

PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus fumigatus* DENGAN PENAMBAHAN ZAT ADITIF MANITOL DAN IMOBILISASI MENGGUNAKAN MATRIKS HIBRID ZEOLIT-KITIN

(Tesis)

Oleh

**ELLA GITA SILVIANA
NPM 2227011004**



**PROGRAM PASCASARJANA MAGISTER KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2024**

ABSTRAK

PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus fumigatus* DENGAN PENAMBAHAN ZAT ADITIF MANITOL DAN IMOBILISASI MENGGUNAKAN MATRIKS HIBRID ZEOLIT-KITIN

Oleh

Ella Gita Silviana

Kestabilan enzim terhadap suhu dan pH merupakan faktor yang sangat penting di industri. Pada umumnya enzim hanya mampu bekerja pada kondisi fisiologis dan tidak tahan pada kondisi suhu dan pH yang ekstrem. Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan kestabilan enzim α -amilase dari *Aspergillus fumigatus* dengan penambahan zat aditif menggunakan variasi konsentrasi manitol 0,5; 1,0; dan 1,5 M serta imobilisasi menggunakan matriks hibrid zeolit-kitin. Enzim α -amilase diisolasi dengan sentrifugasi dan dimurnikan dengan cara pengendapan menggunakan garam amonium sulfat kemudian didialisis.

Hasil penelitian menunjukkan enzim α -amilase hasil pemurnian memiliki tingkat kemurnian sebesar 17 kali lebih besar dibandingkan ekstrak kasar enzim. Uji stabilitas termal enzim hasil pemurnian setelah diinkubasi pada suhu 50°C dan pH optimum 6 selama 100 menit memiliki aktivitas sisa sebesar 17,08% dengan waktu paruh ($t_{1/2}$) sebesar 37,07 menit.

Uji stabilitas termal enzim α -amilase hasil penambahan zat aditif setelah diinkubasi pada suhu optimum 60°C dan pH optimum 5,5 selama 100 menit mempunyai aktivitas sisa berturut-turut sebesar 55,9; 64,9; dan 40,2% dengan stabilitas enzim meningkat berturut-turut sebesar 3,2; 4,5; dan 2,1 kali lebih besar ($t_{1/2}$ berturut-turut sebesar 119,51; 169,06; serta 78,32 menit) dibandingkan enzim hasil pemurnian.

Uji stabilitas termal enzim α -amilase hasil imobilisasi menggunakan matriks hibrid zeolit-kitin setelah diinkubasi pada suhu optimum 60°C dan pH optimum 5 selama 100 menit memiliki aktivitas sisa sebesar 67,30% dengan stabilitas enzim meningkat sebesar 4,7 kali lebih besar ($t_{1/2}$ sebesar 173,29 menit) dibandingkan enzim hasil pemurnian. Pemakaian berulang enzim α -amilase hasil imobilisasi dapat mempertahankan aktivitas sisa sebesar 47,54% setelah digunakan sebanyak 6 kali pengulangan.

Kata kunci: imobilisasi, zeolit-kitin, manitol, α -amilase, *Aspergillus fumigatus*.

ABSTRACT

INCREASING THE STABILITY OF THE ENZYME α -AMYLASE FROM *Aspergillus fumigatus* BY ADDITION OF MANITOL ADITIVE SUBSTANCE AND IMMOBILIZATION USING ZEOLITE-CHITIN HYBRID MATRIX

By

Ella Gita Silviana

The stability of enzymes to temperature and pH is a very important factor in industry. In general, enzymes are only able to work in physiological conditions and cannot withstand extreme temperature and pH conditions. This research aimed to increase the stability of α -amylase enzyme from *Aspergillus fumigatus* with the addition of additives using mannitol concentration variation of 0.5; 1.0; and 1.5 M and immobilization using zeolite-chitin hybrid matrix. The α -amylase enzyme was isolated by centrifugation and purified by precipitation using ammonium sulfate salt, then further dialysed.

The results showed that the purified α -amylase enzyme had a purity level 17 times greater than the crude enzyme extract. Thermal stability test of purified enzyme after incubated at 50°C and optimum pH 6 for 100 minutes had residual activity of 17.08% with half-life ($t_{1/2}$) of 37.07 minutes.

Thermal stability test of α -amylase enzyme from the addition of additives after incubation at an optimum temperature of 60°C and an optimum pH of 5.5 for 100 minutes had residual activity of 55.9; 64.9; and 40.2%, respectively, with enzyme stability increased by 3.2; 4.5; and 2.1 times greater ($t_{1/2}$ of 119.51; 169.06; and 78.32 minutes, respectively) than the purified enzyme.

The thermal stability test of the immobilized α -amylase enzyme using a zeolite-chitin hybrid matrix after incubation at an optimum temperature of 60°C and an optimum pH of 5 for 100 minutes had a residual activity of 67.30% with enzyme stability increasing by 4.7 times greater ($t_{1/2}$ of 173.29 minutes) compared to the purified enzyme. Repeated use of the immobilized α -amylase enzyme can maintain residual activity of 47.54% after 6 repetitions of use.

Keywords: immobilization, zeolite-chitin, mannitol, α -amylase, *Aspergillus fumigatus*.

PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus fumigatus* DENGAN PENAMBAHAN ZAT ADITIF MANITOL DAN IMOBILISASI MENGGUNAKAN MATRIKS HIBRID ZEOLIT-KITIN

Oleh
ELLA GITA SILVIANA

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar
MAGISTER SAINS

Pada
Program Studi Magister Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Lampung



**PROGRAM PASCASARJANA MAGISTER KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2024**

Judul Tesis

: **PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM
 α -AMILASE DARI *Aspergillus
fumigatus* DENGAN PENAMBAHAN
ZAT ADITIF MANITOL DAN
IMOBILISASI MENGGUNAKAN
MATRIKS HIBRID ZEOLIT-KITIN**

Nama Mahasiswa

: **Ella Gita Silviana**

Nomor Pokok Mahasiswa

: 2227011004

Program Studi

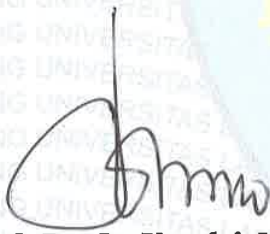
: Magister Kimia

Fakultas

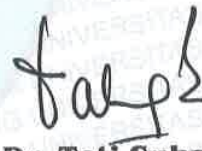
: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing



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



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

2. Ketua Program Studi Magister Kimia



Dr. Nurhasanah, M.Si.
NIP 19741211 199802 2 001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

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

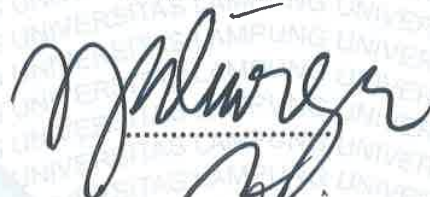


Sekretaris : **Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S.**



Penguji Bukan Pembimbing

Anggota : **Prof. Ir. Suharso, S.Si., Ph.D.**



Anggota : **Dr. Dian Herasari, M.Si.**



Anggota : **Prof. Wasinton Simanjuntak, Ph.D.**



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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

3. Direktur Program Pascasarjana



Prof. Dr. Ir. Murhadi, M.Si.
NIP 19640326 198902 1 001

Tanggal Lulus Ujian Tesis : **24 April 2024**

PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama Mahasiswa : Ella Gita Silviana
Nomor Pokok Mahasiswa : 2227011004
Program Studi : Magister Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

menyatakan dengan sebenarnya bahwa:

1. Tesis dengan judul "**Peningkatan Kestabilan Enzim α -Amilase dari *Aspergillus fumigatus* dengan Penambahan Zat Aditif Manitol dan Imobilisasi Menggunakan Matriks Hibrid Zeolit-Kitin**" adalah karya saya sendiri, baik gagasan, hasil, maupun data analisisnya, dan saya tidak melakukan penjiplakan (*plagiarisme*) atas karya penulis lain dengan cara yang tidak sesuai dengan etika ilmiah yang berlaku.
2. Hak intelektual atas karya ilmiah ini diserahkan kepada Univeritas Lampung. Saya tidak keberatan jika data tesis ini dikemudian hari digunakan oleh pihak dosen atau Prodi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya dicantumkan.

Atas pernyataan ini, apabila dikemudian hari ditemukan adanya ketidakbenaran, maka saya bersedia menerima sanksi sesuai hukum yang berlaku.

Bandar Lampung, 24 April 2024
Pembuat pernyataan,



Ella Gita Silviana
NPM. 2227011004

SANWACANA

Allhamdulillahirobbil'alamin, segala puji dan syukur kepada Allah *Subhanahu wata'ala* atas segala ridho-Nya kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini yang berjudul “**Peningkatan Kestabilan Enzim α -Amilase dari *Aspergillus fumigatus* dengan Penambahan Zat Aditif Manitol dan Imobilisasi Menggunakan Matriks Hibrid Zeolit-Kitin**”. Sholawat serta salam semoga selalu tercurah kepada Nabi Muhammad *Sallallahu 'Alaihiwasallam*, keluarga dan para sahabatnya. Penulis mengucapkan terima kasih kepada berbagai pihak yang telah membantu dalam penyelesaian tesis ini, terkhusus kepada pihak-pihak berikut:

1. Bapak dan Mamah

Bapak F.D. Supriyanto dan Bapak Purnomo serta Ibu Ratna Handayani. Terima kasih atas ilmu, kesabaran, do'a, dan dukungan berupa materiil dan motivasinya. Semoga Allah selalu memberi kesehatan, kesuksesan dan kebahagiaan serta kenyamanan di dunia dan akhirat buat Bapak dan Mamah. *Allahuma amiin*.

2. Dosen Pembimbing

Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S. dan Ibu Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S.

Terima kasih atas ilmu, kesabaran, dan dukungan berupa materiil dan motivasinya. Bapak dan Ibu Pembimbing membimbing penulis bukan sebatas dosen pembimbing dan mahasiswa, akan tetapi seperti keluarga. Bagi penulis, Bapak dan Ibu adalah orangtua penulis di Universitas Lampung. Semoga Allah selalu memberikan kesehatan, kelancaran segala

urusan Bapak dan Ibu, serta kebahagiaan di dunia dan akhirat buat Bapak dan Ibu pembimbing. *Allahuma aamiin.*

3. Dosen Pembahas

Bapak Prof. Ir. Suharso, S.Si., Ph.D., Ibu Dr. Dian Herasari, M.Si., dan Bapak Prof. Drs. Wasinton Simanjuntak, M.Sc., Ph.D.

Terima kasih atas kesabaran, kesempatan dan ilmu yang Bapak dan Ibu berikan kepada penulis. Semoga Allah selalu memberikan kesehatan dan kelancaran segala urusan Bapak dan Ibu pembahas. *Allahuma aamiin.*

4. Ketua Program Studi Pascasarjana Kimia

Ibu Dr. Nurhasanah, M.Si.

Terima kasih atas segala bantuan dan saran demi kelancaran penulis selama studi. Semoga Allah selalu memberikan kesehatan dan kelancaran segala urusan untuk Ibu. *Allahuma aamiin.*

5. Bapak dan Ibu dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah memberikan ilmu serta pengalaman yang dapat menjadi motivasi, penulis ucapkan terima kasih, semoga Allah membalas kebaikan Bapak Ibu semuanya, aamiin.

6. Sahabat-sahabatku mahasiswa pascasarjana FMIPA Unila angkatan 2022.

Terima kasih telah menjadi sahabat yang baik selama studi, semoga silaturahmi kita tidak akan pernah terputus meskipun telah menjadi alumni.

7. Bestie Kosan

Tiara May Rosita, S.Si.

Terima kasih atas bantuannya kepada penulis selama studi dan memberi saran untuk memilih Bapak Wasinton sebagai Pembahas. Semoga Allah selalu memberikan kesuksesan, kesehatan dan kelancaran untukmu agar kamu selalu bisa selalu menjadi orang yang membanggakan orangtuamu.

Terima kasih kepada semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, tetapi saudara sangatlah berarti bagi penulis dan akan selalu

dikenang oleh penulis. Semoga tesis ini dapat bermanfaat untuk siapapun yang membacanya, meskipun penulis menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari kesempurnaan.

Bandar Lampung, 24 April 2024
Penulis

Ella Gita Silviana

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian.....	4
1.3. Manfaat Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Enzim α -Amilase.....	5
2.2. Jamur <i>Aspergillus fumigatus</i>	7
2.3. Zat Aditif	8
2.4. Penambahan Zat Aditif.....	8
2.5. Manitol	9
2.6. Imobilisasi Enzim.....	10
a. Metode Fisika.....	10
b. Metode Kimia.....	11
2.7. Kitin.....	13
2.8. Zeolit	14
2.9. Matriks Hibrid.....	16
2.10. Isolasi Enzim α -Amilase dengan Sentrifugasi	17
2.11. Pemurnian Enzim α -Amilase	18
a. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat	18
b. Dialisis	18
2.12. Uji Kadar Protein dan Aktivitas Enzim α -Amilase	19
a. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry	19
b. Penentuan Aktivitas Enzim	20
c. Kinetika Reaksi Enzim.....	21
d. Stabilitas Enzim	24
2.13. Analisis Spektroskopi <i>Fourier Transform Infra Red</i> (FTIR).....	25
a. Analisis Gugus Fungsi pada Kitin Menggunakan Spektroskopi FTIR.....	26
b. Analisis Gugus Fungsi pada Glutaraldehida Menggunakan Spektroskopi FTIR.....	26

2.14. Analisis Spektroskopi Ultraviolet-Visible (UV-Vis)	26
III. METODE PENELITIAN.....	28
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian	28
3.2. Alat dan Bahan Penelitian	28
3.3. Prosedur Penelitian.....	29
3.3.1. Pemiakan Isolat <i>A. fumigatus</i>	29
a. Pembuatan Media Agar Miring	29
b. Pemiakan <i>A. fumigatus</i>	29
3.3.2. Pembuatan Media Inokulum dan Fermentasi, Inokulasi <i>A. fumigatus</i> , serta Produksi Enzim α -Amilase	30
a. Pembuatan Media Inokulum dan Fermentasi	30
b. Inokulasi <i>A. fumigatus</i>	30
c. Produksi Enzim α -Amilase	30
3.3.3. Uji Aktivitas dan Kadar Protein Enzim α -Amilase	31
a. Penentuan Aktivitas Enzim α -Amilase dengan Metode Mandels	31
b. Penentuan Aktivitas Enzim α -Amilase dengan Metode Fuwa	31
c. Penentuan Kadar Protein Enzim α -Amilase dengan Metode Lowry	32
3.3.4. Pemurnian Enzim α -Amilase	33
a. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	33
b. Dialisis	34
3.3.5. Penambahan Zat Aditif Manitol pada Enzim α -Amilase Hasil Pemurnian	35
3.3.6. Karakterisasi Enzim α -Amilase Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Penambahan Zat Aditif Manitol	35
a. Penentuan pH Optimum Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Penambahan Zat Aditif Manitol.....	35
b. Penentuan Suhu Optimum Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Penambahan Zat Aditif Manitol.....	35
c. Penentuan Data Kinetika (Nilai K_M dan V_{maks}) Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Penambahan Zat Aditif Manitol	36
d. Penentuan Stabilitas Termal Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Penambahan Zat Aditif Manitol.....	36
e. Penentuan Waktu Paruh ($t_{1/2}$), Konstanta Laju Inaktivasi (k_i), dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i)	36
3.3.7. Sintesis dan Karakterisasi Matriks Hibrid Zeolit-Kitin	37
3.3.8. Imobilisasi Enzim α -Amilase Hasil Pemurnian Menggunakan Matriks Zeolit-Kitin	37
a. Penentuan pH Pengikatan Enzim Hasil Pemurnian dengan Matriks Hibrid Zeolit-Kitin	37
b. Imobilisasi Enzim α -Amilase Hasil Pemurnian Menggunakan Matriks Hibrid Zeolit-Kitin	38
3.3.9. Karakterisasi Enzim α -Amilase Hasil Imobilisasi	38

a.	Penentuan Suhu Optimum Enzim Hasil Imobilisasi	38
b.	Penentuan Data Kinetika Enzim (Nilai K_M dan V_{maks}) Enzim Hasil Imobilisasi	38
c.	Penentuan Stabilitas Termal Enzim Hasil Imobilisasi	39
d.	Pemakaian Berulang Enzim Hasil Imobilisasi	39
e.	Penentuan, Konstanta Laju Inaktivasi (k_i), Waktu Paruh ($t_{1/2}$), dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i)	39
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	41
4.1.	Produksi dan Isolasi Enzim α -Amilase dari <i>A. fumigatus</i>	41
4.2.	Pemurnian Enzim α -Amilase	41
4.3.	Karakterisasi Enzim α -Amilase Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Penambahan Zat Aditif Manitol	44
a.	Penentuan pH Optimum Enzim α -Amilase Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Penambahan Zat Aditif Manitol Berdasarkan Aktivitas Sisa	44
b.	Penentuan Suhu Optimum Enzim α -Amilase Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Penambahan Zat Aditif Manitol Berdasarkan Aktivitas Sisa	46
c.	Penentuan Data Kinetika (Nilai K_M dan V_{maks}) Enzim α -Amilase Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Penambahan Zat Aditif Manitol	47
d.	Penentuan Stabilitas Termal Enzim α -Amilase Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Penambahan Zat Aditif Manitol Berdasarkan Aktivitas Sisa	49
e.	Penentuan Konstanta Laju Inaktivasi (k_i), Waktu Paruh ($t_{1/2}$), dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i) Enzim α -Amilase Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Penambahan Zat Aditif Manitol	50
4.4.	Imobilisasi Enzim Hasil Pemurnian dengan Menggunakan Matriks Hibrid Zeolit-Kitin	52
4.4.1.	Analisis Spektrofotometri FTIR	52
4.4.2.	Karakterisasi Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Imobilisasi	55
a.	Penentuan pH Optimum Enzim Hasil Pemurnian Berdasarkan Aktivitas Sisa	55
b.	Penentuan pH Pengikatan Enzim Hasil Pemurnian pada Matriks Hibrid Zeolit-Kitin Berdasarkan Aktivitas Sisa	55
c.	Penentuan Suhu Optimum Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Imobilisasi Berdasarkan Aktivitas Sisa	56
d.	Penentuan Nilai K_M dan V_{maks} Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Imobilisasi	57
e.	Penentuan Stabilitas Termal Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Imobilisasi Berdasarkan Aktivitas Sisa	59

f. Penentuan Konstanta Laju Inaktivasi (k_i), Waktu Paruh ($t_{1/2}$), dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i) Enzim Hasil Pemurnian serta Enzim Hasil Imobilisasi.....	61
g. Pemakaian Berulang Enzim Hasil Imobilisasi	64
V. SIMPULAN DAN SARAN	66
5.1. Simpulan	66
5.2. Saran.....	67
DAFTAR PUSTAKA.....	68
LAMPIRAN.....	74

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil pemurnian enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	43
2. Data kinetika (K_M dan V_{maks}) untuk enzim hasil pemurnian dan enzim hasil penambahan zat aditif manitol 0,5; 1,0; dan 1,5 M	48
3. Nilai k_i , $t_{1/2}$ dan ΔG_i dari enzim hasil pemurnian dan enzim hasil penambahan zat aditif manitol 0,5; 1,0; dan 1,5 M.	50
4. Data kinetika untuk enzim hasil pemurnian dan enzim hasil imobilisasi pada matriks zeolit, kitin, dan hibrid zeolit-kitin.	58
5. Nilai k_i , $t_{1/2}$, dan ΔG_i dari enzim hasil pemurnian dan enzim hasil imobilisasi menggunakan matriks zeolit, kitin, dan hibrid zeolit-kitin.....	62
6. Pemakaian berulang enzim hasil imobilisasi pada matriks zeolit, kitin, dan hibrid zeolit-kitin.	64
7. Hubungan antara berbagai tingkat kejenuhan amonium sulfat dengan aktivitas unit, kadar protein, dan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	75
8. Hubungan antara berbagai tingkat kejenuhan amonium sulfat (0-20)% dan (20-80)% dengan aktivitas unit, kadar protein, dan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	75
9. Aktivitas spesifik enzim α -amilase hasil dialisis	75
10. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode Fuwa (λ_{maks} : 600 nm) pada ekstrak kasar enzim, hasil fraksinasi, dan hasil dialisis	76
11. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode Lowry (λ_{maks} : 750 nm) pada ekstrak kasar enzim, hasil fraksinasi, dan hasil dialisis	77
12. Hubungan antara absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i> hasil penambahan manitol 0,5 M dalam berbagai pH.....	78

13. Hubungan antara absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i> hasil penambahan manitol 1,0 M dalam berbagai pH.....	78
14. Hubungan antara absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i> hasil penambahan manitol 1,5 M dalam berbagai pH.....	79
15. Hubungan antara absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i> hasil pemurnian dalam berbagai pH.	79
16. Hubungan antara suhu dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i> hasil penambahan manitol 0,5 M.....	81
17. Hubungan antara suhu dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i> hasil penambahan manitol 1,0 M.....	81
18. Hubungan antara suhu dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i> hasil penambahan manitol 1,5 M.....	82
19. Hubungan antara suhu dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim α -amilase hasil pemurnian dari <i>A. fumigatus</i>	82
20. Hubungan antara konsentrasi substrat dengan aktivitas unit enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i> hasil penambahan manitol 0,5; 1,0; dan 1,5 M.....	83
21. Data grafik <i>Lineweaver-Burk</i> enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i> hasil pemurnian dan hasil penambahan manitol 0,5; 1,0; dan 1,5 M.	83
22. Hubungan antara aktivitas unit, aktivitas sisa, dan laju inaktivasi termal ($\ln E_i/E_0$) enzim α -amilase hasil penambahan manitol 0,5 M dengan variasi waktu inaktivasi pada suhu 60°C.....	84
23. Hubungan antara aktivitas unit, aktivitas sisa, dan laju inaktivasi termal ($\ln E_i/E_0$) enzim α -amilase hasil penambahan manitol 1,0 M dengan variasi waktu inaktivasi pada suhu 60°C.....	85
24. Hubungan antara aktivitas unit, aktivitas sisa, dan laju inaktivasi termal ($\ln E_i/E_0$) enzim α -amilase hasil penambahan manitol 1,5 M dengan variasi waktu inaktivasi pada suhu 60°C.....	86
25. 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 50°C.....	87
26. Perhitungan waktu paruh ($t_{1/2}$) enzim hasil pemurnian dan enzim hasil penambahan zat aditif manitol 0,5; 1,0 dan 1,5 M.....	88
27. Perhitungan nilai ΔG_i enzim hasil pemurnian dan enzim hasil penambahan zat aditif manitol 0,5; 1,0 dan 1,5 M.....	89
28. Data grafik laju inaktivasi termal orde satu enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil penambahan manitol 0,5; 1,0; dan 1,5 M.....	90

29. Hubungan antara bilangan gelombang (cm^{-1}) dengan transmitansi (%) pada spektra FT-IR matriks zeolit, kitin, dan hibrid zeolit-kitin.....	91
30. Absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i> hasil imobilisasi pada matriks hibrid zeolit-kitin dalam berbagai pH pengikatan.....	93
31. Hubungan antara suhu dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i> hasil imobilisasi pada matriks hibrid zeolit-kitin.....	94
32. Hubungan antara konsentrasi substrat dengan aktivitas unit enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i> hasil imobilisasi pada matriks hibrid zeolit-kitin	95
33. Data grafik <i>Lineweaver-Burk</i> enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i> hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks hibrid zeolit-kitin	95
34. Hubungan antara aktivitas unit, aktivitas sisa, dan laju inaktivasi termal ($\ln E_i/E_0$) enzim α -amilase hasil imobilisasi pada matriks hibrid zeolit-kitin dengan variasi waktu inaktivasi pada suhu 60°C	96
35. Data grafik laju inaktivasi termal orde satu enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks hibrid zeolit-kitin	97
36. Perhitungan waktu paruh ($t_{1/2}$) enzim hasil pemurnian dan enzim hasil imobilisasi pada matriks hibrid zeolit-kitin	98
37. Perhitungan nilai ΔG_i enzim hasil pemurnian dan enzim hasil imobilisasi pada matriks hibrid zeolit-kitin	99
38. Absorbansi BSA pada berbagai konsentrasi	100
39. Absorbansi glukosa pada berbagai konsentrasi	101

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Ilustrasi mekanisme pemecahan pati oleh enzim α -amilase dari <i>A. oryzae</i>	6
2. Jamur <i>A. fumigatus</i>	7
3. Struktur manitol	9
4. Teknik umum metode imobilisasi enzim.....	10
5. Bubuk kitin.....	13
6. Struktur kitin	13
7. Struktur zeolit.....	15
8. Interaksi zeolit dengan enzim α -amilase.....	15
9. Diagram <i>Lineweaver-Burk</i>	22
10. Skema pengendapan enzim dengan amonium sulfat	33
11. Diagram alir penelitian.....	40
12. Produksi enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	41
13. Hubungan antara persentase tingkat kejenuhan amonium sulfat (0–20)%, (20–40)%, (40–60)%, (60–80)%, dan (80–100)% dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari jamur <i>A. fumigatus</i>	42
14. Hubungan antara persentase tingkat kejenuhan amonium sulfat (0–20)% dan 20–80% dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari jamur <i>A. fumigatus</i>	43
15. Aktivitas sisa enzim hasil pemurnian dan enzim hasil penambahan zat aditif manitol 0,5; 1,0; dan 1,5 M pada variasi pH.....	44
16. Aktivitas sisa enzim hasil pemurnian dan enzim hasil penambahan zat aditif manitol 0,5; 1,0; dan 1,5 M pada variasi suhu	46
17. Grafik <i>Lineweaver-Burk</i> dari enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim hasil penambahan zat aditif manitol 0,5; 1,0; dan 1,5 M.....	48

18. Aktivitas sisa enzim hasil pemurnian (pada suhu 50°C) dan enzim hasil penambahan zat aditif manitol 0,5; 1,0 dan 1,5 M (pada suhu 60°C) pada variasi waktu inaktivasi.....	49
19. Grafik laju inaktivasi orde pertama dari enzim hasil pemurnian dan enzim hasil penambahan zat aditif manitol 0,5; 1,0; dan 1,5 M	51
20. Spektra FTIR kitin, zeolit, dan matriks hibrid zeolit-kitin.....	53
21. Ilustrasi interaksi antara gugus karbonil pada glutaraldehida dengan gugus OH pada kitin maupun zeolit.....	54
22. Aktivitas sisa enzim α -amilase hasil pemurnian dalam berbagai pH	55
23. Aktivitas unit enzim α -amilase pada matriks hibrid zeolit-kitin dalam berbagai pH pengikatan	56
24. Aktivitas sisa enzim hasil pemurnian dan enzim hasil imobilisasi pada matriks hibrid zeolit-kitin dalam berbagai suhu	57
25. Grafik <i>Lineweaver-Burk</i> dari enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim hasil imobilisasi pada matriks hibrid zeolit-kitin	58
26. Aktivitas sisa enzim hasil pemurnian dan enzim hasil imobilisasi pada matriks hibrid zeolit-kitin dalam berbagai waktu inaktivasi	59
27. Ilustrasi interaksi antara enzim α -amilase dengan matriks hibrid zeolit-kitin	60
28. Grafik laju inaktivasi orde pertama dari enzim hasil pemurnian dan enzim hasil imobilisasi pada matriks hibrid zeolit-kitin	62
29. Pemakaian berulang enzim hasil imobilisasi pada matriks hibrid zeolit-kitin	65
30. Spektra FTIR sampel kitin	92
31. Spektra FTIR sampel zeolit.....	92
32. Spektra FTIR sampel zeolit-kitin	93
33. Kurva standar BSA	100
34. Kurva standar glukosa.....	101

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Penentuan Pola Fraksi	75
2. Data Penentuan pH Optimum Menggunakan Metode Mandels	78
3. Data Penentuan Suhu Optimum Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Penambahan Zat Aditif Manitol 0,5; 1,0; dan 1,5 M.....	81
4. Data Penentuan K_M Dan V_{maks} Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Penambahan Zat Aditif Manitol 0,5; 1,0; dan 1,5 M.....	83
5. Data Penentuan Kestabilan Termal Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Penambahan Zat Aditif Manitol 0,5; 1,0; dan 1,5 M.	84
6. Perhitungan Waktu Paruh ($t_{1/2}$) Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Penambahan Zat Aditif Manitol 0,5; 1,0; dan 1,5 M.....	87
7. Perhitungan Perubahan Energi Bebas Akibat Denaturasi (ΔG_i) Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Penambahan Zat Aditif Manitol 0,5; 1,0; dan 1,5 M.	88
8. Data Grafik Laju Inaktivasi Termal Enzim α -Amilase Hasil Pemurnian dan Hasil Penambahan Zat Aditif Manitol 0,5; 1,0; dan 1,5 M....	90
9. Spektre FTIR Sampel Kitin, Zeolit, dan Zeolit-Kitin	91
10. Data Penentuan pH Pengikatan Enzim Hasil Imobilisasi Menggunakan Metode Fuwa.....	93
11. Data Suhu Optimum Enzim α -Amilase dari <i>A. Fumigatus</i> Hasil Imobilisasi pada Matriks Hibrid Zeolit-Kitin	94
12. Data Penentuan K_M dan V_{maks} Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Imobilisasi pada Matriks Hibrid Zeolit-Kitin.	95
13. Data Penentuan Kestabilan Termal Enzim Hasil Imobilisasi pada Matriks Hibrid Zeolit-Kitin.....	96
14. Data Grafik Laju Inaktivasi Termal Enzim α -Amilase Hasil Pemurnian dan Hasil Imobilisasi pada Matriks Hibrid Zeolit-Kitin.....	97
15. Perhitungan Waktu Paruh ($t_{1/2}$) Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Imobilisasi pada Matriks Hibrid Zeolit-Kitin	98

16. Perhitungan Perubahan Energi Bebas Akibat Denaturasi (ΔG_i) Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Imobilisasi pada Matriks Hibrid Zeolit-Kitin	98
17. Kurva Standar <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA)	100
18. Kurva Standard Glukosa	101

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Peran enzim sebagai biokatalis semakin meluas di bidang industri pangan, tekstil, dan farmasi. Enzim mampu bekerja secara spesifik dan selektif (Zhang *et al.*, 2021). Selain itu, penggunaan enzim juga lebih ramah lingkungan dan bekerja dengan baik pada kondisi normal (Yandri *et al.*, 2023). Beberapa enzim yang banyak digunakan dalam industri yaitu nuklease, protease, lipase, polimerase, dan amilase (Yandri *et al.*, 2022b). Enzim amilase dapat diklasifikasi menjadi tiga, yaitu α -amilase, β -amilase, dan glukoamilase. Enzim α -amilase adalah salah satu enzim yang banyak digunakan dalam industri, termasuk dalam sakarifikasi pati, pengolahan makanan, produksi bir, dan farmasi (Nangin dan Sutrisno, 2015).

Enzim α -amilase memecah ikatan α -1,4 glikosidik secara acak di sepanjang rantai polimer pati menghasilkan glukosa, maltosa, dan dekstrin (Yandri *et al.*, 2022a). Umumnya enzim ini hanya dapat bekerja pada kondisi fisiologis yaitu pada pH antara 6,9–7,0 dan suhu antara 37–40°C (Zhang *et al.*, 2021). Pada industri, enzim α -amilase diharapkan mampu bekerja secara optimum pada suhu 60–125°C dan pH yang asam ataupun basa. Penelitian Yandri dkk. 2020a dan Yandri dkk. 2020b telah mendapatkan enzim α -amilase yang stabil pada suhu serta pH yang ekstrem melalui metode penambahan zat aditif menggunakan senyawa alkohol polihidrat (poliol), sedangkan dengan metode imobilisasi menggunakan matriks organik, anorganik, maupun hibrid telah berhasil dilakukan oleh Yandri *et al.* 2022a; Yandri *et al.* 2022b; dan Yandri *et al.* 2023. Keunggulan utama dari metode imobilisasi adalah kemampuan enzim untuk dapat digunakan secara berulang (Yandri *et al.*, 2022a), sedangkan metode penambahan zat aditif

menggunakan senyawa poliol hanya memerlukan prosedur yang sederhana (Yandri dkk., 2020a; Yandri dkk., 2020b).

Sorbitol, gliserol, dan manitol adalah senyawa poliol yang dapat meningkatkan stabilitas enzim (Yandri dkk., 2009; Yandri dkk., 2020a; Yandri dkk., 2020b; Riwu, 2022). Penambahan sorbitol dengan konsentrasi 0,5; 1,0; dan 1,5 M mampu meningkatkan stabilitas enzim α -amilase berturut-turut sebesar 1,2; 1,8; dan 1,5 kali (waktu paruh 37,6; 48,8; dan 39,8 menit) dibanding enzim hasil pemurnian, yaitu 26,5 menit (Yandri dkk., 2020b). Sedangkan penambahan gliserol dengan konsentrasi 0,5; 1,0; dan 1,5 M dapat meningkatkan stabilitas enzim α -amilase berturut-turut sebesar 1,2; 1,4; dan 1,7 kali dengan masing-masing waktu paruh sebesar 157,5; 182,3; dan 223,5 menit dibanding enzim hasil pemurnian, yaitu 133,3 menit (Yandri dkk., 2020a). Pada penelitian ini, dilakukan metode penambahan zat aditif manitol untuk meningkatkan kestabilan enzim α -amilase.

Imobilisasi enzim merupakan proses pengikatan atau penahanan molekul enzim secara fisik pada suatu material (matriks) yang tidak larut dalam air. Dalam penelitian ini digunakan imobilisasi dengan metode fisika (Hwang *and* Gu, 2013; Robinson, 2015; Zdarta *et al.*, 2018). Imobilisasi dengan metode fisika cenderung tidak mengubah struktur enzim karena enzim hanya teradsorpsi pada permukaan matriks yang tidak larut dalam air (Zhang *et al.*, 2021). Namun, metode ini memiliki kelemahan, yaitu enzim dapat terlepas dari matriks selama reaksi apabila pemilihan matriks tidak sesuai (Yandri *et al.*, 2022a). Pemilihan matriks yang sesuai sangat penting untuk mengoptimalkan kinerja enzim yang diimobilisasi (Yandri *et al.*, 2020). Contoh matriks yang dapat digunakan adalah kitin (matriks organik) dan zeolit (matriks anorganik).

Kitin merupakan senyawa organik yang tidak larut dalam air, stabil secara termal, memiliki gugus amida dan gugus hidroksil. Beberapa gugus fungsi dalam kitin tersebut dapat membentuk ikatan non-kovalen dengan enzim menghasilkan interaksi hidrofobik. Interaksi hidrofobik akan membuat struktur enzim

mengalami pelipatan (*folding*), sehingga struktur enzim terjaga dari terbukanya rantai polipeptida (*unfolding*). Selain itu interaksi ini juga membuat matriks dapat diregenerasi (Yandri *et al.*, 2022b). Pada tahun 2023, Yandri *et al.* telah melaporkan bahwa imobilisasi enzim α -amilase dari jamur *A. fumigatus* menggunakan kitin dapat meningkatkan stabilitas enzim sebesar 1,5 kali enzim hasil pemurnian. Enzim hasil imobilisasi pada kitin juga masih mempunyai aktivitas sisa sebesar 46% setelah digunakan 6 kali pemakaian.

Zeolit merupakan matriks pendukung berbahan anorganik yang stabil secara termal dengan struktur berpori. Struktur pori zeolit dapat mengadsorpsi enzim, sehingga memberikan tempat untuk enzim berinteraksi dan terikat secara fisik pada permukaan zeolit. Hal ini membantu melindungi enzim dari perubahan lingkungan eksternal yang dapat merusak struktur dan aktivitas katalitik enzim (Zhang *et al.*, 2021). Pada penelitian Yandri *et al.* (2022b), imobilisasi enzim α -amilase dari jamur *A. fumigatus* pada matriks zeolit dapat meningkatkan stabilitas enzim sebesar 2,38 kali lipat dibandingkan enzim hasil pemurnian. Enzim hasil imobilisasi pada zeolit juga masih mempunyai aktivitas sisa sebesar 13,8% setelah 5 kali pemakaian.

Sintesis matriks hibrid zeolit-kitin diharapkan mampu menjadi matriks imobil yang lebih unggul dalam meningkatkan kestabilan enzim dibandingkan dengan penggunaan zeolit ataupun kitin saja (Yandri *et al.*, 2022a). Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan dari penelitian Yandri *et al.*, 2020b dan Yandri *et al.*, 2023. Enzim α -amilase hasil pemurnian ditingkatkan kestabilannya dengan metode penambahan zat aditif manitol dan imobilisasi menggunakan matriks hibrid zeolit-kitin, sehingga enzim tersebut dapat dijadikan alternatif untuk aplikasi di industri.

1.2. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Mendapatkan enzim α -amilase hasil pemurnian dari jamur *A. fumigatus* dengan tingkat kemurnian yang tinggi.
2. Mendapatkan enzim α -amilase hasil penambahan zat aditif menggunakan manitol dan hasil imobilisasi menggunakan hibrida zeolit-kitin dengan kestabilan yang lebih tinggi dari enzim hasil pemurnian.

1.3. Manfaat Penelitian

Adapun manfaat penelitian ini yaitu enzim α -amilase dari *A. fumigatus* yang diimobilisasi menggunakan hibrida zeolit-kitin dan hasil penambahan zat aditif manitol meningkat kestabilannya serta dapat digunakan dalam bidang industri.

II. TINJAUAN PUSTAKA

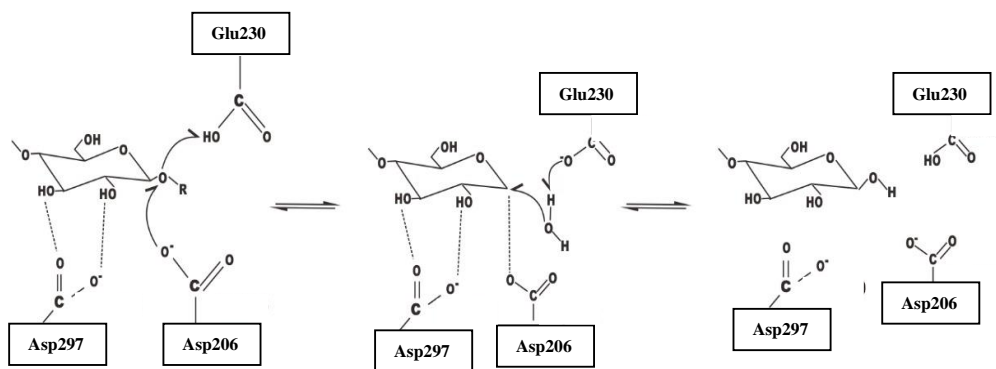
2.1. Enzim α -Amilase

Enzim merupakan biokatalisator yang memiliki spesifitas serta selektivitas yang tinggi pada suatu reaksi. Enzim mendukung program kimia hijau yang memungkinkan reaksi kimia berlangsung pada suhu dan tekanan yang lebih rendah serta bersifat *biodegradable* (Zhang *et al.*, 2021). Penggunaan enzim sebagai katalis dalam industri memiliki keuntungan sebagai berikut: ramah lingkungan, bekerja dengan baik pada kondisi ringan, memiliki toksisitas rendah, mengurangi waktu dan biaya produksi serta dapat meningkatkan kualitas produk (Zhang *et al.*, 2021).

Beberapa enzim yang terlibat dalam industri antara lain protease, lipase, polimerase, nuklease, dan amilase (Yandri *et al.*, 2022a). Enzim amilase dapat dikelompokkan menjadi α -amilase, β -amilase, dan glucoamilase. Enzim glucoamilase dapat memecah ikatan α -1,4 glikosidik dalam amilosa, amilopektin, dan glikogen, selain itu dapat juga menghidrolisis ikatan α -1,6 dan α -1,3, meskipun pemecahan ikatan tersebut sangat lambat. Enzim β -amilase merupakan enzim yang memecah ikatan α -1,4-glikosidik dari luar molekul dan menghasilkan unit-unit maltosa dari ujung non pereduksi pada rantai polisakarida. Aktivitas enzim akan terhenti bila pada ikatan α -1,6-glikosidik seperti yang terdapat pada amilopektin atau glikogen,. Kerja enzim α -amilase cenderung lebih cepat dibanding β -amilase, hal ini dikarenakan enzim α -amilase dapat bekerja memecah ikatan α -1,4-glikosidik pada bagian tengah, sedangkan β -amilase hanya pada bagian ujung rantai yang tidak mengandung gugus aldehid maupun keton (Nangin dan Sutrisno, 2015).

Enzim α -amilase telah banyak diaplikasikan dalam berbagai bidang industri, mulai dari makanan dan minuman, bahan kimia, farmasi, peralatan medis, biosensor, kertas dan *pulp*, kulit, tekstil, deterjen, kosmetik, pakan ternak dan biofuel.

Enzim α -amilase (α -1,4-glukan-4-glukanohidrolase, EC 3.2.1.1) memecah ikatan α -1,4 glikosidik dalam polimer pati, menghasilkan glukosa, maltosa, dan dekstrin (Vogel and May, 2019). Pada enzim α -amilase yang berasal dari *Aspergillus oryzae*, pemecahan dibantu oleh tiga residu asam amino yaitu Glu230, Asp297, dan Asp206 (Gee *et al.*, 2021). Tahapan pertama merupakan pengikatan substrat oleh Asp297. Tahap selanjutnya yaitu Glu230 dalam bentuk asam akan mendonorkan proton ke oksigen pada ikatan glikosidik substrat. Produk dari reaksi tersebut adalah sebuah ion oksokarbonium pada keadaan transisi yang diikuti dengan pembentukan kovalen intermediet. Molekul H₂O kemudian menyerang ikatan kovalen antara oksigen dan residu Asp206. Asam glutamat kemudian menerima H dari molekul H₂O dan residu Asp206 membentuk gugus hidroksil baru pada molekul glukosa yang ditunjukkan pada Gambar 1 (Nangin dan Sutrisno, 2015).



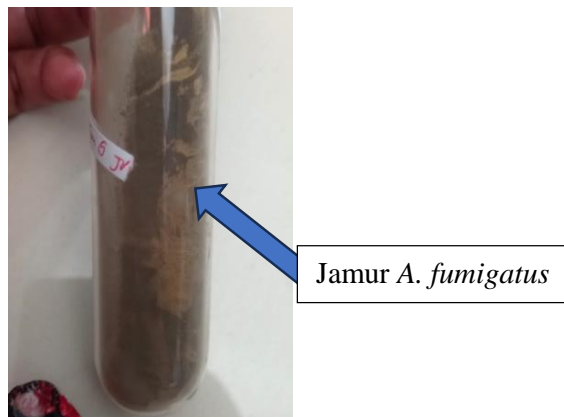
Gambar 1. Ilustrasi mekanisme pemecahan pati oleh enzim α -amilase dari *A. oryzae* (Gee *et al.*, 2021; Nangin dan Sutrisno, 2015).

Enzim α -amilase umumnya dapat diisolasi secara ekstraseluler dari jamur *Aspergillus*. Jamur *A. fumigatus* dapat beradaptasi dengan berbagai senyawa

organik untuk metabolismenya dan tidak memerlukan nutrisi khusus (Yandri *et al.*, 2023).

2.2. Jamur *Aspergillus fumigatus*

Jamur *A. fumigatus* berhasil diisolasi dari tanah lalu dibiakkan dalam media Potato Dextrose Agar (PDA) yang mengandung pati 0,5 % selama 120 jam (Nwagu *and* Okolo, 2011). Pada penelitian Nwagu *and* Okolo (2011), enzim amilase dari *A. fumigatus* dihasilkan pada pH optimum 6,0 selama 96 jam dalam media berisi pati 1% dan nitrogen organik 1,5%. Enzim tersebut tetap stabil pada pH 4,5. Aktivitas hidrolitik tertinggi adalah saat enzim bereaksi dengan pati dari ubi jalar, kentang dan singkong. Menurut Ratnasri *et al.* (2018), isolat *A. fumigatus* menghasilkan koloni berwarna hijau (Gambar 2).



Gambar 2. Jamur *A. fumigatus*.

Jamur *A. fumigatus* memiliki pertumbuhan yang cepat, mudah dikembangbiakkan, mudah ditemukan di alam, menghasilkan enzim dalam waktu singkat dengan jumlah yang besar, tidak bergantung musim, kondisi optimum reaksi yang mudah diatur, dan mudah dimusnahkan setelah pemakaian (Brahmachari *et al.*, 2017). *A. fumigatus* berpotensi menjadi penghasil enzim komersial (Ratnasri *et al.*, 2018). Beberapa enzim komersial, seperti urease, laktase, karbonat anhidrase, peroksidase, dan amilase memerlukan tambahan kofaktor anorganik atau organik untuk dapat mencapai aktivitas katalitik pada pH dan suhu yang optimum (Yandri

et al., 2022b). Berbagai cara yang dapat dilakukan untuk mempertahankan stabilitas enzim α -amilase, yaitu melalui metode modifikasi kimia, metode imobilisasi, dan metode penambahan zat aditif (Lestari dkk., 2011).

2.3. Zat Aditif

Zat aditif adalah zat yang ditambahkan ke dalam reaksi untuk tujuan tertentu. Zat aditif dikelompokkan dalam beberapa kelompok, yaitu substrat atau koenzim, ion logam, garam dan anion, polimer, gula, poliol serta aditif lainnya (Lestari dkk., 2011). Beberapa aditif yang telah diketahui dapat mempertahankan stabilitas enzim diantaranya adalah gula (sukrosa dan laktosa), garam-garam (amonium disulfida) dan macam-macam polimer, serta poliol (gliserol, sorbitol dan manitol) (Costa *et al.*, 2002). Peningkatan stabilitas enzim oleh senyawa poliol disebabkan gugus hidroksil dari poliol dapat melakukan interaksi hidrofobik dengan enzim, sehingga konformasi enzim menjadi lebih *rigid* (Lestari dkk., 2011). Interaksi hidrofobik berperan pada pengikatan antara substrat dengan enzim (Wulandari dan Hendarmin, 2010). Interaksi ini sangat penting dalam menjaga struktur enzim agar terjadi pelipatan (*fold*ing) (Yandri dan Wulandari, 2009) membentuk konformasi dan menjaga stabilitas enzim (Wulandari dan Hendarmin, 2010), sehingga tidak terjadi pembukaan rantai polipeptida (*un*fold)ing) (Yandri dan Wulandari, 2009). Yandri dkk., (2020a) dan Yandri dkk., (2020b) telah berhasil meningkatkan stabilitas enzim α -amilase menggunakan metode penambahan zat aditif.

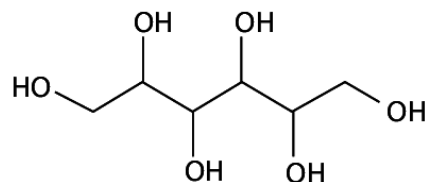
2.4. Penambahan Zat Aditif

Penambahan zat aditif merupakan salah satu cara yang dapat dipilih untuk meningkatkan kestabilan enzim karena metodenya yang sederhana (Yandri dkk., 2020a). Penambahan zat aditif menggunakan gliserol dapat melindungi struktur enzim α -amilase dari *A. fumigatus* dari pengaruh eksternal (suhu, pH, dan interaksi dengan air). Hal ini akan menyebabkan konformasi protein menjadi terjaga dari kemungkinan *un*fold)ing), sehingga enzim menjadi stabil pada kondisi ekstrem. Sorbitol juga memiliki beberapa kelebihan, di antaranya yaitu, dapat

meningkatkan stabilitas, mempertahankan konformasi enzim dan menjaga struktur enzim dari degradasi oleh suhu (Yandri dkk., 2020b). Namun demikian pada batas konsentrasi tertentu, zat aditif mempunyai efek denaturasi yang kuat (Lestari dkk., 2011), sehingga perlu ditentukan konsentrasi zat aditif yang optimum dari zat aditif (senyawa *poliol*) tersebut. Senyawa *poliol* lainnya yang dapat digunakan untuk meningkatkan stabilitas enzim adalah manitol.

2.5. Manitol

Manitol merupakan senyawa *poliol* dengan struktur enam atom karbon dan memiliki gugus hidroksil yang ditunjukkan pada Gambar 3 (Chen *et al.*, 2020). Gugus hidroksil pada manitol akan berinteraksi dengan enzim membentuk ikatan hidrogen, sehingga air tidak dapat berinteraksi langsung dengan sisi aktif maupun pusat aktif enzim. Hal tersebut menjaga struktur enzim dari pengaruh air yang dapat menyebabkan enzim mengalami denaturasi. Residu asam amino non-polar juga mengalami *unfolding*, sehingga konformasi enzim menjadi lebih terjaga dan tahan terhadap kondisi ekstrem. Manitol berbentuk serbuk hablur berwarna putih, tidak berbau, dan memiliki rasa manis (Riwu, 2022).



Gambar 3. Struktur manitol.

Manitol banyak diaplikasikan di industri makanan sebagai pemanis alami dan di bidang farmasi sebagai stabilisator. Permintaan yang semakin meningkat terhadap manitol telah mendorong banyak penelitian mengenai pemanfaatannya (Chen *et al.*, 2020), salah satunya sebagai zat aditif dalam meningkatkan kestabilan enzim. Penggunaan zat aditif merupakan cara yang paling sederhana yang dapat dipilih untuk meningkatkan stabilitas enzim. Namun, penambahan zat aditif ini tidak dapat mengatasi biaya produksi dalam industri skala besar,

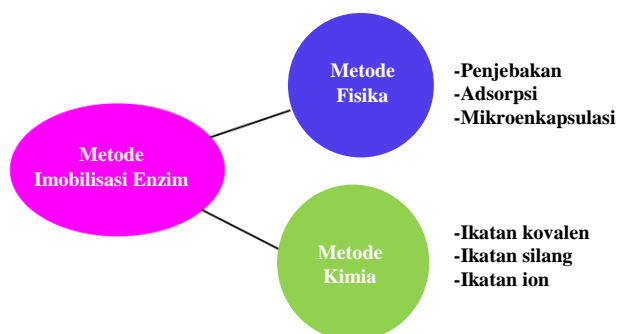
sehingga diperlukan metode lain seperti metode imobilisasi agar enzim dapat digunakan secara berulang (Yandri *et al.*, 2022b).

2.6. Imobilisasi Enzim

Imobilisasi enzim adalah proses pengikatan atau penahanan molekul enzim secara fisik pada suatu material (matriks) yang tidak larut dalam air. Imobilisasi diklasifikasikan menjadi tiga jenis, yaitu: metode pengikatan (*carrier-binding*), metode ikatan silang (*cross-linking*), dan metode penjebakan (*entrapment*).

Metode pengikatan dapat dilakukan melalui adsorpsi fisik, ikatan ionik, maupun ikatan kovalen (Hwang *and* Gu, 2013; Robinson, 2015; Zdarta *et al.*, 2018).

Keunggulan dari metode imobilisasi salah satunya adalah enzim masih memiliki aktivitas katalitik setelah pemakaian berulang kali (Robinson, 2015). Penggunaan enzim imobilisasi dalam industri mempunyai beberapa keuntungan, di antaranya adalah dapat digunakan secara berulang, produknya tidak terkontaminasi oleh enzim, memudahkan proses pengendalian reaksi, dapat digunakan untuk analisis, serta meningkatkan stabilitas enzim (Yandri dan Suhartati, 2018). Menurut Dwevedi (2016), metode imobilisasi enzim terbagi menjadi dua macam yaitu metode fisik dan kimia (Gambar 4).



Gambar 4. Teknik umum metode imobilisasi enzim (Dwevedi, 2016).

a. Metode kimia

Pada metode ini terjadi pembentukan ikatan kovalen (interaksi kovalen, ikatan silang, dan ikatan ionik) antara enzim dengan matriks dan bersifat *irreversibel*.

1. Interaksi kovalen

Interaksi kovalen terjadi karena molekul enzim terikat secara langsung ke gugus hidroksil, amida, amino, ataupun karboksil pada matriks melalui reaksi kimia. Metode imobilisasi ini melibatkan asam amino yang tidak berperan pada pusat aktif enzim maupun sisi aktif enzim. Hal ini meminimalkan perubahan konformasi struktur tiga dimensi enzim dan membantu meningkatkan kestabilan enzim hasil imobilisasi terhadap kondisi yang ekstrem, denaturasi, serta pelarut organik (Yandri dan Suhartati, 2018).

2. Ikatan silang

Metode ikatan silang melibatkan pembentukan sejumlah ikatan kovalen antara enzim dan matriks menggunakan pereaksi multifungsional seperti glutaraldehida. Gugus amino, gugus hidroksil, atau gugus imidazol dapat digunakan untuk mengikat enzim dalam kondisi lunak. Keuntungan utama dari metode ini adalah sederhana, namun kerugian dalam metode ini adalah dapat terjadi inaktivasi enzim akibat pembentukan ikatan antara pusat aktif enzim dengan zat pengikat silang (Yandri dan Suhartati, 2018).

3. Ikatan ionik

Metode ini terjadi interaksi ionik antara molekul enzim dengan matriks bermuatan. Metode ini bergantung pada pH larutan, konsentrasi enzim, dan suhu. Matriks yang umum digunakan adalah turunan polisakarida, polimer sintesis, serta bahan anorganik. Semakin tinggi kerapatan muatan permukaan pada matriks, maka semakin besar jumlah enzim yang terikat pada matriks dan juga dapat teradsorpsi pada matriks. Metode imobilisasi enzim dengan cara ikatan ionik memiliki kesamaan dengan metode imobilisasi secara adsorpsi fisik. Ikatan ionik cenderung lebih kuat dibandingkan adsorpsi fisik, namun kurang stabil jika kondisi lingkungan berubah (Yandri dan Suhartati, 2018).

b. Metode fisika

Prinsip dari metode fisika adalah pengikatan enzim pada matriks tertentu melalui kekuatan fisik yang melibatkan gaya Van der Waals, ikatan hidrogen, dan

interaksi hidrofobik serta prosesnya bersifat *reversible*. Metode ini dapat mencakup berbagai teknik, yaitu metode penjebakan, mikroenkapsulasi, dan adsorpsi (Yandri dan Suhartati, 2018).

1. Metode penjebakan

Prinsip metode ini adalah penjebakan enzim secara fisik di dalam polimer. Enzim terperangkap di dalam matriks tanpa ikatan kimia yang kuat dengan matriks tersebut. Hal ini memungkinkan terjadinya interaksi substrat dengan enzim dan pelepasan produk yang terbentuk, serta memungkinkan terjadinya interaksi berikutnya. Metode ini memiliki beberapa keunggulan, yaitu sederhana, tidak ada perubahan sifat intrinsik enzim (aktivitas dan spesifitas), dan sebagian besar jenis matriks dapat digunakan. Namun metode ini hanya dapat digunakan dalam jumlah enzim yang terbatas, mudah lepasnya interaksi enzim dengan matriks, dan hanya dapat menggunakan substrat atau produk berukuran kecil (Yandri dan Suhartati, 2018).

2. Mikroenkapsulasi

Pada metode ini, enzim diikatkan pada membran polimer semi permeabel. Enzim diimobilisasi dengan enkapsulasi memiliki luas permukaan sangat besar karena memiliki efisiensi katalitik yang tinggi. Namun, dapat juga terjadi inaktivasi enzim, meskipun konsentrasi enzim tinggi (Yandri dan Suhartati, 2018).

3. Adsorpsi

Pada metode adsorpsi, enzim terikat pada permukaan matriks melalui ikatan non-kovalen (interaksi hidrofobik, ikatan hidrogen, dan gaya Van der Waals). Metode ini sederhana dan mudah serta konformasi enzim tidak berubah. Matriks yang dapat digunakan dalam metode ini adalah senyawa anorganik yaitu, keramik, alumina, bentonit, kaca berpori dan silika, maupun senyawa organik yaitu, karbon aktif, kitosan, dekstran, gelatin, selulosa, pati, dan kitin (Yandri dan Suhartati, 2018).

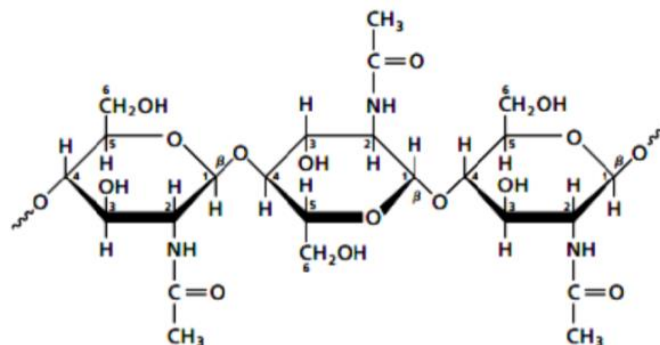
2.7. Kitin

Kitin berbentuk kristal berwarna putih kekuningan seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5. Kitin (*poli-(β (1,4)-2-acetamide-2-deoxy-D-glucopirronase)*) adalah polisakarida linier yang dibentuk oleh monomer *N-acetyl-D-glucosamine* dalam posisi ikatan β , dapat diisolasi dari krustasea eksoskeleton, serangga, dan invertebrata.



Gambar 5. Bubuk kitin.

Kitin tidak berbau dan tidak larut dalam air karena adanya ikatan hidrogen yang sangat kuat antara gugus N–H dengan gugus C=O dari rantai lain yang berdekatan (Dompeipen, 2017), sehingga dapat digunakan dalam metode immobilisasi. Gugus amida (RCONH₂) dan gugus hidroksil (–OH) dalam struktur kitin (Gambar 6) dapat mengalami interaksi dengan asam amino yang tidak berperan pada pusat aktif enzim maupun sisi aktif enzim membentuk ikatan hidrogen (Yandri *et al.*, 2023).



Gambar 6. Struktur kitin.

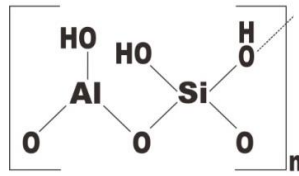
Matriks pendukung selain dari bahan organik, dapat juga berasal dari bahan anorganik (Yandri *et al.*, 2022b), salah satunya yaitu zeolit.

2.8. Zeolit

Zeolit merupakan bahan anorganik yang memiliki struktur berpori yang beragam, sifat permukaan yang dapat disesuaikan, stabilitas termal yang sangat baik, kecepatan adsorpsi tergantung pada ukuran partikel zeolit, kompatibilitas lingkungan yang baik dan biaya yang relatif rendah. Zeolit sebagai matriks pendukung pada proses imobilisasi enzim, sehingga enzim dapat digunakan secara berulang, dapat meningkatkan stabilitas enzim (termasuk stabilitas termal, pH, dan penyimpanan), serta dalam beberapa keadaan dapat meningkatkan aktivitas katalitik enzim (Zhang *et al.*, 2021).

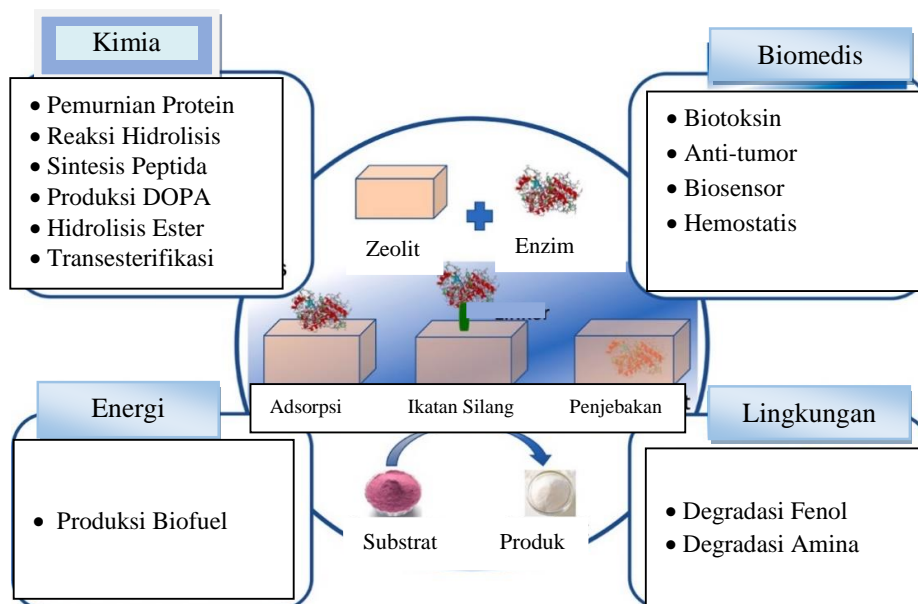
Permukaan zeolit dapat berinteraksi dengan enzim melalui interaksi hidrofobik, sehingga polipeptida melipat (*folding*) dan stabilitas enzim menjadi terjaga. Enzim dapat dilepaskan dari zeolit dan dapat digunakan kembali karena interaksi antara enzim dengan zeolit bersifat lemah dan *reversible*. Pada dasarnya, kekuatan adsorpsi dapat diatur dengan mengubah komposisi atau sifat permukaan zeolit. Rasio Si/Al atau $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ adalah salah satu faktor penting yang memengaruhi sifat permukaan. Dalam aplikasi katalisis, semakin rendah rasio Si/Al (semakin tinggi kandungan aluminium), maka memiliki aktivitas katalitik yang tinggi karena aluminium bertindak sebagai situs aktif katalis, dan meningkatkan sifat hidrofilik karena aluminium menarik lebih banyak air. Selain itu, heteroatom dalam kerangka zeolit juga dapat berkontribusi pada adsorpsi protein enzim. Atom besi dalam kerangka Fe-ZSM-5 dan fosfat dalam fosfatase dapat meningkatkan hasil imobilisasi (Zhang *et al.*, 2021).

Zeolit yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Sigma Aldrich (Gambar 7). Zeolit ini merupakan mineral aluminosilikat mikropori berkode seri CAS-No 1318-02, berbentuk bubuk, berwarna putih dan memiliki ukuran partikel sebesar $<20\mu\text{m}$, ukuran pori sebesar $<10\text{\AA}$, dengan rasio Si/Al $\approx 1,3$ (rendah). Zeolit berperan sebagai penyaring molekuler serta sebagai adsorben untuk berbagai jenis kation, seperti Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , dan lainnya (Zhang *et al.*, 2021).



Gambar 7. Struktur zeolit.

Berbagai teknik digunakan untuk mengikat enzim pada permukaan zeolit melalui metode ikatan silang (*crosslinking*), penjebakan, dan adsorpsi (Gambar 8). Gugus aktif yang sesuai juga dapat diaplikasikan pada zeolit melalui gugus hidroksil (Zhang *et al.*, 2021).



Gambar 8. Interaksi zeolit dengan enzim α -amilase (Zhang *et al.*, 2021).

Imobilisasi enzim pada permukaan zeolit menggunakan metode adsorpsi memiliki keunggulan yaitu mudah, cepat, reprodutibilitas yang baik, dan tanpa terkontaminasi senyawa beracun, sehingga sangat baik untuk membuat komposit zeolit-enzim. Keunggulan ini sangat penting untuk standarisasi dan produksi dalam skala besar (Zhang *et al.*, 2021). Pada penelitian Yandri *et al.*, (2022b), enzim α -amilase yang diisolasi dari jamur *A. fumigatus* telah berhasil

diimobilisasi menggunakan zeolit dengan metode adsorpsi. Stabilitas enzim meningkat sebesar 2,38 kali lebih besar dari enzim hasil pemurnian, namun hanya dapat mempertahankan aktivitas sisa sebesar 13,8% setelah dilakukan 5 kali pengulangan hidrolisis pati (Yandri *et al.*, 2022b). Penggabungan matriks hibrid (zeolit dengan kitin) dapat meningkatkan kestabilan enzim, persen residu enzim, dan pemakaian berulang dibandingkan tanpa dilakukan hibrid (Yandri *et al.*, 2022a).

2.9. Matriks Hibrid

Matriks hibrid terdiri dari gabungan material organik dan anorganik. Matriks hibrid menggabungkan keunggulan masing-masing karakteristik material penyusunnya antara lain sebagai adsorben, katalis, atau matriks pendukung pada imobilisasi enzim (Zdarta *et al.*, 2018). Keberhasilan metode imobilisasi dengan cara adsorpsi fisik ditentukan oleh ukuran dan luas permukaan matriks (Hwang *and* Gu, 2013; Robinson, 2015; Zdarta *et al.*, 2018). Material organik memiliki beberapa keunggulan, antara lain: fleksibel, ringan, dan mudah dibentuk (*moldable*). Sedangkan material anorganik bersifat kuat, elastis, plastis, memiliki kestabilan termal, dan resisten terhadap zat kimia (Hwang *and* Gu, 2013). Penggunaan matriks hibrid membuat interaksi antara enzim dengan matriks menjadi lebih stabil, memberi ketahanan mekanik yang lebih baik, meningkatkan kestabilan termal, masa pemakaian berulang, dan masa penyimpanan enzim.

Yandri *et al.* (2022b) telah melakukan penelitian mengenai enzim α -amilase yang diisolasi dari jamur *A. fumigatus* dan diimobilisasi dengan metode adsorpsi fisik pada matriks zeolit. Enzim hasil imobilisasi meningkat stabilitasnya sebesar 2,38 kali dibandingkan enzim hasil pemurnian. Enzim hasil imobilisasi juga masih mempunyai aktivitas sisa sebesar 13,8% setelah 5 kali pengulangan. Yandri *et al.* (2023) juga melakukan penelitian yang sama dengan mengganti matriks zeolit menggunakan kitin. Enzim hasil imobilisasi meningkat stabilitasnya 1,5 kali dari enzim hasil pemurnian. Pada pemakaian berulang enzim hasil imobilisasi masih mempunyai aktivitas sisa sebesar 46% setelah digunakan 6 kali pemakaian.

Matriks hibrid kitin-bentonit yang diamati dalam penelitian terbaru, mengkonfirmasi adanya peningkatan kapasitas adsorpsi dibandingkan bentonit murni dan kitin murni. Begitu juga dengan zeolit-kitosan terjadi peningkatan kapasitas adsorpsi dibandingkan zeolit murni dan kitosan murni (Yandri *et al.*, 2022a). Hal ini disebabkan matriks hibrid menggabungkan keunggulan masing-masing karakteristik material penyusunnya (Zdarta *et al.*, 2018), sehingga interaksi antara matriks hibrid dengan enzim menjadi lebih stabil (Yandri *et al.*, 2022a). Matriks hibrid zeolit-kitin dapat digunakan sebagai matriks pada metode imobilisasi untuk meningkatkan stabilitas enzim α -amilase. Peningkatan stabilitas enzim α -amilase ditentukan dengan dilakukan uji aktivitas enzim α -amilase.

2.10. Isolasi Enzim α -Amilase dengan Sentrifugasi

Isolasi enzim dengan menggunakan sentrifugasi berdasarkan pada berat jenis molekul dengan cara memberikan gaya sentrifugal, sehingga substansi dengan berat jenis lebih besar akan mengalami gaya sentrifugal lebih besar kemudian mengendap di dasar, sedangkan substansi dengan berat jenis lebih kecil akan berada di atas (filtrat) karena mengalami gaya sentrifugal yang lebih kecil. Sel mikroba ataupun jamur yang berukuran lebih besar dibandingkan enzim ekstraselulernya akan mengalami gaya sentrifugal yang lebih besar, sehingga sel akan mengendap dan enzim akan tetap pada bagian filtrat. Sentrifugasi pada suhu dingin dapat meminimalkan kerusakan enzim (Sari dkk., 2013).

Sentrifugasi dilakukan pada suhu 2–4°C agar enzim α -amilase tidak mengalami denaturasi akibat panas. Hasil produksi α -amilase disentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm selama 15–20 menit untuk memisahkan media yang mengandung α -amilase dari jamur *A. fumigatus*, sehingga dihasilkan filtrat (ekstrak kasar enzim) yang terbebas dari sel jamur *A. fumigatus* dan sisa-sisa media yang tidak larut (Yandri *et al.*, 2023). Untuk memperoleh enzim α -amilase yang lebih murni dari ekstrak kasarnya dapat dilakukan pemurnian melalui metode fraksinasi dan dialisis.

2.11. Pemurnian Enzim α -Amilase

Pemurnian enzim α -amilase bertujuan untuk memisahkan enzim α -amilase dari zat-zat pengotor yang tidak diinginkan. Beberapa tahapan yang umum dilakukan dalam pemurnian enzim α -amilase, yaitu fraksinasi dengan amonium sulfat dan dialisis.

a. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat

Pemurnian enzim menggunakan amonium sulfat bertujuan untuk memisahkan enzim dari zat-zat pengotor (Yandri *et al.*, 2023). Amonium sulfat digunakan untuk mengendapkan protein atau enzim karena kelarutannya tinggi dan tidak mempengaruhi struktur protein atau enzim (Wahyudiati, 2017). Proses fraksinasi enzim atau protein menggunakan amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan tertentu pada hakekatnya merupakan suatu proses pemurnian, karena sifat kelarutan protein yang berbeda dalam air. Protein atau enzim yang sukar larut dalam air akan mengendap dengan konsentrasi amonium sulfat yang rendah (Yandri, dkk. 2020).

Keberadaan garam amonium sulfat dan ion-ion pengganggu akan mengganggu proses pemurnian enzim lebih lanjut, sehingga dilakukan pemurnian lanjutan menggunakan dialisis untuk mengeluarkan garam amonium sulfat dan ion-ion pengganggu dari larutan enzim (Sari dkk., 2013).

b. Dialisis

Garam amonium sulfat dan ion-ion pengganggu dikeluarkan dari larutan enzim melalui proses dialisis. Proses dialisis dilakukan di lingkungan yang dingin untuk mengurangi terjadinya penurunan aktivitas enzim dan mencegah enzim terdenaturasi. Pengadukan dengan kecepatan rendah agar mempermudah keluarnya molekul berukuran kecil dari kantong dialisis (selofan). Pengisian larutan enzim dalam selofan tidak terlalu

penuh, karena volume larutan akan meningkat selama dialisis (Sari dkk., 2013). Enzim yang diperoleh dari dialisis memiliki kemurnian dan aktivitas yang cukup tinggi dibanding enzim hasil fraksinasi maupun ekstrak kasar. Pada penelitian Ahmed *et al.* (2020), hasil uji aktivitas enzim α -amilase setelah dialisis sebesar 2411 U/mL, sedangkan ekstrak kasar sebesar 349 U/mL.

2.12. Uji Kadar Protein dan Aktivitas Enzim α -Amilase

Aktivitas enzim α -amilase dapat ditentukan menggunakan metode Fuwa dan metode Mandels. Metode Fuwa menentukan aktivitas enzim α -amilase berdasarkan pada pengurangan jumlah substrat pati yang terhidrolisis (Lay dan Sugyo, 1992), sedangkan metode Mandels berdasarkan pada terbentuknya produk untuk penentuan data kinetika (Pujiaty dkk., 2018). Kadar protein dalam enzim α -amilase ditentukan menggunakan metode Lowry (Purwanto, 2014).

a. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

Metode Lowry merupakan pengembangan dari metode Biuret yang memiliki tingkat akurasi relatif tinggi. Pada metode ini, reaksi yang terlibat adalah kompleks Cu(II) protein akan terbentuk dalam suasana alkalis Cu(II) akan tereduksi menjadi Cu(I). Ion Cu⁺ kemudian akan mereduksi reagen Folin-Ciocalteu, kompleks *phosphomolybdotungstate*, menghasilkan *hetero-polymolybdenum blue* akibat reaksi oksidasi aromatik (rantai samping asam amino) terkatalis Cu, yang memberikan warna biru intensif dan terdeteksi secara kolorimetri, mengabsorpsi pada panjang gelombang λ_{maks} 750 nm. Metode ini relatif sederhana dan mudah diterapkan, biayanya relatif murah, dan menggunakan volume sampel dalam jumlah sedikit (Purwanto, 2014).

b. Penentuan Aktivitas Enzim

Penentuan aktivitas enzim α -amilase dengan Metode Fuwa berdasarkan pada pengurangan jumlah substrat (pati) yang terhidrolisis menjadi produk.

Produk akhir yang dideteksi adalah pati sisa yang diukur dari berkurangnya intensitas warna antara pati dan iodin. Pati sisa merupakan pati yang tidak terhidrolisis oleh enzim α -amilase, sedangkan pati yang terhidrolisis enzim α -amilase adalah pati awal dikurangi oleh pati sisa. Banyaknya pati yang terhidrolisis sebanding dengan aktivitas unit enzim α -amilase (Yandri *et al.*, 2023).

Apabila zat pati terhidrolisis oleh enzim α -amilase menjadi maltosa ataupun glukosa, maka tidak terbentuk spiral pada molekul pati, sehingga tidak menghasilkan larutan berwarna biru. Pada larutan sampel, enzim menghidrolisis pati menghasilkan glukosa ataupun maltosa. Glukosa ataupun maltosa akan mengikat iodin menghasilkan larutan berwarna kuning. Apabila enzim α -amilase diinaktivasi oleh HCl, maka pati akan bereaksi dengan iodin, kemudian iodin terperangkap dalam rantai spiral pati membentuk kompleks heliks pati-iodin menghasilkan larutan berwarna biru-kehitaman pada larutan kontrol. Aktivitas enzim dihitung sebagai fungsi absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-*Vis* pada λ_{maks} 600 nm. Metode Fuwa digunakan pada tahap isolasi dan pemurnian enzim α -amilase (Lay dan Sugyo, 1992).

Inkubasi 10 menit pada metode Fuwa bertujuan membedakan aktivitas α -amilase dengan β -amilase. Enzim α -amilase cenderung lebih cepat kerjanya dibanding β -amilase (Nangin dan Sutrisno, 2015), sehingga apabila inkubasi dilakukan lebih dari 10 menit maka yang terukur adalah aktivitas β -amilase.

Adapun metode Mandels digunakan dalam penentuan data kinetika (K_M dan V_{maks}) serta termodinamika ($t_{1/2}$, k_i , dan ΔG_i) enzim α -amilase. Metode Mandels didasarkan pada pembentukan produk (glukosa) hasil hidrolisis substrat pati yang akan mengalami oksidasi setelah penambahan pereaksi *Dynitrosalisilic acid* (DNS). Pereaksi DNS digunakan untuk mengukur gula pereduksi yang diproduksi oleh mikroba atau enzim. Reaksi gula pereduksi

dengan pereaksi DNS merupakan reaksi redoks. Gugus aldehid pada rantai pati akan dioksidasi menjadi gugus karboksil, sedangkan DNS bertindak sebagai oksidator akan tereduksi membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat. Apabila terdapat gula pereduksi pada sampel, maka pereaksi DNS yang awalnya berwarna kuning akan bereaksi dengan gula pereduksi menjadi warna jingga kemerahan dan reaksi ini berlangsung pada suasana basa dan suhu 100°C. Semakin banyak komponen pereduksi pada sampel, maka akan semakin banyak molekul 3-amino-5-nitrosalisilat yang terbentuk, sehingga serapan pada panjang gelombang 510 nm akan semakin tinggi. Aktivitas enzim amilase ditentukan oleh konversi nilai absorbansi (serapan) yang diperoleh dari kurva standar glukosa (Pujiaty dkk., 2018). Hasil uji aktivitas enzim dengan metode Mandels dapat digunakan untuk menentukan kinetika reaksi enzim.

c. Kinetika Reaksi Enzim

Enzim memiliki sifat dan karakteristik yang spesifik. Sifat spesifitas enzim terhadap substrat dinyatakan dengan nilai tetapan *Michaelis-Menten* (K_M). Konstanta *Michaelis-Menten* (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) merupakan parameter dalam kinetika reaksi enzim (Kamelia dkk., 2005).

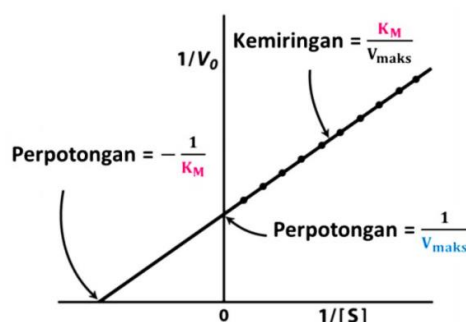
$$V_0 = \frac{V_{maks}[S]}{K_M + [S]} \dots\dots\dots(1)$$

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

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{maks}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}} \dots\dots\dots(3)$$

Persamaan 1 menyatakan laju reaksi enzimatik sebagai fungsi dari konsentrasi substrat. Kemudian persamaan ini dikembangkan menjadi Persamaan 2 dan 3 yang dapat direpresentasikan pada Gambar 9 (Page, 1997). Nilai K_M didefinisikan sebagai konsentrasi substrat tertentu pada saat

enzim mencapai 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, 1997).



Gambar 9. Diagram *Lineweaver-Burk*.

Enzim dinyatakan stabil apabila dapat mempertahankan struktur dan aktivitasnya selama masa penggunaan dan penyimpanan. Kestabilan enzim meliputi kestabilan termal dan pH. Kestabilan ini sangat penting terutama saat enzim diaplikasikan dalam industri yang kondisi kerjanya membutuhkan suhu dan pH ekstrem (Kazan *et al.*, 1997). Kestabilan enzim ditunjang oleh ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, dan distribusi residu asam amino. Ikatan hidrogen memberi kontribusi $\pm 1,3$ kkal/mol untuk menjaga kestabilan enzim melalui donor dan akseptor hidrogen pada jarak $< 3 \text{ \AA}$. Interaksi hidrofobik akan menghasilkan energi guna membentuk pelipatan (*folding*) enzim dalam air. Pelipatan pada struktur tersier enzim akan melindungi sisi aktif enzim dari molekul air. Distribusi residu asam amino penyusun sisi aktif enzim dan interaksinya dalam struktur protein juga akan menunjang kestabilan termal enzim. Jika enzim memiliki banyak residu asam amino yang terlindungi pada bagian dalam sisi hidrofobik maka enzim akan lebih stabil (Yandri dan Suhartati, 2018). Kestabilan enzim dilihat dari penentuan kestabilan termal, waktu paruh ($t_{1/2}$), perubahan energi bebas akibat denaturasi (ΔG_i), dan konstanta laju inaktivasi (k_i) (Kazan *et al.*, 1997), seperti berikut:

- Kestabilan Termal

Kestabilan termal enzim ditentukan dari aktivitas sisa enzim. Enzim diinaktivasi pada suhu tinggi selama waktu tertentu melalui Persamaan 4.

$$\text{Aktivitas sisa (\%)} = \frac{E_i}{E_0} \times 100\% \dots\dots\dots(4)$$

Keterangan: E_0 = aktivitas sisa enzim pada t_0 atau tanpa inaktivasi; E_i = aktivitas sisa enzim setelah diinaktivasi selama waktu t_i .

- Konstanta Laju Inaktivasi Termal (k_i)

Mekanisme inaktivasi *irreversible* enzim berlangsung seperti berikut. Konstanta laju inaktivasi (k_i) adalah konstanta yang menunjukkan perubahan konsentrasi enzim saat diinaktivasi selama waktu tertentu.

Penentuan konstanta laju inaktivasi termal (k_i) menggunakan Persamaan 5.

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

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

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

Waktu paruh ($t_{1/2}$) adalah waktu yang dibutuhkan enzim untuk meluruhkan substrat hingga enzim kehilangan setengah aktivitasnya (Kazan *et al.*, 1997). Waktu paruh dapat dihitung dari persamaan laju inaktivasi termal enzim orde satu menggunakan Persamaan 6.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_i} \dots\dots\dots(6)$$

Keterangan: k_i = konstanta laju inaktivasi termal; dan $t_{1/2}$ = waktu paruh (Kazan *et al.*, 1997; Stahl, 1999). Sedangkan untuk perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan hasil penambahan zat aditif kimia dilakukan dengan menggunakan Persamaan 7 (Yandri *et al.*, 2020).

- Perubahan Energi Bebas Akibat Denaturasi (ΔG_i)

Energi bebas akibat denaturasi (G_i) adalah energi bebas yang dibutuhkan untuk mendenaturasi enzim dari keadaan awal. Penentuan nilai ΔG_i menggunakan Persamaan 7.

$$\Delta G_i = - RT \ln \left(\frac{k_i h}{k_B T} \right) \dots \dots \dots (7)$$

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

Peningkatan waktu paruh menunjukkan bahwa enzim hasil imobilisasi membutuhkan waktu lebih lama untuk mengalami proses inaktivasi, sehingga dapat dikatakan enzim semakin stabil. Penurunan nilai k_i dan peningkatan nilai ΔG_i pada enzim hasil imobilisasi disebabkan oleh kondisi enzim yang semakin *rigid* dan bertambahnya pelipatan (*folding*) pada struktur enzim sehingga kestabilan enzim meningkat (Kazan *et al.*, 1997; Yandri dan Suhartati, 2018).

d. Stabilitas Enzim

Menurut Kazan *et al.* (1997), stabilitas enzim dapat diartikan sebagai kestabilan aktivitas enzim selama penyimpanan dan penggunaan enzim tersebut, serta kestabilan terhadap berbagai senyawa yang bersifat merusak enzim seperti pelarut tertentu (asam atau basa) dan pengaruh suhu dan pH yang ekstrem atau

kondisi non fisiologis lainnya. Semua reaksi enzim dipengaruhi oleh pH medium tempat reaksi terjadi (Suhartono, 1999). Stabilitas enzim dipengaruhi oleh banyak faktor seperti suhu, pH, pelarut, kofaktor, dan kehadiran surfaktan (Eijsink *et al.*, 2005). Perubahan pH lingkungan terhadap keaktifan enzim dikarenakan terjadinya perubahan ionisasi enzim, substrat atau kompleks enzim substrat. Enzim menunjukkan aktivitas maksimum pada pH optimumnya dengan stabilitas yang tinggi (Winarno, 2002). Pada reaksi enzimatik, sebagian besar enzim akan kehilangan aktivitas katalitiknya secara cepat dan *irreversibel* 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).

2.13. Analisis Spektroskopi *Fourier Transform Infra Red* (FTIR)

Fourier Transform Infra Red (FTIR) adalah teknik analisis kimia yang memanfaatkan interaksi antara materi dan radiasi inframerah. Prinsip dasar FTIR adalah pengukuran absorpsi inframerah oleh sampel. Molekul dalam sampel menyerap energi inframerah pada frekuensi tertentu yang tergantung pada ikatan kimia di dalamnya. Ketika cahaya inframerah diserap oleh sampel, ikatan dalam molekul bergetar pada frekuensi yang sama dengan cahaya yang diserap. Setiap ikatan mempunyai frekuensi yang karakteristik sebagai pita serapan. Hal ini akan menghasilkan spektrum yang khas untuk setiap sampel sehingga mempermudah dalam identifikasi (Yudono, 2017).

Instrumentasi dari FTIR, diawali dari energi inframerah diemisikan dari sumber kemudian berjalan melalui bagian optik dari spektrometer, lalu gelombang sinar berjalan melewati interferometer, kemudian sinar tersebut dipisahkan dan digabungkan lagi untuk menghasilkan suatu pola interferensi. Gelombang sinar ditransmisikan dan diukur oleh detektor, kemudian detektor menghasilkan suatu interferogram yaitu suatu daerah yang menggambarkan pola interferensi *Analog Digital Converter* (ADC) dan mengubah pengukuran menjadi suatu formal digital yang digunakan oleh komputer. Suatu *Fast Fourier Transform* (FFT) mengubah

interferogram menjadi suatu pita spektrum tunggal (*single-beam spectrum*) (Muyonga *et al.*, 2004). Spektrum inframerah yang diperoleh kemudian diplot sebagai intensitas fungsi energy dan bilangan gelombang (cm^{-1}) yang memberikan informasi mengenai vibrasi molekul suatu gugus fungsi dalam sampel (Anam *et al.*, 2007). Adapun analisis spektroskopi FTIR material kitin, glutaraldehida, dan zeolit sebagai berikut.

a. Analisis gugus fungsi pada kitin menggunakan spektroskopi FTIR

Karakterisasi gugus fungsi pada kitin ditentukan pada bilangan gelombang 4000–450 cm^{-1} . Spektrum FTIR kitin menunjukkan pita karakteristik pada kisaran 3436–3438 cm^{-1} disebabkan oleh vibrasi dari gugus –OH dan pita 2145–2826 cm^{-1} merupakan vibrasi ikatan N–H. Vibrasi karbonil (C=O) dari gugus amida terdapat pada bilangan gelombang 1627 cm^{-1} . Pita yang tajam pada 1380 cm^{-1} adalah deformasi simetris dari CH_3 . Pita serapan pada 1075–1082 cm^{-1} menunjukkan vibrasi ikatan C–O–C di dalam cincin kitin (Rumengan *et al.*, 2017).

b. Analisis gugus fungsi pada glutaraldehida menggunakan spektroskopi FTIR

Mansur *et al.* (2008) telah melakukan penelitian mengenai karakteristik yang khas pada ikatan silang (*crosslinking*) dari glutaraldehida dan diilustrasikan pada Gambar 11. Gugus C=O dari glutaraldehida muncul pada bilangan gelombang 1710 cm^{-1} . Analisis gugus fungsi pada zeolit menggunakan spektroskopi FTIR Karakteristik yang khas dari zeolit murni adalah pita melebar dari gugus O–H yang meregang pada bilangan gelombang 3401 cm^{-1} . Puncak tajam dari aluminosilikat pada daerah 974 cm^{-1} . Pita serapan pada 794 cm^{-1} merupakan vibrasi dari ikatan Si–O dan Al–O (Bahari *and* Isahak, 2020).

2.14. Analisis Spektroskopi Ultraviolet-Visible (UV-Vis)

Prinsip kerja spektrofotometri UV-Vis adalah pengukuran absorbansi cahaya ultraviolet ataupun cahaya tampak oleh suatu sampel. Molekul atau ion yang menyerap sinar ultraviolet akan mengalami transisi elektron dari keadaan dasar ke

tingkat energi yang lebih tinggi. Empat jenis transisi elektronik yaitu $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$ dan $\pi \rightarrow \pi^*$. Ikatan dan gugus fungsional yang menimbulkan penyerapan radiasi ultraviolet dan *visible* disebut kromofor. Hubungan antara energi yang diserap dengan panjang gelombang absorpsi ditunjukkan pada Persamaan 8 (Yudono, 2017).

$$E = h \times \frac{c}{\lambda} \dots\dots\dots (8)$$

Keterangan: E = energi (J), h = tetapan Planck ($6,63 \times 10^{-34}$ Js), c = kecepatan cahaya ($3,8 \times 10^8$ m/s), dan λ = panjang gelombang (m).

Analisis UV-Vis digunakan untuk menentukan aktivitas enzim dalam metode Mandels berdasarkan konsentrasi gula pereduksi yang terbentuk. Metode Mandels dipilih karena metode ini digunakan dan hasil yang diperoleh lebih presisi dibandingkan metode Biuret maupun Somogyi-Nelson. Gula pereduksi akan bereaksi dengan DNS membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat, yang akan mengabsorpsi dengan kuat sinar UV-Vis pada λ_{maks} 540 nm. Semakin tinggi aktivitas enzim, maka semakin banyak gula pereduksi yang terbentuk, sehingga semakin tinggi pula nilai absorbansi yang terukur oleh spektrofotometer UV-Vis (Solahuddin dkk., 2021). Selain metode ini, terdapat metode lain untuk menentukan aktivitas enzim berdasarkan berkurangnya jumlah substrat yaitu metode Fuwa.

Metode Fuwa dipilih karena spesifik untuk menentukan aktivitas dari enzim α -amilase. Satu unit/mL aktivitas α -amilase adalah jumlah α -amilase yang menyebabkan penurunan intensitas warna biru kompleks iodin-pati, sedangkan penentuan kadar protein digunakan metode Lowry dengan menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA) sebagai standar (Fadhilillah dkk., 2015).

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan pada bulan Mei–November 2023 di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Analisis spektroskopi Ultraviolet-Visible (UV-Vis) dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung dan Laboratorium 3 Institut Teknologi Sumatera. Analisis spektroskopi *Fourier Transform Infrared* (FT-IR) dilakukan di Institut Teknologi Bandung.

3.2. Alat dan Bahan Penelitian

Adapun alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain alat-alat gelas, jarum *ose*, pembakar spritus, mikropipet (Eppendroff), neraca analitik (Ainswort AA-160 *Denver Instrument Company*), spatula, pengaduk magnet, batang pengaduk, sentrifuga (*Cole Parmer Biohazard*), tabung sentrifuga, autoklaf (CV-EL 12 L/18L *Certoclave Sterilizier*), lemari pendingin (Sharp), oven (T60 Heracus), *shaker incubator* (Stuart SSL 2), *waterbath* (Memmert W 350), *Laminar Air Flow* (CRUMA model 9005-FL), termometer, pH meter (pH Mobile 826 Metrohm), kolom kromatografi, pengaduk magnetik (Stuart CB 161), kertas saring, botol film, botol plastik, dan spektrofotometer UV-Vis (*Agilent Technology Cary 60*), serta FT-IR (*IR Prestige-21*).

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain pati jagung (Maizanaku), *Potato Dextrak Agar* (PDA) (Himedia), HCl 1 N, pepton (Himedia), MgSO₄.7H₂O, CaCl₂(Merck), KH₂PO₄ (Merck), urea, (NH₄)₂SO₄, FeSO₄.7H₂O (Merck), ZnSO₄.7H₂O (Merck), CoCl₂(Merck), NaOH (Merck),

Dinitrosalisilic Acid (DNS), Na_2CO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% (Merck), NaH_2PO_4 (Merck), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck), Na_2HO_4 (Merck), Na/K tartarat 1%, reagen *follin-ciocalteau*, *Bovine Serum Albumin* (BSA), *starch solube (ex potato)* (Loba Chemie), urea, akuades, kantong selofan, kapas sumbat, kasa, kertas, karet, aluminium foil, alkohol 70%, tisu, kertas saring, es batu, kitin (CV. ChiMultiguna, *degree of deacetylation*: 95.22%), glutaraldehid (Merck), zeolit berkode seri CAS No 1318-02-1 (Sigma Aldrich, *particle size*: $<45\mu\text{m}$), dan manitol (Merck).

Mikroorganisme penghasil enzim α -amilase yang digunakan dalam penelitian ini adalah *A. fumigatus* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, Universitas Lampung.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Pemiakan Isolat *A. fumigatus*

Pada penelitian ini dilakukan pembiakan isolat *A. fumigatus*, diawali dengan membuat media agar miring kemudian pembiakan *A. fumigatus*.

a. Pembuatan Media Agar Miring

PDA sebanyak 3,9 gram dan 0,1 gram pati jagung dilarutkan ke dalam 100 mL akuades kemudian dipanaskan. Larutan tersebut dituangkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 4–5 mL, kemudian tabung reaksi ditutup menggunakan sumbat kapas lalu media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Tabung reaksi disimpan dalam posisi miring sampai media mengeras (Yandri *et al.*, 2020).

b. Pemiakan *A. fumigatus*

Jamur *A. fumigatus* diambil 1 tarikan *ose* lalu dipindahkan ke dalam media agar miring. Proses tersebut dilakukan dalam *laminar air flow* yang telah disterilisasi menggunakan sinar UV. Media agar yang

mengandung isolat, diinkubasi selama beberapa hari dalam *incubator* pada suhu 37°C (Yandri *et al.*, 2010a).

3.3.2. Pembuatan Media Inokulum dan Fermentasi, Inokulasi *A. fumigatus*, serta Produksi Enzim α -Amilase

a. Pembuatan Media Inokulum dan Fermentasi

Pati jagung dan pepton (1:1) masing-masing sebanyak 1,875 gram, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. CaCl_2 sebanyak 0,75 gram; 5 gram KH_2PO_4 ; 0,75 gram urea; 3,5 gram $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,0125 gram $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,0035 gram $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; dan 0,005 gram CoCl_2 . Semua bahan tersebut dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL dan dilarutkan menggunakan buffer fosfat pH 6,5 sebanyak 100 mL, lalu disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit (Yandri *et al.*, 2010b).

b. Inokulasi *A. fumigatus*

Biakan *A. fumigatus* dari media miring diambil sebanyak 3 tarikan *ose* lalu dipindahkan ke dalam media inokulum secara aseptis, kemudian *dishaker* dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 125 rpm pada suhu ruang selama 24 jam (Yandri *et al.*, 2022b).

c. Produksi Enzim α -Amilase

Produksi enzim α -amilase dilakukan dengan cara memindahkan media inokulum sebanyak 2% dari volume media fermentasi ke dalam media fermentasi secara aseptis. Media fermentasi diletakkan pada *shaker incubator* dengan kecepatan 125 rpm pada suhu ruang selama 112 jam, lalu hasil yang diperoleh kemudian disentrifugasi selama 15–20 menit agar didapat ekstrak kasar enzim α -amilase (Yandri *et al.*, 2022a). Kemudian ditentukan aktivitas

dan kadar protein dari ekstrak kasar enzim α -amilase yang telah diperoleh.

3.3.3. Uji Aktivitas dan Kadar Protein Enzim α -Amilase

Pada penelitian ini telah dilakukan pengujian aktivitas enzim menggunakan metode Mandels dan Fuwa, sedangkan untuk pengujian kadar protein menggunakan metode Lowry.

a. Penentuan Aktivitas Enzim α -Amilase dengan Metode Mandels

Metode ini didasarkan pada terbentuknya produk (gula pereduksi). Enzim α -amilase sebanyak 0,25 mL dimasukkan ke dalam tabung rekasi, lalu ditambahkan 0,25 mL larutan pati 0,1%, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 60°C. Campuran tersebut ditambahkan 1 mL pereaksi DNS dan dididihkan selama 10 menit pada penangas air dan selanjutnya didinginkan, kemudian ditambahkan 2 mL akuades, lalu campuran tersebut diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} 510 nm. Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan dengan menggunakan kurva standar glukosa (Lampiran 12). Uji ini akan dilakukan pada tahap penentuan data kinetika enzim α -amilase (nilai K_M dan V_{maks}) serta termodinamika meliputi $t_{1/2}$, k_i , dan ΔG_i (Pujiaty dkk., 2018).

b. Penentuan Aktivitas Enzim α -amilase dengan Metode Fuwa

Aktivitas enzim α -amilase ditentukan dengan menggunakan metode iodine (Lay dan Sugyo, 1992). Enzim α -amilase sebanyak 0,25 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 0,25 mL larutan pati 0,1%, kemudian diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit. Pati ditambahkan setelah enzim diinaktivasi dengan HCl 1N sebagai kontrol. Setelah diinkubasi, reaksi enzim dan substrat pati dihentikan dengan penambahan 0,25 mL HCl 1 N, selanjutnya

ditambahkan 0,25 mL pereaksi iodin dan 4 mL akuades. Campuran tersebut diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} 600 nm untuk menentukan aktivitas enzim α -amilase.

c. Penentuan Kadar Protein Enzim α -Amilase dengan Metode Lowry

Kadar protein enzim ditentukan dengan metode Lowry. Penentuan kadar protein ini bertujuan untuk mengatur aktivitas spesifik dari protein enzim α -amilase. Metode Lowry diawali dengan pembuatan pereaksi (Purwanto, 2014).

- 1) Pereaksi A: Na_2CO_3 sebanyak 2,0 g dilarutkan ke 100 mL NaOH 0,1 N.
 - 2) Pereaksi B: campuran larutan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% dengan larutan Na/K tartarat 1% (1:1).
 - 3) Pereaksi C: 2,0 mL pereaksi B + 100 mL pereaksi A.
 - 4) Pereaksi D: campuran reagen *folin ciocalteu's phenol* dengan akuades (1:1).
 - 5) Larutan deret standar Bovine Serum Albumin (BSA) dengan konsentrasi 20, 40, 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm.
- Pembuatan kurva standar BSA
 Blanko yang digunakan adalah akuades. Larutan deret standar BSA (20, 40, 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm) dimasukkan ke dalam kuvet sampel secara bertahap dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} 750 nm. Data absorbansi terhadap konsentrasi BSA diplotkan ke dalam grafik linier. Nilai intersep dan slope kurva standar BSA digunakan dalam penentuan kadar protein sampel (Lampiran 11).
 - Enzim α -amilase sebanyak 0,1 mL ditambah dengan 0,9 mL akuades, lalu direaksikan dengan 5 mL pereaksi C, diaduk rata dan dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruang. Setelah itu,

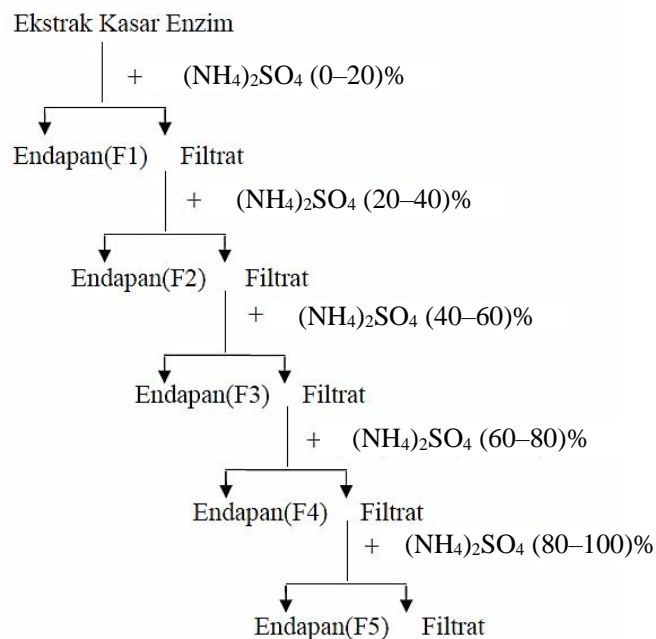
ditambahkan dengan cepat 0,5 mL pereaksi D dan diaduk dengan sempurna, didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Enzim α -amilase sebanyak 0,1 mL diganti dengan 0,1 mL akuades sebagai kontrol, selanjutnya diperlakukan sama seperti sampel, lalu diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} 750 nm. Kadar protein enzim tentukan dengan menggunakan kurva standar *Bovine Serum Albumin* (BSA).

3.3.4. Pemurnian Enzim α -Amilase

Pada penelitian dilakukan pemurnian enzim dengan fraksinasi menggunakan amonium sulfat dan dilakukan pemurnian lanjutan yaitu dialisis.

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

Ekstrak kasar enzim yang diperoleh, kemudian diendapkan dengan garam amonium sulfat pada berbagai derajat kejenuhan yaitu (0–20)%; (20–40)%; (40–60)%; (60–80)%; dan (80–100)% yang ditunjukkan pada Gambar 10.



Gambar 10. Skema pengendapan enzim dengan amonium sulfat.

Filtrat yang didapat dari fraksi (0–20)%, kemudian diendapkan dengan fraksi kejenuhan selanjutnya dengan prosedur yang sama (Yandri *et al.*, 2020). Sejumlah ekstrak kasar enzim yang diperoleh ditambahkan garam amonium sulfat secara perlahan sambil diaduk menggunakan pengaduk magnetik pada suhu 4°C, proses ini dilakukan pada suhu dingin untuk mencegah denaturasi enzim (Atmaja dkk., 2013). Endapan protein enzim yang didapatkan pada tiap fraksi kejenuhan amonium sulfat dipisahkan dari filtratnya dengan sentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm selama 20 menit, kemudian diuji aktivitas enzim dengan metode Fuwa dan kadar protein dengan metode Lowry (Yandri *et al.*, 2020).

b. Dialisis

Endapan enzim yang telah dilarutkan dari tiap fraksi amonium sulfat yang memiliki aktivitas spesifik tertinggi dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis menggunakan buffer fosfat 0,01 M pH 5,5 selama 24 jam pada suhu dingin, yaitu 4–5°C (Pohl, 1990).

Selama dialisis, dilakukan penggantian buffer setiap 2–6 jam sekali agar konsentrasi ion-ion di dalam kantong dialisis dapat dikurangi. Proses ini dilakukan terus menerus hingga tidak ada amonium sulfat yang tersisa. Pengujian adanya amonium sulfat dalam buffer dilakukan dengan menambahkan larutan BaCl₂. Proses ini dihentikan sampai tidak terbentuk endapan putih pada saat penambahan BaCl₂. Uji aktivitas enzim dilakukan dengan metode Fuwa, serta diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry (Yandri *et al.*, 2022a).

3.3.5. Penambahan Zat Aditif Manitol pada Enzim α -Amilase Hasil Pemurnian

Enzim hasil pemurnian ditambahkan dengan manitol 0,5; 1; dan 1,5 M dengan perbandingan 1 : 1 (enzim : manitol), menghasilkan enzim hasil pemurnian dan manitol 0,5 M (manitol 0,5 M); enzim hasil pemurnian

dan manitol 1 M (manitol 1 M); serta enzim hasil pemurnian dan manitol 1,5 M (manitol 1,5 M), kemudian *distirer* selama 1 jam pada suhu 4°C.

3.3.6. Karakterisasi Enzim α -Amilase Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Penambahan Zat Aditif Manitol

Karakterisasi enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil penambahan zat aditif manitol yang telah dilakukan, meliputi :

a. Penentuan pH Optimum Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Penambahan Zat Aditif Manitol

Penentuan pH optimum enzim sebelum dan sesudah penambahan zat aditif manitol, dengan menambahkan buffer fosfat 0,1 M pada variasi pH yaitu 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; dan 8,0. Suhu dijaga agar tetap pada 60°C (Yandri dkk., 2020a; Yandri dkk., 2020b), kemudian dilanjutkan dengan penentuan aktivitas enzim menggunakan metode Mandels.

b. Penentuan Suhu Optimum Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Penambahan Zat Aditif Manitol

Penentuan suhu optimum enzim sebelum dan sesudah penambahan zat aditif manitol dilakukan dengan variasi suhu yaitu 40; 45; 50; ;55; 60; 65; 70; 75; dan 80°C, pH tetap dijaga pada pH optimum yang telah dilakukan, selanjutnya ditentukan aktivitas enzim dengan metode Mandels (Yandri dkk., 2020a; Yandri dkk., 2020b).

c. Penentuan Data Kinetika (Nilai K_M dan V_{maks}) Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Penambahan Zat Aditif Manitol

Konstanta *Michaelis-Menten* (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) enzim sebelum dan sesudah modifikasi ditentukan dari kurva *Lineweaver-Burk*. Kurva *Lineweaver-Burk* dibuat dengan menguji

aktivitas enzim α -amilase dengan variasi konsentrasi substrat yaitu 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; dan 1,25% (Robinson, 2015) dalam buffer fosfat pada pH dan suhu optimum. Aktivitas enzim diukur dengan metode Mandels dan data aktivitas enzim dan konsentrasi substrat diplotkan ke dalam kurva *Lineweaver-Burk* untuk penentuan nilai K_M dan V_{maks} .

d. Penentuan Stabilitas Termal Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Penambahan Zat Aditif Manitol

Penentuan stabilitas termal dilakukan dengan mengukur aktivitas sisa enzim setelah diinkubasi selama periode waktu 100 menit pada suhu dan pH optimum, dengan mengukur aktivitas enzim setelah proses pemanasan setelah interval waktu 10 menit. Aktivitas awal enzim (tanpa proses pemanasan) diberi nilai 100% (Santos *et al.*, 2015). Aktivitas sisa dapat dihitung menggunakan Persamaan 9.

$$\text{Aktivitas sisa} = \frac{\text{Aktivitas enzim setelah perlakuan}}{\text{Aktivitas enzim awal (tanpa perlakuan)}} \times 100\% \dots (9)$$

e. 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 penambahan zat aditif kimia dilakukan dengan menggunakan persamaan kinetika inaktivasi orde 1 (Kazan *et al.*, 1997) dengan persamaan (5). Sedangkan untuk perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan hasil penambahan zat aditif kimia dilakukan dengan menggunakan Persamaan 7 (Yandri *et al.*, 2020).

3.3.7. Sintesis dan Karakterisasi Matriks Hibrid Zeolit-Kitin

Kitin sebanyak 7,5 gram ditambahkan ke dalam asam asetat 1% (100 mL). Campuran tersebut diaduk selama 4 jam menggunakan pengaduk magnetik, kemudian ditambahkan 2,0 gram zeolit, diikuti dengan 100 mL akuades,

kemudian campuran diaduk kembali dengan pengaduk magnetik selama 68 jam (Yandri *et al.*, 2022a). Glutaraldehida 1% sebagai agen pengikat silang ditambahkan sebanyak 2 mL, kemudian diaduk kembali menggunakan pengaduk magnetik selama 24 jam agar homogen menjadi matriks hibrid zeolit-kitin. Matriks hibrid dikeringkan dalam oven pada suhu 65°C (Yandri *et al.*, 2023),

Sebanyak 5 gram bubuk matriks hibrid zeolit-kitin dikarakterisasi. Karakterisasi dilakukan menggunakan spektroskopi FT-IR pada bilangan gelombang berkisar 4000-500 cm^{-1} (Rumengan *et al.*, 2017), untuk mengetahui gugus fungsi dan memastikan terbentuknya matriks hibrid zeolit-kitin.

3.3.8. Imobilisasi Enzim α -Amilase Hasil Pemurnian Menggunakan Matriks Zeolit-Kitin

a. Penentuan pH Pengikatan Enzim Hasil Pemurnian dengan Matriks Hibrid Zeolit-Kitin

Zeolit-kitin sebanyak 0,5 gram distabilkan dengan buffer fosfat 1,0 M dengan variasi pH 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; dan 8, kemudian dikeringkan dalam oven dengan suhu 65°C lalu disimpan pada suhu ruang (Yandri *et al.*, 2022). Sebanyak 0,5 gram matriks hibrid zeolit-kitin yang telah distabilkan dengan buffer fosfat 1,0 M dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi dan ditambahkan enzim α -amilase hasil dialisis sebanyak 0,5 mL dan 0,5 mL buffer fosfat 1,0 M sesuai variasi pH masing-masing, kemudian disimpan pada suhu 4°C selama 12 jam. Enzim hasil imobilisasi disentrifugasi selama 15 menit, kemudian supernatan diambil 0,5 mL sebagai sampel uji metode Fuwa (Yandri *et al.*, 2023). Aktivitas terendah pada variasi pH ditetapkan sebagai pH pengikatan.

b. Imobilisasi Enzim α -Amilase Hasil Pemurnian Menggunakan Matriks Hibrid Zeolit-Kitin

Sebanyak 0,5 gram matriks hibrid zeolit-kitin yang telah distabilkan dengan buffer fosfat 1,0 M dimasukkan ke dalam tabung sentrifus dan ditambahkan enzim α -amilase 0,5 mL hasil dialisis dan 0,5 mL buffer fosfat 1,0 M pH pengikatan, kemudian disimpan pada suhu 4°C selama 12 jam dan disentrifugasi. Supernatan sebanyak 0,25 mL dipisahkan untuk dijadikan sebagai kontrol uji, lalu ke dalam matriks-enzim ditambahkan 0,75 mL pati, kemudian diinkubasi pada suhu optimum selama 30 menit. Setelah itu, enzim hasil imobilisasi disentrifugasi selama 15 menit. Supernatan diambil 0,5 mL sebagai sampel uji metode Mandels (Yandri *et al.*, 2023).

3.3.9. Karakterisasi Enzim α -Amilase Hasil Imobilisasi

a. Penentuan Suhu Optimum Enzim Hasil Imobilisasi

Penentuan suhu optimum kerja enzim dilakukan dengan variasi suhu yaitu 40; 45; 50; 55; 60; 65; 70; 75; dan 80°C pada pH pengikatan yang telah dilakukan (Yandri *et al.*, 2022a), selanjutnya ditentukan aktivitas enzim dengan metode Mandels.

b. Penentuan Data Kinetika (K_M dan V_{maks}) Enzim Hasil Imobilisasi

Penentuan konstanta *Michaelis-Menten* (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) semua enzim pada variasi konsentrasi pati, yaitu 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1,0% (Robinson, 2015), diplotkan ke dalam grafik *Lineweaver-Burk* pada Gambar 6. Nilai K_M serta V_{maks} ditentukan berdasarkan Persamaan 3 dari grafik *Lineweaver-Burk* (Yandri *et al.*, 2023).

c. Penentuan Stabilitas Termal Enzim Hasil Imobilisasi

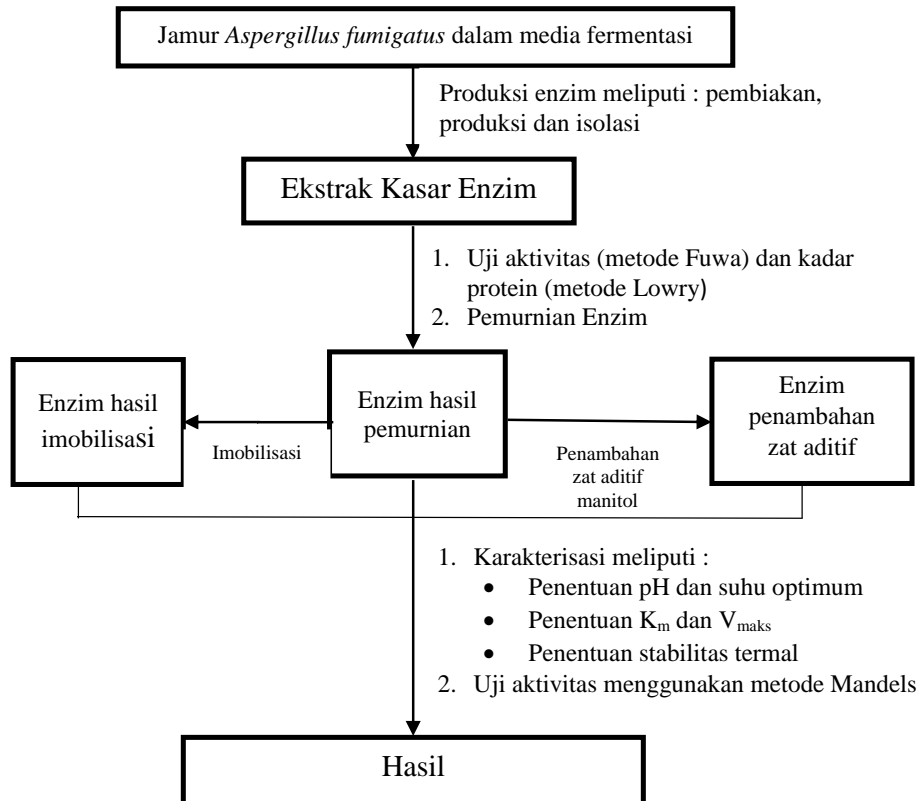
Penentuan stabilitas termal dan pH enzim dilakukan dengan mengukur aktivitas sisa enzim setelah diinkubasi selama periode waktu 100 menit, dengan mengukur aktivitas enzim setelah proses pemanasan setelah interval waktu 10 menit pada suhu optimum (Santos *et al.*, 2015) dan pH pengikatan. Aktivitas awal enzim (tanpa proses pemanasan) diberi nilai 100%. Aktivitas sisa dapat dihitung menggunakan Persamaan 9.

d. Pemakaian Berulang Enzim Hasil Imobilisasi

Enzim hasil imobilisasi yang telah direaksikan dengan substrat dicuci kembali dengan buffer awal melalui sentrifugasi. Supernatan diambil 0,25 mL sebagai kontrol, kemudian enzim hasil imobilisasi direaksikan dengan 0,75 mL substrat baru melalui prosedur imobilisasi yang sama dan diuji aktivitas enzim dengan metode Mandels, diulangi prosedur ini sampai diperoleh aktivitas sisa enzim kurang dari 50% (Baysal *et al.*, 2014).

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

Penentuan nilai k_i didasarkan pada persamaan kinetika inaktivasi orde satu, nilai $t_{1/2}$ dihitung dari Persamaan 6, sedangkan nilai ΔG_i ditentukan melalui Persamaan 7. Secara keseluruhan penelitian ini terangkum dalam diagram alir penelitian yang ditunjukkan pada Gambar 11.



Gambar 11. Diagram alir penelitian.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

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

1. Aktivitas spesifik enzim α -amilase hasil pemurnian yaitu 827,298 U/mg, meningkat 17 kali dibandingkan ekstrak kasar enzim yang mempunyai aktivitas spesifik 30,872 U/mg.
2. Enzim hasil pemurnian optimum pada pH 6,0 dan suhu 50°C, serta memiliki nilai K_M sebesar 2,611 mg mL⁻¹ substrat, dan V_{maks} sebesar 2,593 μ mol mL⁻¹ menit⁻¹.
3. Uji stabilitas termal enzim hasil pemurnian pada suhu 60°C selama 100 menit memiliki aktivitas sisa sebesar 17,1 %, nilai $k_i = 0,0187$ menit⁻¹; nilai $t_{1/2} = 37,067$ menit, dan nilai $\Delta G_i = 104,2270$ kJ mol⁻¹.
4. Enzim hasil penambahan zat aditif manitol dengan variasi konsentrasi 0,5; 1,0 dan 1,5 M optimum pada pH optimum 5,5 dan suhu 60°C serta memiliki nilai K_M berturut-turut sebesar 3,23; 4,83; dan 3,31 mg mL⁻¹ substrat serta nilai V_{maks} berturut-turut sebesar 1,18; 1,70; dan 1,53 μ mol mL⁻¹ menit⁻¹.
5. Uji stabilitas termal enzim hasil penambahan zat aditif manitol dengan variasi konsentrasi 0,5; 1,0 dan 1,5 M pada suhu 60°C selama 100 menit memiliki aktivitas sisa berturut-turut sebesar 55,9; 64,9; dan 40,2% dan memiliki nilai $k_i = 0,006$; 0,004; dan 0,009 menit⁻¹; nilai $t_{1/2} = 119,51$, 169,06; dan 78,32 menit; serta nilai $\Delta G_i = 107,47$; 108,43; dan 107,35 kJ mol⁻¹.

6. Enzim hasil imobilisasi menggunakan hibrida zeolit-kitin optimum pada pH optimum 5,0 dan suhu 60°C serta memiliki nilai K_M sebesar 5,583 mg mL⁻¹ dan nilai V_{maks} sebesar 2,195 $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$.
7. Uji stabilitas termal enzim hasil imobilisasi pada suhu 60°C selama 100 menit memiliki aktivitas sisa sebesar 67,3% dan memiliki nilai $k_i = 0,004 \pm 0,0000$ menit⁻¹; nilai $t_{1/2} = 173,29$ menit; serta nilai $\Delta G_i = 108,50$ kJ mol⁻¹.
8. Terjadi peningkatan waktu paruh dan ΔG_i serta penurunan nilai k_i enzim α -amilase hasil penambahan zat aditif manitol dengan variasi konsentrasi 0,5; 1,0 dan 1,5 M dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian, menunjukkan bahwa penambahan zat aditif manitol dapat meningkatkan stabilitas enzim α -amilase dari *A. fumigatus*.
9. Enzim α -amilase hasil imobilisasi menggunakan hibrida zeolit-kitin memiliki stabilitas yang lebih baik dibandingkan dengan enzim α -amilase hasil pemurnian, hal ini ditunjukkan dengan peningkatan waktu paruh ($t_{1/2}$) sebesar 4,68 kali dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian.
10. Enzim hasil imobilisasi mempunyai aktivitas sisa sebesar 47,54% setelah digunakan sebanyak 6 kali pengulangan.

5.2. Saran

Dari pembahasan, maka disarankan untuk penelitian selanjutnya melakukan sebagai berikut :

1. Pemurnian enzim lebih lanjut menggunakan kromatografi kolom penukar ion dan penyaring molekul agar menghasilkan kemurnian enzim yang lebih tinggi.
2. Melakukan penambahan zat aditif dengan senyawa poliol lain yang memiliki rantai C lebih panjang agar semakin banyak ikatan hidrogen yang terbentuk untuk menjaga kestabilan enzim, sehingga peningkatan kestabilan enzim menjadi lebih besar.
3. Menggunakan matriks hibrid silika-kitosan dan TiO₂-bentonit pada metode imobilisasi agar memiliki peningkatan kestabilan yang lebih besar.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, N. E., El Shamy, A. R., and Awad, H. M. 2020. Optimization and immobilization of amylase produced by *Aspergillus terreus* using pomegranate peel waste. *Bull. Natl. Res. Cent.* **44**(109): 1–12.
- Anam, C., Sirojudin, K., dan Sofyan, F. 2007. Analisis gugus fungsi pada sampel uji, bensin dan spiritus menggunakan metode spektroskopi FT-IR. *BFI-JIFPA.* **10**(1): 79–85.
- Atmaja, W. S., Kadi, A., Sulistijo, dan Rachmaniar, S. 2013. Pengenalan jenis-jenis pemurnian enzim. Jakarta: Puslitbang LIPI, hlm. 16–19.
- Bahari, N.A. and Isahak, W.N.R. 2020. Selective short chain carboxylic acid production over Fe: zeolite nanoparticles from CO₂ hydrogenation reaction. *IOP Conf. Series: Mater. Sci. Eng.* **778**: 1–7.
- Baysal, Z., Bulut, Y., Yavuz, M., and Aytekin, C. 2014. Immobilization of α -amylase via adsorption onto bentonite/chitosan composite: determination of equilibrium, kinetics and thermodynamic parameters. *Starch.* **66**: 484–490.
- Brahmachari, G., Demain, A. L., and Adrio, J. L. 2017. *Biotechnology of Microbial Enzymes.* Elsevier Inc. United Kingdom, pp. 15–20.
- Califano, V. and Costantini, A. 2020. Immobilization of cellulolytic enzymes in mesostructured silica materials. *J. Catalysts.* **10**(6): 1–31.
- Chen, M., Zhang, W., and Mu, W. 2020. Mannitol : physiological functionalities, determination methods, biotechnological production, and application. *App. Microbio. Biotec.* **104**: 6941–6951.
- Costa, S. A., Tzanov, T., Carneiro, A.F., Paar, A., Gubitz, G.M. and Cavaco-Paulo, A. 2002. Study of stabilization of native catalyst using additives. *Enzyme and Microbial. Technol.* **30**: 387–391.

- Dompeipen, E. J. 2017. Isolation and identification of chitin and chitosan from windu shrimp (*Penaeus monodon*) with infrared spectroscopy. *Majalah BIAM*. **13** (01): 31–41.
- Dwevedi, A. 2016. *Enzyme immobilization: Advances in industry, agriculture, medicine, and the environment*. Switzerland. Springer International Publishing, pp. 21–24.
- Eijnsink, G.H., Sirgit, G., Torben, V., and Bertus van de Burg. 2005. Directed evolution of enzyme stability. *Chem. Biomol. Eng.* **23**: 21–30.
- Fadhilillah, M., Soemitro, S., Subroto, T. 2015. Potensi enzim α -amilase dari *Bacillus sp.* (termamyl) untuk pemrosesan tepung sorgum. *Chimica et Natura Acta*. **3**(3): 110–115.
- Fernandez-Lafuente, R. 2009. Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. *Enzyme Microb. Technol.* **45**(6): 405–418.
- Gee, C. L., Holton, J. M. and McPherson, A. 2021. Structure of two novel crystal forms of *Aspergillus oryzae* alpha amylase (taka-amylase). *J. Bioscie. Bioeng.* **131**(6): 605–612.
- Hwang, E. T. and Gu, M. B. 2013. Enzyme stabilization by nano/microsized hybrid materials. *Eng. Life Sci.* **13**(1): 49–61.
- Kamelia, R., Muliawati, S. dan Dessy, N. 2005. Isolasi dan karakterisasi protease intraseluler termostabil dari bakteri *Bacillus stearothermophilus* RP1. *Seminar Nasional MIPA*. Departemen Kimia, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Kazan, D., Ertan, H. and Erarslan, A. 1997. Stabilization of *Escherichia coli* penicillin G acylase against thermal inactivation by cross-linking with dextran dialdehyde polymers. *App. Microbio and Biotech.* **48**: 191–197.
- Larkin, P. J. 2018. *Infrared and raman spectroscopy, principle and spectral interpretation*. Second Edition. Elsevier Inc, pp. 135–137.
- Lay, B.W. dan Sugyo, H. 1992. *Mikrobiologi*. Rajawali Pers. Jakarta, hlm. 107–112.
- Lestari, P., Richana, N., dan Rosmimik. 2011. Karakterisasi dan studi stabilisasi α -amilase *Bacillus licheniformis* TVII.6 menggunakan bahan aditif. *Biota*. **10**(5): 581–588.

- Mansur, H.S., Sadahira, C.M. Souza, A.N., and Mansur, A.P. 2008. FTIR Spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. *Mater. Sci. Eng. Chem.* **28**: 539–548.
- Muyonga, J. H., Cole, C. G., and Duodu, K. G. 2004. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy study of acid soluble collagen and gelatin from skin and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chem.* **86**(1): 325–332.
- Nangin, D., dan Sutrisno, A. 2015. Enzim amilase pemecah pati mentah dari mikroba: kajian pustaka. *Jurnal Pangan dan Agroindustri.* **3**(3): 1032–1039.
- Nwagu, T. N. and Okolo, B. N. 2011. Growth profile and amylolytic activity of thermophilic fungus *Aspergillus fumigatus* isolated from soil. *Asian J. Biotech.* **3**(1): 46–57.
- Page, D. S. 1997. *Prinsip-Prinsip Biokimia*. Erlangga. Jakarta, hlm. 241–257.
- Pohl, T. 1990. *Concentration of protein removal of salute dalam M.P. Deutscher, methods of enzymology: guide to protein purification*. Academic Press. New York. 68–83.
- Pujiaty, Ardhi, M. W., and Prastyo, E. N. 2018. *Bioteknologi Berbasis Proyek*. CV AE Media Grafika. Madiun, hlm. 51–60.
- Purwanto, M. G. 2014. Perbandingan analisa kadar protein dengan berbagai metode spektroskopi *UV-Visible*. *JST.* **7**(2): 64–71.
- Ratnasri, P. V., Lakshmi, B. K. M., Devi, K. A., and Hemalatha, K. P. J. 2018. Isolation, characterization of *Aspergillus fumigatus*, and optimization of cultural conditions for amylase production. *IJRET.* **3**(2): 457–463.
- Riwu, F. K. 2022. Effect manitol concentration on the stability of encapsulated yeast black rice extract. *Indo. J. Chem. Sci.* **11**(2): 137–144.
- Robinson, P. K. 2015. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem.* **59**: 1–41.
- Rumengan, I.F.M., Suptijah, P., Wullur, S., and Talumepa. 2017. Characterization of chitin extracted from fish scales of marine fish species purchased from local markets in North Sulawesi, Indonesia. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **89**: 1–4.

- Santos, A. S., Rosa, N., Souza, M., Philippsen, H. K., and Medeiros, E. 2015. Thermal-stability of enzyme activity and its application in the hydrolysis of starchy residue from Mandioca processing. *Int. J. Sci. Res.* **4**(10): 2277–8179.
- Sari, D.P., Wuryanti, dan Anam, K. 2013. Isolasi, purifikasi, dan karakterisasi α -amilase dari *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012. *Chem. Info.* **1**(1): 337–344.
- Shirley, B. A., Stansses, P., Hahn, U., and Pace, C. N. 1992. Contribution of hydrogen bonding to the conformational stability of ribonuclease T1. *Biochem.* **31**(3): 725–732.
- Stahl, S. 1999. *Thermophilic Microorganisms: The Biological Background for Thermophily and Thermoresistance of Enzymes in Thermostability of Enzymes*. Springer. New York, pp. 59–60.
- Suhartono, M.T. 1999. *Enzim dan Bioteknologi*. Penelitian Antar Universitas IPB. Bogor. 13–37.
- Soemitro, S. 2005. Pengaruh modifikasi kimiawi selektif terhadap kestabilan α -amilase dari *Saccharomycopsis fibuligera*. *J. Bionatura.* **7**(3): 259–273.
- Solahuddin, Hanifa, N.E., Deccati, R.F., dan Muliastari, H. 2021. Isolasi dan uji aktivitas enzim selulase dari ramen sapi (*Bibos javanicus*). *JSTE.* **3**(1): 1–7.
- Vogel, A. and May, O. 2019. *Industrial Enzyme Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. Weinheim, pp. 433.
- Wahab, R.A., Elias, N., Abdullah, F., and Ghoshal, S.K. 2020. On the taught new tricks of enzymes immobilization: an all-inclusive overview. *React Funct Polym.* **152**: 1–26.
- Wahyudiati, D. 2017. *Biokimia*. LEPPIM Mataram. Mataram, hlm. 209–221.
- Winarno, F.G. 2002. *Kimia Pangan dan Gizi*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta, hlm. 37–60.
- Wu, L., Wu, S., Xu, Z., Qiu, Y., Li, S., and Xu, H. 2016. Modified nanoporous titanium dioxide as a novel carrier for enzyme immobilization. *JBSBE.* **80**: 59–66.
- Wulandari, E., dan Hendarmin, L. A. 2010. *Integrasi Biokimia dalam Modul Kedokteran*. UIN Syarif Hidayatullah. Jakarta, hlm. 60–79.

- Yandri, A.S., Apriyanti., Suhartati, T., and Hadi, S. 2010a. The increase of thermal stability of α -amylase from locale bacteria isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148 by chemical modification with dimethyladipimide. *Biosci. Biotech. Res.* **7**(2): 713–718.
- Yandri, A.S., Suhartati, T. and Hadi, S. 2010b. 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, hlm. 36–102.
- Yandri, A.S., dan Wulandari, P. 2009. Pengaruh penambahan sorbitol terhadap stabilitas termal enzim α -amilase dari *Rhizopus oryzae*. *J. Sains MIPA.* **15** (2): 111–118.
- Yandri, Y., Nadila, N., Suhartati, T., Satria, H., Irawan, B., dan Hadi, S. 2020a. Peningkatan kestabilan enzim α -amilase dengan penambahan gliserol. *Anal. Environ. Chem.* **5**(2): 143–154.
- Yandri., Wahyuningsih, F., Suhartati, T., Satria H., dan Hadi, S. 2020b. *Peningkatan kestabilan enzim α -amilase dengan penambahan sorbitol*. Prosiding Seminar Nasional Kimia (SNK) 2020. Universitas Negeri Surabaya, hlm. 232–241.
- 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**: 505–518.
- Yandri, Y., Ropingi, H., Suhartati, T., Hendri, J., Irawan, B., and Hadi, S. 2022b. Immobilization of α -amylase from *Aspergillus fumigatus* using adsorption method onto zeolit. <https://doi.org/10.1515/psr-2022-0258>.
- Yandri, Y., Suhartati, T., Satria, H., Widyasmara, A., and Hadi, S. 2020. Increasing stability of α -amylase obtained from *Bacillus subtilis* ITBCCB148 by immobilization with chitin. *Mediterr. J. Chem.* **10**(2): 155–161.
- Yandri, Y., Tiarsa, E. R., Suhartati, T., Satria, H., Irawan, B., and Hadi, S., 2023. Immobilization and stabilization of *Aspergillus fumigatus* α -amylase by adsorption on a chitin. *Emerg. Sci. J.* **7**(1):77–86.

- Yu, L., Yu, B., Chen, H., Shang, X., He, M., Lin, M., Li, D., Zhang, W., Kang, Z., Li, J., Wang, F., Xiao, L., Wang, Q., and Fan, J. 2021. Highly efficient artificial blood coagulation shortcut confined on Ca-zeolite surface. *Nano Research*. **14**(9): 3309–3318.
- Yudono, B. 2017. *Spektrometri*. Simetri. Palembang, hlm. 63.
- 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.
- Zhang, H., Jiang, Z., Xia, Q., and Zhou, D., 2021. Progress and perspective of enzyme immobilization on zeolit crystal materials. *Biochem. Eng. J.* **172**: 1–11.