

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

(Skripsi)

Oleh

**AVI ERIYANI
NPM 2017011064**



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

ABSTRAK

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

Oleh

AVI ERIYANI

Kestabilan enzim terhadap pH dan suhu adalah faktor yang sangat penting dalam dunia industri. Enzim tidak dapat bekerja secara optimum pada suhu tinggi dan pH ekstrem sehingga perlu dilakukan peningkatan kestabilan enzim untuk mengatasi masalah tersebut.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan enzim α -amilase dari *Aspergillus* sp. dengan aktivitas dan tingkat kemurnian yang tinggi dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim. Mendapatkan enzim α -amilase hasil imobilisasi dengan matriks kitosan dari *Aspergillus* sp. yang meningkat kestabilannya dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Prosedur penelitian ini dilakukan melalui tahap berikut: produksi, isolasi, pemurnian, dan imobilisasi. Karakterisasi enzim hasil pemurnian dan enzim hasil imobilisasi.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa enzim α -amilase hasil pemurnian memiliki tingkat kemurnian sebesar 11,39 kali lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim. Uji stabilitas termal pada suhu 60°C selama 80 menit enzim hasil pemurnian menunjukkan aktivitas sisa sebesar 3,67% dan waktu paruh 17,54 menit. Sementara itu, enzim hasil imobilisasi dengan matriks kitosan menunjukkan aktivitas sisa sebesar 18,93% dengan waktu paruh 33,16 menit, dalam kondisi yang sama. Kestabilan enzim hasil imobilisasi mengalami peningkatan sebesar 1,88 kali dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian. Aktivitas sisa enzim hasil imobilisasi dengan matriks kitosan setelah pemakaian berulang sebanyak enam kali menunjukkan nilai sebesar 19,85%.

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

ABSTRACT

IMOBILIZATION OF THE ENZYME α -AMYLASE FROM *Aspergillus* sp. BY USING CHITOSAN

By

AVI ERIYANI

The stability of enzymes against pH and temperature is a very important factor in the industrial world. Enzymes cannot function optimally at high temperatures and extreme pH levels, so it is necessary to enhance enzyme stability to address this issue.

This research aims to obtain the α -amylase enzyme from *Aspergillus* sp. with higher activity and purity levels compared to crude enzyme extracts. It also seeks to obtain the immobilized α -amylase enzyme using a chitosan matrix from *Aspergillus* sp., which has enhanced stability compared to the purified enzyme. The research procedure was conducted through the following stages: production, isolation, purification, and immobilization. The enzymes were then characterized after purification and immobilization.

The results of this study indicate that the purified α -amylase enzyme has a purity level 11.39 times higher than the crude enzyme extract. The thermal stability test at 60°C for 80 minutes showed that the purified enzyme had a residual activity of 3.67% and a half-life of 17.54 minutes. Meanwhile, the immobilized enzyme with chitosan matrices showed a residual activity of 18.93% and a half-life of 33.16 minutes under the same conditions. The stability of the immobilized enzyme increased by 1.88 times compared to the purified enzyme. The residual activity of the immobilized enzyme with chitosan matrices after six repeated uses was 19.85%

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

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

Oleh

AVI ERIYANI

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 Percobaan

: **IMOBILISASI ENZIM α -AMILASE**
***Aspergillus* sp. MENGGUNAKAN KITOSAN**

Nama Mahasiswa

: **AVI ERIYANI**

Nomor Pokok Mahasiswa

: **2017011064**

Jurusan

: **Kimia**

Fakultas

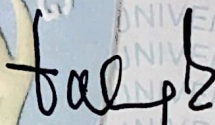
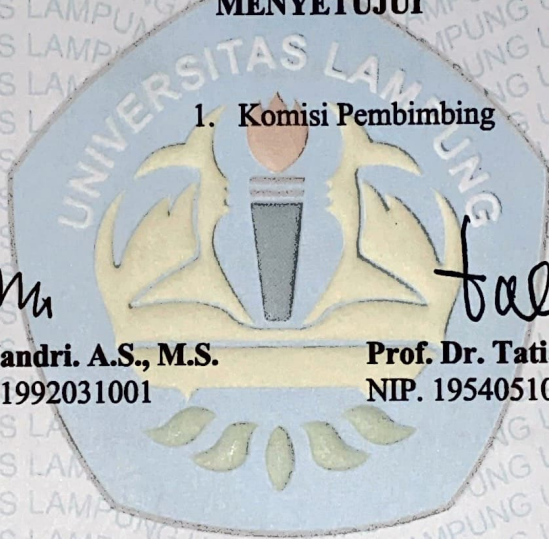
: **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

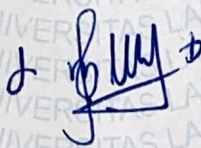


Prof. Dr. Ir. Yandri. A.S., M.S.
NIP. 195609051992031001



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

2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA



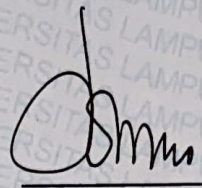
Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si.
NIP. 197205302000032001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

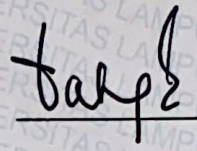
Ketua

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



Sekretaris

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



Anggota

: Prof. Drs. John Hendri., M.S. Ph.D.



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 20 Agustus 2024

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : AVI ERIYANI

NPM : 2017011064

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

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

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

Bandar Lampung, 29 Agustus 2024
Yang Menyatakan,



AVI ERIYANI
NPM. 2017011064

RIWAYAT HIDUP

Penulis Bernama lengkap Avi Eriyani, Lahir di Tulang Bawang pada tanggal 09 April 2001. Penulis merupakan anak ke tiga dari pasangan Bapak Sartono dan Ibu Sumarni. Penulis menyelesaikan Pendidikan dasar di SD Negeri 1 Gedung Asri pada tahun 2014. Kemudian, melanjutkan Pendidikan MTs Nurul Iman hingga 2017. Penulis menamatkan Pendidikan sekolah menengah atas di SMA Negeri 1 Penawar Aji pada tahun 2020. Selanjutnya, 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 Badan Eksekutif Mahasiswa (BEM) menjabat sebagai anggota Sains dan Pengabdian Masyarakat pada Periode 2021-2022 dan 2022-2023. Lalu Rohani Islam (ROIS) menjabat sebagai anggota Biro Kemuslimahan pada Periode 2021-2022. Biro Rohani Islam Mahasiswa Unila (BIROHMAH) menjabat sebagai anggota Biro Kemuslimahan pada periode 2021-2022. Koperasi Mahasiswa (KOPMA) sebagai anggota pada periode 2022-2023. Penulis juga Pernah mengikuti Lomba Program Wirausaha (PMW) pada tahun 2021, Program Kreativitas Mahasiswa (PKM) pada tahun 2021 dan 2022, Lomba Kewirausahaan tingkat daerah pada tahun 2021 Menjadi 10 Besar terbaik. Penulis juga pernah menjadi Bendahara pelaksana Karya Wisata Ilmiah (KWI XXXIII) pada tahun 2022.

Pada bulan Maret-Agustus 2023 penulis telah menyelesaikan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Laboratorium Biokimia, pada tahun 2023 penulis juga melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Way Sindi, Kecamatan Karya Penggawa, Kabupaten Pesisir Barat sebagai bentuk pengabdian kepada masyarakat. Pada tahun 2024 penulis menyelesaikan penelitian yang dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung dengan judul “Imobilisasi Enzim α -Amilase dari *Aspergillus* sp. Menggunakan Kitosan”.

MOTTO

"Belajar dari masa lalu, hidup untuk hari ini, dan rencanakan untuk masa depan"

"Barangsiapa yang mengerjakan kebaikan sekecil apa pun, niscaya dia akan melihat (balasan)nya"
(Q.S Al Zalzalah: 7)

"Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan, sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan"
(Q.S Al Insyirah: 5-6)

"Barangsiapa yang menempuh suatu jalan untuk menuntut ilmu, maka Allah Swt akan memudahkan baginya jalan menuju surga."
(HR. Muslim)

"Barangsiapa yang menghendaki kebaikan di dunia maka dengan ilmu. Barangsiapa yang menghendaki kebaikan di akhirat maka dengan ilmu. Barangsiapa yang menghendaki keduanya maka dengan ilmu"
(HR. Bukhori dan Muslim)

PERSEMBAHAN

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT atas Rahmat-Nya serta sholawat dan salam kepada kekasih Allah, Nabi Muhammad SAW



Dengan segala kerendahan hati, karya sederhana ini kupersembahkan kepada:

**Kedua orang tuaku tercinta dan saudaraku Bapak Sartono, Ibu Sumarni
dan Kakak Tersayang Eli Yanto dan Miswanto**

Yang senantiasa memberikan motivasi, nasihat, cinta dan kasih, do'a, dan dukungan secara moril dan finansial kepadaku selama ini.

**Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri AS., M.S., Ibu Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S.,
Bapak Prof. Drs. John Hendri., M.S. Ph.D.
dan seluruh dosen Jurusan Kimia**

Terima kasih telah mendidik, membimbing, dan memberikan wawasan selama saya menempuh pendidikan di kampus. Semoga Allah SWT membalas kebaikan bapak dan ibu kelak, Aamiin.

Keluarga besar dan sahabat-sahabat seperjuangan

Almamater tercinta

Dan

Diriku

SANWACANA



Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya. Shalawat dan salam senantiasa kita sanjung agungkan kepada junjungan kita Nabi Muhammad SAW yang senantiasa diharapkan syafa'atnya hingga hari akhir kelak, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul: **“Imobilisasi Enzim α -Amilase dari *Aspergillus* sp. Menggunakan Kitosan”**. Skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

Selama proses penyusunan skripsi ini, penulis banyak menerima bantuan, bimbingan, kritik, saran, dan semangat dari berbagai pihak baik secara langsung maupun tidak langsung. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri AS., M.S., sebagai pembimbing pertama penulis. Terima kasih atas bimbingan, arahan, dukungan, dan ilmu pengetahuan yang telah diberikan kepada penulis mulai dari saat penulis melaksanakan Praktik Kerja Lapangan hingga melaksanakan penelitian untuk menuntaskan tugas akhir ini.
2. Ibu Pof. Dr. Tati Suhartati, M.S., sebagai pembimbing kedua penulis. Terima kasih atas kritik dan saran terhadap format penulisan tugas akhir penulis dan saran atas diksi-diksi yang terdapat dalam tugas akhir penulis.

3. Bapak Prof. Drs. John Hendri., M.S. Ph.D., sebagai pembahas tugas akhir penulis. Terima kasih karena telah memberikan masukan-masukan yang membangun untuk kemudian dijadikan sebuah pembelajaran oleh penulis.
4. Bapak Dr. Sonny Widiarto, S.Si., M.Sc., selaku dosen Pembimbing Akademik penulis. Terima kasih telah membimbing dan selalu memberi arahan kepada penulis mengenai bimbingan akademik dan pengenalan tentang perkuliahan sejak penulis menjadi mahasiswa baru hingga menyelesaikan tugas akhir ini.
5. Ibu Dr. Mita Rilyanti, M.Si., selaku ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
6. Ibu Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si., selaku Sekretaris Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
7. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, M.Si., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
8. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung yang telah memberikan ilmu, baik dalam bidang akademik maupun non akademik.
9. Laboran, staff administrasi, satuan pengaman, dan seluruh pegawai di lingkungan Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
10. Kepada yang tersayang, Bapak dan mama penulis, yang selalu memberikan nasihat, arahan, semangat, serta dukungan moril dan finansial kepada penulis. Terima kasih karena selalu mendukung pilihan penulis, terima kasih atas cinta dan kasih sayang yang selalu diberikan di setiap jalan penulis menempuh pendidikan, terima kasih atas do'a yang selalu dipanjatkan kepada Allah SWT sehingga penulis selalu diberikan dan diberkahi kelancaran dalam setiap urusan dalam menyelesaikan pendidikan.
11. Kepada yang terkasih, saudara kandung penulis, Eli Yanto dan Miswanto. Terima kasih telah memberi semangat dan do'a kepada penulis. Terima kasih pula kepada keluarga besar penulis yang selalu mendukung dan mendoakan penulis.

12. Kepada yang terkasih Nyono Santoso, S.Pd., terima kasih telah menjadi salah satu penyemangat, pendengar keluh kesah dalam penulisan skripsi, penasehat yang baik dan senantiasa memberikan kasih sayangnya kepada penulis.
13. Partner kerja laboratorium, Stephani Marisca Febrianti, Maria Agustina Sidabutar dan Rusmauli Defana Panjaitan, terima kasih atas bahu, telinga, pengorbanan waktu istirahat, keringat, dan air mata yang telah dikorbankan selama menjalankan penelitian bersama penulis di laboratorium.
14. Terima kasih kepada Stephani, Depa, Maria, Bunga, Anggun, Muti, Geo, Rahmat, Najla, Erlisa, Anin, ribka dan ratih. Terima kasih kepada grup dadakan: Rahmat, Nurdiana, Carlos, Hinaya, Maria, Depa, Step. Terima kasih atas ilmu dan pengalaman yang diberikan selama penulis menyelesaikan tugas akhir ini, terima kasih telah mewarnai hari-hari penulis selama menjalankan penelitian di laboratorium.
15. Terima kasih kepada sahabat saya Annisa Urbaningrum dan Alda Nurmala Dewi. Terima kasih telah menjadi pendengar keluh kesah yang baik dan memberikan semangat pada penulis selama penulisan skripsi.
16. Terim kasih kepada kak Steven, kak Santa, dan kak Ejak yang telah memberikan saran, masukan dan kritik yang membangun bagi penulis.
17. Kepada seluruh mahasiswa Kimia Angkatan 2020 yang namanya tidak dapat penulis sebutkan satu per satu, yang secara langsung maupun tidak langsung membantu penulis menyelesaikan tugas akhir ini.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan dan kesalahan dalam penyusunan skripsi ini. Namun, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat untuk perkembangan ilmu dan pengetahuan di masa depan.

Bandar Lampung, 29 Agustus 2024
Penulis

AVI ERIYANI

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL.....	xvii
DAFTAR GAMBAR.....	xxix
DAFTAR RUMUS	xxi
DAFTAR LAMPIRAN	xxii
1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan penelitian	3
1.3. Manfaat Penelitian	3
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Enzim	4
2.1.1 Suhu	6
2.1.2 pH	6
2.1.3 Inhibitor	7
2.1.4 Kofaktor logam.....	7
2.2 Kinetika Reaksi enzim	8
2.3 Stabilitas Enzim	9
2.3.1 Stabilitas Termal Enzim	10
2.3.2 Stabilitas pH enzim.....	11
2.4 Isolasi dan Pemurnian Enzim.....	11
2.4.1 Sentrifugasi.....	12
2.4.2 Fraksinasi dengan Amonium Sulfat	12
2.4.3 Dialisis.....	13
2.5 Penentuan Aktivitas Katalitik dan Kadar Protein	
Enzim α -Amilase	14
2.5.1 Metode Fuwa	14
2.5.2 Metode Mandels	15
2.5.3 Metode Lowry.....	15
2.6 <i>Aspergillus</i> sp.....	16
2.7 Kitosan	17
2.8 Imobilisasi Enzim	20
2.9 Analisis Spektroskopi Ultraviolet-Visible (UV-Vis).....	22

III. METODE PENELITIAN	24
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	24
3.2 Alat dan Bahan.....	24
3.3 Prosedur Penelitian	25
3.3.1 Pembuatan media inokulum, fermentasi dan larutan pereaksi.....	25
3.3.2 Uji aktivitas α -amilase dan penentuan kadar protein	28
3.3.3 Fraksinasi dengan amonium sulfat.....	30
3.3.4 Penentuan pola fraksinasi kedua	31
3.3.5 Dialisis	33
3.3.6 Imobilisasi enzim hasil pemurnian dengan kitosan	33
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	37
4.1 Produksi dan Isolasi Enzim α -amilase	37
4.2 Fraksinasi dengan Amonium Sulfat.....	37
4.3 Dialisis	40
4.4 Penentuan pH Pengikatan Enzim Hasil Pemurnian dengan Kitosan	41
4.5 Penentuan Suhu Optimum	42
4.6 Penentuan K_m dan V_{maks} Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Imobilisasi pada Matriks Kitosan	43
4.7 Penentuan Kestabilan Termal Enzim Hasil Pemurnian dan Hasil Imobilisasi pada Matriks kitosan.....	44
4.8 Penentuan Konstanta Laju Inaktivasi Termal (k_i), Waktu Paruh ($t_{1/2}$), dan Perubahan Energi Bebas Akibat Denaturasi (ΔG_i) Enzim Hasil Pemurnian dan Hasil Imobilisasi pada Matriks Kitosan	45
4.9 Pemakaian Berulang Enzim Hasil Imobilisasi pada Matriks Kitosan.....	47
V. SIMPULAN DAN SARAN	48
5.1 Simpulan	48
5.2 Saran	49
DAFTAR PUSTAKA.....	50

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Peningkatan kestabilan termal enzim α -amilase yang diimobilisasi dengan matriks zeolite/kitosan dan bentonit/kitosan	5
2. Berbagai penelitian imobilisasi enzim dengan berbagai matriks.....	21
3. Rangkuman hasil perhitungan massa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (gram) yang ditambahkan untuk fraksinasi dengan berbagai persentase kejenuhan	32
4. Hasil pemurnian enzim α -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp	40
5. Nilai K_M dan V_{maks} enzim α -amilase hasil pemurnian imobilisasi pada matriks kitosan.	44
6. Nilai k_i , $t_{1/2}$, dan ΔG_i enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks kitosan	47
7. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode Fuwa (λ_{maks} : 600 nm) pada ekstrak kasar enzim, hasil fraksinasi dan hasil dialisis.....	59
8. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode Lowry (λ_{maks} : 750 nm) pada ekstrak kasar enzim, hasil fraksinasi, dan dialisis.	61
9. Hubungan antara berbagai tingkat kejenuhan amonium sulfat dengan aktivitas unit, kadar protein, dan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp.	62
10. Hubungan antara tingkat kejenuhan amonium sulfat (0-20)% dan (20-95)% dengan aktivitas unit, kadar protein, dan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp.....	62
11. Hubungan antara absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim α -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp. menggunakan matriks kitosan dalam berbagai pH.....	63
12. Hubungan antara suhu dengan absorbansi, aktivitas, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim hasil pemurnian.....	64

13. Hubungan antara suhu dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim hasil imobilisasi menggunakan matriks kitosan	64
14. Hubungan antara konsentrasi substrat dengan aktivitas unit, dan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp. hasil pemurnian	65
15. Hubungan antara konsentrasi substrat dengan aktivitas unit, dan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp. hasil imobilisasi menggunakan matriks kitosan	65
16. Data grafik Lineweaver-Burk enzim α -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp. hasil imobilisasi menggunakan matriks kitosan.....	66
17. Hubungan antara aktivitas unit, aktivitas sisa dan laju inaktivasi termal ($\ln E_i/E_0$) enzim α -amilase hasil pemurnian dengan variasi waktu inaktivasi pada suhu 60 °C	67
18. Hubungan antara aktivitas unit, aktivitas sisa dan laju inaktivasi termal ($\ln E_i/E_0$) enzim α -amilase hasil imobilisasi menggunakan matriks kitosan 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 kitosan selama inaktivasi termal pada suhu 60 °C	68
20. Perhitungan waktu paruh ($t_{1/2}$) enzim hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks kitosan	69
21. Pemakaian berulang enzim hasil imobilisasi	67
22. Perhitungan waktu paruh ($t_{1/2}$) enzim hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks kitosan	71
23. Absorbansi BSA pada berbagai konsentrasi	71
24. Absorbansi glukosa pada berbagai konsentrasi	72

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Diagram <i>Lineweaver-Burk</i>	9
2. Reaksi antara DNS dengan Glukosa	15
3. <i>Aspergillus</i> sp.	16
4. Struktur Kitosan	17
5. Serbuk Kitosan.....	19
6. Skema Metode Imobilisasi Enzim	22
7. Skema Proses Fraksinasi Enzim Dengan Amonium Sulfat	31
8. Diagram Alir Imobilisasi Enzim α -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp. menggunakan kitosan	36
9. Hubungan Antara Aktivitas Unit Enzim dengan Tingkat Kejenuhan Amonium Sulfat 0-90%	38
10. Hubungan Antara Aktivitas Unit Enzim dengan Tingkat Kejenuhan Amonium Sulfat 0-95%	39
11. Aktivitas Unit Enzim α -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp. Hasil Pemurnian Dalam Berbagai pH.	41
12. Suhu Optimum Enzim α -amilase Hasil Pemurnian dan Hasil Imobilisasi Pada Matriks Kitosan ...	42
13. Grafik <i>Lineweaver-Burk</i> Enzim α -amilase Hasil Pemurnian dan Hasil Imobilisasi Pada Matriks Kitosan.....	44
14. Stabilitas Termal Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Imobilisasi Dengan Matriks Kitosan	45
15. Grafik Laju Inaktivasi Termal Enzim A-Amilase Hasil Pemurnian dan Hasil Imobilisasi Pada Matriks Kitosan.....	46

16. Pemakaian Berulang Enzim Imobilisasi dengan Matriks Kitosan.....	47
17. Kurva Standar BSA.....	71
18. Kurva Standar glukosa	72

DAFTAR RUMUS

Rumus	Halaman
1. <i>Lineweaver-Burk</i>	9
2. Aktivitas Unit Metode Fuwa.....	28
3. Aktivitas Unit Metode Mandels.....	29
4. Laju Inaktivasi Termal Enzim Orde Satu	35
5. Perubahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i).....	35
6. Kadar protein Metode Lowry.....	73
7. Aktivitas spesifik	73
8. Aktivitas total.....	73
9. Protein total.....	73
10. Hasil (%).....	73
11. <i>Purity</i>	73

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Data Hasil Pengukuran Absorbansi Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis	59
2. Penentuan Pola Fraksinasi	62
3. Data pH Pengikatan Enzim dan Matriks Pengimobil	63
4. Data Penentuan Suhu Optimum Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Imobilisasi menggunakan Matriks Kitosan	64
5. Data Penentuan K_M dan V_{maks} Enzim hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Imobilisasi Menggunakan Matriks Kitosan	65
6. Data Kestabilan Termal	67
7. Data Grafik Lanju Inaktivasi Termal Orde Satu	68
8. Perhitungan Waktu Paruh ($t_{1/2}$)	69
9. Perhitungan Perubahan Energi Bebas Akibat Denaturasi (ΔG_i)	69
10. Data pemakaian berulang enzim hasil imobilisasi pada matriks kitosan	71
11. Kurva Standar <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA)	71
12. Kurva Standar Glukosa	72
13. Persamaan Untuk Kuantitasi Pada Saat Sebelum dan Sesudah Pemurnian	73

1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Industri kimia berdampak besar dalam meningkatkan kesejahteraan manusia dengan menghasilkan berbagai produk seperti obat-obatan, bahan bakar, pangan, dan penyediaan air yang aman untuk dikonsumsi (Colberg *et al.*, 2022). Namun, industri kimia juga berdampak negatif terhadap lingkungan, misalnya terjadinya pencemaran lingkungan serta limbah industri menyebabkan polusi tanah (Godbole *et al.*, 2023). Untuk mengatasi masalah ini, diterapkan prinsip kimia hijau guna menghindari penggunaan bahan kimia berbahaya dalam proses industri.

(Nurbaity, 2011; Amyyana *et al.*, 2017). Dalam kimia berkelanjutan, digunakan enzim seperti α -amilase yang menghidrolisis ikatan α -1,4 glikosidik dalam pati dan mempunyai manfaat dalam bidang industri kimia sebagai biokatalisator (Cipolatti *et al.*, 2019; Irdawati dkk., 2015). Kelebihan dari produk akhir yang dihasilkan enzim α -amilase, yaitu dapat mengurangi biaya pemurnian, mudah diproduksi, serta mengurangi kerusakan terhadap lingkungan (Zdarta *et al.*, 2018).

Mikroorganisme yang banyak digunakan untuk menghasilkan α -amilase yaitu jamur dan bakteri. Jamur banyak digunakan sebagai penghasil enzim α -amilase karena mempunyai kelebihan di antaranya enzim yang dihasilkan lebih stabil jika dibandingkan dengan enzim yang dihasilkan dari bakteri sehingga lebih menguntungkan jika digunakan dalam industri (Jayanti dkk., 2013). Salah satu spesies dalam genus *Aspergillus* yang diketahui mampu memproduksi enzim α -amilase adalah *Aspergillus* sp. .

Saat akan diaplikasikan dalam industri kimia, faktor kestabilan enzim α -amilase perlu diperhatikan karena enzim kurang mampu bekerja secara optimum pada pH dan suhu yang ekstrem. Salah satu metode yang digunakan untuk meningkatkan kestabilan enzim α -amilase, yaitu imobilisasi dengan adsorpsi fisik karena tidak menyebabkan kerusakan pada konformasi enzim atau destruksi pada pusat aktif enzim (Jayanti dkk., 2013). Imobilisasi memiliki keuntungan seperti meningkatkan aktivitas dan stabilitas enzim, serta kemudahan dalam memperoleh enzim setelah dilakukan imobilisasi (Kharrat *et al.*, 2011).

Matriks yang digunakan dalam imobilisasi, yaitu matriks yang tidak larut dalam air, salah satunya matriks pendukung yang digunakan untuk imobilisasi enzim, yaitu kitosan. Pemanfaatan kitosan sebagai media pendukung imobilisasi sebelumnya telah dilakukan yaitu untuk imobilisasi enzim α -amilase dari *Bacillus Subtilis* ITBCCB148 oleh (Yandri *et al.*, 2022a) dan terbukti hasil imobilisasi dengan menggunakan kitosan dapat meningkatkan stabilitas enzim sebesar 4,65 kali dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian serta memiliki aktivitas sisa sebesar 10,97% setelah lima kali penggunaan kembali enzim.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya yaitu, imobilisasi enzim α -amilase dari *Bacillus Subtilis* ITBCCB148 menggunakan kitosan (Yandri *et al.*, 2022a), maka pada penelitian ini dilakukanlah imobilisasi enzim α -amilase dari *Aspergillus* sp. menggunakan kitosan sebagai matriks pendukung. Penggunaan matriks ini belum pernah dilakukan pada enzim α -amilase dari *Aspergillus* sp. dan diharapkan dapat meningkatkan kestabilan enzim α -amilase.

1.2. Tujuan penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mendapatkan enzim α -amilase dari *Aspergillus* sp. dengan aktivitas dan tingkat kemurnian yang tinggi dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim.
2. Mendapatkan enzim α -amilase hasil imobilisasi dengan matriks kitosan dari *Aspergillus* sp. yang meningkat kestabilannya dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian.

1.3. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai kemampuan kitosan sebagai agen pengimobilisasi enzim α -amilase dalam meningkatkan kestabilan enzim.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Enzim

Enzim merupakan protein yang berfungsi sebagai katalis yang mampu mempercepat proses reaksi tanpa harus bereaksi sempurna dalam reaksi kimia organik (Hao *et al.*, 2006). Menurut Poedjiadi (1994), fungsi suatu enzim yaitu sebagai katalis untuk proses biokimia yang terjadi di dalam sel maupun di luar sel. Suatu enzim dapat mempercepat reaksi 10^8 hingga 10^{11} kali lebih cepat dibandingkan reaksi yang dilakukan tanpa katalis. Selain itu, enzim dapat bertindak sebagai katalis dengan sangat efisien dan dengan spesifisitas yang tinggi. Seperti katalis lainnya, enzim dapat mengurangi energi aktivasi suatu reaksi kimia.

Kelebihan enzim sebagai katalis dibandingkan dengan katalisator sintetik antara lain (1) enzim mempunyai spesifitas tinggi, (2) enzim bekerja secara spesifik (hanya mengkatalisis substrat tertentu), (3) tidak berbentuk produk samping yang tidak ada diinginkan, (4) mempunyai produktivitas tinggi, (5) produk akhir pada umumnya tidak terkontaminasi, sehingga mengurangi biaya pemurnian dan mengurangi dampak negatif terhadap lingkungan (Chaplin *and* Bucke, 1990). Keuntungan lain dari enzim adalah dapat bekerja pada kondisi yang mudah digunakan sehingga dapat mengurangi konsumsi energi (suhu dan tekanan tinggi). Hal ini membuat reaksi yang dikatalisis oleh enzim menjadi lebih efisien dibandingkan dengan reaksi yang dikatalis oleh katalisis kimia (Junita, 2002). Enzim dapat bekerja secara efektif dan efisien pada suhu dan tingkat pH tertentu, akan tetapi aktivitasnya menurun pada kondisi di atas atau di bawah suhu tertentu. Aktivitas enzim tidak hanya dipengaruhi oleh suhu dan pH tetapi juga oleh faktor-faktor seperti konsentrasi.

Enzim yang berperan dalam mengubah karbohidrat kompleks adalah karbohidrase, amilase, dan selulase. Amilase adalah enzim yang berfungsi untuk memecah pati dan polisakarida lainnya menjadi monosakarida, suatu bentuk gula yang dapat diserap tubuh. Selain itu, amilase digunakan dalam proses industri. Amilase terdiri dari tiga jenis, yaitu α -amilase, β -amilase, dan γ -amilase. α -amilase terdapat dalam ludah dan pankreas. Enzim ini memecah ikatan 1,4 glikosidik yang terdapat pada pati dan disebut enzim amilase karena memecah bagian dalam atau bagian tengah molekul amilum (Tazkiah dkk., 2017). β -amilase terdapat pada tumbuhan dan dikenal sebagai ekso amilase, karena secara berurutan memecah dua unit glukosa yang ada pada ujung molekul amilum secara berurutan sehingga pada akhirnya membentuk maltose. γ -amilase terdapat dalam hati. Enzim ini dapat memecah ikatan 1,4 dan 1,6 pada glikogen dan menghasilkan glukosa (Tazkiah dkk., 2017). Amilase merupakan enzim yang memecah pati dan diproduksi oleh berbagai organisme seperti bakteri, jamur, tumbuhan, dan manusia (Arunsasi *et al.*, 2010).

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

Tabel 1. Peningkatan kestabilan termal enzim α -amilase yang diimobilisasi dengan matriks zeolite/kitosan dan bentonit/kitosan.

Sumber Enzim	Matriks	Suhu	Durasi	Aktivitas Sisa (%)		Ref.
				Enzim Bebas	Enzim Imobil	
<i>A. fumigatus</i>	Zeolit/Kitosan	60°C	80 min	21,50	72,28	(Yandri <i>et al.</i> , 2022)
<i>A. fumigatus</i>	Bentonit/Kitosan	60°C	80 min	7,42	59,61	(Yandri <i>et al.</i> , 2023)

Beberapa faktor-faktor yang mempengaruhi kerja enzim adalah sebagai berikut :

2.1.1 Suhu

Suhu atau temperatur dapat mempengaruhi aktivitas enzim. Pada suhu rendah, reaksi enzimatik berlangsung lambat, peningkatan suhu akan mempercepat reaksi, sehingga suhu optimum tercapai dan reaksi enzimatik mencapai maksimum. Peningkatan suhu melewati suhu optimum akan menyebabkan enzim terdenaturasi dan dapat menurunkan kecepatan reaksi enzimatik (Wuryanti, 2004). Suhu menentukan aktivitas suatu enzim ketika mengkatalisis suatu reaksi. Semua enzim memerlukan sejumlah panas agar dapat berfungsi. Semakin tinggi suhu maka aktivitas enzim juga semakin meningkat.

Secara umum, ketika suhu dinaikkan hingga 100 °C di atas suhu optimum, aktivitas enzim menjadi dua kali lipat. Aktivitas enzim meningkat pada tingkat ini hingga kondisi optimal tercapai. Peningkatan suhu melebihi suhu optimal akan menyebabkan ikatan pada struktur enzim melemah (Pertiwi, 2008). Pada suhu maksimum enzim akan mengalami denaturasi karena struktur protein terbuka dan gugus non polar di dalam molekul terbuka, kelarutan protein dalam air polar menurun sehingga aktivitas enzim menurun (Lehninger, 1997).

2.1.2 pH

Menurut Lehninger (1998), pH berpengaruh terhadap kecepatan aktivitas enzim dalam mengkatalis suatu reaksi. Hal ini dikarenakan konsentrasi ion hidrogen dapat mempengaruhi ukuran struktur enzim dan aktivitasnya. Setiap enzim memiliki pH optimal, pada pH struktur tiga dimensinya mengikat substrat paling efisien. Jika konsentrasi ion hidrogen menyimpang dari konsentrasi optimal, aktivitas enzim akan hilang hingga enzim menjadi tidak aktif. Palmer (1981), selain aktivitas enzim yang menurun akibat perubahan pH, akibat perubahan ion, substrat dan enzim. Pada rentang penyimpangan pH yang luas, perubahan pH akan menyebabkan denaturasi enzim akibat terganggunya interaksi non-kovalen yang menjaga struktur tiga dimensi enzim (Baehaki, 2005).

2.1.3 Inhibitor

Inhibitor atau penghambat reaksi enzim adalah berkurangnya laju reaksi enzim akibat adanya senyawa kimia tertentu dalam larutan substrat enzim (Mara, 1999). Molekul atau ion yang dapat menghambat reaksi tersebut dinamakan inhibitor (Poedjiadi, 1994). Secara umum inhibitor bekerja dengan cara menyerang sisi aktif enzim sehingga tidak dapat lagi berikatan dengan substrat hingga fungsi katalitiknya terganggu (Winarno, 1986).

2.1.4 Kofaktor logam

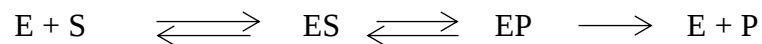
Kofaktor adalah suatu faktor yang membantu keaktifan enzim. Ikatan antara kofaktor dengan enzim dapat sangat kuat dan ada pula yang tidak terikat dengan kuat (Poedjiadi, 1994). Terdapat senyawa kofaktor berupa ion logam yang mampu meningkatkan aktivitas kerja enzim yang disebut sebagai aktivator enzim. Terdapat juga ion logam yang menghambat aktivitas enzim yang disebut inhibitor enzim (Sumardjo, 2006).

Kemampuan beberapa logam untuk mengikat ke beberapa ligan pada medan koordinasi logam menyebabkan logam ikut mengikat substrat atau koenzim pada enzim dan menginduksi polarisasi gugus reaktif pada posisi aktif. Ion logam dapat mendukung kinerja katalitik enzim. Ion logam dapat memfasilitasi reaksi yang dikatalisis dengan mengikat substrat pada pemotongan. Selain berperan dalam mengikat enzim ke substrat, beberapa ion logam juga dapat berikatan langsung dengan enzim untuk menstabilkan aktivitasnya atau menginduksi pembentukan situs pengikatan atau situs aktif enzim (Baehaki dan Budiman, 2011).

2.2 Kinetika Reaksi enzim

Konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) merupakan parameter dalam kinetika reaksi enzim. Kinetika enzim adalah salah satu cabang enzimologi yang membahas faktor-faktor yang mempengaruhi kecepatan reaksi enzimatis. Salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah konstanta substrat. Konsentrasi substrat ini dapat divariasikan untuk mempelajari mekanisme suatu reaksi enzim, yakni bagaimana tahap-tahap terjadinya pengikatan substrat oleh enzim maupun pelepasan produknya (Suhartono, 1989).

Berdasarkan postulat Michaelis-Menten pada suatu reaksi enzimatis terdiri dari beberapa fase yaitu pembentukan kompleks enzim substrat (ES), E adalah enzim dan S adalah substrat, modifikasi dari substrat membentuk produk (P) yang masih terikat dengan enzim (EP), dan pelepasan produk dari molekul enzim (Shahib, 2005). Berikut merupakan persamaan Michaelis-Menten:



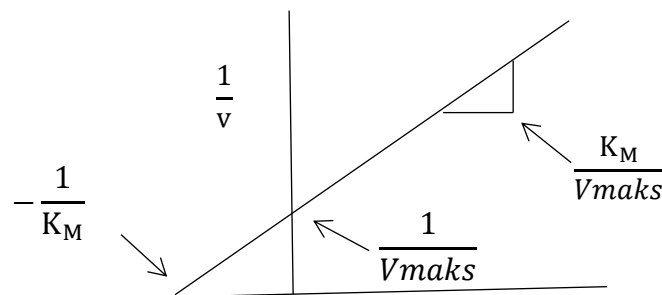
Setiap enzim memiliki sifat dan karakteristik yang spesifik seperti yang ditunjukkan pada sifat spesifisitas interaksi enzim terhadap substrat yang dinyatakan dengan nilai tetapan Michaelis-Menten (K_M). Nilai K_M didefinisikan sebagai konsentrasi substrat tertentu pada saat enzim mencapai kecepatan setengah kecepatan maksimum. Setiap enzim memiliki nilai V_{maks} dan K_M yang khas dengan substrat spesifik pada suhu dan pH tertentu (Kamelia dkk., 2005). Nilai K_M yang kecil menunjukkan bahwa kompleks enzim substrat memiliki afinitas tinggi terhadap substrat, sedangkan jika nilai K_M suatu enzim besar maka enzim tersebut memiliki afinitas rendah terhadap substrat (Page, 1989).

Persamaan Lineweaver-Burk, yang ditunjukkan pada Persamaan 1, merupakan bentuk lain dari persamaan Michaelis-Menten. Ketika persamaan Lineweaver-Burk diubah menjadi bentuk linear regresi, maka didapatkan suatu persamaan Lineweaver-Burk yang ditunjukkan dalam Gambar 1.

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

Keterangan: K_M = konstanta Michaelis; V_{maks} = laju reaksi maksimum; v = laju reaksi awal; dan $[S]$ = konsentrasi substrat (Robinson, 2015).

K_M dan V_{maks} dapat diperoleh dengan melakukan pengukuran aktivitas unit enzim pada sejumlah konsentrasi substrat yang berbeda, kemudian hasilnya diplotkan pada grafik Lineweaver-Burk. Aktivitas unit enzim berbanding lurus dengan laju reaksi enzimatik. Ilustrasi grafik Lineweaver-Burk diperlihatkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Grafik *Lineweaver-Burk* (Suhartono, 1989).

2.3 Stabilitas Enzim

Stabilitas enzim merupakan sifat penting yang harus dimiliki oleh enzim sebagai biokatalis. Enzim dikatakan stabil apabila enzim dapat mempertahankan aktivitasnya selama proses penyimpanan dan penggunaan, selain itu enzim dapat mempertahankan kestabilannya terhadap berbagai senyawa yang bersifat merusak enzim seperti pelarut tertentu (asam atau basa) dan oleh pengaruh suhu serta pH yang ekstrim (Wiseman, 1985). Beberapa cara yang dapat digunakan untuk meningkatkan stabilitas enzim adalah penggunaan zat aditif, modifikasi kimia, imobilisasi dan penggunaan rekayasa protein (Illanes, 1999; Yandri *et al.*, 2020b). Terdapat dua cara yang dapat dilakukan untuk mendapatkan enzim yang mempunyai stabilitas tinggi, yaitu menggunakan enzim yang memiliki stabilitas

ekstrak alami dan mengusahakan peningkatan stabilitas enzim yang secara alami tidak atau kurang stabil (Junita, 2002).

2.3.1 Stabilitas Termal Enzim

Pada suhu yang terlalu rendah kemantapan enzim tinggi, tetapi aktivitasnya rendah. Sedangkan pada suhu yang terlalu tinggi aktivitas enzim tinggi, tetapi kemantapannya rendah. Daerah suhu saat kemantapan dan aktivitas enzim cukup besar disebut suhu optimum untuk enzim tersebut (Wirahadikusumah, 1977). Dalam industri, pada proses reaksinya biasanya menggunakan suhu yang tinggi. Penggunaan suhu yang tinggi bertujuan untuk mengurangi tingkat kontaminasi dan masalah-masalah viskositas serta meningkatkan laju reaksi. Namun, pada suhu yang tinggi ini merupakan masalah utama dalam stabilitas enzim, karena enzim umumnya tidak stabil pada suhu tinggi. Penggunaan enzim dalam industri umumnya dilakukan pada suhu relatif rendah, misalnya pada suhu 50-60 °C (untuk glukamilase dan glukosa isomerase) atau lebih rendah. Penggunaan enzim pada suhu yang lebih tinggi hingga 85-100 °C hanya dijumpai pada proses hidrolisis pati dengan menggunakan α -amilase bakterial. Oleh sebab itu, diperlukan enzim yang stabilitas termal pada rentang suhu yang tinggi.

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

- a. Adanya pembukaan partial (partial *unfolding*) struktur sekunder, tersier atau kuaterner molekul enzim.
- b. Perubahan struktur primer enzim karena adanya kerusakan asam amino-asam amino tertentu oleh panas (Ahen and Klivanov, 1987).

Air memegang peranan penting pada kedua tahap di atas. Oleh karena itu, dengan menggunakan air seperti pada kondisi mikroakueus, reaksi inaktivasi oleh panas dapat diperlambat dan stabilitas termal enzim akan meningkat. Stabilitas termal enzim akan jauh lebih tinggi dalam kondisi kering dibandingkan dalam kondisi basah. Adanya air sebagai pelumas membuat konformasi suatu molekul enzim

menjadi sangat fleksibel, sehingga bila air dihilangkan molekul enzim akan menjadi lebih kaku (Virdianingsih, 2002).

2.3.2 Stabilitas pH enzim

Semua reaksi enzim dipengaruhi oleh pH medium tempat reaksi terjadi (Suhartono, 1989). Stabilitas enzim dipengaruhi oleh banyak faktor seperti suhu, pH, pelarut, kofaktor, dan kehadiran surfaktan (Eijink *et al.*, 2005). Dari faktor-faktor tersebut, pH memegang peranan penting. Diperkirakan perubahan keaktifan pH lingkungan disebabkan terjadinya perubahan ionisasi enzim, substrat atau kompleks enzim substrat. Enzim menunjukkan aktivitas maksimum pada kisaran pH optimum enzim dengan stabilitas yang tinggi (Winarno, 1986).

Pada reaksi enzimatik, sebagian besar enzim akan kehilangan aktivitas katalitiknya secara tepat dan *irreversible* pada pH yang jauh dari rentang pH optimum untuk reaksi enzimatik. Inaktivasi ini terjadi karena *unfolding* molekul protein sebagai hasil dari perubahan kesetimbangan elektrostatis dan ikatan hidrogen (Kazan *et al.*, 1997).

2.4 Isolasi dan Pemurnian Enzim

Isolasi dan pemurnian enzim merupakan proses yang melibatkan beberapa tahap, yaitu ekstraksi, pengendapan protein, sentrifus, dialisis, dan pemisahan dengan kromatografi kolom (Brockhoff and Jensen, 1974). Enzim dapat diisolasi secara ekstraseluler dan intraseluler. Enzim ekstraseluler merupakan enzim yang bekerja di luar sel sedangkan enzim intraseluler merupakan enzim yang bekerja di dalam sel. Ekstraksi enzim ekstraseluler lebih mudah dibandingkan ekstraksi enzim intraseluler karena tidak memerlukan pemecahan sel dan enzim yang dikeluarkan dari sel mudah dipisahkan dari pengotor lain serta tidak banyak bercampur dengan bahan-bahan lain (Pelezar dan Chan, 1986).

2.4.1 Sentrifugasi

Sentrifugasi merupakan tahap awal pemurnian enzim. Metode ini digunakan untuk memisahkan enzim ekstraseluler dari sisa-sisa sel. Sentrifugasi akan menghasilkan supernatan yang jernih dan endapan yang terikat kuat pada dasar tabung, yang kemudian dipisahkan secara normal. Sel-sel jamur biasanya mengalami sedimentasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit (Scopes, 1982). Prinsip sentrifugasi berdasarkan pada kenyataan bahwa setiap partikel yang berputar pada laju sudut yang konstan akan memperoleh gaya keluar (F). Besar gaya ini bergantung pada laju sudut ω (radian/detik) dan radius pertukarannya dalam satuan sentimeter (Sariningsih, 2000).

2.4.2 Fraksinasi dengan Amonium Sulfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$

Fraksinasi merupakan proses pengendapan protein atau enzim dengan penambahan senyawa elektrolit seperti garam amonium sulfat, natrium klorida atau natrium sulfat. Menurut Suhartono (1989), penambahan senyawa elektrolit ke dalam larutan yang mengandung protein dapat menyebabkan terjadinya proses pengendapan protein. Proses pengendapan protein tersebut dipengaruhi oleh kekuatan ion dalam larutan. Dengan meningkatnya kekuatan ion, kelarutan enzim akan semakin besar atau disebut dengan peristiwa *salting in*. Setelah mencapai suatu titik tertentu, kandungan garam semakin tinggi, maka kelarutan protein semakin menurun dan terjadinya pengendapan protein. Peristiwa pengendapan protein ini disebut *salting out* (Wirahadikusumah, 1977).

Pada kekuatan ion rendah, protein akan terionisasi sehingga interaksi antar protein akan menurun dan kelarutan akan meningkat. Peningkatan kekuatan io ini meningkatkan kadar air yang terikat pada ion dan jika interaksi antar ion kuat, maka kelarutannya menurun akibatnya antar protein lebih kuat dan kelarutannya menurun (Agustin dan Munir, 1997). Senyawa elektrolit yang sering digunakan untuk mengendapkan protein ialah amonium sulfat. Kelebihan amonium sulfat dibandingkan dengan senyawa-senyawa elektrolit lain adalah memiliki kelarutan yang tinggi, tidak mempengaruhi aktivitas enzim, mempunyai daya pengendap

yang efektif, efek penstabil terhadap kebanyakan enzim, dapat digunakan pada berbagai pH dan harganya murah (Scopes, 1982).

2.4.3 Dialisis

Dialisis adalah suatu metode yang digunakan untuk memisahkan garam dari larutan protein enzim. Proses dialisis secara umum dapat dilakukan dengan memasukkan larutan enzim dalam suatu kantung dialisis yang terbuat dari membran semipermeabel seperti selofan. Jika kantung yang berisi larutan enzim dimasukkan ke dalam buffer maka molekul kecil yang ada di dalam larutan protein atau enzim seperti garam anorganik akan keluar melewati pori-pori membran.

Sementara, molekul enzim yang berukuran besar akan tertahan dalam kantung dialisis. Keluarnya molekul menyebabkan distribusi ion-ion yang ada di dalam dan di luar kantung dialisis tidak seimbang. Untuk memperkecil pengaruh ini digunakan larutan buffer dengan konsentrasi rendah di luar kantung dialisis (Lehninger, 1998). Setelah tercapai keseimbangan, larutan di luar kantung dialisis dapat dikurangi. Proses ini dapat dilakukan secara kontinu sampai ion-ion di dalam kantung dialisis dapat diabaikan (Boyer, 1993).

Proses dialisis berlangsung karena adanya perbedaan konsentrasi zat terlarut di dalam dan di luar membran. Difusi zat terlarut bergantung pada suhu dan viskositas larutan. Meskipun suhu tinggi dapat meningkatkan laju difusi, tetapi sebagian besar protein dan enzim stabil pada suhu 4-8 °C sehingga dialisis harus dilakukan di dalam ruang dingin (Pohl, 1990).

2.5 Penentuan Aktivitas Katalitik dan Kadar Protein Enzim α -Amilase

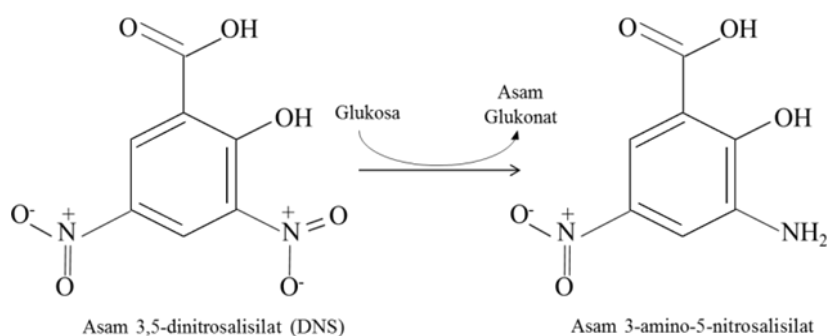
Aktivitas katalitik enzim diukur dalam dua cara: sebagai aktivitas unit dan aktivitas spesifik. Aktivitas unit enzim merujuk pada jumlah enzim (dalam mL) yang menghasilkan perubahan 1 μmol substrat per menit pada kondisi optimum pH dan suhu. Aktivitas spesifik enzim adalah aktivitas unit enzim yang dinormalisasi terhadap jumlah protein dalam miligram. Tingkat kemurnian enzim tercermin dalam aktivitas spesifiknya; semakin tinggi nilai aktivitas spesifik, semakin murni pula enzim yang dihasilkan. Penentuan aktivitas unit enzim dan kandungan protein dapat diukur menggunakan spektrofotometer Ultraviolet-Visible dengan cara mengukur absorbansinya. Metode Fuwa dan Mandels digunakan untuk mengukur aktivitas unit enzim α -amilase, yang melibatkan pengukuran aktivitas enzim berdasarkan penurunan substrat atau pembentukan produk (Yandri *et al.*, 2018).

2.5.1 Metode Fuwa

Metode Fuwa memusatkan pada pengurangan substrat pati menjadi produk setelah dihidrolisis. Dalam metode ini, produk akhir adalah sisa pati yang terdeteksi, di mana jumlahnya mengindikasikan seberapa banyak pati yang tidak dihidrolisis oleh enzim α -amilase; sedangkan pati yang telah dihidrolisis diperoleh dari selisih antara pati awal dan sisa pati. Jumlah pati yang berhasil dihidrolisis oleh enzim α -amilase sejalan dengan aktivitas unit enzim α -amilase. Pada larutan kontrol, enzim dinonaktifkan oleh HCl, sehingga substrat pati bereaksi dengan reagen iodine (I_2). Iodin terperangkap dalam struktur heliks pati, membentuk kompleks amilosa-iodine yang berwarna biru. Namun, pada larutan sampel, enzim mengubah substrat pati menjadi glukosa, yang kemudian bereaksi dengan iodine, menghasilkan larutan berwarna kuning. Perubahan warna tersebut akan menyerap cahaya pada panjang gelombang maksimum 600 nm (Fuwa, 1954).

2.5.2 Metode Mandels

Metode Mandels didasarkan pada pembentukan gula pereduksi seperti glukosa, yang kemudian dioksidasi oleh asam 2-hidroksi-3,5-dinitrosalisilat (DNS), menghasilkan larutan berwarna merah jingga. Warna ini menyerap cahaya pada panjang gelombang maksimum 510 nm (Eveleigh *et al.*, 2009; Mandels *et al.*, 1976). Glukosa dikategorikan sebagai gula pereduksi karena memiliki gugus aldehida yang mudah dioksidasi menjadi gugus karboksil. Bentuk hemiasetal siklik dari aldosa (termasuk glukosa) cenderung teroksidasi karena dapat berubah menjadi bentuk rantai aldehida yang terbuka. DNS berfungsi sebagai zat pengoksidasi yang direduksi dari gugus nitro menjadi gugus amina, menghasilkan asam 2-hidroksi-3-amino-5-nitrosalisilat, sementara glukosa dioksidasi menjadi asam glukonat (Miller, 1959). seperti yang diperlihatkan dalam Gambar 2.



Gambar 2. Reaksi antara DNS dengan Glukosa (Gumelar dan Dicky, 2020)

2.5.3 Metode Lowry

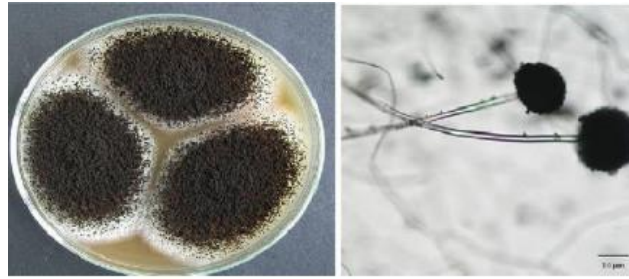
Penentuan kandungan protein bertujuan untuk memastikan keberadaan enzim (protein) dalam sampel setelah proses pemurnian dengan aktivitas optimal. Evaluasi kandungan protein dilakukan menggunakan kurva standar *Bovine Serum Albumin* (BSA), karena BSA mengandung asam amino seperti tirosin dan triptofan yang umum ditemukan pada banyak protein. Asam-asam amino ini memiliki ikatan konjugasi yang mengalami transisi elektronik pada panjang gelombang maksimum 280 nm (Boyer, 2012). Dalam metode ini, ion Cu^{2+}

bereaksi dengan ikatan peptida pada enzim (protein) yang mengandung rantai samping tirosin atau triptofan. Ion Cu^{2+} membentuk kompleks dengan protein dan selanjutnya tereduksi menjadi Cu^+ dalam suasana alkalis. Kemudian, kompleks Cu^+ protein berinteraksi dengan reagen Folin-Ciocalteu's phenol. Protein secara perlahan mereduksi reagen tersebut sehingga terbentuk senyawa heteromolibdenum yang menghasilkan warna hijau kebiruan. Warna ini menyerap cahaya pada panjang gelombang maksimum 750 nm. Intensitas warna yang dihasilkan tergantung pada jumlah tirosin dan triptofan dalam sampel protein (Lowry *et al.*, 1951).

2.6 *Aspergillus* sp.

Aspergillus sp. merupakan jamur yang sering ditemukan pada bahan organik misalnya karbohidrat, protein dan lemak sehingga dapat menyebabkan kerusakan di sejumlah bahan pangan. *Aspergillus* sp. menghasilkan toksin yang disebut dengan alfatoksin yang bila masuk ke dalam tubuh dapat mengakibatkan kerusakan hati. Jamur ini mudah tumbuh pada suhu ruang, memiliki spora yang ringan dan kecil sehingga mudah diterbangkan oleh angin (Anita dkk., 2021). Berdasarkan uraian tersebut, *Aspergillus* dapat menyebabkan infeksi pada saluran pernapasan jika mengonsumsi makanan yang telah terkontaminasi oleh *Aspergillus* khususnya pada roti tawar, terutama pada pasien yang memiliki kekebalan tubuh yang lemah kemungkinan invasifnya akan lebih cepat menyebar pada organ tubuh manusia ataupun hewan (Indriani dkk., 2020).

Aspergillus sp. adalah suatu jamur yang termasuk dalam kelas *Ascomycetes* yang dapat ditemukan khususnya di alam. *Aspergillus* tumbuh sebagai saprofit pada tumbuh-tumbuhan yang membusuk dan terdapat pula pada tanah, debu organik, makanan seta ditemukan di rumah sakit dan laboratorium (Widarti, 2017).



Gambar 3. *Aspergillus* sp. (Güçlü *et al.*, 2010)

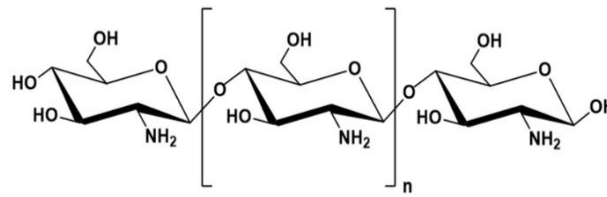
Klasifikasi *Aspergillus* sp. yaitu sebagai berikut:

Divisio : Eumycetes
 Kelas : Deuteromycetes
 Ordo : Moniliase
 Famili : Moniliceae
 Genus : *Aspergillus*
 Spesies : *Aspergillus* sp.

Jamur ditumbuhkan pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) miring dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 7 hari. PDA miring dibuat dengan mendinginkan media setelah sterilisasi secara miring dengan menggunakan kemiringan $\pm 20^\circ$ hingga padat (Ptiwari *et al.*, 2009). Biasanya memerlukan waktu 12 jam supaya agar memadat secara sempurna sebelum digunakan. Setelah media agar memadat spora jamur diinokulasikan dengan ose pertama dipermukaan media (Bykowski *and* Tomasz, 2008).

2.7 Kitosan

Kitosan merupakan senyawa turunan dari hasil proses kitin yang banyak terkandung di dalam hewan laut seperti udang dan kepiting. Kitosan merupakan biopolimer yang banyak digunakan di berbagai industri kimia antara lain sebagai koagulan dalam pengolahan limbah air, bahan pelembab, pelapis benih yang akan ditanam, adsorben ion logam, bidang farmasi, pelarut lemak, dan pengawet makanan. Kitosan mempunyai bentuk mirip dengan selulosa dan bedanya terletak pada gugus rantai C kedua (Thariq dkk., 2016).



Gambar 4. Struktur kitosan (Thariq dkk., 2016).

Klasifikasi kitosan adalah sebagai berikut:

Rumus kimia	: $(C_6H_{11}NO_4)_n$
Bentuk	: Tidak teratur dan berbentuk kristalin atau semikristalin
Penampilan	: Putih kekuningan
Kelarutan	: Tidak larut pada pH yang lebih rendah atau lebih tinggi
Jenis Larutan	: Polielektrolit
Viskositas	: 200 – 800 cps

Proses utama dalam pembuatan kitosan, meliputi penghilangan protein dan kandungan mineral melalui proses deproteinasi dan demineralisasi, yang masing-masing dilakukan dengan menggunakan larutan basa dan asam. Selanjutnya, kitosan diperoleh melalui proses deasetilasi dengan cara memanaskan dalam larutan basa (Tolaimatea *et al.*, 2003). Kitosan umumnya larut dalam asam organik, pH 4 - 6,5 tidak larut pada pH yang lebih rendah atau lebih tinggi. Aplikasi kitosan ada di beberapa industri makanan, pemrosesan makanan, bioteknologi, pertanian, farmasi, kesehatan, dan lingkungan (Balley and Ollis, 1977). Senyawa kitosan mudah terurai dan tidak mempunyai sifat racun serta ramah terhadap lingkungan (Sopiah dan Susanto, 2002).

Kitosan berasal dari limbah udang yang berupa kulit, kepala, dan ekor mengandung senyawa kimia berupa kitin, yang digunakan sebagai adsorben untuk menyerap logam berat seperti Seng (Zn), Kromium (Cr), Tembaga (Cu), Kobalt (Co), Nikel (Ni) dan Besi (Fe) dalam skala lab. Mengingat besarnya manfaat dari

senyawa kitosan serta tersedianya bahan baku yang banyak dan mudah didapatkan maka dari itu perlu pengkajian dan pengembangan dari limbah ini sebagai bahan penyerap terhadap logam-logam berat di perairan (Agusnar, 2003). Kitosan memiliki kemampuan sebagai koagulan karena memiliki banyak kandungan nitrogen pada gugus aminanya. Gugus amina dan hidroksil menjadikan kitosan bersifat lebih aktif dan bersifat polikationik, sifat tersebut dimanfaatkan sebagai koagulan dalam pengolahan air gambut yang dapat menyerap logam Fe lebih besar dibandingkan dengan PAC (Rumapea, 2009). Berikut merupakan serbuk dari kitosan dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Serbuk Kitosan (Hendri dan Aspita, 2013).

Kitosan mengandung tiga jenis gugus fungsi, yaitu gugus amina, gugus hidroksil primer, dan gugus hidroksil sekunder. Kehadiran gugus-gugus fungsi ini memberikan kitosan reaktivitas kimia yang tinggi. Imobilisasi enzim pada kitosan dapat dilakukan dengan metode adsorpsi sederhana, adsorpsi pada kitin yang diaktifkan dengan glutaraldehid, atau dengan ikatan silang antara enzim dan pendukung menggunakan glutaraldehid. Ikatan silang dengan glutaraldehid dapat mengurangi aktivitas enzim sebesar 14-60%. Metode adsorpsi fisik merupakan salah satu metode imobilisasi enzim yang sederhana dan efektif karena sedikit atau tidak menyebabkan perubahan konformasi enzim atau kerusakan pada pusat aktif enzim (Laila dkk., 2007).

Kitosan dapat dimanfaatkan sebagai bahan pengikat enzim karena memiliki beberapa keuntungan, seperti struktur yang keras, inert, berpori, dan mudah didapat. Penggunaan kitosan sebagai matriks pengimobilisasi didasarkan pada adanya gugus hidroksil dan amino pada kitosan, yang dapat dimanfaatkan sebagai tempat pengikatan enzim melalui berbagai modifikasi kimia (Hendri dan Aspita, 2013). Peningkatan konsentrasi protein enzim berbanding lurus dengan jumlah protein enzim yang teradsorpsi oleh matriks kitosan. Artinya, ketika konsentrasi protein enzim meningkat, jumlah protein enzim yang teradsorpsi oleh matriks kitosan juga meningkat. Namun, pada kondisi tertentu, peningkatan konsentrasi protein enzim tidak diikuti oleh peningkatan jumlah protein enzim yang teradsorpsi oleh kitosan. Hal ini menunjukkan bahwa kitosan telah mencapai titik adsorpsi maksimum dan tidak mampu lagi mengadsorpsi lebih banyak protein enzim (Hendri dan Aspita, 2013).

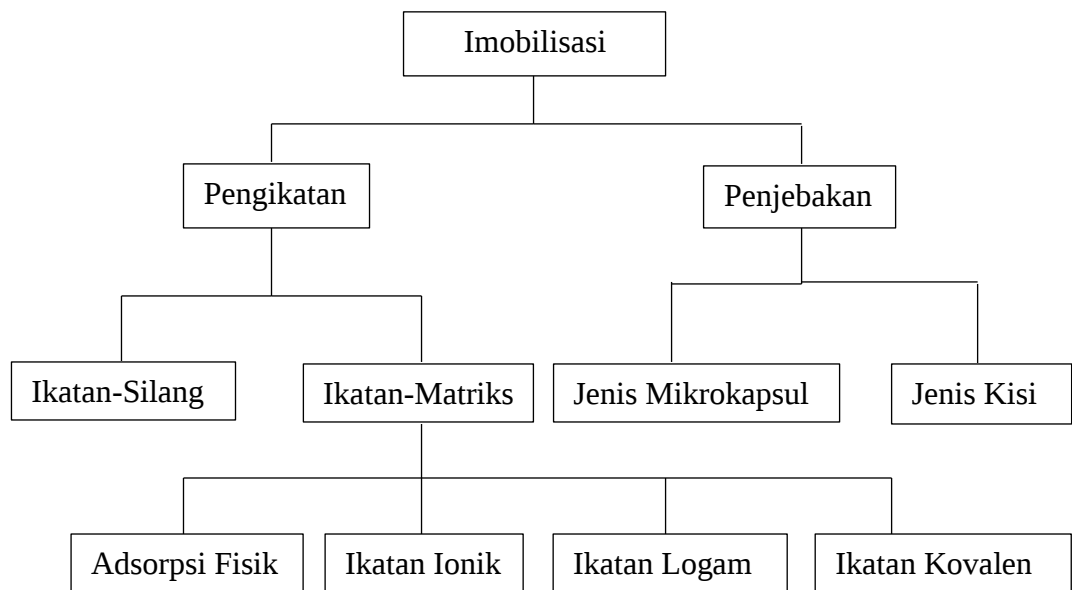
2.8 Imobilisasi Enzim

Imobilisasi enzim adalah suatu enzim yang secara fisik maupun kimia tidak bebas bergerak, sehingga dapat dilakukan atau diatur kapan enzim harus bereaksi dengan substrat (Winarno, 1986). Metode ini menempatkan enzim dalam wilayah ruang tertentu sehingga terbatas secara fisik dan dapat digunakan secara berulang. Teknik imobilisasi enzim dibagi menjadi empat kelompok yaitu metode adsorpsi, penjebakan, pengikatan kovalen dan ikatan silang. Padatan pendukung yang digunakan dalam imobilisasi enzim harus area permukaan yang luas, dapat ditembus, tidak dapat larut, memiliki stabilitas kimia, stabilitas termal, kekakuan yang tinggi, mempunyai bentuk dan ukuran pori yang cocok, tahan terhadap serangan microbial dan dapat diregenerasi (Wardoyo dan Aprilia, 2017)

Tabel 2. Berbagai penelitian imobilisasi enzim dengan berbagai matriks

Sumber Enzim	Jenis Enzim dan Matriks	Penggunaan Berulang	Aktivitas Sisa (%)	Referensi
Enzim dibeli dari Sigma	Urease dan TiO ₂ beads	11	50	(Doğaç <i>et al.</i> , 2014)
Enzim dibeli dari Sigma	Urease dan hibrida kitosan-TiO ₂ beads	16	50	(Doğaç <i>et al.</i> , 2014)
Enzim dibeli dari Himedia Laboratories Pvt Ltd	α -Amilase dan hibrida kitosan-TiO ₂ nanokomposit	10	63	(Mohan and Bindu, 2017)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Yeast alkohol dehidrogenase dan hibrida kitin-shellac	8	46	(Mei <i>et al.</i> , 2018)
<i>Thermatoga maritima</i>	β -Glukosidase dan kitin	10	66	(Alnadari <i>et al.</i> , 2020)
<i>A. fumigatus</i>	α -Amilase dan kitin	6	46	(Yandri <i>et al.</i> , 2022b)

Keunggulan penggunaan enzim imobil dalam industri, antara lain: dapat digunakan berulang, dapat mengurangi biaya, produk tidak dipengaruhi oleh enzim, memudahkan pengendalian enzim, tahap kondisi ekstrim, dapat digunakan untuk uji analisis, meningkatkan daya guna. Metode untuk imobilisasi enzim dapat dibagi menjadi tiga kelompok yaitu : cara fisik (penjebakan), cara kimia (pengikatan) dan kombinasi keduanya dapat dilihat pada Gambar 5 (Chibata, 1978).



Gambar 6. Skema metode imobilisasi enzim (Chibata, 1978).

2.9 Analisis Spektroskopi Ultraviolet-Visible (UV-Vis)

Spektrofotometer UV-Vis merupakan metode analisis yang menggunakan panjang gelombang UV dan *Visible* sebagai area serapan untuk mendeteksi senyawa. Pada umumnya senyawa yang dapat diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis adalah senyawa yang memiliki gugus kromofor dan gugus auksokrom.

Pengujian menggunakan spektrofotometer UV-Vis tergolong cepat jika dibandingkan dengan metode lainnya (Sahumena dkk., 2020). Sampel yang akan dianalisis berupa padat atau cair berdasarkan absorbansi foton. Agar sampel dapat menyerap foton pada daerah UV-Vis panjang gelombang foton yang digunakan yaitu 200 nm – 700 nm. Biasanya sampel harus diperlakukan misalnya penambahan reagen dalam pembuatan garam kompleks dan lain sebagainya..

Spektrofotometer UV-Vis merupakan alat utama maka harus dikalibrasi. Kalibrasi instrument spektrofotometer meliputi: akurasi panjang, akurasi fotometri, *resolution*, kebocoran sinar/*straylight*, *base line stability*, *base line flatness*, dan akurasi detektor (Irawan, 2019).

Prinsip kerja spektrofotometer UV-Vis berdasar pada serapan cahaya, dimana atom dan molekul berinteraksi dengan cahaya. Gabungan antara prinsip spektrofotometer ultraviolet dan *visible* disebut spektrofotometer ultraviolet-*visible* (UV-Vis). Sumber UV dan *visible* adalah dua sumber sinar yang berbeda yang digunakan pada instrumen ini. Spektrofotometer UV-Vis berdasar pada hukum Lambert-Beer. Jika sinar monokromatik melewati suatu senyawa maka sebagian sinar akan diabsorbansi, sebagian dipantulkan dan Sebagian lagi dipancarkan. Cermin yang berputar pada bagian dalam spektrofotometer akan membagi sinar dari sumber cahaya menjadi dua. Panjang gelombang pada daerah ultraviolet adalah 100 nm – 400 nm, sedangkan pada daerah *visible* adalah 400 nm – 750 nm (Ahriani dkk., 2021).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada Oktober 2023 sampai April 2024 di Laboratorium biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Analisis spektroskopi ultraungu-tampak (UV- Vis) dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain spektrofotometer UV-Vis (Thermo Genesys 180™), neraca analitik (Ainsworth AA-160 Denver Instrument Company™), inkubator (Precistern P' Selecta™), *autoclave* (S-90-N Electric Steroclave™), *centrifuge* (17250-10-Centrifuge Cole Parmer™ dan Labor 50-M WIFUG™), tabung sentrifugasi (15 mL dan 50 mL), mikropipet 50 µL – 1.000 µL (Eppendorf™) dan tip mikropipet, *Laminar Air Flow/LAF* (9005-FL Crumair™), *waterbath* (Memmert W 350™), *shaker incubator* (SSL2 Stuart™), pengaduk magnetik pelat panas (CB162 Stuart™) dan *stir bar, vortex* (PV-1 Grant-bio™), oven (T60 Heraeus™), pH meter (MetroHM™ 827), jarum ose (lurus), pembakar spiritus, *freezer*, kulkas, botol semprot, spatula, kaca arloji, termometer, batang pengaduk, pipet tetes, tabung reaksi, rak tabung reaksi *stainless steel*, penjepit tabung reaksi, labu Erlenmeyer (50-1.000 mL), gelas kimia (200-2.000 mL), gelas ukur (10-500 mL), labu ukur (25-1.000 mL), corong gelas, botol kaca gelap, botol film 30 mL, botol plastik (100-1.000 mL), dan wadah plastik.

Mikroorganisme yang digunakan pada penelitian ini adalah jamur *Aspergillus* sp. yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Universitas Lampung. Bahan-bahan yang digunakan adalah: kitosan (Sigma-Aldrich™) derajat deasetilasi (75-85%), pati singkong /cassava starch (Loba Chemie™), *Potato Dextrose Agar*/PDA (Himedia™), KH_2PO_4 (Merck™), MgSO_4 (Merck™), CaCl_2 (Merck™), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck™), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck™), CoCl_2 (Merck™), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck™), pepton (Himedia™), NaH_2PO_4 (Merck™), Na_2HPO_4 (Merck™), KI (Merck™), I_2 (Merck™), HCl pekat (Merck™), NaOH (Merck™), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck™), Na/K-tartrate tetrahidrat (Merck™), urea (Merck™), *folin ciocalteu's phenol* (Merck™), *Bovine Serum Albumin*/BSA, D-glukosa anhidrat (Merck™), asam 2-hidroksi-3,5-dinitrosalisilat/DNS (Sigma-Aldrich™), fenol (Merck™), Na_2SO_3 (Merck™), Na_2CO_3 (Merck™), NaCl (Merck™), asam asetat glasial (Merck™), natrium asetat (Merck™), akuades, kantong selofan, kertas saring, kapas, kasa, alkohol 70 %, spiritus, pemantik api, aluminium foil, kertas, tisu, karet, plastik wrap, dan es batu.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pembuatan media inokulum, fermentasi dan larutan pereaksi

a. Pembuatan media inokulum dan fermentasi

Media inokulum yang digunakan terdiri dari KH_2PO_4 0,1 gram; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,7 gram; MgSO_4 0,015 gram; pepton 0,0375 gram; urea 0,015 gram; CaCl_2 0,015 gram; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,00025 gram; $\text{ZnSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,000007 gram; CoCl_2 0,0001 gram; dan substrat 0,375 gram. Kemudian semua bahan dilarutkan dalam akuades sebanyak 50 mL dalam labu Erlenmeyer dan disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C tekanan 1 atm selama 15 menit (Yandri *et al.*, 2010).

Sedangkan media fermentasi yang digunakan terdiri dari KH_2PO_4 0,5 gram; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,35 gram; MgSO_4 0,075 gram; pepton 0,1875 gram; urea 0,075 gram; CaCl_2 0,075 gram; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,00125 gram; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,00035 gram; CoCl_2 0,0005 gram; dan

substrat 0,375 gram yang dilarutkan dalam akuades sebanyak 250 mL dan disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C tekanan 1 atm selama 15 menit (Yandri *et al.*, 2010).

b. Inokulasi *Aspergillus* sp.

Sebanyak 3 ose *Aspergillus* sp. dari media agar miring dipindahkan ke dalam 50 mL media inokulum secara aseptik lalu dikocok dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam (Yandri *et al.*, 2010).

c. Produksi enzim α -amilase

Produksi enzim α -amilase dilakukan dengan cara memindahkan sebanyak 2% media inokulum dari jumlah media fermentasi dimasukkan ke dalam media fermentasi secara aseptis lalu dikocok dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 1500 rpm pada 29 °C (Yandri *et al.*, 2010).

d. Isolasi enzim α -amilase

Isolasi enzim α -amilase dilakukan menggunakan metode sentrifugasi untuk memisahkan enzim dari komponen sel lainnya digunakan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Filtrat yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim yang selanjutnya diuji aktivitasnya dengan menggunakan metode Fuwa (Yandri *et al.*, 2010).

e. Pembuatan pereaksi untuk pengukuran aktivitas α -amilase metode Fuwa

Pereaksi Iodin	: Ke dalam labu takar 100 mL, 2 gram KI dilarutkan dalam 10 mL akuades. Lalu ditambahkan 0,2 gram I ₂ . Kemudian ditambahkan akuades hingga tanda batas.
Larutan Pati	: 0,1 gram pati dilarutkan dalam 100 mL akuades dan dipanaskan hingga larut.

- Larutan HCl 1N : Dihitung pengenceran HCl pekat 12 N menjadi 1 N. Sehingga diperoleh 8,3 mL HCl pekat yang ditambah akuades hingga batas miniskus pada labu ukur 100 mL.
- Larutan Buffer Fosfat : Larutan buffer fosfat pH 6,5 dibuat dengan mencampurkan stok A dan stok B pada volume tertentu. Stok A dibuat dengan cara menimbang NaH_2PO_4 sebanyak 31,970 gram kemudian dilarutkan dalam 1000 mL akuades. Stok B dibuat dengan cara menimbang Na_2HPO_4 sebanyak 14,211 gram kemudian dilarutkan dalam 500 mL akuades hingga homogen. Larutan buffer fosfat pH 6,5 dibuat dengan mencampurkan stok A dan stok B dengan perbandingan volume 342,5 mL stok A dan 157,5 mL stok B.
- Pembuatan pereaksi untuk pengukuran aktivitas α -amilase berdasarkan metode Fuwa (Fuwa 1954; Mwakalukwa *et al.*, 2020).

f. Pembuatan pereaksi untuk pengukuran aktivitas α -amilase metode Mandels

Dalam labu ukur 100 mL dimasukkan w/v 1% NaOH, 1 mL Na(K) tartarat 40%, 1% DNS (*Dinnitrosalisilic acid*), 0,2% fenol dan 0,05% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ kemudian dilarutkan dengan labu ukur 100 mL akuades hingga tanda batas (Mandels *et al.*, 1976; Rahmiati dkk., 2016).

g. Pembuatan pereaksi untuk penentuan kadar protein metode Lowry

- Pereaksi A : 2 gram Na_2CO_3 dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 N.
- Pereaksi B : 5 mL larutan $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1% ditambahkan ke dalam 5 mL larutan Na(K) tartarat 1%.
- Pereaksi C : 2 mL pereaksi B ditambahkan 100 mL pereaksi A
- Pereaksi D : reagen *folin ciocelteau* diencerkan dengan akuades 1:1.
- Larutan standar : larutan BSA (*Bovine Serum Albumin*) dengan kadar 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm. Pembuatan pereaksi untuk penentuan kadar protein metode Lowry (Soeharsono, 2006).

3.3.2 Uji aktivitas α -amilase dan penentuan kadar protein

a. Metode Fuwa

Aktivitas α -amilase ditentukan dengan metode iodine. Metode ini berdasarkan pada pengurangan jumlah substrat (pati). Sebanyak 0,25 mL enzim ditambahkan ke dalam 0,25 mL larutan pati 0,1% lalu diinkubasi pada suhu 60 °C selama 10 menit. Kemudian reaksi dihentikan dengan penambahan 0,25 mL HCl 1 N dan kemudian ditambahkan 0,25 mL pereaksi iodine dan 4 mL akuades. Setelah campuran diaduk rata, serapannya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ 600 nm. Kontrol dibuat dengan cara yang sama hanya menggunakan 0,25 mL enzim yang telah dinaktifkan (Fuwa, 1954; Mwakalukwa *et al.*, 2020). Rumus dasar aktivitas unit ditunjukkan dengan Persamaan 2, yaitu:

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

Keterangan:

A_{kontrol} = absorbansi kontrol

A_{sampel} = absorbansi sampel

FP = faktor pengenceran

V = volume enzim = 0,25 mL

b. Metode Mandels

Metode ini berdasarkan glukosa yang terbentuk (Mandels *et al.*, 1976; Rahmiati dkk., 2016). Sebanyak 0,5 mL enzim, 0,5 mL larutan pati 0,1% dalam buffer sitrat pH 6,0 dicampur, lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 60 °C. Setelah itu ditambahkan 2 mL pereaksi asam dinitrosalisilat (DNS), dididihkan selama 10 menit pada penangas air dan didinginkan. Setelah dingin serapannya diukur pada panjang gelombang 510 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan dengan menggunakan kurva standar glukosa. Uji ini dilakukan pada tahap penentuan K_M dan V_{maks} . Pereaksi asam dinitrosalisilat (Mandels *et al.*, 1976) terdiri dari: asam dinitrosalisilat 1%, fenol 0,2%, Na_2SO_3 0,05%, NaOH 1%, garam Rochel (NaK-tartarat) 40% 1 mL. Campurkan semua zat sampai volume hingga 100 mL. Aktivitas unit dihitung melalui Persamaan 3 sebagai berikut:

$$AU = \frac{(A_{\text{sampel}} - A_{\text{kontrol}}) - b}{a} \times \frac{1}{V_{\text{enzim}}} \times \frac{1}{t_{\text{inkubasi}}} \times \frac{1.000 \times FP}{Mr_{\text{produk}}} \dots\dots\dots(3)$$

Keterangan:

FP = faktor pengenceran

V = volume enzim = 0,25 mL

t = waktu inkubasi = 30 menit

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

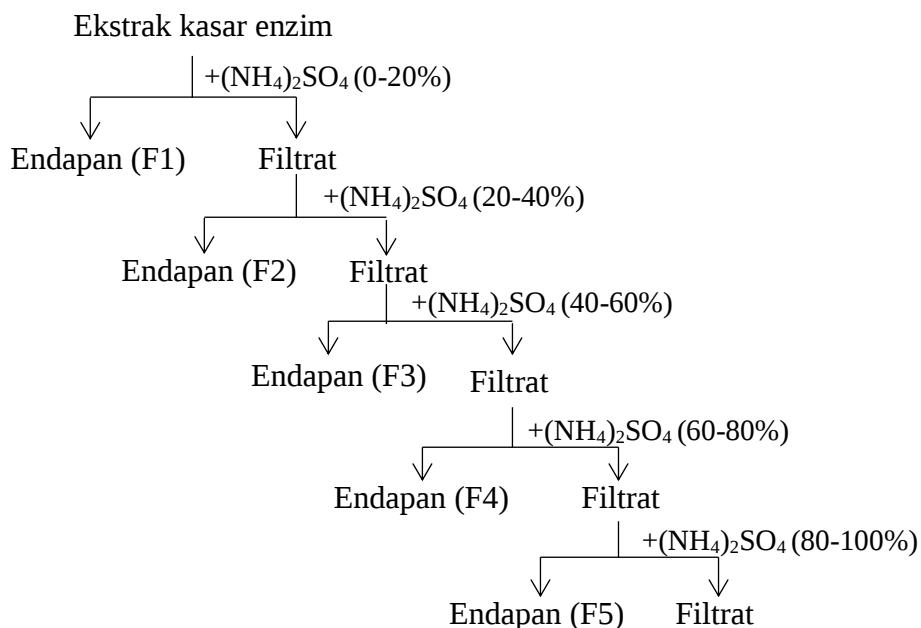
b dan a = *intercept* dan *slope* kurva standar glukosa

c. Penentuan kadar protein metode Lowry

Kadar protein enzim ditentukan dengan metode Lowry *et al* (1951). Penentuan kadar protein dilakukan sebagai berikut: sebanyak 0,1 mL larutan enzim ditambah 0,9 mL air dan 5 mL pereaksi C, dikocok dan didiamkan pada suhu kamar selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan 0,5 mL pereaksi D, dikocok dan didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit. Serapan dibaca pada λ 750 nm. Untuk menentukan konsentrasi protein enzim digunakan kurva standar BSA (Soeharsono, 2006).

3.3.3 Fraksinasi dengan amonium sulfat [(NH₄)₂SO₄]

Ekstrak kasar enzim yang diperoleh dimurnikan dengan cara fraksinasi menggunakan garam amonium sulfat pada berbagai derajat kejenuhan yaitu w/v (0-15)%; (15-30)%; (30-45)%, (45-60)%, (60-75)% dan (75-90)%. Skema proses pengendapan protein enzim dengan penambahan amonium sulfat ditunjukkan pada Gambar 7. Sejumlah ekstrak kasar enzim yang diperoleh ditambahkan garam amonium sulfat yang telah dihaluskan secara perlahan sambil diaduk dengan *magnetik stirrer* pada suhu 4 °C. Endapan protein enzim yang didapatkan pada tiap fraksi kejenuhan amonium sulfat dipisahkan dari filtratnya dengan sentrifugasi dingin pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Kemudian endapan yang diperoleh dilarutkan dengan bufer fosfat 0,1 M pH 6 dan diuji aktivitasnya dengan metode Fuwa, serta diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry. Selanjutnya, filtrat yang didapat dari fraksi 0-15% digunakan untuk diendapkan kembali dengan fraksi kejenuhan 15-30% dengan prosedur yang sama hingga fraksi kejenuhan 75-90% (Yandri *et al.*, 2010).



Gambar 7. Skema proses fraksinasi enzim dengan amonium sulfat.

3.3.4 Penentuan pola fraksinasi kedua

Tiga atau empat fraksi dari pola fraksinasi pertama dengan aktivitas spesifik tertinggi dijadikan acuan untuk penentuan pola fraksi kedua. Pola fraksi kedua hanya dibagi menjadi dua fraksi saja. Hal ini bertujuan untuk menambah rendemen enzim sehingga tidak kehilangan banyak enzim dari proses pemurnian dan aktivitas enzim α -amilase yang diperoleh lebih tinggi daripada aktivitas ekstrak kasar enzim (Yandri *et al.*, 2010). Prosedur ini sama dengan penentuan pola fraksinasi pertama. Fraksinasi dilakukan setiap 1 L ekstrak kasar enzim. Berdasarkan hasil perhitungan massa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (gram) yang ditambahkan untuk fraksinasi dengan berbagai persentase kejenuhan. Seperti yang diperlihatkan pada Tabel 3.

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

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

Sumber: Bollag *et al.*, 1996.

3.3.5 Dialisis

Endapan enzim yang telah dilarutkan dari tiap fraksi amonium sulfat dengan aktivitas spesifik yang tinggi, dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis dengan buffer fosfat 0,05 M pH 6,0 selama 24 jam pada suhu dingin. Selama didialisis, dilakukan pergantian buffer selama 4-6 jam agar konsentrasi ion-ion di dalam kantong dialisis dapat dikurangi. Proses ini dilakukan secara kontinyu sampai ion-ion di dalam kantong dialisis dapat diabaikan. Untuk mengetahui bahwa sudah tidak ada lagi ion-ion garam dalam kantong, maka diuji dengan menambahkan larutan $\text{Ba}(\text{OH})_2$ atau BaCl_2 . Bila masih ada ion sulfat dalam kantong, maka akan terbentuk endapan putih BaSO_4 . Semakin banyak endapan yang terbentuk, maka semakin banyak ion sulfat yang ada dalam kantong. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas dengan metode Fuwa dan diukur kadar proteinnya dengan metode *Lowry* (Yandri *et al.*, 2010).

3.3.6 Imobilisasi enzim hasil pemurnian dengan kitosan

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

Kitosan yang digunakan untuk proses pengikatan enzim α -amilase memiliki derajat deasetilasi 75-85%. Enzim α -amilase diikatkan pada matriks dengan variasi pH 4; 4,5; 5; 5,5; 6; dan 6,5 dengan menggunakan buffer fosfat 0,1 M. Kemudian matriks kitosan sebanyak 0,25gram diisi dengan 0,5 mL larutan enzim dan dielusi dengan 2 mL buffer yang sesuai, diaduk kemudian disentrifugasi selama 20 menit. Selanjutnya supernatan didekantasi dan diuji aktivitas enzim.

b. Imobilisasi enzim α -amilase

Sebanyak 0,5 mL larutan enzim α -amilase diimobil dengan kitosan pada pH optimum pengikatan. 0,5 mL enzim α -amilase diikatkan pada 0,25 gram kitosan dan 2 mL buffer yang sesuai. Kemudian campuran diaduk hingga rata dan simpan dalam *freezer* selama 10 menit. Selanjutnya disentrifugasi selama 20 menit. Selanjutnya supernatan didekantasi

sebagai kontrol untuk diuji aktivitas enzimnya. Kemudian endapan yang diperoleh ditambahkan dengan 0,5 mL substrat pati 0,1% kemudian diaduk selanjutnya diinkubasi dan diuji aktivitasnya dengan metode Mandels.

c. Pemakaian berulang enzim imobilisasi dengan menggunakan matriks kitosan

Enzim imobil yang telah dipakai (direaksikan dengan substrat), dipakai kembali untuk direaksikan kembali dengan substrat dengan uji metode Mandels. Pengikatan enzim pada kitosan terjadi karena enzim teradsorpsi pada permukaan kitosan yang mempunyai *counter ions* (ion penukar) yang bermuatan negatif. Dengan teradsorpsinya enzim tersebut, terjadi interaksi secara elektrostatis yaitu penukaran *reversible* dari ion-ion dalam campuran (Laila dkk., 2007).

d. Karakterisasi enzim hasil imobilisasi

Karakterisasi enzim hasil imobilisasi meliputi: penentuan pH dan suhu optimum, penentuan data kinetika, dan penentuan kestabilan terhadap suhu dan pH.

e. Penentuan suhu optimum enzim hasil imobilisasi

Penentuan suhu optimum enzim α -amilase ditentukan dengan memvariasikan suhu, yaitu 50; 55; 60; 65; 70; dan 75 °C. Selanjutnya dilakukan pengukuran aktivitas enzim dengan metode Mandels.

f. Penentuan data kinetika enzim (K_M dan V_{maks})

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. Selanjutnya data aktivitas enzim dengan konsentrasi substrat diplotkan ke dalam kurva Lineweaver-Burk untuk penentuan K_M dan V_{maks} .

g. Uji stabilitas termal enzim hasil imobilisasi terhadap pH dan suhu

Penentuan stabilitas termal enzim dilakukan dengan variasi waktu inkubasi. Waktu inkubasi dibutuhkan enzim untuk bereaksi dengan substrat secara optimum. Pada penelitian ini, uji stabilitas termal enzim dilakukan dengan variasi waktu inkubasi 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, dan 100 menit pada pH optimum. Selanjutnya diukur aktivitas enzim dengan metode Mandels (Yang *et al.*, 1996).

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

Penentuan nilai K_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil imobilisasi dilakukan dengan menggunakan persamaan kinetika inaktivasi orde 1 (Kazan *et al.*, 1997) dengan persamaan berikut ini:

$$\ln \left(\frac{E_i}{E_o} \right) = - k_i t \quad \dots\dots\dots(4)$$

Sedangkan untuk perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan hasil imobilisasi kimia dilakukan dengan menggunakan persamaan berikut ini (Kazan *et al.*, 1997):

$$\Delta G_i = - RT \ln \left(\frac{K_i \times h}{k_B \times T} \right) \quad \dots\dots\dots(5)$$

Keterangan :

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

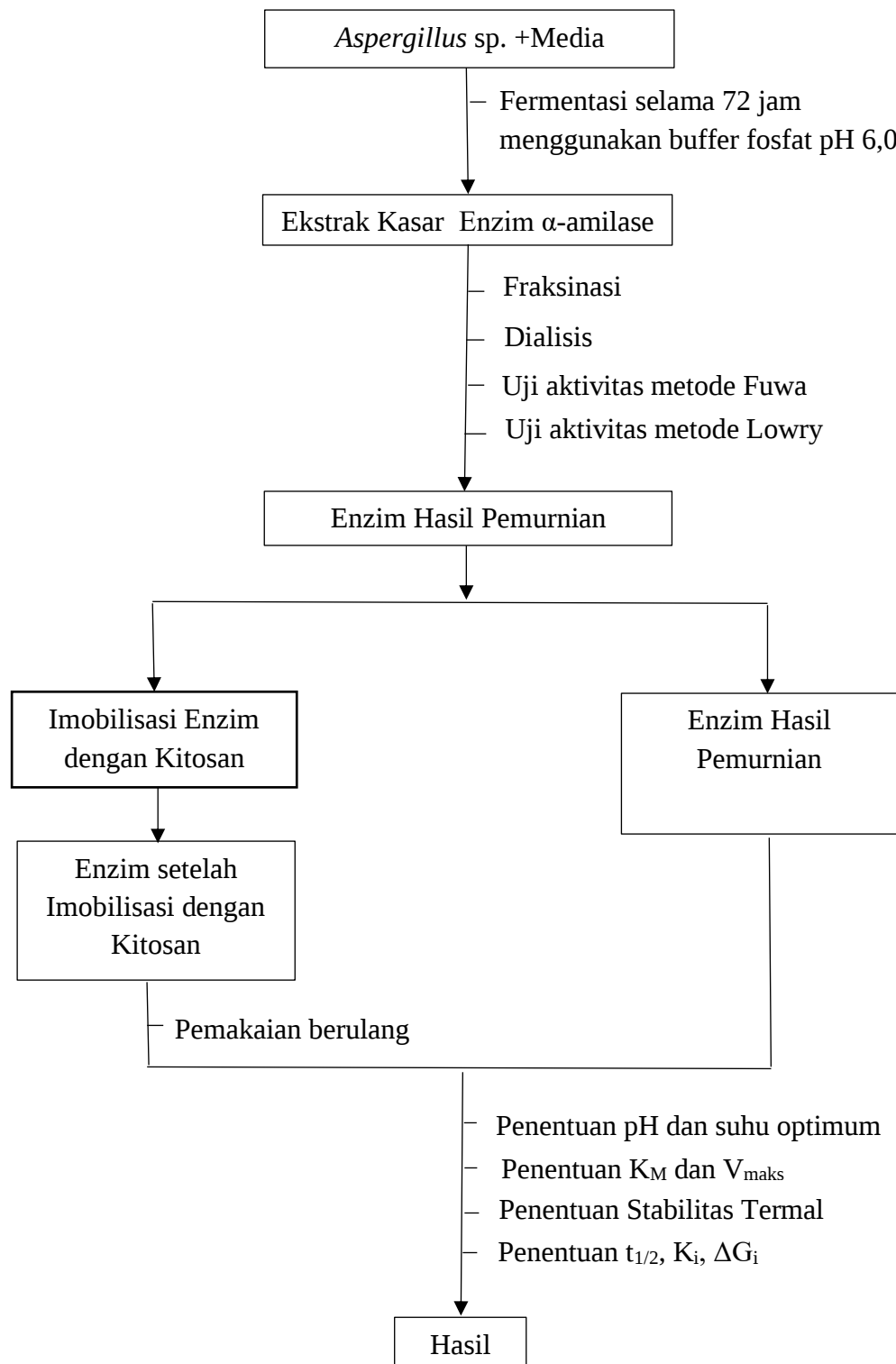
T = suhu absolut (K)

k_i = konstanta laju inaktivasi termal (menit^{-1})

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

k_B = konstanta Boltzmann ($1,381^{-23} \times 10^{-1} \text{ J - K}$)

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



Gambar 8. Diagram alir imobilisasi enzim α -amilase dari *Aspergillus* sp. menggunakan kitosan

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Dari pembahasan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Aktivitas spesifik enzim α -amilase hasil pemurnian sampai tahap dialisis yang berasal dari *Aspergillus* sp. yaitu sebesar 511,300 U/mg.
2. Enzim α -amilase hasil pemurnian memiliki suhu optimum 55°, $K_M = 6,401055 \text{ mg mL}^{-1}$ substrat, $V_{maks} = 13,19261 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$, $k_i = 0,0395 \text{ menit}^{-1}$, $t_{1/2} = 17,54 \text{ menit}$, dan $\Delta G_i = 102,15 \text{ kJ mol}^{-1}$.
3. Enzim α -amilase hasil imobilisasi pada matriks kitosan memiliki suhu optimum 55 °C, $K_M = 9,05 \text{ mg mL}^{-1}$ substrat, $V_{maks} = 8,86 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$, $k_i = 0,0209 \text{ menit}^{-1}$, $t_{1/2} = 33,16 \text{ menit}$, dan $\Delta G_i = 103,91 \text{ kJ mol}^{-1}$.
4. Uji stabilitas termal pada enzim α -amilase hasil pemurnian pada suhu 60°C selama 80 menit menunjukkan aktivitas sisa sebesar 3,6%.
5. Uji stabilitas termal pada enzim α -amilase hasil imobilisasi pada suhu 60 °C selama 80 menit menunjukkan aktivitas sisa sebesar 18,93%.
6. Enzim hasil imobilisasi menggunakan matriks kitosan dapat digunakan 6 kali pengulangan, dengan aktivitas sisa 19,85%.

5.2 Saran

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

1. Melakukan pemurnian enzim tidak hanya dengan fraksinasi dan dialisis saja, seperti menggunakan metode kromatografi filtrasi gel.
2. Melakukan imobilisasi dengan menggunakan matriks lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Agusnar, H. 2003. Analisa keefektifan penggunaan kitosan untuk menurunkan kadar logam berat. *J. Kim. Sains*. 7(1): 7-10.
- Agustin, A., dan Munir, E. 1997. Prosiding Seminar Wawasan Keilmuan Untuk Meningkatkan Kualitas Pembangunan Bangsa Indonesia. (hal. 177-270). Malaysia: PPI Universitas Sains Malaysia.
- Ahen, T. J., and Klibanov. 1987. *Why do Enzyme Irreversibly inactive at high temperature. Biotec. 1. Microbial Genetic Engineering and enzyme Technology*. Gustav Fischer Stuttgart. New York.
- Ahriani., Sri, Z., Hernawati., dan Fitriyanti. 2021. Analisis Nilai Absorbansi Untuk Menentukan Kadar Flavonoid Daun Jarak Merah (*Jatropha Gossypifolia* L) Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. *J. Fis. Terap*. 8(2): 56-64.
- Alnadari, F., Xue, Y., Zhou, L., Hamed, Y. S., Taha, M., and Foda, M. F. 2020. Immobilization of β -glucosidase from *Thermatoga maritima* on chitin-functionalized magnetic nanoparticle via a novel thermostable chitin-binding domain. *Sci. Rep.* 10(1663): 1-12.
- Anita, Nurhidayat, Dewi. A., dan Lilis. W. 2021. Identifikasi *Aspergillus* sp pada kentang (*Solanum Tuberosum*) yang di perjualbelikan di pasar tradisional kota Makassar. *J. Medika*. 6(1): 1-5.
- Amyyana, A. H., Maria, P., dan Fera, k. 2017. Pirolisis Sederhana Limbah Plastik dan Implementasinya Sebagai Sumber Belajar Berbasis *Education For Sustainable Development* (ESD) Pada Pembelajaran Kimia. *J. Ris. Pend. kim*. 7(1); 15-16.
- Arunsasi, Manthirikani, S., Jegadeesh, G., and Ravikumar, M. 2010. Submerged fermentation of amylase enzyme by *Aspergillus flavus* using cocos nucifera meal. *JESTEC*. 6(2): 75-87.
- Baehaki. 2005. Purifikasi dan karakterisasi protease dari bakteri patogen *Pseudomonas aeruginosa*. *JITIPARI*. 19(1): 80-86.

- Baehaki, A. R., dan Budiman, A. 2011. Isolasi dan karakterisasi protease dari bakteri tanah Rawa Indralaya, Sumatra Selatan. *JITIPARI*. **22**(1): 37-42.
- Balley, J. E., and Ollis. D. F. 1977. *Biocemical Engineering Fundamental*. Mc. Graw Hill Kogakusha. ITD.Tokyo.
- Bollag, D. M., Rozycki, M. D., and Edelstein, S. J. 1996. *Protein Methods 2nd ed*. John Wiley and Sons, Inc. New York. hal.1-106.
- Boyer, R. F. 1993. *Modern Experimental Biochemistry*. Publishing Company. California.
- Boyer, R. F. 2012. *Biochemistry Laboratory: Modern Theory and Techniques Second Edition*. Pearson Education, Inc. Indianapolis. pp.70-71.
- Brokerhoff, H., and Jensen, R. 1974. *Lipolytic Enzymes*. Academic Press. New York.
- Bykowski, and Tomasz. 2008. Aseptic Technique. In *Current Protocol in Microbiology*, Wiley Intescience .
- Chaplin, M. F., and Bucke, C. 1990. *Enzyme Technology*. Press Chambridge. Great Britain.
- Chibata, I. 1978. *Immobilized Enzyme. Research and Development*. Halsted Press Book. New York.
- Cipolatti, E. P., Cerqueira Pinto, M. C., Henriques, R. O., da Silva Pinto, J. C., de Castro, A. M., Freire, D. M., and Manoel, E. A. 2019. *Enzymes in green chemistry: The state of the art in chemical transformations: Advances in Enzyme Technology*. Elsevier. London. hal.137-147.
- Colberg, J., Hii, K. K., and Koenig, S.G. 2022. *Importance of Green and Sustainable Chemistry in the Chemical Industry: A joint virtual issue between ACS Sustainable Chemistry and Engineering and Organic Process Research and Development*. ACS Publications. Washington, D.C. hal.2176-2177.
- Dhiman, S., Srivastava, B., Singh, G., Khatri, M., and Arya, S.K. 2020. Immobilization of mannanase on sodium alginate-grafted- β -cyclodextrin: An easy and cost effective approach for the improvement of enzyme properties. *Int. J. Biol. Macromol.* **156**(2):1347-1358.
- Doğaç, Y. I., Deveci, İ., Teke, M., and Mercimek, B. 2014. TiO₂ beads and TiO₂-chitosan beads for urease immobilization. *Mater. Sci. Eng. C*. **42**: 429–435.
- Eijink, G. H., Sirgit, V., Torben, and van de Burg. 2005. *Biomolecular Engineering*. Elsevier Science Inc. New York.

- Eveleigh, D. E., Mandels, M., Andreotti, R., and Roche, C. 2009. Measurement of saccharifying cellulose. *Biotechnol. Biofuel.* **2**(21): 1-8.
- Fuwa, H., 1954. A new method for micro determination of amylase activity *J. of Biochem.* **41**(1): 584-603.
- 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. pp.185.
- Goddette, D. W., Christianson, T., Ladin, B. F., Lau, M., Mielenz, J. R., Pae, C., Reynolds, R. B., Yang, S. S., and Wilson, C. R. 1993. Strategy and implementation of a system for protein engineering. *J. Biotechnol.* **28**(1): 41-54.
- Güçlü, Ö., Halil, B., and Aslı Ş. 2010. Mycoflora identified from loggerhead turtle (*Caretta caretta*) egg shells and nest sand at Fethiye beach, Turkey. *J. of Microbiol. Research.* **4**(5): 408-413.
- Gumelar., dan Dicky, E.F. 2020. Pengaruh Waktu Perkecambahan Biji Kacang Hijau (*Phaseolus Radiatus L.*) Terhadap Produksi Enzim A-Amilase. *J. Penelit.* **4**(1): 1-10.
- Hao, X-Cai, Yu, X-bin, dan Yan, Z-li. 2006. Optimization of the medium for the production of cellulase by the mutant trichiderma reesei WX-112 using response surface methodology. *J. Food Technol. Biotechnol.* **44**(1): 89-94.
- Hendri, J., dan Aspita, L. 2013. *Kitin Kitosan.* Lembaga Penelitian Universitas Lampung. Lampung.
- Illanes, A. 1999. Stability of biocatalysts. *Electron. J. Biotechnol.* **2**(1): 1-2.
- Indriani, C., Fadhila, F. R., dan Kodariah, L. 2020. Identifikasi Pertumbuhan jamur *Aspergillus* sp. pada Roti Tawar Terhadap Suhu Penyimpanan. *J. Pend.* **2**(10): 94-95.
- Irawan, A. 2019. Kalibrasi Spektrofotometer Sebagai Penjaminan Mutu Hasil Pengukuran Dalam Kegiatan Penelitian dan Pengujian. *Indonesian J. of Laboratory.* **1**(2): 1-9.
- Irdawati., Fifendy, M., dan Yenti, N. 2015. Penapisan Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Amilase Dari Sumber Air Panas Sapan Sungai Aro Kabupaten Solok Selatan. *J. Eksakta.* **1**(1): 73-81.
- Jayanti, D., Wuryanti., dan Taslimah. 2013. Isolasi, Karakterisasi, dan Amobilisasi α -Amilase dari *Aspergillus oryzae* FNCC 6004. *J. Chem Info.* **1**(1): 76-84.

- Jegannathan, K. R., Abang, S., Poncelet, D., Chan, E. S., and Ravindra, P., 2008, Production of Biodiesel using Immobilized Lipase-a Critical Review, *Crit. Rev. Biotechnol.* 28: 253–64.
- Junita. 2002. *Mempelajari Stabilitas Termal Enzim Protease dari Bacillus stearothermophilus dalam Pelarut Heksana, Toluena dan Benzena*. Institute Pertanian Bogor. Bogor.
- Kamelia, R., M. Sindumarta., dan Natalia, D. 2005. Isolasi dan karakterisasi protease intraseluler termostabil dari bakteri *Bacillus stearothermophilus* RP1. In *Seminar Nasional MIPA*. Departemen Kimia, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Kazan, D., Ertan, H., and Erarslan, A. 1997. Stabilization of *Escherichia coli* penicillin G acylase againsts thermal inactivation by cross-linking with dextran dialdehyde polymers. *Appl Microbiol Biotechnol.* **48**(1): 191-197.
- Kharrat, N., Yassine, B. A., Sana, M., Youssef-Talel, G., and Maha, K. 2011. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. *Process Biochem.* **46**(1): 1083-1089.
- Laila, A., Fetra, A., Hendri, J., dan Ginting, I.S. 2007. Peningkatan stabilitas enzim amilase melalui amobilisasi pada polimer kitosan. *J. Sains MIPA.* **13**(2): 119-126.
- Lehninger, A. L. 1998. *Dasar - Dasar Biokimia jilid 3*. Erlangga. Jakarta.
- Lehninger, A. L. 1997. *Dasar-Dasar Biokimia jilid 2*. Erlangga. Jakarta.
- Lowry, O. H., N. J, Rosebrough., A. R, Farr., and R. J, Randal. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**(1): 75-265.
- Madera-Santana, T. J., Herrera-Mendez., C. H., dan Rodriguez-Nunez, J. R. 2018. An overview of the chemical modifications of chitosan and their advantages. *Green Mater.* **6**(4): 131-142.
- Mandels , M. A., Raymond., and R, Charles. 1976. *Measurement of Saccharifying Cellulase*. Biotech and Bioeng. New York.
- Mara, A. 1999. *Penentuan Kondisi Optimum dan Pengaruh Ion Logam Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} dan Ca^{2+} Pada Glukosa Isomerise yang telah diambil dengan DEAE Selulosa untuk Produksi Sirup Fruktosa dari Singkong (Manihot utilisima)*. (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- 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**(2): 1-8.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**(3): 426-428.

- Mohammadi, M., Rezaei Mokarram, R., Shahvalizadeh, R., Sarabandi, K., Lim, L.T., and Hamishehkar, H. 2020. Immobilization and stabilization of pectinase on an activated montmorillonite support and its Application in Pineapple Juice Clarification. *Food Biosci.* **36**(5): 100625.
- Mohanan, P. V., and Bindu, V. U. 2017. Enhanced Stability of α -amylase via Immobilization onto Chitosan-TiO₂ Nanocomposite. *Nanosci. Technol.* **4**(2): 1–9.
- Mwakalukwa, R., Amen, Y., Nagata, M. and Shimizu, K. 2020. Postprandial hyperglycemia lowering effect of the cristaled compounds from olive mill wastes - An inhibitory activity and kinetics studies on α -glucosidase and α -amylase enzymes. *ACS Omega.* **5**(32):20070–20079.
- Nurbaity. 2011. Pendekatan *Green Chemistry* Suatu Inovasi Dalam Pembelajaran Kimia Berwawasan Lingkungan. *J. Riset Pendidikan Kimia.* **1**(1); 2252-5378.
- Page, D. 1989. *Prinsip-Prinsip Biokimia*. Erlangga. Jakarta.
- Palmer, T. 1981. *Understanding Enzyme Third Edition*. Ellis Horwood Limited. England.
- Pelezar, M. J., dan Chan, E.C.S. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. UI-Press. Jakarta.
- Pereira, E. B., Zanin, G.M., and Castro, H. F., 2003, Immobilization and Chatalytic Properties of Lipase on Chitosan for Hydrolysis and Esterification Reaction, *Braz. J. Chem. Eng.* **20**(4): 343-355.
- Pertiwi. 2008. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Erlangga. Jakarta.
- Poedjiadi, A. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. UI-Press. Jakarta.
- Pohl, T. 1990. *Methods of Enzymology. Guide to Protein Purification*. Academic Press. New York.
- Ptiwari, Hoondal, R., and Tewari, R. 2009. *Laboratory Techniques in Mikrobiologi and Biotechnology*. Mehra Offset. New Delhi.
- Rahmiati, Pujiyanto, S., dan Kusdiyantin, E. 2016. Eksplorasi mikroba penghasil enzim-enzim hidrolitik di kawasan Taman Nasional Lore Lindu Sulawesi Tengah. *J. Biomassa.* **18**(1): 14-19.
- Robinson, P.K. 2015. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem.* **59**: 1–41.
- Rumapea, N. 2009. *Penggunaan Kitosan dan Polyalumunium Chlorida (PAC) untuk Menurunkan Kadar Logam Besi (Fe) dan Seng (Zn) dalam Air Gambut*. Universitas Sumatra Utara.

- Sahumena, M.H., Ruslin., Asriyanti., dan Endah, N.D. 2020. Identifikasi Jamu Yang Beredar di Kota Kendari Menggunakan Metode Spektrofotometer UV-Vis. *J. Syifa Sci. Clin. Res.* 2(2): 66-67.
- Sariningsih, R. 2000. *Produksi Enzim Protease oleh Bacillus subtilis BAC-4*. Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Scopes, R. 1982. *Proteins Purification*. Springer Verlag. New York.
- Shahib, M. 2005. *Biologi Molekuler Medik I*. Universitas Padjajaran Press. Bandung.
- Soeharsono. 2006. *Biokimia 1*. UGM Press. Yogyakarta
- Sopiah, N., dan Susanto, J.P. 2002. Isolasi dan identifikasi bakteri proteolitik terhadap deproteinasi limbah cangkang rajungan pada proses pembuatan kitin. *J. Sains Teknol. BPPT.* 4(1): 9-14.
- Suhartono. M. T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi* . PAU Bioteknologi ITB. Bogor.
- Sukma, D. 2003. *Amobilisasi Enzim Protease dengan Bahan Pendukung Polimer Kitosan* (Skripsi). Unila. Bandar Lampung.
- Sumardjo, D. 2006. *Pengantar Kimia*. Buku Kedokteran EGC. Jakarta
- Tazkiah, N., Puspita., Rosahdi, Tina. D., dan Asep. S. 2017. Isolasi dan karakterisasi enzim amilase dari biji nangka (*Artocarpus heterophyllus*). *J. Al-kimiyah.* 4(1): 17-22.
- Thariq, R., Ahmad, F., Anisa, R., dan Rani, H. 2016. *Pengembangan Kitosan Terkini pada Berbagai Aplikasi Kehidupan*. Erlangga. Jakarta.
- Tolaimatea. A., Dresbrieresh, J., Rhazia, M., and Alaguic. A. 2003. Contribution t the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties. *Polym. J.* 44(1): 7939-7952.
- Virdianingsih, R. 2002. *Mempelajari Stabilitas Termal Enzim Protease dari Bacillus pumilus1 dalam Pelarut Heksana, Toluena dan Benzena*. Institute Pertanian Bogor. Bogor.
- Vogel, A. and May, O. 2019. *Industrial Enzyme Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. Weinheim. 433.
- Wardoyo, F. A., dan Aprilia, I. K. 2017. Imobilisasi Enzim Lipase Pada Padatan Pendukung Zeolit Alam. *PP*. Universitas Muhammadiyah Semarang.
- Winarno, F. 1986. *Enzim Pangan dan Gizi*. PT Gramedia. Jakarta.

- Widarti. 2017. Identifikasi *Aspergillus* sp. pada mentega curah yang diperjualbelikan di pasar terong kota Makasar. *J. Media Anal. Kes.* **8**(2): 24-28.
- Wirahadikusuma, M. 1977. *Biokimia : Protein, Enzim dan Asam Nukleat*. ITP-Press. Bandung.
- Wiseman, A. 1985. *Handbook of Enzymes Biotechnology 2nd ed.* Ellis Harwood Lim. Chicester.
- Wuryanti. 2004. Isolasi dan penentuan aktivasi spesifik enzim bromelin dari buah nanas (*Ananas comosus L.*). *J. Kes.* **7**(3): 83-87.
- Yandri, Suhartati, T., and Hadi, S. 2010. Purification and characterization of extracellular α -amilase enzyme from locale bacteria isolate *Bacillus Subtilis* ITBCCB148. *Eur. J.Sci. Res.* **39**(1). 64-74.
- Yandri, A. S., dan Suhartati, T. 2018. *Peningkatan Kestabilan Enzim*. CV. Anugrah Utama Raharja. Bandar Lampung.
- Yandri, Suhartati, T., Yuwono, S.D., Qudus, H.I., Tiarsa, E.R., and Hadi S. 2018. Immobilization of α -amilase from *Bacillus Subtilis* ITBCCB148 using Bentonit. *AJMBES.* **20**(2):487-492.
- Yandri, Suhartati, T., Heri, S., Arum. W., dan Sutopo. H. 2020a. Increasing stability of α -amylase obtained from *Bacillus Subtilis* ITBCCB148 by immobilization with chitosan. *Mediterr. J. of Chem.* **10**(2): 155-161.
- Yandri, Nadila, N., Suhartati, T., Satria, H., dan Hadi, S., 2020b. Peningkatan kestabilan enzim α -amilase dengan penambahan gliserol. *J. Analit and Environ.Chem.* **5**(2): 1-12.
- Yandri, Y., 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, Y., 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 *Aspergillus fumigatus* α -amylase via adsorption onto Bentonite/Chitosan for Stability Enhancement. *Emerg. Sci. J.* **7**(5): 1811–1826.
- Yang, Z., Domach, M., Auger, R., Yang, F. X., and Russell, A. J. 1996. Polyethylene glycol-induced stabilization of subtilisin. *J. Enzyme Microb. Technol.* **18**(2): 82-89.

Zdarta, J., Meyer, A. S, Jesionowski, T., and Pinelo, M.A. 2018. A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility. *Catalyst*. **8**(92): 1-27.