.*, 2016).

### b. Fraksinasi

Fraksinasi adalah suatu cara untuk memisahkan senyawa berdasarkan sifat kepolarannya. Senyawa polar akan masuk ke polar, begitupula senyawa non polar akan masuk pada pelarut non polar (Magnette *et al.*, 2016). Fraksinasi bekerja dengan melakukan pengendapan protein atau enzim dengan penambahan senyawa elektrolit seperti garam amonium sulfat, natrium klorida atau natrium sulfat. Dalam proses fraksinasi, jika konsentrasi garam lebih tinggi maka kelarutan enzim dalam air akan menjadi rendah. Kekuatan ion garam yang lebih tinggi menghasilkan muatan yang dapat membentuk ikatan kovalen dengan air sehingga sebagian air yang menghidrasi molekul enzim akan tertarik oleh garam sehingga enzim mengendap.

c. Dialisis

Dialisis merupakan proses transport solut melalui membran, solut dipindahkan antara dua cairan. Pada proses dialisis terjadi perpindahan garam amonium sulfat yang mempunyai berat molekul rendah dari sampel berganti dengan larutan bufer dalam dialisat. Pada waktu garam bergerak melalui pori-pori membran, garam teradsorpsi pada permukaan membran dan selanjutnya bergerak dari sisi membran yang satu ke sisi membran yang lain (Mayasari, 2016). Prinsip dialisis adalah difusi, yaitu terjadinya perpindahan zat terlarut dari larutan berkonsentrasi tinggi ke larutan berkonsentrasi yang rendah. Konsentrasi bufer di luar membran selofan lebih rendah daripada konsentrasi bufer di dalam membran selofan sehingga amonium sulfat dapat berdifusi ke luar membran selofan (Sinatari dkk., 2013).

## 2.6 Uji Aktivitas Enzim $\alpha$ -Amilase

Penentuan aktivitas unit enzim dilakukan dengan dua pendekatan, yaitu berdasarkan berkurangnya substrat atau dari terbentuknya produk. Penentuan aktivitas unit enzim  $\alpha$ -amilase dapat dilakukan dengan metode Fuwa dan Mandels.

a. Metode Fuwa

Uji aktivitas enzim amilase dilakukan menggunakan metode Fuwa

Metode Fuwa merupakan uji yang menggunakan larutan iodin.

Enzim dalam sampel akan mengikat substrat untuk membentuk kompleks enzim-substrat. Kompleks ini akan bereaksi dengan larutan iodin, menghasilkan larutan berwarna kuning yang bisa diukur menggunakan spektrofotometri. Seiring dengan peningkatan hidrolisis substrat oleh enzim, warna larutan akan semakin kuning bening. Hal ini disebabkan oleh pengikatan pati dengan iodin dan enzim yang semakin berkurang, menghasilkan produk glukosa. Enzim juga memecah ikatan antara iodin dan substrat, menyebabkan perubahan warna menjadi kuning bening. Berkurangnya substrat pati yang terhidrolisis dan menghasilkan warna biru setelah penambahan iodin dan warna tersebut akan menyerap cahaya

monokromatis pada  $\lambda_{\text{maks}}$  600 nm merupakan hal yang mendasari uji Fuwa (Fuwa, 1954; Tazkiah dkk., 2017).

b. Metode Mandels

Aktivitas enzim amilase diukur dengan menggunakan metode Mandels yang didasarkan oleh pembentukan glukosa dari substrat *Carboxymethyl Cellulase* (CMC) yang dideteksi dengan penambahan pereaksi *dinitrosalisilic acid* (DNS). Reaksi gula pereduksi dengan reagen DNS merupakan reaksi redoks, gugus aldehid yang bertindak sebagai pereduksi akan teroksidasi menjadi karboksil, sedangkan DNS yang bertindak sebagai oksidator akan tereduksi membentuk asam 3- amino-5-nitrosalisat. Apabila terdapat gula pereduksi pada sampel, maka larutan DNS yang awalnya berwarna kuning bereaksi dengan gula pereduksi akan menimbulkan warna jingga kemerahan (Ruswandi dkk., 2018).

## 2.7 Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

Metode Lowry dikembangkan pada tahun 1951 dengan menggunakan reagen pendeteksi Folin-Ciocalteu. Reagen ini biasa digunakan untuk mendeteksi gugus-gugus fenolik. Dalam keadaan basa, ion tembaga divalen ( $\text{Cu}^{2+}$ ) dengan ikatan peptida yang mereduksi  $\text{Cu}^{2+}$  menjadi tembaga monovalen ( $\text{Cu}^+$ ) (Bintang dan Maria, 2010). Prinsip kerja penentuan kadar protein dengan metode Lowry, yaitu terjadinya reaksi kompleks protein dengan reagen folin (fosfomolibdat tungstat). Tahapan kerjanya terdiri dari 2 reaksi yang berbeda. Pertama, protein pada sampel direaksikan dengan ion Cu pada kondisi alkalis selama 10 menit. Reaksi ini akan menghasilkan kompleks Cu-tetradentat. Kedua, terjadi reaksi reduksi terhadap larutan asam fosfomolibdat-fosfotungstat menghasilkan warna biru (Deasy, 2016).

## 2.8 Imobilisasi Enzim

Imobilisasi enzim adalah suatu teknik enzim dilokalisir pada suatu ruang tertentu dengan mempertahankan aktivitas katalitiknya, sehingga enzim dapat digunakan berulang-ulang. Teknik imobilisasi enzim akan memberikan keuntungan seperti enzim dapat digunakan berkali-kali, aktivitas katalitik enzim dapat dipertahankan, peningkatan stabilitas enzim, menghasilkan produk yang bebas enzim, dan efisiensi biaya (Sutrisno, 2017). Enzim dapat di imobilisasi dengan metode adsorpsi fisik.

Pada metode adsorpsi enzim terikat pada bahan pendukung dengan hubungan ikatan non-kovalen termasuk interaksi ion atau interaksi hidrofobik, ikatan hidrogen, dan interaksi Van der Waals . Matriks yang digunakan adalah senyawa organik maupun senyawa anorganik, yaitu: keramik, alumina, karbon aktif, kaolin, bentonit, kaca berpori, kitosan, dekstran, gelatin, selulosa, pati. Metode imobilisasi meliputi optimasi variabel termasuk pH, suhu, sifat pelarut, kekuatan ion, konsentrasi enzim dan adsorben. Enzim tersebut langsung ditambahkan ke permukaan (adsorben aktif) tanpa penghilangan enzim yang tidak teradsorpsi selama pencucian (Yandri dan Suhartati, 2018). Berbagai penelitian terkait imobilisasi enzim dengan menggunakan beberapa matriks pendukung dapat dilihat pada Tabel 2.

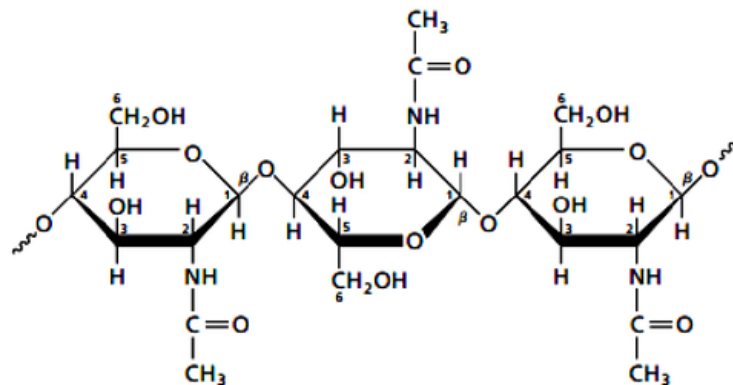
**Tabel 2.** Berbagai penelitian imobilisasi enzim dengan kitin.

| Sumber Enzim                    | Jenis Enzim dan Matriks                               | Penggunaan Berulang | Aktivitas Sisa (%) | Referensi                       |
|---------------------------------|---|---------------------|--------------------|---------------------------------|
| <i>Bacillus Subtilis</i>        | $\alpha$ -amilase dan kitin                           | 5                   | 63                 | (Yandri <i>et al.</i> , 2021)   |
| <i>Aspergillus fumigatus</i>    | $\alpha$ -amilase dan kitin                           | 6                   | 46                 | (Yandri <i>et al.</i> , 2023)   |
| <i>Thermatoga maritima</i>      | $\beta$ -Glukosidase dan kitin                        | 10                  | 66                 | (Alnadari <i>et al.</i> , 2020) |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Yeast alkohol dehidrogenase dan hibrida kitin-shellac | 8                   | 46                 | (Mei <i>et al.</i> , 2018)      |

## 2.9 Kitin

Kitin adalah biopolimer (polimer alami yang diproduksi oleh organisme hidup) yang melimpah di alam setelah selulosa. Kitin umumnya ditemukan dalam bentuk kristal mikrofibril pada komponen struktural krustasea, serangga, sel-sel jamur dan mikroorganisme lainnya (Komi *and* Michael, 2017).

Kitin merupakan zat padat yang larut dalam asam-asam mineral pekat, tetapi tidak larut di dalam air, pelarut organik, alkali pekat dan asam mineral encer. Kitin tidak larut dalam air (Dewi dkk., 2008). Kitin dipilih sebagai matriks pengamobil karena ketersediaannya melimpah di alam, harga ekonomis, dan ramah lingkungan. Struktur kitin ditunjukkan pada Gambar 4.



**Gambar 4.** Struktur kitin (Moran *et al.*, 2012).

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada 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 adalah alat-alat gelas, neraca analitik, *autoclave*, sentrifuga *Cole-Parmer*, tabung sentrifuga, *laminar air flow* CRUMA model 9005-FL, *shaker incubator*, *waterbath*, *hot plate*, jarum ose, mikropipet *Eppendorf*, pembakar spirtus, oven, inkubator, pH meter, dan spektrofotometer *Cary-100 UV-Vis Agilent Technologies*.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pati singkong, *Potato Dextrose Agar*,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2$ , pepton, Urea,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , KI,  $\text{I}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , NaOH, HCl, Na/K-tartrat, *Follin Ciocalteu*, *Bovine Serum Albumin (BSA)*, *Dinitrosalisilic Acid (DNS)*, bufer fosfat, akuades, kantong selofan, kapas sumbat, kasa, aluminium foil, kertas, karet, kertas saring, alkohol 70 %, tisu, dan kitin. Penelitian ini menggunakan mikroorganisme *Aspergillus* sp. yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, Universitas Lampung.

### 3.3 Prosedur Penelitian

Prosedur kerja yang dilakukan dalam penelitian ini terbagi menjadi beberapa bagian 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, dipanaskan, dan kemudian dituangkan ke dalam tabung reaksi. Tabung reaksi ditutup dengan sumbat kapas, lalu disterilkan media dengan dimasukkan ke dalam *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 1 Atm selama 15 menit. Setelah itu, tabung reaksi yang berisi media steril disimpan dalam posisi miring sampai mengeras.

##### b. Pembiakan *Aspergillus sp.*

Proses pembiakan dilakukan di dalam *laminar air flow* yang telah disterilisasi dengan sinar UV. Kemudian diambil sebanyak satu goresan jarum ose biakan murni *Aspergillus sp.* lalu ditusuk ke permukaan media agar miring dan media yang telah berisi isolat diinkubasi didalam inkubator dengan suhu 37°C.

#### 3.3.2 Pembuatan Media Inokulum dan Fermentasi

##### a. Pembuatan bufer fosfat

Media fermentasi dibuat menggunakan buffer fosfat yang merupakan kombinasi dari  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  dan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Variasi dalam proporsi antara  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  dan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  akan menghasilkan perubahan pH yang dapat diestimasi melalui persamaan Henderson-Hasselbach berikut:

$$[\text{H}^+] = K_a \left( \frac{V_{\text{asam lemah}}}{V_{\text{basa konjugasi}}} \right) \dots\dots\dots (1)$$

1) Larutan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ( $M_r = 120 \text{ g/mol}$ ) 0,05 M sebanyak 1.000 mL (Stok A)

Larutan dibuat dengan Persamaan 2 sebagai berikut:

$$M = \frac{\text{massa (g)}}{M_r \text{ (g/mol)}} \times \frac{1.000}{V_{\text{pelarut}} \text{ (mL)}} \dots\dots\dots(2)$$

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

Massa = 6,0 gram

Untuk membuat 1000 mL larutan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,05 M diperlukan 6,0 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  yang dilarutkan dengan akuades dalam labu ukur 1000 mL hingga batas meniskus, lalu dihomogenkan.

- 2) Larutan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ( $M_r = 142$  g/mol) 0,05 M sebanyak 500 mL (Stok B)

Larutan dibuat dengan Persamaan 2. Untuk membuat 500 mL larutan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,05 M diperlukan 3,57 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  yang dilarutkan dengan akuades dalam labu ukur 500 mL hingga tanda tera, lalu dihomogenkan.

- 3) Larutan bufer fosfat 0,05 M sebanyak 300 mL pH 6,0 (Tiarsa, 2022)

Larutan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Stok A) dicampurkan dengan larutan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (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 1.

$$[\text{H}^+] = K_a (\text{NaH}_2\text{PO}_4) \left( \frac{V_{(\text{NaH}_2\text{PO}_4)}}{V_{(\text{Na}_2\text{HPO}_4)}} \right)$$

dengan keterangan:  $V_{(\text{Na}_2\text{HPO}_4)} = V_{\text{total}} - V_{(\text{NaH}_2\text{PO}_4)}$

$$[\text{H}^+] = K_a (\text{NaH}_2\text{PO}_4) \left( \frac{V_{(\text{NaH}_2\text{PO}_4)}}{V_{\text{total}} - V_{(\text{NaH}_2\text{PO}_4)}} \right)$$

$$10^{-6,0} = 6,3 \times 10^{-8} \left( \frac{V_{(\text{NaH}_2\text{PO}_4)}}{300 - V_{(\text{NaH}_2\text{PO}_4)}} \right)$$

$$V_{(\text{NaH}_2\text{PO}_4)} = 282,22 \text{ mL}$$

$$V_{(\text{Na}_2\text{HPO}_4)} = 17,78 \text{ mL}$$



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

b. Pembuatan media inokulum dan fermentasi

Media inokulum digunakan sebagai medium adaptasi awal pertumbuhan dan medium untuk berkembang biakan jamur pada media cair. Media fermentasi dibuat dengan menimbang bahan-bahan yang terdiri dari 4,2 gram  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 6 gram  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,9 gram urea, 0,9 gram  $\text{MgSO}_4$ , 0,9 gram  $\text{CaCl}_2$ , 0,015 gram  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,0042 gram  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,006 gram  $\text{CoCl}_2$ , 2,25 gram pepton, 2,25 gram substrat. Lalu dilarutkan semua bahan ke dalam 300 mL bufer fosfat 0,05 M pH 6 pada Erlenmeyer 500 mL dan dipanaskan di atas *hot plate* agar semua bahan homogen, kemudian setelah homogen dipindahkan sebanyak 50 mL dari media fermentasi sebagai media inokulum dan disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu  $121^\circ\text{C}$ , tekanan 1 atm selama 15 menit.

c. Inokulasi *Aspergillus* sp.

Sebanyak 3 ose *Aspergillus* sp. dipindahkan dari media agar miring ke dalam 50 mL media inokulum secara aseptik, kemudian diletakkan pada *shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam.

d. Produksi enzim  $\alpha$ -amilase

Sebanyak 2 % media inokulum dipindahkan dari jumlah media fermentasi ke dalam media fermentasi secara aseptik, kemudian diletakkan pada *shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama 72 jam.

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

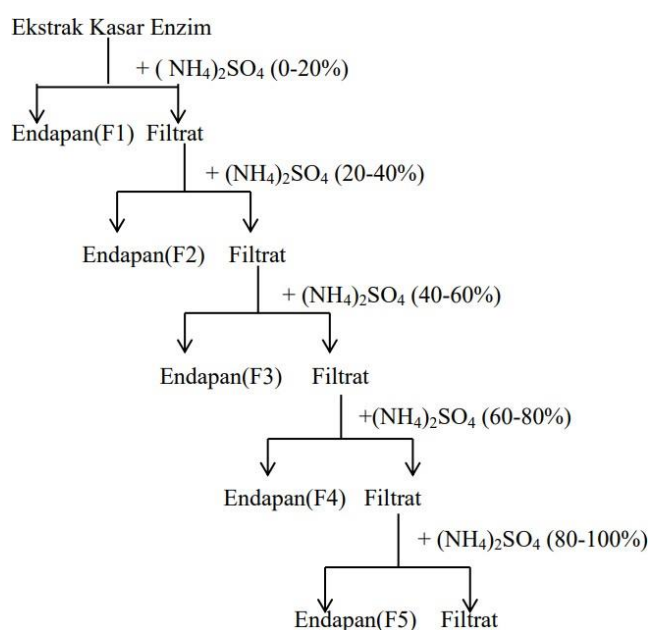
Isolasi enzim  $\alpha$ -amilase dilakukan dengan menggunakan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit, yang bertujuan untuk memisahkan filtrat dan endapan (Yandri dkk., 2020). Ekstrak kasar enzim yang diperoleh akan diuji aktivitasnya dengan metode Fuwa dan kadar proteinnya diukur dengan metode Lowry.

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

#### a. Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan menggunakan amonium sulfat, dengan cara ekstrak kasar enzim diendapkan dengan amonium sulfat pada berbagai derajat kejenuhan antara lain 0-20; 20-40 ; 40-60 ; 60-80 ; dan 80-100 %.

Skema fraksinasi dapat dilihat pada Gambar 5.



**Gambar 5.** Skema fraksinasi dengan amonium sulfat.

Ekstrak kasar enzim yang diperoleh ditambahkan garam amonium sulfat secara perlahan sambil diaduk menggunakan *magnetic stirer*, dipisahkan endapan protein enzim yang diperoleh dari tiap derajat kejenuhan dari filtratnya dengan menggunakan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Kemudian endapan yang diperoleh dilarutkan menggunakan bufer fosfat 0,025 M pH 6, diuji aktivitasnya dengan metode Fuwa dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.

#### b. Dialisis

Endapan enzim yang dihasilkan dari fraksinasi dimurnikan menggunakan metode dialisis, dengan cara endapan enzim yang telah

diperoleh dari fraksinasi dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis dengan bufer fosfat 0,1 M pH 6 pada suhu 4°C selama 24 jam. Selama proses dialisis, dilakukan pergantian bufer setiap 4 jam yang bertujuan untuk mengurangi konsentrasi ion-ion di dalam selofan. Proses ini dilakukan secara berulang. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas dengan metode Fuwa dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.

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

#### 1. Metode Fuwa

- a. Pembuatan pereaksi untuk uji aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase menggunakan metode Fuwa.

- Pereaksi Iodin

Sebanyak 2 gram KI dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan dilarutkan dengan akuades 10 mL, lalu ditambahkan 0,2 gram I<sub>2</sub> dan ditambahkan akuades hingga tanda tera, kemudian dihomogenkan.

- Larutan Pati

Sebanyak 0,1 gram pati ditambahkan ke dalam 100 mL akuades 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 3 sebagai berikut:

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2 \dots\dots\dots(3)$$

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

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

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

b. Uji Aktivitas

- Sampel

Sebanyak 0,25 mL enzim ditambahkan 0,25 mL larutan pati, lalu diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit. Kemudian ditambahkan 0,25 mL HCL 1 N untuk menghentikan reaksi enzim dan pati, selanjutnya ditambahkan 0,25 mL pereaksi iodin, lalu ditambahkan 4 mL akuades dan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda$  600 nm. Rumus dasar aktivitas unit ditunjukkan dengan Persamaan 4, yaitu:

$$AU = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{kontrol}}} \times \frac{1}{V_{\text{enzim}}} \times FP \dots\dots\dots(4)$$

Keterangan:

$A_{\text{kontrol}}$  = absorbansi kontrol

$A_{\text{sampel}}$  = absorbansi sampel

FP = faktor pengenceran

V = volume enzim = 0,25 mL

- Kontrol

Sebanyak 0,25 mL enzim ditambahkan 0,25 mL larutan HCL 1 N, lalu diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit. Kemudian ditambahkan 0,25 mL larutan pati setelah enzim diinaktivasi dengan HCL 1 N, selanjutnya ditambahkan 0,25 mL pereaksi iodin, lalu ditambahkan 4 mL akuades dan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda$  600 nm.

## 2. Metode Mandels

a. Pembuatan pereaksi untuk uji aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase menggunakan metode Mandels

Sebanyak 1 gram DNS dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, lalu ditambahkan 1 gram NaOH dan dihomogenkan. Selanjutnya ditambahkan 0,2 gram fenol, 0,05 gram  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ , 0,4 gram Na(K)-tartarat dan dilarutkan dengan akuades hingga tanda tera.

## b. Uji Aktivitas

Sebanyak 0,25 mL enzim ditambahkan 0,25 mL larutan pati, lalu diinkubasi dengan *waterbath incubator* selama 30 menit pada suhu 60°C. Selanjutnya ditambahkan 2 mL pereaksi asam dinitrosalisilat (DNS) lalu dididihkan selama 10 menit menggunakan penangas air dan didinginkan, setelah itu ditambahkan sebanyak 1,5 mL akuades dan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan  $\lambda$  510 nm dan digunakan kurva standar glukosa untuk menentukan kadar glukosa yang terbentuk. Aktivitas unit dapat dihitung dengan Persamaan 5 berikut:

$$AU = \frac{(A_{\text{sampel}} - A_{\text{kontrol}}) - b}{a} \times \frac{1}{V_{\text{enzim}}} \times \frac{1}{t_{\text{inkubasi}}} \times \frac{1.000 \times FP}{Mr_{\text{produk}}} \dots\dots\dots(5)$$

Keterangan:

FP = faktor pengenceran

V = volume enzim = 0,25 mL

t = waktu inkubasi = 30 menit

Mr produk = massa relatif molekul glukosa = 180 g/mol

b dan a = *intercept* dan *slope* kurva standar glukosa

## 3. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

## a. Pembuatan pereaksi untuk menentukan kadar protein dengan metode Lowry

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

b. Penentuan Kadar Protein

0,1 mL enzim ditambahkan 0,9 mL akuades dan direaksikan dengan 5 mL pereaksi C, lalu dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruang. Kemudian ditambahkan dengan cepat 0,5 mL pereaksi dan dihomogenkan, lalu didiamkan selama 30 menit. Untuk kontrol, dilakukan perlakuan yang sama dengan 0,1 mL enzim diganti dengan akuades. Selanjutnya diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis  $\lambda$  750 nm.

### 3.3.6 Imobilisasi Enzim

a. Penetapan pH untuk proses pengikatan enzim  $\alpha$ -amilase pada kitin

Enzim  $\alpha$ -amilase diikatkan pada matriks dengan variasi pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; dan 6 menggunakan bufer fosfat 0,1 M kecuali pH 4,0 dan 4,5 yang menggunakan bufer asetat 0,1 M. Lalu matriks diisi larutan enzim sebanyak 0,5 mL larutan enzim dan dielusi dengan 2 mL bufer yang sesuai, lalu diaduk dan disentrifugasi selama 15 menit. Selanjutnya didekantasi supernatan dan diuji aktivitas enzimnya.

b. Pembuatan bufer asetat

Bufer asetat terbuat dari campuran  $\text{CH}_3\text{COOH}$  dan  $\text{CH}_3\text{COONa}$ .

1) Larutan  $\text{CH}_3\text{COOH}$  ( $M_r = 60,05$  g/mol) 0,1 M sebanyak 100 mL

Molaritas  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glasial ditentukan dengan menggunakan

Persamaan 6 sebagai berikut:

$$M = \frac{\rho \times 10 \times \%}{M_r} \dots\dots\dots (6)$$

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

$$M = 17,5$$

Selanjutnya, larutan  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glasial 17,5 M diencerkan menjadi

0,1 M melalui Persamaan 3. Untuk membuat 100 mL  $\text{CH}_3\text{COOH}$

0,1 M diperlukan 0,57 mL  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glasial yang diencerkan dengan 100 mL akuades dan dihomogenkan.

- 2) Larutan  $\text{CH}_3\text{COONa}$  ( $M_r = 82,03 \text{ g/mol}$ )  $0,1 \text{ M}$  sebanyak  $100 \text{ mL}$   
 Larutan dibuat dengan Persamaan 2. Berdasarkan hasil perhitungan, untuk membuat  $100 \text{ mL}$   $\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,1 \text{ M}$  diperlukan  $0,82 \text{ g}$   $\text{CH}_3\text{COONa}$  yang kemudian dilarutkan dengan  $100 \text{ mL}$  akuades dan dihomogenkan.
- 3) Larutan bufer asetat  $0,1 \text{ M}$  sebanyak  $100 \text{ mL}$  dengan  $\text{pH}$   $4,5$   
 Bufer asetat dibuat dari campuran  $\text{CH}_3\text{COOH}$  dan  $\text{CH}_3\text{COONa}$ . Untuk membuat buffer asetat dengan  $\text{pH}$  tertentu, volume  $\text{CH}_3\text{COOH}$  dan  $\text{CH}_3\text{COONa}$  yang dibutuhkan diperkirakan nilainya melalui Persamaan 1.

$$[\text{H}^+] = K_a (\text{CH}_3\text{COOH}) \left( \frac{V_{(\text{CH}_3\text{COOH})}}{V_{(\text{CH}_3\text{COONa})}} \right)$$

dengan keterangan:  $V_{(\text{CH}_3\text{COONa})} = V_{\text{total}} - V_{(\text{CH}_3\text{COOH})}$

$$[\text{H}^+] = K_a (\text{CH}_3\text{COOH}) \left( \frac{V_{(\text{CH}_3\text{COOH})}}{V_{\text{total}} - V_{(\text{CH}_3\text{COOH})}} \right)$$

$$10^{-4,5} = 1,754 \times 10^{-5} \left( \frac{V_{(\text{CH}_3\text{COOH})}}{100 - V_{(\text{CH}_3\text{COOH})}} \right)$$

$$V_{(\text{CH}_3\text{COOH})} = 64,29 \text{ mL}$$

$$V_{(\text{CH}_3\text{COONa})} = 35,71 \text{ mL}$$

Pembuatan bufer  $\text{pH}$   $6,0$  dengan persamaan di atas perlu diverifikasi akurasi menggunakan  $\text{pH}$  meter yang telah dikalibrasi.

c. Imobilisasi enzim  $\alpha$ -amilase

Sebanyak  $0,25 \text{ gram}$  kitin distabilkan menggunakan bufer pada  $\text{pH}$  pengikatan melalui 3 kali pergantian bufer dengan sentrifugasi selama  $15 \text{ menit}$ . Kemudian, ditambahkan  $0,5 \text{ mL}$  enzim hasil pemurnian dan  $0,5 \text{ mL}$  bufer pengikatan lalu disentrifugasi selama  $15 \text{ menit}$ . Supernatan diambil sebanyak  $0,25 \text{ mL}$  untuk dijadikan kontrol uji Mandels, lalu ditambahkan  $0,75 \text{ mL}$  substrat pati ke dalam matriks-enzim dan diinkubasi pada suhu optimum selama  $30 \text{ menit}$ , kemudian disentrifugasi selama  $30 \text{ menit}$  dan diambil  $0,5 \text{ mL}$  supernatan untuk digunakan sebagai sampel pada uji Mandels.

d. Pemakaian berulang enzim imobilisasi

Enzim imobil yang telah dipakai (direaksikan dengan substrat), kemudian dicuci dengan bufer fosfat 0,1 M pH pengikatan optimum lalu disentrifugasi. Kemudian endapan enzim imobil direaksikan dengan substrat yang baru. Selanjutnya, diuji dan dibandingkan aktivitas sisa (%) enzim imobil sebelum dan sesudah pemakaian berulang menggunakan metode Mandels.

### 3.3.7 Karakterisasi Enzim Amilase

a. Penentuan suhu optimum

Penentuan enzim amilase dilakukan dengan memvariasikan suhu 50, 55, 60, 65, 70, dan 75°C, kemudian diuji dengan metode Mandels. Aktivitas enzim yang tertinggi diartikan sebagai suhu optimum karena sesuai dengan aturan umum, bahwa semakin tinggi aktivitas relatif pada suhu ekstrem maka semakin stabil enzim tersebut (Yandri *et al.*, 2023).

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

Penentuan Konstanta Michaelis-Menten ( $K_M$ ) dan laju reaksi maksimum ( $V_{maks}$ ) enzim amilase dilakukan dengan data aktivitas enzim dengan konsentrasi substrat yaitu 0,2 ; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1,0 % diplotkan ke dalam kurva Lineweaver-Burk (Yandri *et al.*, 2023). Kemudian diukur aktivitas enzim dengan metode Mandels.

c. Uji stabilitas termal enzim

Penentuan stabilitas termal enzim dengan menggunakan variasi waktu inkubasi, pada penelitian ini variasi waktu inkubasinya yaitu 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, dan 80 menit. Selanjutnya ditentukan aktivitas enzimnya dengan metode Mandels dan aktivitas residu ditentukan dengan menggunakan persamaan 7:



$$\text{Aktivitas sisa} = \frac{\text{Aktivitas enzim setelah perlakuan}}{\text{Aktivitas enzim awal (tanpa perlakuan)}} \times 100 \% \dots\dots\dots(7)$$

(Virdianingsih, 2002).

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

Konstanta laju inaktivasi ( $k_i$ ) dan waktu paruh ( $t_{1/2}$ ) dihitung dengan persamaan:

$$\ln \left( \frac{E_i}{E_0} \right) = k_i \times t_i \dots\dots\dots(8)$$

dan untuk perubahan energi akibat denaturasi ( $\Delta G_i$ ) enzim hasil pemurnian dan hasil imobilisasi dilakukan dengan menggunakan persamaan:

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

Keterangan :

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

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

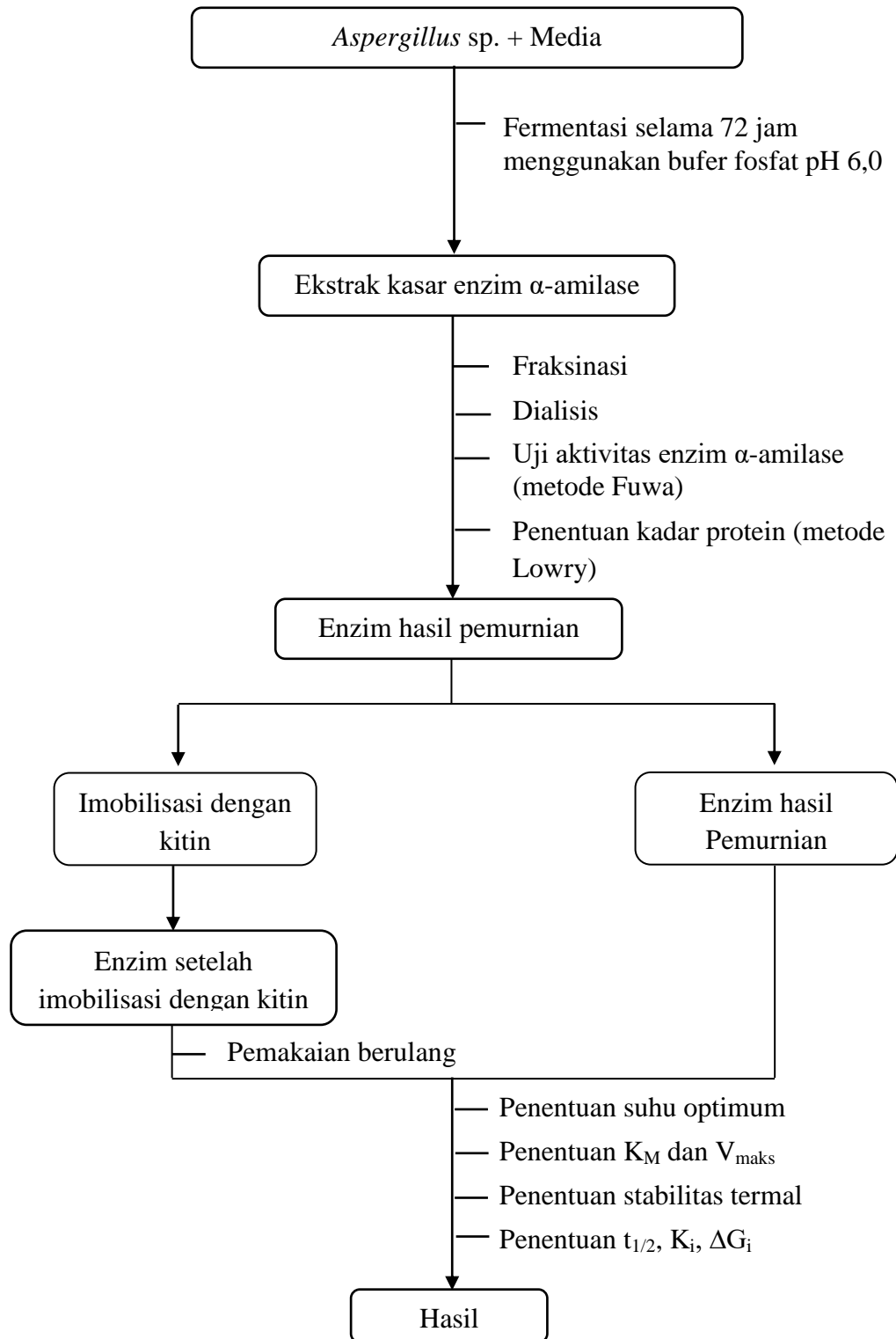
$k_i$  = konstanta laju inaktivasi termal

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

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

(Suwarso dkk., 2016).

Secara keseluruhan, penelitian ini dirangkum dalam diagram alir penelitian yang ditunjukkan dalam Gambar 6.



**Gambar 6.** Diagram alir imobilisasi enzim  $\alpha$ -amilase dari *Aspergillus* sp. menggunakan kitin.

## V. SIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Aktivitas spesifik enzim  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian hingga tahap dialisis yang berasal dari *Aspergillus* sp. adalah 2002,32 U/mg dan kemurniannya meningkat 9 kali lipat dibandingkan ekstrak kasar enzim dengan hasil 85,12 %.
2. Enzim  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian memiliki suhu optimum 55°C,  $K_M = 4,56 \text{ mg mL}^{-1}$  substrat,  $V_{maks} = 48,54 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$ ,  $k_i = 0,0164 \text{ menit}^{-1}$ ,  $t_{1/2} = 42,27 \text{ menit}$ , dan  $\Delta G_i = 104,59 \text{ kJ mol}^{-1}$ .
3. Enzim  $\alpha$ -amilase hasil imobilisasi pada matriks kitin memiliki suhu optimum 55°C,  $K_M = 4,72 \text{ mg mL}^{-1}$  substrat,  $V_{maks} = 40,98 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$ ,  $k_i = 0,0084 \text{ menit}^{-1}$ ,  $t_{1/2} = 82,52 \text{ menit}$ , dan  $\Delta G_i = 106,44 \text{ kJ mol}^{-1}$ .
4. Uji stabilitas termal pada enzim  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian pada suhu 60°C selama 80 menit menunjukkan aktivitas sisa sebesar 24 %, sedangkan enzim hasil imobilisasi dengan kitin menunjukkan aktivitas sisa sebesar 49 %.
5. Aktivitas sisa enzim  $\alpha$ -amilase hasil imobilisasi pada matriks kitin setelah pemakaian berulang ke-6 sebesar 47 %.
6. Setelah diimobilisasi pada kitin, enzim  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian mengalami peningkatan kestabilan sebesar dua kali lipat berdasarkan peningkatan waktu paruh ( $t_{1/2}$ ).

## **5.2 Saran**

Dari hasil penelitian dan pembahasan, disarankan untuk melakukan optimalisasi penggunaan kitin dalam proses imobilisasi mengenai kondisi reaksi, konsentrasi reaksi untuk meningkatkan efisiensi dan stabilitas imobilisasi. Pemurnian enzim lebih lanjut, tidak hanya menggunakan fraksinasi dan dialisis agar menghasilkan enzim dengan pemurnian yang lebih tinggi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alnadari, F., Xue, Y., Zhou, L., Hamed, Y.S., Taha, M., and Foda, M.F. 2020. Immobilization of  $\beta$ -glucosidase from *Thermatoga maritima* on chitin-functionalized magnetic nanoparticle via a novel thermostable chitin-binding domain. *Sci. Rep.* **10**(1663): 1-12.
- Anastas, P.T. and Eghbali, N. 2010. Green Chemistry: Principles and practice. *Chem. Soc. Rev.* **39**(1): 301–312.
- Ariandi, M. 2016. Pengenalan enzim amilase ( $\alpha$ -amylase) dan reaksi enzimatisnya menghidrolisis amilosa pati menjadi glukosa. *Dinamika.* **7**(1): 74–82.
- Arivo, D., dan Annissatussholeha, N. 2017. Pengaruh tekanan osmotik pH, dan suhu terhadap pertumbuhan bakteri E.Coli. *JIK.* **4**(3): 153–160.
- Awaliatul, B. 2011. *Studi Reaksi Esterifikasi Antara Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Kelapa Dengan Sukrosa Menggunakan Lipase Candida rugosa EC 3.1.1.3.* Universitas Indonesia. Jakarta.
- Azhar, M. 2016. *Biomolekul Sel Karbohidrat, Protein, dan Enzim.* UNP Press. Padang.
- Baharuddin, Rahayu, M, and Febriyanti, A. 2021. Isolation of cellulose-degrading bacteria from Luwu Timur in oil palm empty fruit bunch. *Walisongo J.Chem.* **4**(2): 139–146.
- Bintang dan Maria. 2010. *Biokimia Teknik Penelitian.* Erlangga. Jakarta.
- Bintang, M., Tri, P., and Susy,S. 2015. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on zeolit, CaCO<sub>3</sub>, silica gel, and cow bone. *Curr. Biochem.* **2**(2): 54-63.
- Deasy, N. 2016. Kandungan protein pada daging ikan roa asap yang diperoleh dari pasar tradisional Gorontalo. *Entropi.* **11**(2). 232–234.
- Dewi, Iche, dan Marina. 2008. *Isolasi bakteri dan Uji Aktivitas Kitinase Termofilik Kasar dari Sumber Air Panas Tinggi Raja, Saimalungun Sumatera Utara.* Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Faatih, M. 2009. Isolasi dan digesti DNA kromosom. *J.Penelit.Saintek.* **20**(1): 61–67.

- Fifendy dan Biomed. 2017. *Mikrobiologi*. Kencana Prenamedia. Jakarta.
- Fuwa, H. 1954. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. *J.Biochem.* **41**(5): 583–603.
- Godbole, A., Wadetwar, R. N., Lawal, T. O., Mahady, G. B., and Raut, N. A. 2023. *Microbiology of waste treatment: 360-Degree Waste Management*. Elsevier. London.
- Guisan, J. 2006. *Immobilization of enzymes and Cells*. Humana Press. Totowa.
- Irianto, K. 2013. *Parasitologi Medis*. Alfabeta. Bandung.
- Jinu, J. 2017. Amylases-bioprocess and potential applications: a review. *IJJB.* **5**(2): 41–50.
- Komi, D. E. and Michael, R. 2017. Chitin and chitosan : production and application of versatile biomedical nanomaterials. *Int. J.Adv.Res.* **4**(3): 411–427.
- Magnette, A., Chatelain, B., Ten, C., and Muller. 2016. Pre-analytical issues in the haemostatis laboratory: guidance for the clinical laboratories. *Thrombosis.* **14**(1).
- Mariyanto, S., Yandri, dan Rosa, P. 2022. Isolasi, pemurnian, dan ,modifikasi kimia enzim alpha amilase dari *Aspergillus niger* L-51 menggunakan senyawa asam glioksilat. *J.Saintek.* **1**(1): 100–111.
- Martinez, Mario, M., Joana, P., and Manuel, G. 2015. *Physicochemical Modification of Native and Extruded Wheat Flours by Enzymatic*. University of Valladolid. Spanyol.
- Mayasari. 2016. *Pemurnian Enzim Amilase Kasar dari Bakteri Amilolitik Endogenous Bekatul Secara Parsial Menggunakan Ammonium Sulfat*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik. Malang.
- Mei, S., Hana, P., Wua, H., Shib, J., Tanga, L. and Jianga, Z. 2018. One-pot fabrication of chitin-shellac composite microspheres for efficient enzyme immobilization. *J.Biotech.* **266**: 1–8.
- Moran, H., Schofield, E., White, A., and Harris, C. 2012. Study on chitin structure. *J.Mar.Biol.***47**(3):125-135.
- More, N., Daniel, M.R., Petach, H.H. 2001. Research communication the effect of low temperatures on enzyme activity. *J.Biochem.* **1995**(305): 17-20.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A. and Rodwell, V. W. 2003. *Harper's Illustrated BioChemistry. Ed ke-26*. McGraw-Hill. San Fransisco.

- Murty, J. B. and Muniswaran P, K, A. 2002. Hydrolysis of rice bran oil using immobilized lipase in a stirred batch reactor. *Biotechnol, Bioprocess Eng.* **7**: 367–370.
- Ningsih, D., Rastuti, U. dan Kamaludin, R. 2012. Karakterisasi enzim amilase dari bakteri *Bacillus amyloliquefaciens*. *Prosiding Seminar Nasional: Pengembangan Sumber Daya Pedesaan dan Kearifan Lokal Berkelanjutan II*.
- Poedjiadi, A. dan Supriyanti, T. 2006. *Dasar- Dasar Biokimia*. UI Press. Jakarta.
- Rachmawaty dan Madihah. 2013. Potensi perlakuan awal limbah kulit udang untuk produksi enzim kitinase oleh *Trichoderma Virens* pada fermentasi substrat padat. *J.Bionature*. **14**(1): 33–37.
- Rahayu, S. 2000. Pemurnian dan Karakterisasi Kitinase dan Kitin Deasetilase Termotabil dari Isolat *Bacillus K-29-14* Asal Kawah Lamojang, Jawa Barat. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Ratnayani, K.A.A., Mayun,L., Sudiarto,M. 2015. Penentuan laju reaksi maksimal ( $V_{maks}$ ) dan konstanta Michaelis-Menten ( $K_M$ ) enzim lipase pankreas pada substrat minyak kelapa, minyak sawit, dan minyak zaitu. *J.Kimia*, **9**(1), 93–97.
- Robinson, P. 2015. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem.* **59**: 1–41.
- Ruswandi, R., Oktavia, B. dan Azhar, M. 2018. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Padang. *Eksakta*. **19**(1): 1–20.
- Saropah, D. A., Jannah, A., dan Maunatin, A. 2012. Kinetika reaksi enzimatis ekstrak kasar enzim selulase bakteri selulolitik hasil isolasi dari bekatul. *Alchemy*. **2**(1): 34–45.
- Shahib, M. N. 2005. *Biologi Molekuler Medik I*. Universitas Padjajaran Press. Bandung.
- Sinatari, H., Aminin, A. L., dan Sarjono, P. 2013. Pemurnian selulase dari isolat kompas termofilik Desa Bayat Klaten menggunakan fraksinasi amonium sulfat. *J.Chem.Info*. **1**(1): 130–140.
- Suryani, Y. dan Taupiqurrahman, O. 2021. *Mikrobiologi Dasar*. Universitas Islam Negeri Sunan Gunung Djati. Bandung.
- Susanti, R. dan Fidia, F. 2017. *Teknologi Enzim*. ANDI OFFSET. Yogyakarta.
- Sutrisno, A. 2017. *Teknologi Enzim*. UB Press. Malang.

- Suwarso, N., Yandri, dan Hadi, S. 2016. Peningkatan kestabilan enzim protease dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dengan modifikasi kimia menggunakan sitrakonat anhidrida. *J.Kes.Analis.* **5**(1): 475.
- Tazkiah, N. P., Rosahdi, T., Dewi dan Supriadin, A. 2017. Isolasi dan karakterisasi enzim amilase dari biji nangka (*Artocarpus heterophyllus*). *Al-Kimiya.* **4**(1): 17–22.
- Tiarsa, E.R., Yandri, Y., Suhartati, T., Satria, H., Irawan, B., and Hadi, S. 2022. The stability improvement of *Aspergillus Fumigatus*  $\alpha$ -amylase by immobilization onto chitin-bentonite hybrid. *Biochem. Res. Int.* **2022**: 1-9.
- Viridianingsih, R. 2002. *Mempelajari Stabilitas Termal Enzim Protease dari Bacillus pumilus y1 dalam Pelarut Heksana, Toluena, dan Benzena*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Wang and Sun, N. 2009. *Starch Hydrolysis by Amylase*. Department of Chemical and Biomolecular Engineering University of Maryland. Maryland.
- Winarno, F. 2010. *Enzim Pangan*. M-Brio Press. Jakarta.
- 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  $\alpha$ -amylase enzyme from locale bacteria isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148. *Eur. J. Sci. Res.* **39**(1):64-74.
- Yandri dan Ibadurrahman. 2011. Pengaruh penambahan sorbitol terhadap stabilitas enzim protease dari *Bacillus licheniformis*. *Alchemy.* **17**(2): 59–66.
- Yandri dan Suhartati, T. 2018. *Peningkatan Kestabilan Enzim*. AURA. Bandar Lampung.
- Yandri, Nurul, N., Suhartati, T., Satria, H. dan Hadi, S. 2020. Peningkatan kestabilan enzim  $\alpha$ -amilase dengan penambahan gliserol. *Analit.* **5**(2): 143–154.
- Yandri., Suhartati, T., Satria, H., Karlinasari, S., Yuwono, S.D., and Hadi, S. 2021. Stability enhancement of *Bacillus subtilis* ITBCCB148 originating  $\alpha$ -amylase by immobilization using chitin. *J. Adv. Pharm. Educ. Res.* **11**(3): 63-69.
- Yandri., Tiarsa, E. R., Suhartati, T., Irawan, B. and Hadi, S. 2023. Immobilization and stabilization of *A.Fumigatus* alpha amylase by adsorption on a chitin. *J.emerg.sci.* **7**(1): 77–89.



- Yusak. 2004. Pengaruh Suhu dan Buffer Asetat Terhadap Hidrolisis CMC oleh Enzim Selulase dari Ekstrak *Aspergillus niger* dalam Media Campuran Onggok dan Dedak. *J.Sains Kimia*. **8**(2): 35–36.
- Yusriah dan Kuswytasari, N. D. 2013. Pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas protease *Penicillium* sp. *Pomits*. **2**(1): 48–50.
- Zdarta, J., Meyer, A., Jesionowski, T. and Pinelo, M.A. 2018. A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practicality. *Catalysts*. **8**(92): 1-27.
- Zhou, Y and Yang, Y. 2019. Osmotic pressure and its role in enzyme activity. *J. Mol. Catal. Enzym*. **154**: 1-8.