

PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus fumigatus* DENGAN METODE IMOBILISASI MENGGUNAKAN SILIKA GEL 60, KITOSAN, DAN HIBRIDA KITOSAN-SILIKA GEL 60

(Tesis)

Oleh

**SANTALUM ALBA
NPM 2227011010**



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

PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus fumigatus* DENGAN METODE IMOBILISASI MENGGUNAKAN SILIKA GEL 60, KITOSAN, DAN HIBRIDA KITOSAN-SILIKA GEL 60

Oleh

SANTALUM ALBA

Tesis

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai 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**

ABSTRAK

PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus fumigatus* DENGAN METODE IMOBILISASI MENGGUNAKAN MENGGUNAKAN SILIKA GEL 60, KITOSAN, DAN HIBRIDA KITOSAN-SILIKA GEL 60

Oleh

Santalum Alba

Kestabilan enzim terhadap pH dan suhu merupakan faktor yang penting di dalam dunia industri. Pada umumnya, enzim tidak dapat bekerja secara optimum pada kondisi pH dan suhu yang ekstrem sehingga untuk dapat digunakan dalam industri perlu dilakukan peningkatan kestabilan enzim.

Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan kestabilan enzim α -amilase dari *Aspergillus fumigatus* dengan imobilisasi menggunakan matriks silika gel 60, kitosan, dan hibrida kitosan–silika gel 60. Enzim α -amilase diisolasi dengan sentrifugasi dan dimurnikan dengan cara pengendapan menggunakan garam amonium sulfat dilanjutkan dengan dialisis.

Enzim α -amilase hasil pemurnian memiliki tingkat kemurnian sebesar 4,9 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim. Uji stabilitas termal pada enzim α -amilase hasil pemurnian pada suhu 60°C selama 80 menit menunjukkan aktivitas sisa sebesar 24,8 % dan waktu paruh sebesar 39,93 menit, sedangkan enzim hasil imobilisasi dengan silika gel 60, kitosan, dan hibrida kitosan–silika gel 60 berturut-turut menunjukkan aktivitas sisa sebesar 44,8; 25,1; dan 57,8 %, serta waktu paruh berturut-turut sebesar 219,81; 94,18; dan 260,85 menit, pada kondisi yang sama. Peningkatan kestabilan enzim hasil pemurnian setelah diimobilisasi pada silika gel 60, kitosan, dan hibrida kitosan–silika gel 60 berturut-turut sebesar 5,5; 2,4; dan 6,1 kali. Aktivitas sisa enzim α -amilase hasil imobilisasi pada silika gel 60, kitosan, dan hibrida kitosan–silika gel 60 setelah pemakaian berulang sebanyak enam kali berturut-turut sebesar 77,3; 55,1, dan 79,0 %.

Kata kunci: α -amilase, *Aspergillus fumigatus*, imobilisasi, hibrida kitosan–silika gel 60

ABSTRACT

ENHANCEMENT OF α -AMYLASE ENZYME STABILITY FROM *Aspergillus fumigatus* BY IMMOBILIZATION METHODS USING CHITOSAN, SILICA GEL 60 AND CHITOSAN– SILICA GEL 60 HYBRID

By

Santalum Alba

The stability of enzymes against pH and temperature is an important factor in the industrial world. Generally, enzymes cannot function optimally under extreme pH and temperature conditions, so enhancing enzyme stability is necessary for industrial use.

This study aims to enhance the stability of α -amylase enzymes from *Aspergillus fumigatus* by immobilization using silica gel 60, chitosan, and chitosan–silica gel 60 hybrid. The α -amylase enzyme was isolated by centrifugation and purified by precipitation using ammonium sulfate followed by dialysis.

The purified α -amylase enzyme has a 4.9 times higher purity level than the crude enzyme extract. Thermal stability test on the purified α -amylase enzyme at 60°C for 80 minutes showed residual activity of 24.8 % and half-life of 39.93 minutes, while the enzyme immobilized with silica gel 60, chitosan, and chitosan–silica gel 60 hybrids respectively showed residual activities of 44.8, 25.1, and 57.8, and half-lives of 219,81; 94,18; dan 260,85 minutes under the same conditions. The enzyme's stability increased after immobilization on silica gel 60, chitosan, and chitosan–silica gel 60 hybrids, respectively 5.5, 2.4, and 6.1-fold. The residual activity of α -amylase enzyme immobilized on silica gel 60, chitosan, and chitosan–silica gel 60 hybrids after repeated use for six consecutive times was 77.3, 55.1, and 79.0 %, respectively.

Keywords: α -amylase, *Aspergillus fumigatus*, immobilization, chitosan–silica gel 60 hybrid

Judul Tesis

**: PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM
 α -AMILASE DARI *Aspergillus
fumigatus* DENGAN METODE
IMOBILISASI MENGGUNAKAN SILIKA
GEL 60, KITOSAN, DAN HIBRIDA
KITOSAN-SILIKA GEL 60**

Nama Mahasiswa

: Santalum Alba

Nomor Pokok Mahasiswa

: 2227011010

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.**

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

Dr. Sonny Widiarto, S.Si., M.Sc.

Dr. Dra. Ilim, M.S.

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. H. Murhadi, M.Si.

NIP 19640326 198902 1 001

Tanggal Lulus Ujian Tesis : **30 Juli 2024**

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Santalum Alba
Nomor Pokok Mahasiswa : 2227011010
Program Studi : Magister Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini menyatakan bahwa tesis saya yang berjudul “Peningkatan Kestabilan Enzim α -Amilase dari *Aspergillus fumigatus* dengan Metode Imobilisasi Menggunakan Silika Gel 60, Kitosan, dan Hibrida Kitosan-Silika Gel 60” adalah benar karya saya sendiri dan saya tidak melakukan penjiplakan (*plagiarism*) atas karya penulis lain dengan cara yang tidak sesuai dengan tata etika ilmiah yang berlaku. Hak intelektual karya ilmiah ini saya serahkan kepada Universitas Lampung dan saya tidak keberatan jika data tesis ini di kemudian hari dipergunakan oleh pihak dosen atau Prodi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya dicantumkan.

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

Bandar Lampung, Agustus 2024

Pembuat Pernyataan,



Santalum Alba
NPM 2227011010

RIWAYAT HIDUP

Nama penulis adalah Santalum Alba. Penulis lahir di Sribhawono pada tanggal 08 Desember 1994. Penulis adalah anak sulung dari dua bersaudara, anak dari Bapak Margono dan Ibu Susmiati. Saat ini penulis sudah menikah dengan Syelawati.

Penulis memulai pendidikan di TK Pertiwi Sribhawono pada tahun 1998. Setelah itu, penulis melanjutkan ke SDN 1 Bandar Sribhawono dan lulus pada tahun 2006. Selanjutnya, penulis bersekolah di SMPN 1 Bandar Sribhawono dan lulus pada tahun 2009. Setelah SMP, penulis melanjutkan ke SMA Negeri 1 Metro dan lulus pada tahun 2012. Setelah lulus SMA, penulis melanjutkan studi ke Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Institut Teknologi Bandung. Penulis menyelesaikan pendidikan sarjananya pada tahun 2016.

Setelah lulus dari Institut Teknologi Bandung, penulis memulai karier sebagai Staf *Research and Development* di PT. Dunia Kimia Jaya selama 2 tahun 5 bulan. Kemudian menjadi Pegawai Paruh Waktu di PT. Ruang Raya Indonesia (Ruangguru) selama 6 bulan. Saat ini, penulis bekerja sebagai Pranata Laboratorium Pendidikan di Program Studi Farmasi Institut Teknologi Sumatera. Di sana, penulis mengelola laboratorium pendidikan dan penelitian untuk mahasiswa dan dosen.

Pada tahun 2024, penulis dapat menyelesaikan pendidikan di Program Studi Magister Kimia, FMIPA, Universitas Lampung.

SANWACANA

Puji dan syukur saya panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas berkat dan rahmat-Nya, sehingga saya dapat menyelesaikan tesis ini yang berjudul "Peningkatan Kestabilan Enzim α -Amilase dari *Aspergillus fumigatus* dengan Metode Imobilisasi Menggunakan Silika Gel 60, Kitosan, dan Hibrida Kitosan-Silika Gel 60".

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

1. Keluargaku: Istriku Syelawati, Ayahanda Margono dan Salmudin, Ibunda Susmiati dan Mulyani, dan Adinda Marcheliana, .
2. Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S. dan Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S., selaku Komisi Pembimbing Tesis.
3. Prof. Ir. Suharso, S.Si., Ph.D., Dr. Sonny Widiarto, S.Si., M.Sc., dan Dr. Dra. Ilim, M.S., selaku Tim Pembahas Tesis.
4. Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si. selaku Kaprodi Magister Kimia, FMIPA, Universitas Lampung.
5. Segenap Tenaga Pendidik dan Kependidikan Jurusan Kimia dan Prodi Magister Kimia, FMIPA, Universitas Lampung.
6. Tim Satu Komisi Pembimbing S2: Ella Gita Silviana, Kartika Dewi Rachmawati, dan Stevenson Waruwu.
7. Tim Satu Komisi Pembimbing S1: Avi Eriyani, Maria Agustina Sidabutar, Rusmauli Defana Panjaitan, dan Stephani Marisca Febrianti.

8. Rekan Studi di Prodi Magister Kimia Angkatan 2022: Qudwah Mutawakkilah, Siti Nurjanah, Siti Aisah, Innamaa Trina, Nurul Rosadinah, Chyntia Gustiyanda Patraini, dan Pinkan Valencia.
9. Semua pihak yang telah membantu dan mendukung dalam penyelesaian tesis ini.

Semoga tesis ini dapat berguna dan bermanfaat.

Bandar Lampung, Agustus 2024
Penulis,

Santalum Alba

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR RUMUS.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian.....	4
1.3. Manfaat Penelitian.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Enzim	5
2.2. Enzim α -Amilase.....	7
2.3. Reaksi Hidrolisis Pati secara Enzimatik.....	9
2.4. <i>A. fumigatus</i>	12
2.5. Produksi Enzim dengan Metode Fermentasi.....	14
2.6. Isolasi Enzim dengan Metode Sentrifugasi	15
2.7. Pemurnian Enzim	16
2.7.1. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat	16
2.7.2. Dialisis.....	16
2.8. Penentuan Aktivitas Enzim dan Kadar Protein	18
2.8.1. Metode Fuwa	19
2.8.2. Metode Mandels	19
2.8.3. Metode Lowry	20
2.9. Kinetika Reaksi Enzim.....	21
2.10. Kestabilan Enzim	22
2.10.1. Kestabilan Termal	23
2.10.2. Konstanta Laju Inaktivasi Termal (k_i).....	23
2.10.3. Waktu Paruh ($t_{1/2}$).....	24
2.10.4. Perubahan Energi Bebas Akibat Denaturasi (ΔG_i).....	24
2.11. Imobilisasi Enzim.....	25
2.12. Kitosan	26
2.13. Silika Dioksida	27
2.14. Material Hibrida untuk Imobilisasi	29

2.15. Spektrofotometri UV-Vis	31
2.16. <i>Fourier-transform Infrared Spectroscopy</i>	33
III. METODE PENELITIAN.....	34
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian	34
3.2. Alat dan Bahan	34
3.3. Prosedur Penelitian.....	35
3.3.1. Pembiakan <i>A. fumigatus</i>	35
3.3.2. Produksi Enzim α -Amilase dari <i>A. fumigatus</i>	36
3.3.3. Isolasi Enzim α -Amilase dari <i>A. fumigatus</i>	37
3.3.4. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat	38
3.3.5. Dialisis.....	40
3.3.6. Penentuan Aktivitas Unit dengan Metode Fuwa	41
3.3.7. Penentuan Aktivitas Unit dengan Metode Mandels	41
3.3.8. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry.....	42
3.3.9. Imobilisasi Enzim α -Amilase dengan Silika	43
3.3.10. Sintesis Hibrida Kitosan–Silika Gel 60.....	44
3.3.11. Analisis <i>Fourier-transform Infrared Spectroscopy</i>	45
3.3.12. Imobilisasi Enzim α -Amilase dengan Hibrida Kitosan–Silika Gel 60	45
3.3.13. Karakterisasi Enzim α -Amilase Hasil Pemurnian Enzim Hasil Imobilisasi dengan Silika, dan Hibrida Kitosan-Silika.....	46
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	49
4.1. Produksi Enzim α -Amilase dari <i>A. fumigatus</i>	49
4.2. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat	49
4.3. Dialisis	52
4.4. Penentuan pH Optimum Enzim Hasil Pemurnian	52
4.5. Sintesis Hibrida Kitosan–Silika gel 60	53
4.6. Analisis Spektroskopi Infra Merah Transformasi Fourier (FT-IR).....	54
4.7. Penentuan pH Buffer Pengikatan Enzim dengan Matriks	56
4.7.1. Penentuan pH pengikatan enzim hasil pemurnian pada silika gel 60.....	56
4.7.2. Penentuan pH pengikatan enzim hasil pemurnian pada kitosan	57
4.7.3. Penentuan pH pengikatan enzim hasil pemurnian pada hibrida kitosan–silika gel 60	58
4.8. Penentuan Suhu Optimum Enzim Hasil Pemurnian dan Hasil Imobilisasi pada Matriks silika gel 60, Kitosan, dan Hibrida Kitosan–Silika gel 60	60
4.9. Penentuan Nilai K_M dan V_{maks} Enzim Hasil Pemurnian dan Hasil Imobilisasi pada Matriks Silika Gel 60, Kitosan, dan Hibrida Kitosan–Silika gel 60	61
4.10. Penentuan Kestabilan Termal Enzim Hasil Pemurnian dan Hasil Imobilisasi pada Matriks silika gel 60, Kitosan, dan Hibrida Kitosan-Silika gel 60	63

4.11. Penentuan Konstanta Laju Inaktivasi Termal (k_i), Waktu Paruh ($t_{1/2}$), dan Perubahan Energi Bebas Akibat Denaturasi (ΔG_i) Enzim Hasil Pemurnian dan Hasil Imobilisasi pada Matriks silika gel 60, Kitosan, dan Hibrida Kitosan–Silika gel 60.....	64
4.12 Pemakaian Berulang Enzim Hasil Imobilisasi pada Matriks silika Gel 60, Kitosan, dan Hibrida Kitosan–Silika gel 60.....	66
V. SIMPULAN DAN SARAN	68
5.1. Simpulan.....	68
5.2. Saran.....	69
DAFTAR PUSTAKA.....	70

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Perbandingan nilai K_M dan V_{maks} enzim pada berbagai penelitian	22
2. Berbagai penelitian imobilisasi enzim dengan kitosan dan silika	26
3. Berbagai penelitian imobilisasi enzim dengan material hibrida	31
4. Rangkuman hasil pemurnian enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	52
5. Nilai K_M dan V_{maks} enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks silika gel 60, kitosan, dan hibrida kitosan–silika gel 60	62
6. Nilai k_i , $t_{1/2}$, dan ΔG_i enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks silika gel 60, kitosan, dan hibrida kitosan–silika gel 60	66
7. Hubungan antara persen kejenuhan amonium sulfat dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	78
8. Hubungan antara persen kejenuhan amonium sulfat (0-30) % dan (30-90) % dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	78
9. Aktivitas unit enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i> hasil pemurnian dalam berbagai pH	79
10. Aktivitas unit enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i> pada matriks silika gel dalam berbagai pH pengikatan	80
11. Aktivitas unit enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i> pada matriks kitosan dalam berbagai pH pengikatan	80
12. Aktivitas unit enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i> pada matriks hibrida dalam berbagai pH pengikatan	81
13. Hubungan antara suhu dengan aktivitas unit enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i> hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks silika gel, kitosan, dan hibrida kitosan–silika gel	82
14. Hubungan antara suhu dengan aktivitas sisa enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i> hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks silika gel, kitosan, dan hibrida kitosan–silika gel	82

15. Hubungan antara konsentrasi substrat dengan aktivitas unit enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i> hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks silika gel, kitosan, dan hibrida kitosan–silika gel	83
16. Data grafik Lineweaver-Burk enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i> hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks silika gel, kitosan, dan hibrida kitosan–silika gel	83
17. Perhitungan V_{maks} enzim hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks silika gel 60, kitosan, dan hibrida kitosan-silika gel 60.....	84
18. Perhitungan K_M enzim hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks silika gel 60, kitosan, dan hibrida kitosan-silika gel 60.....	84
19. Hubungan antara aktivitas unit enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks silika gel, kitosan, dan hibrida kitosan–silika gel selama inaktivasi termal pada suhu 60°C	85
20. Hubungan antara aktivitas sisa enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks silika gel, kitosan, dan hibrida kitosan–silika gel selama inaktivasi termal pada suhu 60°C	85
21. Data grafik laju inaktivasi termal orde satu enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks silika gel, kitosan, dan hibrida kitosan–silika gel selama inaktivasi termal pada suhu 60°C	86
22. Perhitungan waktu paruh ($t_{1/2}$) enzim hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks silika gel, kitosan, dan hibrida kitosan–silika gel ...	87
23. Perhitungan nilai ΔG_i enzim hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks silika gel, kitosan, dan hibrida kitosan–silika gel	89
24. Aktivitas unit enzim hasil imobilisasi pada matriks silika gel , kitosan, dan hibrida kitosan–silika gel saat pemakaian berulang	90
25. Aktivitas sisa enzim hasil imobilisasi pada matriks silika gel , kitosan, dan hibrida kitosan–silika gel saat pemakaian berulang	90
26. Penentuan panjang gelombang maksimum untuk metode Lowry	91
27. Absorbansi BSA pada berbagai konsentrasi	92
28. Penentuan panjang gelombang maksimum untuk metode Mandels	93
29. Absorbansi glukosa pada berbagai konsentrasi	94
30. Penentuan panjang gelombang maksimum untuk metode Fuwa	95
31. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV- <i>Vis</i> dengan metode Fuwa (λ_{maks} : 601 nm) pada ekstrak kasar enzim, hasil fraksinasi, dan hasil dialisis	96
32. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV- <i>Vis</i> dengan metode Lowry (λ_{maks} : 750 nm) pada ekstrak kasar enzim, hasil fraksinasi, dan hasil dialisis	96

33. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV- <i>Vis</i> dengan metode Mandels (λ_{maks} : 509 nm) untuk penentuan pH optimum enzim hasil pemurnian	97
34. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV- <i>Vis</i> dengan metode Mandels (λ_{maks} : 509 nm) untuk penentuan pH buffer pengikatan enzim dengan matriks silika gel, kitosan, dan hibrida kitosan–silika gel	98
35. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV- <i>Vis</i> dengan metode Mandels (λ_{maks} : 509 nm) untuk penentuan suhu optimum enzim hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks Silika gel, kitosan, dan hibrida kitosan–silika gel	99
36. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV- <i>Vis</i> dengan metode Mandels (λ_{maks} : 509 nm) untuk penentuan K_M dan V_{maks} enzim hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks silika gel, kitosan, dan hibrida kitosan–silika gel	100
37. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV- <i>Vis</i> dengan metode Mandels (λ_{maks} : 509 nm) untuk penentuan kestabilan termal enzim hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks silika gel, kitosan, dan hibrida kitosan–silika gel	102
38. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV- <i>Vis</i> dengan metode Mandels (λ_{maks} : 509 nm) untuk pemakaian berulang enzim hasil imobilisasi pada matriks silika gel, kitosan, dan hibrida kitosan–silika gel	104
39. Hubungan bilangan gelombang (cm^{-1}) dan transmitansi (%) pada spektrum FT-IR matriks silika gel 60, kitosan, dan hibrida kitosan-silika gel 60.....	108

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Enzim α -amilase yang berasal dari <i>Aspergillus oryzae</i> : (a) Struktur tiga dimensi dan (b) Pusat aktif (Gee <i>et al.</i> , 2021)	7
2. Struktur tiga dimensi α -amilase yang terdiri dari tiga domain (Singh <i>and</i> Guruprasad, 2014)	8
3. Interaksi ion (a) Cl^- dan (b) ion Ca^{2+} terhadap rantai samping residu asam amino α -amilase (Singh <i>and</i> Guruprasad, 2014)	9
4. Struktur (a). amilosa, (b). amilopektin (Bergthaller <i>and</i> Hollmann, 2014) ...	10
5. Tahap pembentukan intermediet pada hidrolisis pati oleh α -amilase (Rydberg <i>et al.</i> , 2002)	11
6. Proses hidrolisis zat intermediet oleh Glu204 dan Asp289 (Rydberg <i>et al.</i> , 2002).....	11
7. Tahap akhir hidrolisis pati oleh enzim α -amilase (Rydberg <i>et al.</i> , 2002)	12
8. <i>A. fumigatus</i> (Gonçalves <i>et al.</i> , 2020).....	13
9. Pemurnian enzim dengan metode dialisis	18
10. Reaksi reduksi DNS menjadi asam 2-hidroksi-3-amino-5-nitrosalisilat	20
11. Grafik Lineweaver-Burk	21
12. Struktur kitosan	27
13. Struktur kubik silika (SiO_2) (Ricci <i>et al.</i> , 2007)	28
14. Contoh interaksi antara silika dengan matriks organik (Kickelbick <i>et al.</i> , 2007).....	30
15. Spektrum FTIR (a). Kitosan, (b). Hibrida kitosan-silika (Diosa <i>et al.</i> , 2019).....	33
16. Skema fraksinasi dengan amonium sulfat	38
17. Diagram alir penelitian.....	48
18. Hubungan antara persentase kejenuhan amonium sulfat dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	50

19. Hubungan antara persentase kejenuhan amonium sulfat (0-30) dan (30-90)% dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i>	51
20. Aktivitas unit enzim α -amilase dari <i>A. fumigatus</i> hasil pemurnian dalam berbagai pH	53
21. (a). Silika gel 60, (b). kitosan, (c). hibrida kitosan-silika gel 60.....	54
22. Spektrum FT-IR silika gel 60, kitosan, dan hibrida kitosan-silika gel 60.....	55
23. Gabungan spektrum FT-IR silika gel 60, kitosan, dan hibrida kitosan-silika gel 60	56
24. Aktivitas unit enzim α -amilase hasil pemurnian pada matriks silika gel 60 dalam berbagai pH buffer pengikatan	57
25. Aktivitas unit enzim α -amilase hasil pemurnian pada matriks kitosan dalam berbagai pH buffer pengikatan.....	58
26. Aktivitas unit enzim α -amilase hasil pemurnian pada matriks hibrida dalam berbagai pH buffer pengikatan.....	59
27. Suhu optimum enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks silika gel 60, kitosan, dan hibrida kitosan-silika gel 60.....	60
28. Grafik Lineweaver-Burk enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks silika gel 60, kitosan, dan hibrida kitosan-silika gel 60.....	62
29. Kestabilan termal enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks silika gel 60, kitosan, dan hibrida kitosan-silika gel 60.....	63
30. Grafik laju inaktivasi termal orde satu enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks silika gel 60, kitosan, dan hibrida kitosan-silika gel 60.....	65
31. Pemakaian berulang enzim hasil imobilisasi pada matriks silika gel 60, kitosan, dan hibrida kitosan-silika gel 60.....	67
32. Penentuan panjang gelombang maksimum untuk metode Lowry.....	90
33. Kurva standar BSA.....	91
34. Penentuan panjang gelombang maksimum untuk metode Mandels.....	92
35. Kurva standar glukosa.....	93
36. Penentuan panjang gelombang maksimum metode Fuwa	94
37. Spektrum FT-IR kitosan	104
38. Spektrum FT-IR silika gel 60	105
39. Spektrum FT-IR hibrida kitosan-silika gel	106

DAFTAR RUMUS

Rumus	Halaman
1. Lineweaver-Burk.....	21
2. Aktivitas Sisa	23
3. Laju Inaktivasi Termal Enzim Orde Satu.....	23
4. Waktu Paruh	24
5. Perubahan Energi Bebas Akibat Denaturasi (ΔG_i).....	24
6. Aktivitas Unit Metode Fuwa	41
7. Aktivitas Unit Metode Mandels	42
8. Kadar Protein	108
9. Aktivitas Spesifik	108
10. Kemurnian.....	108

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Data Penentuan Pola Fraksinasi	78
2. Data Penentuan pH Optimum Enzim Hasil Pemurnian	79
3. Data Penentuan pH Pengikatan Enzim dan Matriks Pengimobil.....	80
4. Data Penentuan Suhu Optimum.....	82
5. Data Penentuan K_M dan V_{maks}	83
6. Data Penentuan Kestabilan Termal	84
7. Data Grafik Laju Inaktivasi Termal Enzim Orde Satu.....	85
8. Perhitungan Waktu Paruh ($t_{1/2}$).....	86
9. Perhitungan Perubahan Energi Bebas akibat Denaturasi (ΔG_i)	87
10. Data Pemakaian Berulang Enzim Hasil Imobilisasi pada Matriks Silika gel 60 Kitosan, dan Hibrida Kitosan–Silika gel 60	89
11. Data Penentuan Panjang Gelombang Maksimum untuk Metode Lowry.....	90
12. Kurva Standar <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA)	91
13. Data Penentuan Panjang Gelombang Maksimum untuk Metode Mandels.....	92
14. Kurva Standar Glukosa	93
15. Data Penentuan Panjang Gelombang Maksimum untuk Metode Fuwa	94
16. Data Hasil Pengukuran Absorbansi Menggunakan Spektrofotometer UV- V_{is}	95
17. Data Spektrum FT-IR Matriks Imobil	104
18. Persamaan Untuk Kuantitasi Enzim Pada Saat Sebelum dan Sesudah Pemurnian	108

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Di dalam tubuh manusia, setidaknya terjadi triliun reaksi biokimia yang penting agar proses metabolisme dapat terjadi (Lewis *and* Stone, 2023). Enzim merupakan salah satu bagian penting dalam proses metabolisme di dalam organisme hidup. Enzim dikenal sebagai biokatalisator yang berfungsi untuk mempercepat reaksi biokimia di dalam metabolisme makhluk hidup (Robinson, 2015). Prinsip kerja enzim adalah dengan menurunkan energi aktivasi yang diperlukan agar reaksi kimia dapat berlangsung di dalam organisme hidup (Lewis *and* Stone, 2023).

Kemampuan mempercepat reaksi kimia dan dapat diekstraksi ke luar sel membuat berbagai enzim telah banyak digunakan untuk kebutuhan industri. Selain digunakan untuk mempercepat proses produksi, enzim juga digunakan untuk mengembangkan produk dan metode produksi. Penggunaan enzim di industri paling banyak didominasi oleh enzim-enzim hidrolitik seperti protease, amilase dan lipase (Singh *et al.*, 2016). Enzim-enzim pemecah karbohidrat seperti selulase dan amilase merupakan jenis enzim kedua paling banyak digunakan di industri.

Enzim α -amilase merupakan salah satu enzim yang paling banyak digunakan di industri karena aplikasi yang cukup luas seperti pada pengolahan makanan, kertas, tekstil, dan detergen (Souza *and* Magalhães, 2010). Hal ini disebabkan karena karbohidrat seperti pati dan selulosa banyak digunakan di berbagai sektor industri. Enzim α -amilase digunakan karena mampu memutuskan ikatan α -1,4-glikosidik pada bagian dalam rantai secara acak dan cepat.

Enzim untuk kebutuhan produksi dapat diekstraksi dari berbagai jenis mikroorganisme, khususnya jamur. Enzim pada jamur disekresikan ke luar sel, sehingga memudahkan proses isolasi dan pemurniannya. Enzim ekstraseluler yang dihasilkan mampu untuk mendegradasi senyawa organik kompleks yang akan larut dan diserap oleh jamur. Jamur dalam kelompok *Aspergillus* memiliki kemampuan fermentasi yang baik dan sekresi protein tingkat tinggi, sehingga organisme ini dapat dimanfaatkan dengan baik dalam bidang industri.

Enzim yang digunakan dalam industri haruslah stabil pada suhu dan pH yang ekstrem, namun pada kenyataannya enzim mudah terdenaturasi dan kehilangan sifat katalitiknya. Pada enzim α -amilase, ketidakstabilan enzim tersebut diperkirakan karena residu lisin yang terpapar ke permukaan lalu berinteraksi dengan molekul air melalui ikatan hidrogen. Adanya interaksi tersebut akan mengganggu residu lisin yang berfungsi untuk mengikat enzim dengan substrat, sehingga enzim menjadi lebih tidak stabil (Yandri dan Suhartati, 2018).

Kestabilan yang menurun akan menyebabkan proses denaturasi karena hilangnya kesetimbangan ikatan non-kovalen (Fitter, 2005). Proses denaturasi menyebabkan enzim tidak memiliki aktivitas katalitik. Padahal, harga enzim di industri relatif mahal dibandingkan dengan bahan kimia lain, sehingga menyebabkan harga produksi meningkat (Robinson, 2015).

Beberapa metode dapat digunakan untuk meningkatkan stabilitas enzim di antaranya imobilisasi, mutagenesis terarah, dan modifikasi kimia. Imobilisasi enzim adalah salah satu metode yang banyak dipelajari dan dipakai di dunia industri (Homaei *et al.*, 2013). Imobilisasi enzim adalah proses terlokalisasi secara fisik molekul enzim oleh material yang tidak larut air, sehingga memiliki aktivitas katalitik yang stabil dan dapat digunakan secara berulang (Brena *et al.*, 2013).

Kelebihan enzim imobil dibandingkan enzim murni diantaranya mengurangi biaya produksi, meningkatkan stabilitas, dan dapat dihilangkan dari campuran reaksi (Cherry and Fidantsef, 2003). Selain itu, imobilisasi suatu enzim pada bahan pendukung dapat meningkatkan ketahanannya terhadap perubahan pH dan suhu (Cherry and Fidantsef, 2003).

Bahan pendukung atau matriks yang digunakan untuk imobilisasi enzim umumnya dibedakan menjadi dua yaitu matriks anorganik dan organik. Matriks anorganik seperti oksida logam, mineral, dan material berbasis karbon memiliki kestabilan termal, kimia, dan mekanik yang bagus sedangkan matriks organik memiliki banyak gugus fungsi yang mampu mengikat enzim secara kovalen, sehingga afinitasnya terhadap enzim cenderung tinggi. Penelitian lebih lanjut mengembangkan matriks dalam bentuk material hibrida (organik-organik, anorganik-anorganik, dan anorganik-organik). Material hibrida memiliki stabilitas termal, kimia, dan mekanik yang lebih baik. Selain itu memiliki biokompabilitas dan afinitas dengan enzim yang lebih baik juga, sehingga akan meningkatkan pemakaian berulang enzim (Zdarta *et al.*, 2018).

Silika diketahui dapat digunakan sebagai matriks imobilisasi karena bersifat tidak larut ke dalam air. Silika juga memiliki stabilitas kimia dan termal yang tinggi, luas permukaan partikel yang besar, ketersediaannya melimpah baik di alam maupun sintesis dan harga ekonomis (Anastasescu *et al.*, 2020). SiO₂ digunakan sebagai matriks untuk imobilisasi enzim laccase, sehingga mampu digunakan berulang sebanyak 10 kali aktivitas sisa sebesar 82,6% (Patel *et al.*, 2014). Selain material anorganik, material organik juga dapat digunakan seperti kitosan. Kitosan memiliki harga ekonomis, tidak larut dalam air, tidak beracun, dan mudah terurai ke lingkungan. Kitosan juga memiliki sifat biokompatibel dengan enzim karena terdapat gugus amino yang dapat terikat secara kovalen ke enzim. Berdasarkan penelitian Yandri *et al.* (2018), imobilisasi enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 menggunakan kitosan mampu digunakan berulang selama enam kali dengan aktivitas sisa sebesar 16%.

Silika memiliki kemampuan yang baik dalam meningkatkan kestabilan enzim, sedangkan kitosan memiliki biokompatibilitas yang baik dengan enzim. Belum ada penelitian yang menggabungkan kedua material tersebut sebagai matriks untuk proses imobilisasi enzim α -amilase. Gabungan kedua material tersebut telah mampu dibuat dalam bentuk gel yang disebut sebagai hibrida SiO₂-kitosan (Yang *et al.*, 2004). Hibrida SiO₂-kitosan memiliki luas permukaan yang lebih besar dan

daya adsorpsi yang lebih baik. (Yang *et al.*, 2004). Dalam penelitian ini, diharapkan hibrida Silika gel-kitosan mampu meningkatkan stabilitas enzim amilase dan pemakaian berulang. Pada penelitian ini akan dibandingkan penggunaan kitosan sebagai material organik, silika gel 60 sebagai material anorganik, dan hibrida kitosan-silika sebagai matriks pendukung dalam proses imobilisasi enzim α -amilase dari *Aspergillus fumigatus*.

1.2. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah ;

1. Memperoleh enzim α -amilase dari *A. fumigatus* dengan aktivitas unit dan tingkat kemurnian yang tinggi dibandingkan ekstrak kasar enzim.
2. Memperoleh enzim α -amilase hasil imobilisasi yang dapat digunakan berulang dan memiliki kestabilan lebih tinggi dibandingkan enzim hasil pemurnian.
3. Menentukan matriks pengamobil paling baik antara kitosan, silika, dan hibrida kitosan-silika terhadap peningkatan kestabilan enzim α -amilase dari *A. fumigatus*.

1.3. Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari hasil penelitian ini adalah ;

1. Memperoleh enzim α -amilase dari *A. fumigatus* dengan kestabilan yang tinggi dan dapat digunakan berulang sebagai upaya meminimalisasi biaya pengeluaran enzim dalam industri.
2. Memberikan informasi tentang nilai aktivitas, suhu optimum, K_M , V_{maks} , k_i , $t_{1/2}$, dan ΔG_i enzim α -amilase dari *A. fumigatus* hasil pemurnian dan hasil imobilisasi sebagai literatur penelitian selanjutnya.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Enzim

Di dalam makhluk hidup, setidaknya terdapat triliunan reaksi kimia untuk melangsungkan proses metabolisme. Enzim sebagai biokatalisator merupakan golongan protein yang dihasilkan oleh makhluk hidup untuk mempercepat reaksi biokimia di dalam tubuh. Mekanisme katalitik perubahan substrat menjadi produk dengan cara menurunkan energi aktivasi (E_a) sehingga menghasilkan keadaan transisi yang lebih rendah (Lewis and Stone, 2023). Aktivitas katalitik enzim dapat dilihat dari banyaknya jumlah substrat yang dapat diubah menjadi produk oleh satu molekul enzim dalam satuan waktu.

Salah satu ciri khas enzim adalah bekerja pada substrat yang spesifik. Substrat akan terikat pada enzim di daerah tertentu pada struktur makromolekul enzim. Daerah tersebut disebut sebagai sisi aktif enzim. Sisi aktif enzim disusun oleh residu-residu asam amino yang mengikat substrat melalui ikatan hidrogen, interaksi kovalen, dan ikatan van der Waals untuk membentuk kompleks enzim-substrat. Sisi aktif enzim dapat ditemui dalam bentuk struktur tiga dimensi (struktur tersier dan kuaterner). Struktur tersier terbentuk akibat interaksi antara rantai-rantai samping asam amino pada satu rantai polipeptida sehingga terjadi pelipatan pada struktur sekundernya (α -helix, β -pleated sheet, maupun *random coil*). Pelipatan struktur protein disebabkan oleh interaksi-interaksi non-kovalen seperti ikatan hidrogen antar peptida, ikatan hidrogen rantai samping, ikatan van der Waals, dan ikatan disulfida. Pada struktur kuaterner, terjadi konformasi yang lebih kompleks akibat gabungan dari beberapa rantai polipeptida.

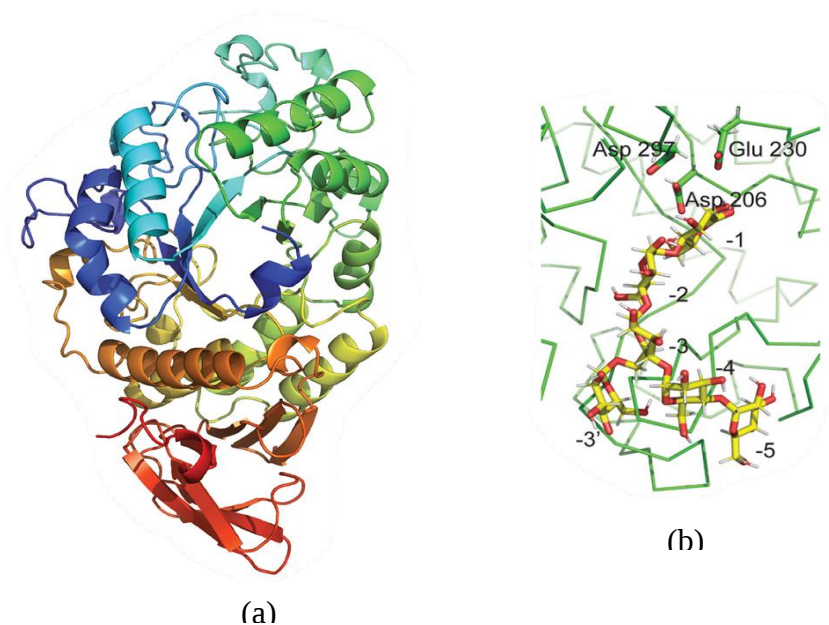
Struktur kuartener suatu enzim akan mempengaruhi sisi aktif enzim dan aktivitas katalitiknya. Enzim menghasilkan aktivitas katalitik secara maksimal pada suhu dan pH optimum. Jika diinkubasi pada suhu optimum, sisi aktif enzim akan lebih terbuka sehingga interaksi dengan substrat akan semakin baik. Suhu optimum juga akan membantu mencapai energi aktivasi enzim sehingga mampu menjalani reaksi katalitik. Pada suhu yang terlalu tinggi akan mengganggu ikatan hidrogen dan ikatan non kovalen yang menstabilkan konformasi enzim. Perubahan konformasi enzim akan mengganggu sisi aktif sehingga mengakibatkan menurunnya aktivitas katalitik sampai kehilangan kemampuan katalitiknya. Namun, jika suhu terlalu rendah, aktivitas katalitik enzim akan rendah karena tidak cukup energi untuk mencapai keadaan transisi kompleks enzim substrat. Hal ini disebabkan karena sisi aktif enzim cenderung menutup dari masuknya substrat. Selain itu, pH yang terlalu asam atau basa akan menyebabkan terputusnya ikatan non-kovalen pada struktur tiga dimensi sehingga mengubah sisi aktif enzim menjadi sulit untuk mengikat substrat (Robinson, 2015).

Konsentrasi substrat juga berpengaruh pada aktivitas katalitik enzim. Pada konsentrasi substrat yang rendah, aktivitas katalitik enzim meningkat tajam seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat. Hal ini disebabkan karena sisi aktif enzim masih kosong, sehingga laju perubahan substrat menjadi produk sangat dipengaruhi oleh konsentrasi substrat. Namun, dengan meningkatnya konsentrasi substrat, sisi aktif enzim akan penuh sehingga menjadi jenuh terhadap substrat. Kecepatan pembentukan produk sekarang bergantung pada aktivitas enzim itu sendiri, dan penambahan lebih banyak substrat tidak akan mempengaruhi laju reaksi secara signifikan. Laju reaksi ketika enzim jenuh dengan substrat adalah laju reaksi maksimum, V_{maks} . Hubungan antara laju reaksi dan konsentrasi substrat bergantung pada afinitas enzim terhadap substratnya yang biasanya dinyatakan sebagai K_M (konstanta Michaelis) (Robinson, 2015).

2.2. Enzim α -Amilase

Amilase adalah enzim yang digunakan untuk memecah karbohidrat kompleks yang memiliki ikatan α -1,4 glikosidik atau α -1,6 glikosidik menjadi karbohidrat yang lebih sederhana. Amilase dibedakan menjadi tiga berdasarkan hasil hidrolisis dan letak ikatan yang dipecah, yaitu alfa-amilase, beta-amilase, dan glukamilase. Enzim α -amilase (E.C. 3.2.1.1 α -1,4-glukan-4-glukanohidrolase) adalah enzim yang berperan memecah ikatan α -1,4 glikosidik pada pati menghasilkan dekstrin, maltosa, glukosa, dan oligosakarida bercabang. α -amilase merupakan enzim yang paling banyak digunakan di industri karena reaksinya acak sehingga mampu mengubah substrat menjadi lebih cepat.

Gambar 1(a) menunjukkan struktur tiga dimensi dari enzim α -amilase yang berasal dari *Aspergillus oryzae* yang terdiri dari 478 residu asam amino. Pusat aktif dari enzim α -amilase yang berasal dari *Aspergillus oryzae* ditunjukkan pada Gambar 1(b), yang ditandai dengan adanya tiga residu asam amino yang mengandung gugus fungsi karboksil (triad katalitik), yaitu: Asp206, Asp297, dan Glu230 (Gee *et al.*, 2021).



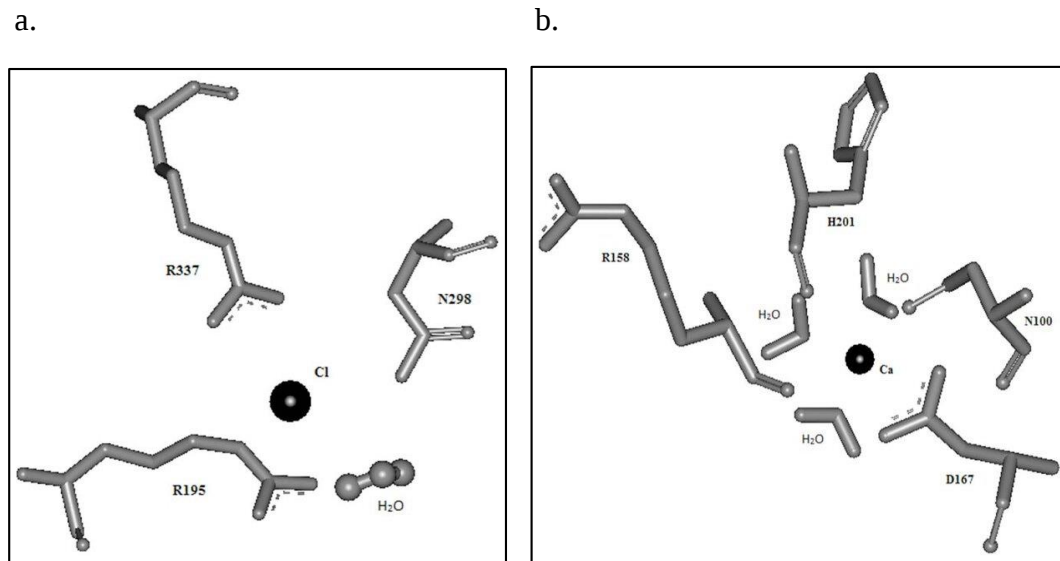
Gambar 1. Enzim α -amilase yang berasal dari *Aspergillus oryzae*:
(a) Struktur tiga dimensi dan (b) Pusat aktif (Gee *et al.*, 2021).

Sebagian α -amilase menunjukkan sifat termostabil dan halotoleran sehingga dapat digunakan dalam industri yang membutuhkan stabilitas pada suhu tinggi dan adanya kehadiran garam (Far *et al.*, 2020). Enzim α -amilase memiliki tiga bagian pada struktur 3 dimensi yang ditunjukkan pada Gambar 2. Tiga bagian tersebut adalah domain A, domain B, dan domain C (Singh *and* Guruprasad, 2014). Ion Ca^{2+} terikat di antara struktur tiga dimensi domain A dan domain B, sehingga mampu menstabilkan struktur tiga dimensi enzim.



Gambar 2. Struktur tiga dimensi α -amilase yang terdiri dari tiga domain (Singh *and* Guruprasad, 2014).

Beberapa bakteri penghasil α -amilase juga mengandung ion Zn^{2+} sebagai kofaktor. Seperti yang ditunjukkan Gambar 3, ion klorida terikat di sekitar sisi aktif dan dapat berfungsi sebagai aktivator katalisis alosterik (Aghajari *et al.*, 2002). Ion Cl^- berikatan koordinasi dengan rantai samping Arg 195, Asn 298, dan Arg 337, bersama dengan molekul air. Dua ligan ion klorida yang diamati (Arg 195 dan Asn 298) berdekatan dengan sisi aktif enzim yaitu Asp 197 dan Asp 300 (Singh *and* Guruprasad, 2014).

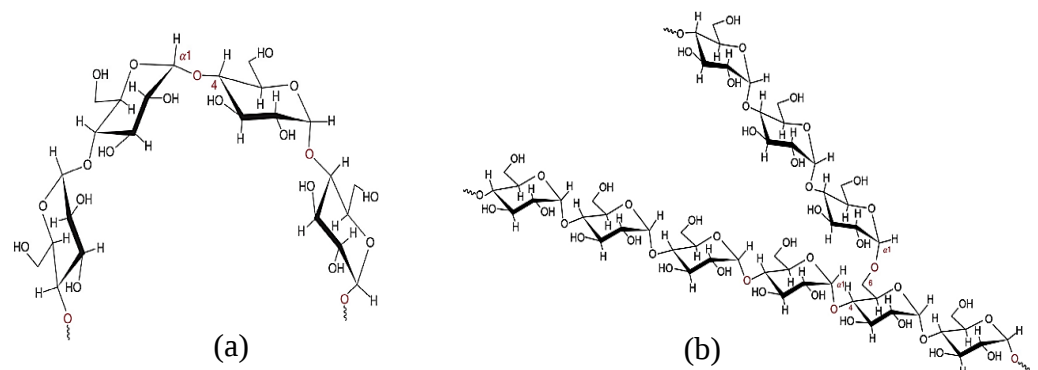


Gambar 3. Interaksi ion (a) Cl^- dan (b) ion Ca^{2+} terhadap rantai samping residu asam amino α -amilase (Singh and Guruprasad, 2014).

2.3. Reaksi Hidrolisis Pati secara Enzimatik

Pati merupakan polisakarida yang dihasilkan oleh tumbuhan untuk menyimpan kelebihan glukosa (sebagai produk fotosintesis) dalam jangka panjang. Pati dapat diisolasi dari berbagai jenis tumbuhan seperti umbi-umbian, jagung, kentang, gandum, dan beras. Pati yang terdapat di dalam tumbuhan tersusun atas dua jenis polimer alam yaitu amilosa dan amilopektin. Selain itu, pati juga mengandung air, abu, protein, dan lemak dalam jumlah sedikit.

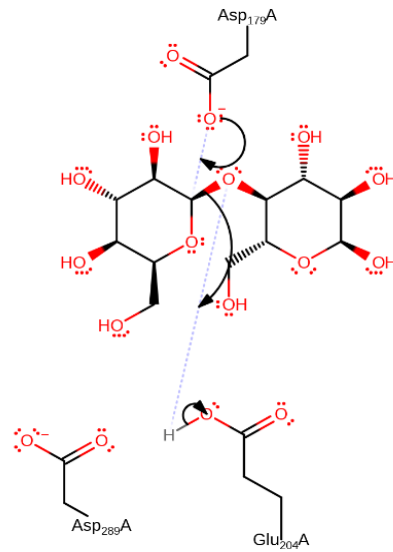
Amilopektin merupakan polimer yang tersusun atas monomer yang terikat melalui ikatan glikosidik α -1,4 dan ikatan glikosidik α -1,6. Rantai lurus amilopektin terdiri atas ikatan glikosidik α -1, 4 sedangkan percabangannya dibentuk oleh ikatan glikosidik α -1,6. Amilosa disusun oleh monomer-monomer glukosa membentuk ikatan glikosidik α -1,4. Amilosa hanya membentuk rantai lurus tanpa adanya percabangan seperti pada struktur amilopektin. Struktur amilosa dan amilopektin pada pati ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Struktur ; (a). amilosa, (b). amilopektin (Bergthaller *and* Hollmann, 2014).

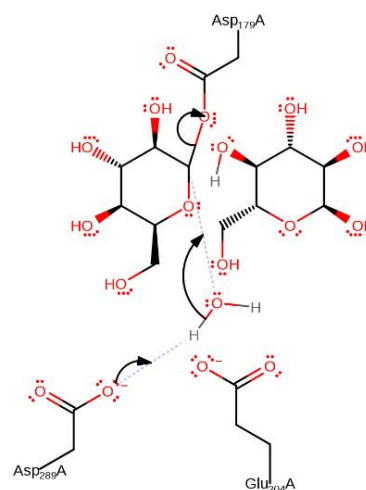
Secara garis besar, residu-residu asam amino yang berperan dalam reaksi katalitik enzim dengan substrat terdiri dari dua residu asam aspartat dan satu residu asam glutamat. Mekanisme katalitik reaksi hidrolisis substrat pati oleh enzim α -amilase berlangsung dalam tiga tahap, yaitu pembentukan zat intermediet, hidrolisis zat intermediet, dan deglikosilasi. Ketiga mekanisme tersebut dapat dilihat pada gambar 5,6, dan 7.

Gambar 5. Merupakan tahap pertama dalam proses hidrolisis pati oleh enzim α -amilase. Mekanisme reaksi dimulai dengan pengikatan substrat oleh sisi aktif enzim. Pengikatan ini melibatkan pembentukan ikatan hidrogen antara atom O dari salah satu residu asam aspartat dengan atom H dari gugus hidroksil ($-\text{OH}$). Ikatan hidrogen ini akan mengganggu kestabilan substrat sehingga memudahkan proses hidrolisis. Residu asam glutamat akan memprotonasi atom O pada ikatan glikosidik. (Rydberg *et al.*, 2002).



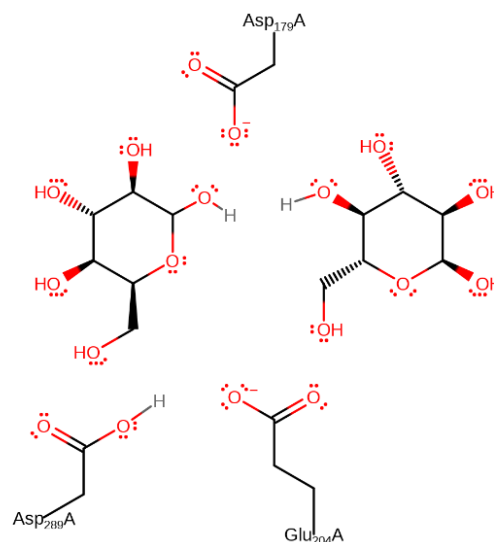
Gambar 5. Tahap pembentukan intermediet pada hidrolisis pati oleh α -amilase (Rydberg *et al.*, 2002).

Tahap selanjutnya ditunjukkan pada Gambar 6. Zat intermediet glikosil mengalami hidrolisis yang dikatalisis oleh Glu204 dan Asp289 pada suasana basa melalui serangan nukleofilik (S_N2) di pusat anomer. Rantai samping Glu 204 dan Asp 289 mendeponasi air, mengaktifkannya menuju serangan nukleofilik. Residu ini juga membentuk ikatan hidrogen pada molekul. Hal ini menyebabkan keadaan transisi seperti ion oksokarbenium, yang membentuk produk deglikosilasi (Rydberg *et al.*, 2002).



Gambar 6. Proses hidrolisis zat intermediet oleh Glu204 dan Asp289 (Rydberg *et al.*, 2002).

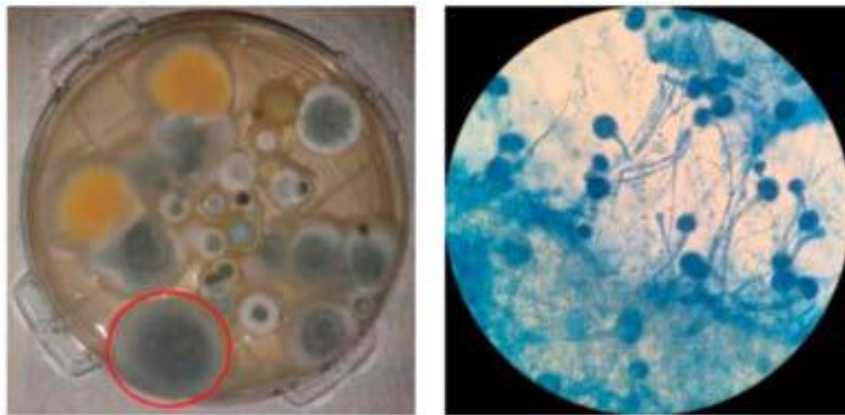
Pada tahap hidrolisis, terjadi pemutusan ikatan glikosidik yang telah terprotonasi. Hal ini menyebabkan keadaan transisi seperti ion oksokarbenium, yang selanjutnya membentuk produk deglikosilasi. Molekul air hasil hidrolisis selanjutnya memasuki sisi aktif enzim. Atom H dari molekul air diserang oleh oksigen dari ion glutamat sehingga glutamat kembali berada dalam bentuk asam, dan proses terulang kembali. Mekanisme reaksi tahap akhir hidrolisis pati oleh α -amilase dapat dilihat pada Gambar 7 (Rydberg *et al.*, 2002).



Gambar 7. Tahap akhir hidrolisis pati oleh enzim α -amilase (Rydberg *et al.*, 2002).

2.4. *A. fumigatus*

A. fumigatus merupakan golongan kapang saprofit yang tidak memiliki klorofil dan mendapatkan makanan dari benda mati. Sebagai pendaur ulang yang efisien di alam, *A. fumigatus* memiliki metabolisme untuk kebutuhan nutrisinya dalam kondisi lingkungan yang berbeda. *A. fumigatus* dapat diisolasi dari berbagai macam substrat. Kehadiran banyak glikosilhidrolase dan sekelompok proteinase ekstraseluler dalam genom *A. fumigatus* membuktikan kemampuan jamur untuk tumbuh melalui degradasi polisakarida dari dinding sel tanaman dan memperoleh sumber nitrogen yang tersedia melalui degradasi substrat berprotein. Gambar 8 memperlihatkan *A. fumigatus* dalam penelitian Gonçalves *et al.* (2020).



Gambar 8. *A. fumigatus* (Gonçalves *et al.*, 2020).

Isolat *A. fumigatus* memberikan warna hijau pada koloninya (Ratnasri *et al.* 2018). *A. fumigatus* tumbuh optimal pada suhu 37°C dengan rentang pH 3,7 hingga 7,6. Walaupun demikian, *A. fumigatus* dapat diisolasi pada berbagai jenis vegetasi yang membusuk dan tanah yang memiliki suhu antara 12 hingga 65°C dan pH berkisar antara 2,1–8,8. Ion-ion seperti Ca^{2+} , Zn^{2+} , dan Fe^{2+} membantu dalam proses pertumbuhannya. Selain itu, jamur ini membutuhkan oksigen untuk hidup (Veerdonk *et al.*, 2017). *A. fumigatus* dapat diisolasi dari tanah lalu dibiakkan pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) yang mengandung pati 0,5 % kemudian diinkubasi selama 120 jam (Nwagu and Okolo, 2011).

A. fumigatus memiliki potensi sebagai sumber enzim komersial karena mampu tumbuh cepat, mudah dikultur, tersebar luas di lingkungan alami, menghasilkan jumlah enzim yang besar dalam waktu singkat, tidak terpengaruh oleh musim, memiliki kondisi reaksi optimal yang dapat diatur dengan mudah, dan mudah diinaktivasi setelah penggunaan (Brahmachari *et al.*, 2017). *A. fumigatus* diketahui dapat menghasilkan enzim amilase menggunakan metode *Sub-merged Fermentation* (SmF) dengan substrat α -metil-D-glikosida (Ahmed *et al.*, 2015). Kondisi optimum produksi enzim amilase oleh *A. fumigatus* adalah pada pH 6,0 dan suhu 30°C (Ahmed *et al.*, 2015). Pada penelitian lain, enzim amilase dari *A. fumigatus* dihasilkan pada pH optimum 6,0 selama 96 jam dalam media berisi pati 1 % dan nitrogen organik 1,5 % (Nwagu and Okolo, 2011).

2.5. Produksi Enzim dengan Metode Fermentasi

Enzim dapat dihasilkan melalui beberapa cara yaitu melalui ekstraksi dari tanaman atau hewan dan melalui produksi oleh mikroba seperti jamur atau mikroba. Metode ekstraksi menggunakan tanaman dan hewan dirasa kurang efektif karena hanya menghasilkan sedikit enzim dan tidak kontinu. Produksi enzim menggunakan mikroba merupakan salah satu metode yang efektif karena mampu menghasilkan enzim secara kontinu dan dalam jumlah banyak. Selain itu, mikroorganisme dianggap memiliki nilai ekonomis, karena dapat menghasilkan enzim dalam waktu singkat dan mudah mengatur kondisi reaksi seperti pH dan temperatur. Jenis mikroba yang sering digunakan untuk memproduksi enzim adalah jamur dan bakteri. α -amilase dari jamur mempunyai kelebihan di antaranya memiliki sifat yang lebih stabil jika dibandingkan dengan α -amilase dari bakteri.

Salah satu cara untuk menghasilkan enzim dari mikroba adalah menggunakan metode fermentasi. Terdapat tiga jenis kultur mikroba untuk melakukan proses fermentasi di antaranya kultur permukaan/*surface fermentation*, kultur terendam/*submerged fermentation* (SmF), dan kultur padat/*solid state fermentation*. Metode SmF lebih umum digunakan dalam skala komersil karena mudah mengatur suhu, pH, dan aerasi (Far *et al.*, 2020).

Menurut penelitian Deb *et al.* (2013) yang mempelajari kandungan nutrisi dalam produksi enzim α -amilase dari *B. amyloliquefaciens* P-1, sumber nitrogen dapat diperoleh dari kasein, *beef extract*, *yeast extract*, gelatin, pepton, tripton, NH_4NO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, dan urea ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$). Induser yang dapat digunakan untuk produksi enzim α -amilase dapat diperoleh dari *starch soluble*, tepung jagung, tepung beras, dan tepung gandum. Kondisi optimum yang menghasilkan aktivitas enzim tertinggi menggunakan induser tepung jagung dengan sumber nitrogen berasal dari tripton dan NH_4NO_3 . Penggunaan Ion Ca^{2+} , Mg^{2+} , dan Fe^{2+} dari CaCl_2 dan MgSO_4 membantu dalam meningkatkan aktivitas enzim (Deb *et al.*, 2013). pH optimum dalam memproduksi enzim α -amilase menggunakan media fermentasi adalah 6,5 (Deb *et al.*, 2013). Dalam produksi enzim digunakan larutan penyangga untuk mempertahankan kestabilan pH larutan

meskipun ditambahkan sedikit asam atau basa. Buffer merupakan campuran dari asam lemah dengan basa konjugasinya ataupun basa lemah dengan asam konjugasinya.

2.6. Isolasi Enzim dengan Metode Sentrifugasi

Enzim α -amilase adalah enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh mikroba seperti bakteri maupun jamur (Souza *and* Magalhães, 2010). Enzim ekstraseluler merupakan enzim yang diproduksi di dalam sel, lalu disekresikan ke luar sel untuk melakukan aktivitas enzimatik (Brahmachari *et al.*, 2017). Hal tersebut membuat enzim ekstraseluler mudah diisolasi dan dipisahkan dari pengotor lain dengan metode sentrifugasi (Battisti *et al.*, 2024). Isolasi enzim dengan metode sentrifugasi dilakukan untuk memisahkan enzim dari makromolekul lain seperti asam nukleat, karbohidrat, dan protein (Okafor *and* Okeke, 2018).

Sentrifugasi merupakan salah satu metode yang digunakan untuk memisahkan partikel berdasarkan berat jenis molekul dengan cara memberikan gaya sentrifugal relatif. Partikel yang memiliki berat jenis lebih berat akan berada di dasar, sedangkan partikel yang lebih ringan akan berada di atas. Prinsip ini yang digunakan untuk memisahkan enzim dari sel pengotor lainnya. Sentrifugasi akan menghasilkan filtrat atau supernatan jernih yang merupakan ekstrak enzim kasar dan endapan di bawah yang merupakan pengotor (sisa-sisa sel mikroba). Sel-sel mikroba umumnya mengalami sedimentasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit (Battisti *et al.*, 2024). Proses sentrifugasi dilakukan pada suhu dingin sekitar 2–4 °C agar enzim tidak mengalami denaturasi akibat panas yang dihasilkan dari proses sentrifugasi (Rahmadina, 2017).

2.7. Pemurnian Enzim

2.7.1 Fraksinasi dengan Amonium Sulfat

Fraksinasi merupakan proses pemurnian enzim dengan cara menambahkan garam-garam elektrolit seperti ammonium sulfat, natrium klorida, atau natrium sulfat agar protein (enzim) mengendap. Proses pengendapan enzim akibat kelarutan yang semakin menurun dengan penambahan larutan elektrolit disebut *salting out* (Duong-Ly and Gabelli, 2014). Pada penambahan awal larutan elektrolit, enzim akan memiliki kelarutan yang semakin besar di dalam air (*salting in*). Namun, saat konsentrasi garam semakin besar maka kelarutan enzim dalam air menjadi lebih rendah. Hal ini disebabkan oleh kemampuan ion garam yang mampu berikatan kuat dengan air sehingga molekul enzim kurang terhidrasi dan mengalami pengendapan.

Dengan proses fraksinasi, enzim akan mengalami peningkatan kemurnian setelah diendapkan. Penelitian yang dilakukan oleh Ahmed *et al.* (2020), aktivitas unit α -amilase dari *A. terreus* mengalami peningkatan setelah dilakukan fraksinasi. Aktivitas unit enzim α -amilase sebelum difraksinasi adalah 349 U/mL sedangkan setelah difraksinasi menjadi 1246 U/mL. Pada penelitian Xian, *et al.* (2015), hasil pemurnian α -amilase dari *Talaromyces pinophilus* 1-95 melalui fraksinasi diperoleh peningkatan aktivitas spesifik dari 2,7 U/mg menjadi 4,78 U/mg.

2.7.2 Dialisis

Setelah fraksinasi, dilakukan proses dialisis untuk meningkatkan kemurnian enzim. Dialisis adalah proses difusi molekul-molekul yang mampu melewati pori-pori pada membran semipermeabel karena adanya perbedaan tekanan osmotik. Membran semipermeabel yang digunakan pada proses pemurnian enzim adalah kantong selofan. Kantong selofan memiliki ukuran pori-pori yang lebih kecil dibandingkan dengan ukuran molekul protein sehingga enzim (protein) akan tertahan di dalamnya dan molekul yang lebih kecil akan terlewati. Kantong selofan merupakan membran transparan dari selulosa termodifikasi yang mengandung sejumlah senyawa kecil seperti sulfur, ion logam, dan beberapa enzim. Proses dialisis akan berlangsung saat terjadi difusi dari lingkungan yang

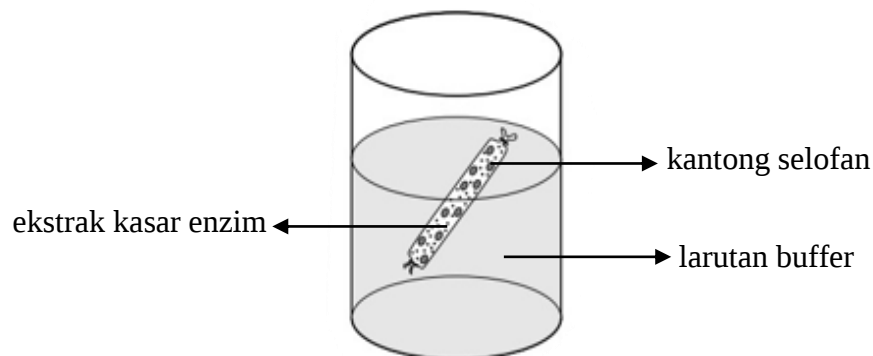
memiliki tekanan osmotik tinggi menuju tekanan osmotik yang lebih rendah (Virgen-Ortíz *et al.*, 2012).

Hasil fraksinasi merupakan campuran ekstrak enzim dan garam garam elektrolit. Larutan enzim hasil fraksinasi memiliki tekanan osmotik lebih tinggi daripada larutan buffer yang merendam kantong selofan. Hal ini akan menyebabkan ion-ion garam akan ke luar dari membran menuju konsentrasinya yang lebih rendah, sedangkan ion H^+ dari buffer bertukar masuk ke dalam membran. Enzim akan tertahan di dalam kantong selofan karena ukuran molekulnya lebih besar daripada pori-pori membran. Pada proses dialisis perlu pergantian larutan buffer secara berkala. Hal ini disebabkan karena tekanan osmosis akan setimbang sehingga ion-ion garam tidak akan berdifusi ke luar kantong selofan. Proses dialisis perlu dilakukan dalam suhu 2-4 °C untuk mencegah terjadinya denaturasi enzim (Virgen-Ortíz *et al.*, 2012).

Untuk mencapai keseimbangan osmotik, diperlukan percepatan dalam pergerakan molekul (Virgen-Ortíz *et al.*, 2012) dengan menggunakan metode berikut:

1. Penggantian secara berkala dari larutan buffer yang memiliki konsentrasi rendah.
2. Memperbesar luas permukaan membran, seperti dengan memperpanjang ukuran kantong selofan.
3. Pengadukan larutan buffer menggunakan pengaduk magnetik dan dilakukan secara terus-menerus.

Proses pemurnian enzim dengan menggunakan metode dialisis ditunjukkan pada Gambar 9. Pada Gambar 9, proses dialisis terdiri dari kantong selofan yang diisi oleh ekstrak enzim dan larutan buffer. Larutan buffer yang biasa digunakan untuk proses dialisis enzim adalah buffer fosfat.



Gambar 9. Pemurnian enzim dengan metode dialisis.

Pada proses dialisis ekstrak enzim hasil fraksinasi, kantong selofan dicuci dengan akuades, kemudian salah satu ujungnya diikat dengan benang. Kantong selofan diisi dengan bahan yang akan dialisis (enzim hasil fraksinasi). Kemudian ujung yang satunya diikat pada statif. Dialisis lebih baik dilakukan menggunakan kantong selofan yang baru. Apabila sudah basah, kantong akan mudah mengalami kontaminasi dengan mikroorganisme. Jika harus disimpan, maka kantong selofan disimpan dalam larutan yang mengandung asam benzoat pada suhu dingin.

Pada penelitian Ahmed *et al.* (2020) diketahui bahwa aktivitas enzim α -amilase *A. terreus* hasil dialisis memiliki nilai yang lebih tinggi dibandingkan enzim hasil fraksinasi. Hasil dialisis enzim α -amilase menghasilkan aktivitas unit sebesar 2411 U/mL, sedangkan enzim hasil fraksinasi memiliki aktivitas unit sebesar 349 U/mL.

2.8. Penentuan Aktivitas Enzim dan Kadar Protein

Aktivitas katalitik enzim dapat dinyatakan sebagai unit aktivitas enzim dan aktivitas spesifik. Unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah mL enzim yang dapat menyebabkan perubahan 1 μ mol substrat per satuan waktu (menit) sedangkan aktivitas spesifik enzim adalah unit aktivitas enzim per miligram protein. Aktivitas spesifik enzim juga dapat menyatakan kemurnian ekstrak enzim yang diperoleh. Semakin tinggi nilai aktivitas spesifik, maka semakin murni

enzim tersebut. Unit aktivitas enzim dan kadar protein dapat dihitung menggunakan pengukuran spektrofotometer UV-Vis. Penentuan aktivitas unit enzim dapat melalui dua metode, yaitu metode Fuwa berdasarkan berkurangnya substrat dan metode Mandels berdasarkan terbentuknya produk. Penentuan kadar protein untuk menghitung aktivitas spesifik enzim dapat menggunakan metode Lowry (Yandri *et al.*, 2018).

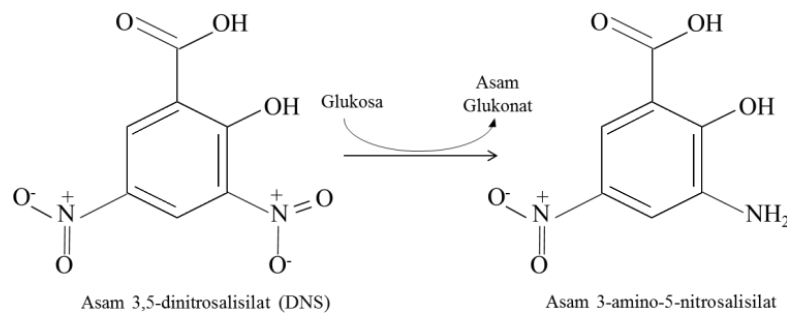
2.8.1 Metode Fuwa

Metode Fuwa adalah metode yang dapat mengukur aktivitas unit enzim berdasarkan berkurangnya substrat pati yang terhidrolisis. Pati yang terhidrolisis adalah pati awal (kontrol) dikurangi oleh pati sisa setelah penambahan enzim. Pada metode Fuwa, substrat pati akan bereaksi dengan iodine membentuk kompleks heliks iodine-pati yang berwarna biru. Warna biru tersebut akan menyerap cahaya monokromatis pada λ_{maks} 580 nm (Xiao *et al.*, 2007). Reaksi enzimatis α -amilase akan mengubah warna larutan menjadi kuning karena pati mengalami hidrolisis sehingga tidak terbentuk kompleks pati-iodine berwarna biru. Pengujian berkurangnya warna biru pada larutan substrat pati-iodine dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Semakin kecil absorbansi pada panjang gelombang 600 nm, maka sisa pati semakin sedikit akibat proses hidrolisis oleh α -amilase. Artinya banyaknya pati yang berhasil dihidrolisis oleh enzim α -amilase sebanding dengan aktivitas unit enzim α -amilase. Pada larutan kontrol, enzim diinaktivasi oleh HCl sehingga substrat pati bereaksi dengan pereaksi iodine (I_2) dan tidak bereaksi dengan enzim.

2.8.2 Metode Mandels

Metode Mandels adalah metode yang dapat mengukur aktivitas enzim α -amilase berdasarkan terbentuknya gula pereduksi dari hasil hidrolisis pati. Prinsip metode Mandels adalah oksidasi gula pereduksi (glukosa) oleh asam 2-hidroksi-3,5-dinitrosalisilat (DNS). Perubahan warna yang terjadi adalah dari kuning (Larutan DNS) menjadi jingga kemerahan. Larutan tersebut memberikan warna jingga kemerahan yang menyerap pada panjang gelombang 510 nm (Eveleigh *et al.*,

2009). DNS akan mengalami reduksi pada gugus nitro menjadi gugus amina menghasilkan senyawa asam 2-hidroksi-3-amino-5-nitrosalisilat (Saqib *and* Whitney, 2011), sedangkan glukosa akan mengalami oksidasi menjadi asam glukonat (Saqib *and* Whitney, 2011) seperti ditunjukkan pada Gambar 10. Reaksi tersebut dapat berlangsung pada suasana basa dengan suhu 90-100 °C.



Gambar 10. Reaksi reduksi DNS menjadi asam 2-hidroksi-3-amino-5-nitrosalisilat.

2.8.3. Metode Lowry

Metode Lowry digunakan untuk mengukur kadar protein di dalam sampel. Penentuan kadar protein bertujuan untuk mengetahui bahwa enzim (protein) masih terkandung dalam sampel ekstrak. Pada metode Lowry, ion Cu^{2+} bereaksi dengan ikatan peptida pada enzim membentuk kompleks dengan protein. Kompleks protein- Cu^{2+} akan mengalami reduksi menjadi protein- Cu^{+} pada kondisi basa. Kemudian, kompleks Cu^{+} -protein bereaksi dengan reagen *folin-ciocalteu's phenol* membentuk senyawa kompleks berwarna. Protein akan mereduksi reagen tersebut membentuk senyawa heteromolibdenum berwarna hijau-kebiruan yang menyerap panjang gelombang 750 nm. Penentuan kadar protein didasarkan pada kurva standar BSA karena BSA mengandung tirosin dan triptofan yang hampir dimiliki oleh semua protein (Ma *et al.*, 2006).

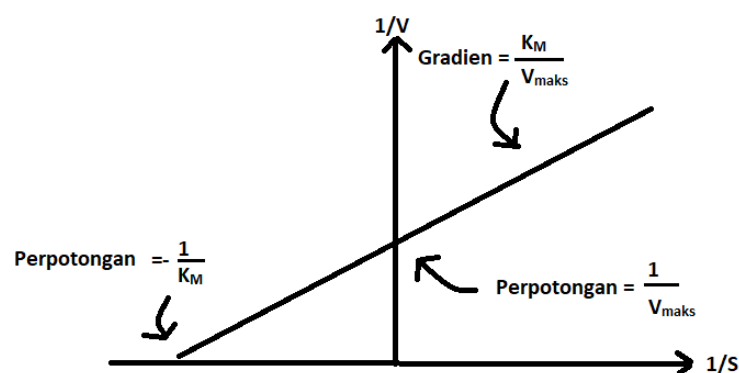
2.9. Kinetika Reaksi Enzim

Menurut Michaelis-Menten, perhitungan kinetika reaksi enzimatis dapat dilakukan melalui kesetimbangan antara enzim dengan substrat. Dua parameter yang digunakan menurut Michaelis-Menten adalah K_M dan V_{maks} . Konstanta Michaelis-Menten (K_M) melambangkan afinitas enzim terhadap substrat sedangkan V_{maks} merupakan laju reaksi maksimum saat seluruh enzim terikat pada substrat membentuk kompleks enzim-substrat. persamaan Lineweaver-Burk merupakan bentuk lain dari persamaan Michaelis-Menten. Ketika persamaan Lineweaver-Burk diubah menjadi bentuk linear regresi, diperoleh persamaan 1 sebagai berikut :

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

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

Nilai K_M sama dengan $\frac{1}{2} V_{maks}$ saat konsentrasi substrat setengah dari lokasi aktifnya telah terisi (Robinson, 2015). Nilai K_M dan V_{maks} dihitung dengan mengukur aktivitas unit enzim pada berbagai konsentrasi substrat yang diplotkan ke dalam grafik Lineweaver-Burk seperti Gambar 11.



Gambar 11. Grafik Lineweaver-Burk.

Nilai K_M yang tinggi menunjukkan afinitas terhadap substrat yang rendah.

Semakin kecil nilai K_M semakin tinggi afinitasnya terhadap substrat, sehingga semakin rendah konsentrasi substrat yang diperlukan untuk mencapai kecepatan maksimum (V_{maks}). Imobilisasi enzim dapat meningkatkan maupun menurunkan nilai K_M enzim. Molekul enzim amobil tidak dapat bergerak bebas dan bereaksi dengan molekul substrat karena terjebak oleh matriks pengamobil. Adapun interaksi elektrostatis antara substrat dan matriks pengamobil dapat menyebabkan penurunan nilai K_M (Robinson, 2015). Perbandingan nilai K_M dan V_{maks} enzim dari beberapa penelitian ditunjukkan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Perbandingan nilai K_M dan V_{maks} enzim pada berbagai penelitian

Jenis Enzim dan Matriks	K_M enzim murni	K_M enzim imobil	V_{maks} enzim murni	V_{maks} enzim imobil	Referensi
α -amilase dan hibrida bentonit-kitosan	43,56 g L ⁻¹	46,10 g L ⁻¹	20,58 U/mg	28,17 U/mg	(Baysal <i>et al.</i> , 2014)
α -amilase dan bentonit	6,18 mg mL ⁻¹	12,19 mg mL ⁻¹	909,09 μ mol mL ⁻¹ menit ⁻¹	88,5 mol mL ⁻¹ menit ⁻¹	(Yandri <i>et al.</i> , 2018)
β -glukosidase dan kitin termostabil	2,70 mM	3,31 mM	31,06 U/menit	26,67 U/menit	(Alnadari <i>et al.</i> , 2020)
α -amilase dan hibrida bentonit-kitin	3,04 mg mL ⁻¹	11,57 mg mL ⁻¹	10,90 μ mol mL ⁻¹ menit ⁻¹	3,37 μ mol mL ⁻¹ menit ⁻¹	(Tiarsa <i>et al.</i> , 2022)

2.10. Kestabilan Enzim

Kestabilan enzim merupakan ketahanan enzim baik dari aktivitas dan strukturnya terhadap pengaruh kondisi fisiologis seperti suhu dan pH selama proses penggunaan dan penyimpanan. Kestabilan enzim dapat dipengaruhi oleh distribusi residu asam amino, interaksi hidrofobik, dan ikatan hidrogen. Distribusi residu asam amino penyusun sisi aktif enzim dan interaksinya dalam struktur protein juga akan menunjang kestabilan termal enzim. Enzim akan lebih stabil jika memiliki banyak residu asam amino yang bersifat hidrofobik pada bagian dalam (Yandri dan Suhartati, 2018). Interaksi hidrofobik akan menstabilkan enzim dengan menghasilkan energi saat proses pelipatan enzim (*folding*). Pelipatan pada

struktur tersier enzim akan melindungi sisi aktif enzim dari molekul air. Ikatan hidrogen mampu menjaga kestabilan enzim melalui donor dan akseptor hidrogen sehingga mempertahankan struktur tiga dimensi enzim (Pace *et al.*, 2014).

Kestabilan enzim dapat dilihat dari penentuan kestabilan termal, waktu paruh ($t_{1/2}$), perubahan energi bebas akibat denaturasi (ΔG_i), dan konstanta laju inaktivasi (k_i) (Saqib and Siddiqui, 2018).

2.10.1. Kestabilan Termal

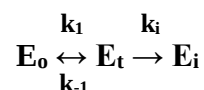
Kestabilan termal enzim dapat ditentukan dengan melihat aktivitas sisa enzim setelah terpapar suhu tinggi dalam jangka waktu tertentu, menggunakan persamaan (2) berikut:

$$\text{Aktivitas sisa (\%)} = \frac{E_i}{E_0} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (2)$$

Keterangan: E_0 = aktivitas sisa enzim pada t_0 atau tanpa inaktivasi; E_i = aktivitas sisa enzim setelah diinaktivasi selama waktu t_i (Nassar *et al.*, 2015)

2.10.2. Konstanta Laju Inaktivasi Termal (k_i)

Mekanisme reaksi inaktivasi *irreversible* suatu enzim berlangsung seperti berikut:



Konstanta laju inaktivasi (k_i) adalah nilai yang mencerminkan perubahan konsentrasi enzim selama periode inaktivasi. Penentuan konstanta laju inaktivasi termal (k_i) bergantung pada persamaan (3) laju inaktivasi termal enzim orde satu, yaitu:

$$\ln \left(\frac{E_i}{E_0} \right) = -k_i \times t_i \quad \dots\dots\dots (3)$$

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 $\ln \left(\frac{E_i}{E_o} \right)$ terhadap t_i (Saqib *and* Siddiqui, 2018)

2.10.3. Waktu Paruh ($t_{1/2}$)

Waktu paruh ($t_{1/2}$) mengacu pada periode waktu pada saat enzim kehilangan separuh aktivitasnya, dan ini adalah konsep yang penting dalam mengukur stabilitas enzim (Saqib *and* Siddiqui, 2018). Perhitungan waktu paruh ditentukan melalui persamaan (4) laju inaktivasi termal enzim orde satu seperti berikut:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_i} \dots\dots\dots (4)$$

Keterangan: k_i = konstanta laju inaktivasi termal; dan $t_{1/2}$ = waktu paruh (Saqib *and* Siddiqui, 2018).

2.10.4. Perubahan Energi Bebas akibat Denaturasi (ΔG_i)

Energi bebas akibat denaturasi (ΔG_i) adalah energi bebas yang dibutuhkan untuk mengubah enzim dari keadaan awal menjadi keadaan terdenaturasi. Penentuan nilai ΔG_i dapat dihitung menggunakan persamaan (5) termodinamika, sebagai berikut:

$$\Delta G_i = -RT \ln \frac{k_i \cdot h}{k_B \cdot T} \dots\dots\dots (5)$$

Keterangan: R = konstanta gas ideal ($8,315 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$); T = suhu inaktivasi termal (K); k_i = konstanta laju inaktivasi termal; h = konstanta Planck ($6,625 \times 10^{-34} \text{ J.detik}$); dan k_B = konstanta Boltzman ($1,381 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$) (Saqib *and* Siddiqui, 2018).

Menurut studi yang dilakukan oleh Tiarsa *et al.* (2022), enzim α -amilase yang mengalami imobilisasi pada substrat hibrida bentonit-kitin menunjukkan penurunan nilai k_i , peningkatan $t_{1/2}$, dan kenaikan ΔG_i dibandingkan dengan enzim yang telah dimurnikan. Peningkatan $t_{1/2}$ menandakan bahwa enzim imobil memerlukan lebih banyak waktu sebelum mengalami inaktivasi, mengindikasikan tingkat kestabilan yang lebih tinggi. Penurunan nilai k_i dan peningkatan ΔG_i pada

enzim immobil disebabkan oleh sifatnya yang menjadi semakin kaku serta terjadinya penambahan lipatan (*folding*) pada enzim, yang menyebabkan peningkatan kestabilan enzim secara keseluruhan (Saqib *and* Siddiqui, 2018 ; Yandri dan Suhartati, 2018).

2.11. Immobilisasi Enzim

Immobilisasi merupakan salah satu cara yang digunakan untuk menstabilkan enzim saat proses penggunaan dan penyimpanan. Selain mampu menstabilkan enzim, immobilisasi juga dapat membuat enzim digunakan secara berulang. Immobilisasi enzim adalah proses pengikatan atau penahanan molekul enzim secara fisik pada suatu material (matriks) yang tidak larut dalam air (Datta *et al.*, 2013). Enzim yang dimodifikasi menggunakan proses immobilisasi disebut enzim amobil. (Robinson, 2015). Menurut mekanismenya, Immobilisasi enzim dibedakan menjadi tiga metode, yaitu: metode penjebakan (*entrapment*), metode pengikatan (*carrier-binding*), dan metode ikatan silang (*cross-linking*).

Immobilisasi menggunakan metode pengikatan dapat dilakukan melalui adsorpsi fisik, ikatan ionik, maupun ikatan kovalen. Pada proses adsorpsi fisik, enzim diadsorpsi pada permukaan matriks melalui interaksi non-kovalen seperti ikatan hidrofobik, ikatan hidrogen, dan gaya Van der Waals. Keuntungan dari metode ini adalah mudah dilakukan, tidak merusak struktur enzim, dan penurunan aktivitas enzim cenderung rendah. Namun, kelemahan dari metode ini adalah rentan terhadap perubahan pH ikatan antara enzim dan matriks cukup lemah. Keberhasilan metode ini ditentukan ukuran dan luas permukaan matriks (Hwang *and* Gu, 2013; Robinson 2015; Zdarta *et al.*, 2018).

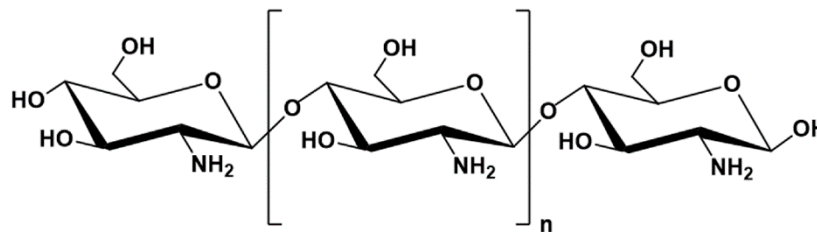
Berbagai penelitian tentang immobilisasi enzim dengan silika dan kitosan dapat dilihat pada Tabel 2. Penelitian tersebut menggunakan beberapa jenis tipe dan struktur silika dan kitosan. Penggunaan immobilisasi menggunakan kitosan dan silika mampu meningkatkan pemakaian berulang dan aktivitas sisa enzim dibandingkan dengan enzim murninya.

Tabel 2. Berbagai penelitian imobilisasi enzim dengan kitosan dan silika

Sumber Enzim	Jenis Enzim dan Matriks	Penggunaan Berulang	Aktivitas Sisa (%)	Referensi
<i>Bacillus species</i>	Lapian tipis Silika mesopori	6 kali	70	(Bellino <i>et al.</i> , 2010)
<i>Raw Starch Degestion Amylase</i>	Silika gel dengan glutaraldehida	10 kali	89,4	(Nwagu <i>et al.</i> , 2011)
Lipase	Silika gel dari abu sekam padi	6 kali	67,71	(Rizki <i>et al.</i> , 2020)
Alpha Amylase dari Himedia	Kitosan termodifikasi <i>microspheres</i>	7 kali	49	(Rana <i>et al.</i> , 2014)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Chitosan Beads</i>	5 kali	43,3	(Zusfahair <i>et al.</i> , 2016)
<i>Bacillus subtilis</i> ITBCCB148	Kitosan	6 kali	16	(Yandri <i>et al.</i> , 2020)

2.12. Kitosan

Kitosan merupakan polisakarida hasil dari deasetilasi kitin yang membentuk polimer rantai panjang dengan struktur ($\beta(1,4)$ -2-amina -2-deoksi-D- glukosa). Kitosan terdiri dari dua monomer, yaitu N-asetilglukosamin dan D-glukosamin. Kitosan berbentuk padatan amorf berwarna putih kekuningan. Kitosan dapat diperoleh dari proses deasetilasi kitin menggunakan basa. Proses deasetilasi kitin merupakan penghilangan gugus asetil ($-\text{COCH}_3$) yang terikat pada gugus amina ($-\text{NH}_3$). Kitosan tidak larut di dalam air, asam kuat, basa kuat, dan beberapa pelarut organik seperti alkohol, aseton, dan dimetilsulfoksida. Kitosan dapat larut dalam larutan yang memiliki pH 4 hingga 6,5 tergantung pada derajat deasetilasi. Semakin tinggi derajat deasetilasi maka semakin mudah larut kitosan. Sebaliknya, semakin kecil derajat deasetilasi maka semakin tidak mudah larut di dalam air. Gambar 12 menunjukkan struktur kitosan.



Gambar 12. Struktur kitosan.

Kitosan juga dapat membentuk sebuah membran yang berfungsi sebagai adsorben pada waktu terjadinya pengikatan zat-zat organik maupun anorganik oleh kitosan. Hal ini yang menyebabkan kitosan lebih banyak manfaatnya dibandingkan dengan kitin. Kitosan merupakan suatu polimer yang bersifat polikationik. Keberadaan gugus hidroksil dan amino sepanjang rantai polimer mengakibatkan kitosan sangat efektif mengikat kation ion logam berat maupun kation dari zat-zat organik seperti protein dan lemak. Sifat tidak larut di dalam air dan memiliki interaksi yang baik dengan protein dapat dimanfaatkan sebagai matrik pengamobil. Selain itu, kitosan memiliki harga ekonomis, tidak larut dalam air, tidak beracun, dan mudah terurai ke lingkungan. Berdasarkan penelitian Yandri *et al.* (2020), imobilisasi enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 menggunakan kitosan mampu digunakan berulang selama enam kali dengan aktivitas sisa sebesar 16 %.

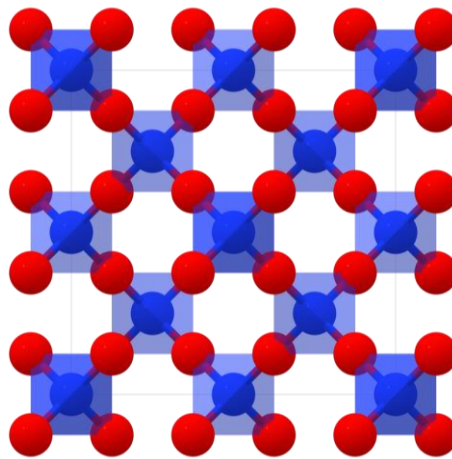
2.13. Silika Dioksida

Silika adalah suatu mineral yang penyusun utamanya berupa silikon dioksida (SiO₂). Silika tersusun dari dua unsur yang terdiri dari silikon (Si) dan oksigen (O₂). Keduanya merupakan unsur yang paling banyak di alam. Diperkirakan 60 % dari kerak bumi ini tersusun dari silika. Silika yang ada di bumi ini biasanya ditemukan dalam bentuk silikat (Lujan and Ary, 2014).

Silika terdiri dari berbagai bentuk yaitu: silika kristalin, silika mikrokristalin, silika *vitreous* (*supercooled liquid glasses*), dan silika amorf. Berdasarkan struktur molekulnya silika dibagi menjadi dua bagian yaitu: silika kristalin dan silika

amorf. Silika kristalin adalah silika yang susunan molekulnya membentuk pola tertentu (kristal) sedangkan silika amorf adalah silika yang susunan molekulnya tidak teratur. Silika sebagai senyawa yang terdapat di alam berstruktur kristalin, sedangkan sebagai senyawa sintetisnya berupa amorf. Secara sintetis senyawa silika dapat dibuat dari larutan silikat atau dari pereaksi silan.

Silika memiliki beberapa bentuk kristal seperti trigonal, heksagonal, ortorombik, tetragonal, monoklinik, dan kubik. Salah satu struktur SiO_2 pada yang cukup banyak ditemukan adalah kubik seperti Gambar 13. Warna biru melambangkan atom Si sedangkan warna merah menggambarkan atom oksigen.



Gambar 13. Struktur kubik silika (SiO_2) (Ricci *et al.*, 2007)

Silika diketahui dapat digunakan sebagai matrik imobilisasi karena bersifat tidak larut ke dalam air. Silika juga memiliki stabilitas kimia dan termal yang tinggi, luas permukaan partikel yang besar, ketersediaannya melimpah baik di alam maupun sintesis dan harga ekonomis (Anastasescu *et al.*, 2020). SiO_2 digunakan sebagai matrik untuk imobilisasi enzim laccase, sehingga mampu digunakan berulang sebanyak 10 kali aktivitas sisa sebesar 82,6 % (Patel *et al.*, 2014). Selain material anorganik, material organik juga dapat digunakan seperti kitosan.

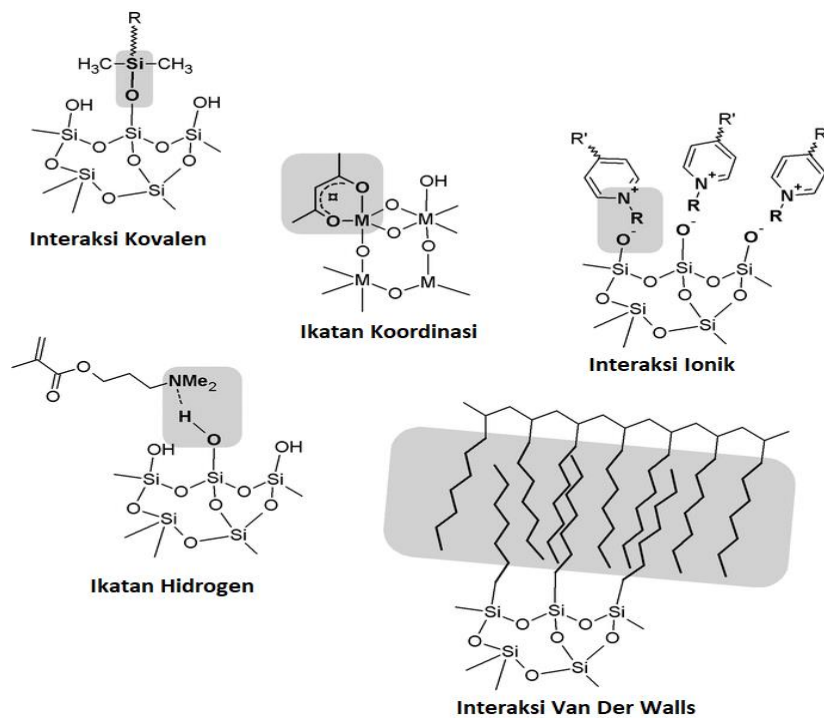
2.14. Material Hibrida untuk Imobilisasi

Berbagai jenis material dapat digunakan sebagai matriks pengikat enzim untuk proses imobilisasi seperti material organik, anorganik, dan hibrida. Syarat material dapat digunakan sebagai matriks imobil adalah mampu membantu enzim mempertahankan aktivitas katalitiknya, tidak larut dalam proses reaksi, memiliki afinitas yang baik dengan enzim, dan dapat digunakan berulang. Silika merupakan salah satu material anorganik yang sering digunakan sebagai matriks pada proses imobilisasi. Hal ini disebabkan karena silika memiliki ketahanan panas dan kimia sehingga mampu bertahan pada berbagai aplikasi. Silika mampu mengikat enzim secara adsorpsi karena memiliki luas permukaan yang tinggi dan strukturnya berpori. Selain itu silika memiliki banyak gugus hidroksil (-OH) yang mampu memfasilitasi agen pemodifikasi seperti glutaraldehid terikat kuat pada struktur enzim. Silika juga mampu membentuk matriks imobil dengan berbagai kelas enzim seperti hidrolase, oksidoreduktase, transferase, dan isomerase. Penggunaan matriks silika dan silika mesopori mampu mempertahankan aktivitas enzimnya sampai 91 % dan 96 % dari enzim murninya. (Kickelbick *et al.*, 2007)

Saat ini pengembangan matriks imobil tidak hanya menggunakan satu material tunggal. Namun, penggunaan campuran beberapa material mulai digunakan untuk meningkatkan stabilitas enzim dan pemakaian berulang. Material hibrida merupakan salah satu matriks yang dapat digunakan untuk matriks imobil dan mampu meningkatkan kualitas enzim imobil.

Material hibrida (*hybrid*) adalah material yang terbuat dari pencampuran dua bahan atau lebih pada skala molekuler. Umumnya material hibrida terdiri dari campuran material organik dan anorganik melalui interaksi antar penyusunnya. Material hibrida diklasifikasikan menjadi dua kelas, yaitu kelas 1 dan 2. Kelas I mencakup hibrida dengan komponen organik dan anorganik berinteraksi melalui ikatan yang tidak kuat, seperti interaksi van der Waals, ikatan hidrogen, atau interaksi elektrostatik. Sementara Kelas II merujuk pada material hibrida dengan komponen organik dan anorganik yang terhubung melalui ikatan kimia kovalen dan atau ion. Meskipun banyak bahan hibrida memiliki antarmuka organo-mineral

yang memiliki ikatan kuat dan lemah, namun jika mempertimbangkan pengaruh keberadaan ikatan kimia yang kuat terhadap sifat-sifat akhir bahan hibrida maka jenis hibrida ini juga akan termasuk dalam Kelas II (Faustini et al., 2018; Rurack and Manez, 2010). Gambar 14 menunjukkan interaksi kimia antara silika dan material organik pada proses pembentukan material hibrid.



Gambar 14. Contoh interaksi antara silika dengan matriks organik (Kickelbick *et al.*, 2007)

Penggunaan material hibrida sebagai matriks pengamobil enzim dapat menjadikan interaksi antara enzim dengan matriks lebih stabil, memberi ketahanan mekanik yang lebih baik, meningkatkan kestabilan termal, meningkatkan masa pemakaian berulang, dan meningkatkan masa penyimpanan enzim (Zdarta *et al.*, 2018). Material hibrida menggabungkan keunggulan masing-masing karakteristik material penyusunnya. 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).

Tabel 3 merupakan beberapa penelitian tentang imobilisasi enzim α -amilase pada matrik hibrida organik-anorganik. Penggunaan material hibrid sebagai matrik imobilisasi enzim cukup menjanjikan. Enzim mampu stabil baik dalam penyimpanan maupun saat proses terjadi reaksi. Hal tersebut dapat dilihat dari jumlah penggunaan berulang dan aktivitas sisa unit enzim.

Tabel 3. Berbagai penelitian imobilisasi enzim dengan material hibrida

Sumber Enzim	Matriks	Penggunaan Berulang	Aktivitas Sisa (%)	Referensi
α -amilase <i>Aspergillus fumigatus</i>	Zeolit/Kitosan	5	10,97	(Yandri <i>et al.</i> , 2022)
α -amilase dari <i>Sigma-Aldrich</i>	Kitosan/TiO ₂ beads	16	50	Doğaç <i>et al.</i> , 2014)
α -amilase <i>Aspergillus fumigatus</i>	Bentonit/Kitosan	6	47,61	(Yandri <i>et al.</i> , 2023)
α -amilase dari Himedia	Kitosan/TiO ₂ nanokomposit	10	63	(Bindu <i>and</i> Mohanan, 2017)

2.15. Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis merupakan metode instrumen dalam analisis kuantitatif kimia yang digunakan untuk mendeteksi senyawa berdasarkan absorbansi foton. Sampel yang digunakan dalam analisis harus dapat menyerap foton pada daerah UV-Vis dengan hukum Lambert-Beer. Jika sampel menyerap sinar ultraungu (ultraviolet), akan muncul absorbansi pada panjang gelombang antara 200-400 nm, dan sinar tampak (*visible*) mempunyai panjang gelombang 400-750 nm.

Syarat senyawa dapat dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis adalah mengandung gugus aoksokrom dan kromofor. Gugus aoksokrom merupakan gugus fungsional yang mempunyai elektron bebas seperti –OH, NH₂, NO₂, -X. Sedangkan gugus kromofor merupakan suatu gugus dalam senyawa organik yang memberikan serapan pada daerah sinar tampak dan ultraviolet. Hampir semua kromofor mempunyai ikatan rangkap yang terkonjugasi seperti diena (C=C-C=C),

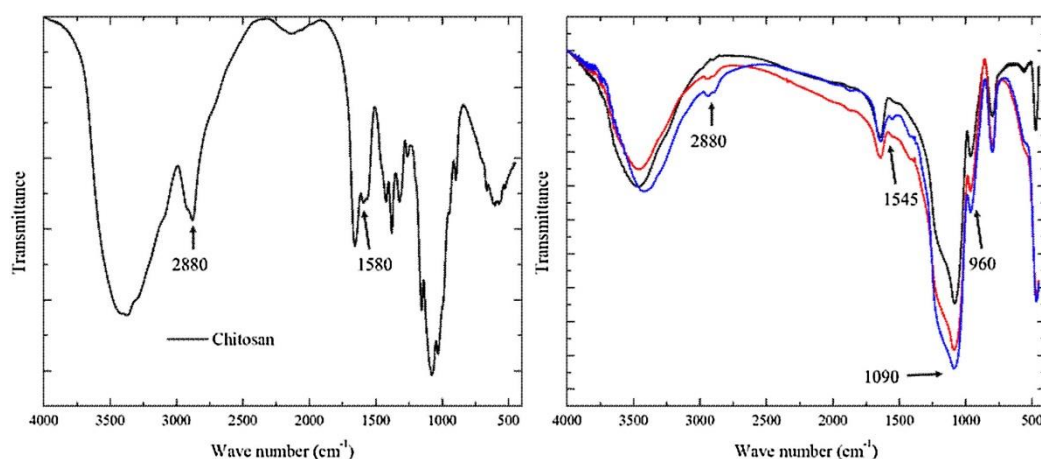
dienon ($C=C-C=O$), benzen dan lain-lain. Untuk mendapatkan spektrum UV-Vis yang baik perlu diperhatikan pula konsentrasi sampel. Hubungan antara absorbansi terhadap konsentrasi akan linier ($A \approx C$) apabila nilai absorbansi larutan antara 0,2-0,8 ($0,2 \leq A < 0,8$) atau sering disebut sebagai daerah berlakunya hukum Lambert-Beer.

Adapun prinsip kerja spektrofotometri UV-Vis yaitu cahaya yang berasal dari lampu deuterium maupun wolfram yang bersifat polikromatis diteruskan melalui lensa menuju ke monokromator pada spektrofotometer dan filter cahaya pada fotometer. Monokromator kemudian akan mengubah cahaya polikromatis menjadi cahaya monokromatis (tunggal). Berkas- cahaya dengan panjang tertentu akan dilewatkan pada sampel yang mengandung suatu zat dalam konsentrasi tertentu. Oleh karena itu, terdapat cahaya yang diserap (diabsorpsi) dan ada pula yang dilewatkan. Cahaya yang dilewatkan ini kemudian diterima oleh detektor.

Pada umumnya, spektroskopi UV-Vis digunakan untuk melakukan pengukuran jumlah protein dan enzim. Sebuah metode pengukuran berbasis UV-Vis yang sederhana, cepat, dan tidak mahal telah dikembangkan untuk mengukur kadar protein atau enzim, yang mengatasi beberapa kelemahan yang terdapat dalam teknik tradisional. Metode ini telah terbukti berhasil dalam mengukur jumlah protein dan enzim seperti serum albumin bovine, insulin, lipase, dan peroksidase. Dalam proses pengukuran ini, metode tersebut mempertimbangkan aspek-aspek seperti agregasi, konsentrasi buffer, dan sifat dari standar, yang mungkin memengaruhi ketepatan proses pengukuran. Spektroskopi UV-Vis juga digunakan dalam penelitian kinetika enzim dan tingkat afinitas interaksi antara enzim dan substratnya. Metode ini memungkinkan pengukuran yang tepat terhadap kecepatan reaksi enzim dan memberikan gambaran seberapa cepat reaksi berlangsung serta tingkat afinitas enzim terhadap substratnya (Yandri *et al.*, 2018). Pada penelitian ini, pengukuran aktivitas enzim, kadar protein di dalam enzim, dan kecepatan enzim diuji dengan metode Fuwa, Mendels, dan Lowry menggunakan analisis spektrofotometri UV-Vis.

2.16. Fourier-transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

Gambar 15 merupakan spektrum FTIR yang mengkonfirmasi keberadaan kitosan dan silika dari hasil sintesis hibrida. Kelechi Ebisike telah melakukan sintesis dan karakterisasi hibrida silika-kitosan aerogel menggunakan metode sol gel. Terbentuk pita pada bilangan gelombang 3700–3200 cm^{-1} akibat tumpang tindih vibrasi ulur Si-OH dan amina. Adanya puncak pada bilangan gelombang 2100–2360 cm^{-1} disebabkan oleh vibrasi ulur Si-H yang tumpang tindih dengan vibrasi pada ikatan rangkap C=O. Bilangan gelombang 1636 cm^{-1} menunjukkan adanya vibrasi ulur ikatan C-O (Dhawade and Jagtap, 2012). Puncak pada bilangan gelombang 1439 cm^{-1} menunjukkan adanya vibrasi tekuk dari ikatan OH. Puncak pada 1093 cm^{-1} berkaitan dengan vibrasi ulur Si-O-Si (Dhawade and Jagtap, 2012) sedangkan puncak pada 800 cm^{-1} disebabkan oleh tumpang tindih vibrasi ulur ikatan Si-C dan dan NH_2 . Puncak pada 467 cm^{-1} berhubungan dengan vibrasi tekuk O-Si (Tadjarodi *et al.*, 2013). Intensitas puncak yang besar pada 1093 cm^{-1} terutama disebabkan oleh tumpang tindih ikatan Si-O-Si dan ikatan C-O-C dari ikatan glikosidik (Dhawade and Jagtap, 2012). Hibrida kitosan-silika juga dilaporkan memiliki ikatan Si-OH dan ikatan Si-O-Si dengan pita di pada bilangan gelombang masing-masing 3300–3370 cm^{-1} dan 1000–1250 cm^{-1} (Al-Sagheer and Muslim, 2010).



Gambar 15. Spektrum FTIR : (a). kitosan, (b). hibrida kitosan-silika (Diosa *et al.*, 2019).

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober 2023 hingga Juni 2024, bertempat di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung dan Laboratorium Teknologi Farmasi Program Studi Farmasi Fakultas Sains Institut Teknologi Sumatera. Analisis spektrofotometri UV-Vis dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Analisis spektroskopi FT-IR dilakukan di UPA Laboratorium Terpadu Institut Teknologi Sumatera.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain; spektrofotometer UV-Vis (Thermo Genesys 150™), spektrofotometer FT-IR (Shimadzu IRSpirit™), neraca analitik (Ainsworth AA-160 Denver Instrument Company™), inkubator (Precistern P' Selecta™), *autoclave* (GEA LS35HD™), *centrifuge* (17250-10-Centrifuge Cole Parmer™ dan Labor 50-M WIFUG™), tabung sentrifugasi (15 mL dan 50 mL), mikropipet 50 µL - 1000 µL (Eppendorf™), *Laminar Air Flow/LAF* (9005-FL Crumair™), *waterbath* (Mettler W 350™), *shaker incubator* (SSL2 Stuart™), pengaduk magnetik pelat panas (CB162 Stuart™) dan *stir bar*, *vortex* (PV-1 Grant-bio™), oven (T60 Heraeus™), pH meter (MetroHM™ 827), jarum ose (lurus), *freezer*, kulkas.

Mikroorganisme yang digunakan pada penelitian ini adalah ; isolat jamur lokal *A. fumigatus* dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Universitas Lampung.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini, di antaranya; Silika Gel 60 G (0,2-0,5 mm) (Merck™), kitosan (Sigma-Aldrich™), glutaraldehid 25 % (Sigma-Aldrich™), pati kentang / *starch soluble ex potato extra pure* (Loba Chemie™), pati jagung (Maizenaku™), *Potato Dextrose Agar/PDA* (Himedia™), KH_2PO_4 (Merck™), MgSO_4 (Merck™), CaCl_2 (Merck™), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck™), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck™), CoCl_2 (Merck™), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck™), pepton (Himedia™), NaH_2PO_4 (Merck™), Na_2HPO_4 (Merck™), KI (Merck™), I_2 (Merck™), HCl pekat (Merck™), NaOH (Merck™), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck™), Na/K-tartrate tetrahidrat (Merck™), urea (Merck™), *folin ciocalteu's phenol* (Merck™), *Bovine Serum Albumin/BSA*, D-glukosa anhidrat (Merck™), asam 2-hidroksi-3,5-dinitrosalisilat/DNS (Sigma-Aldrich™), fenol (Merck™), Na_2SO_3 (Merck™), Na_2CO_3 (Merck™), NaCl (Merck™), asam asetat glasial (Merck™), natrium asetat (Merck™), akuades, kantong selofan (Wards Science USA), kertas saring, kapas, kasa, alkohol 70 %, spiritus, pemantik api.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Pembiakan *A. fumigatus*

A. Pembuatan Media Agar Miring

Media dibuat dengan melarutkan 0,1 gram pati jagung dan 3,9 gram *Potato Dextrose Agar* ke dalam 100 mL akuades. Kemudian campuran tersebut dipanaskan sambil diaduk hingga larut. Selanjutnya, 5 mL media tersebut dituangkan pada saat kondisi panas ke dalam beberapa tabung reaksi. Tabung reaksi ditutup dengan kapas sumbat, aluminium foil, dan kertas. Selanjutnya, media disterilisasi pada suhu 121°C , 1 atm, selama 15 menit dalam *autoclave*. Tabung reaksi diletakkan pada bidang miring selama ± 24 jam secara aseptis sampai agar mengeras (Nwagu and Okolo, 2011).

B. Pembiakan Isolat Baru *A. fumigatus*

Pembiakan dilakukan secara aseptis dalam *Laminar Air Flow* (LAF) yang telah disterilisasi oleh sinar UV. Setelah agar miring mengeras dan dipastikan bebas kontaminan, isolat *A. fumigatus* diambil satu tarikan ose, lalu ditusukkan ke dalam media agar miring. Isolat baru *A. fumigatus* kemudian dibiakkan dalam inkubator ± 5 hari. Isolat *A. fumigatus* akan tampak berwarna hijau hingga kecoklatan (Ratnasri *et al.*, 2018).

3.3.2. Produksi Enzim α -Amilase dari *A. fumigatus*

A. Pembuatan Larutan Buffer Fosfat 0,05 M

Pada proses fermentasi *A. fumigatus*, pH optimum yang digunakan adalah 6,5.

1. Larutan NaH_2PO_4 ($M_r = 120 \text{ g/mol}$) 0,05 M 1000 mL

Larutan NaH_2PO_4 0,05 M dibuat dengan cara melarutkan 6,0g NaH_2PO_4 dengan akuades ke dalam labu ukur 1000 mL hingga tanda batas.

2. Larutan Na_2HPO_4 ($M_r = 142 \text{ g/mol}$) 0,05 M 500 mL

Larutan Na_2HPO_4 0,05 M dibuat dengan cara melarutkan 7,14 g Na_2HPO_4 dengan akuades ke dalam labu ukur 1000 mL hingga tanda batas.

3. Larutan buffer fosfat 0,05 M 250 mL dengan pH dapat diperoleh dengan mencampurkan larutan NaH_2PO_4 (stok A) dengan larutan Na_2HPO_4 (stok B) masing-masing sebanyak 208,47 dan 41,53 mL.

B. Pembuatan Media Inokulum dan Fermentasi

Pembuatan media inokulum dan media fermentasi terdiri dari bahan bahan dengan kandungan nutrisi yang sama, yaitu; 2,0 % KH_2PO_4 ; 1,40 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,75 % pati jagung; 0,75 % pepton; 0,30 % urea; 0,30 % CaCl_2 ; 0,30 % MgSO_4 ; 0,005 % $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,002 % CoCl_2 ; 0,0014 % $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Deb *et al.*, 2013). Media inokulum dibuat dalam 100 mL akuades, sedangkan media fermentasi dibuat masing-masing sebanyak 7 buah ke dalam 500 mL buffer fosfat 0,05 M pH 6,5 pada labu Erlenmeyer 1000 mL (Veerdonk *et al.*, 2017). Media dipanaskan hingga mendidih, lalu labu erlenmeyer ditutup dengan kapas sumbat, aluminium foil, dan

kertas. Selanjutnya, media disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C, 1 atm, selama 15 menit. Media didiamkan pada LAF dalam kondisi aseptis selama 12 jam untuk mengetahui ada/tidaknya kontaminan dalam media.

C. Inokulasi

Sebanyak 3 tarikan ose isolat *A. fumigatus* digoreskan dari media agar miring. Kemudian, dipindahkan ke dalam 100 mL media inokulum secara aseptis ke dalam LAF. Selanjutnya, media inokulum diinkubasi sambil dikocok menggunakan *shaker incubator* dengan kecepatan 125 rpm pada suhu ruang selama 24 jam.

D. Fermentasi

Produksi enzim dilakukan bertahap hingga diperoleh ekstrak kasar enzim α -amilase dengan aktivitas unit yang tinggi sebanyak 3500 mL. Hasil inokulasi dipindahkan secara aseptis dalam LAF ke setiap media fermentasi sebanyak 2 % dari volume media fermentasi (500 mL). Media fermentasi diinkubasi sambil dikocok pada *shaker incubator* dengan kecepatan 125 rpm pada suhu ruang selama 112 jam yang merupakan waktu optimum.

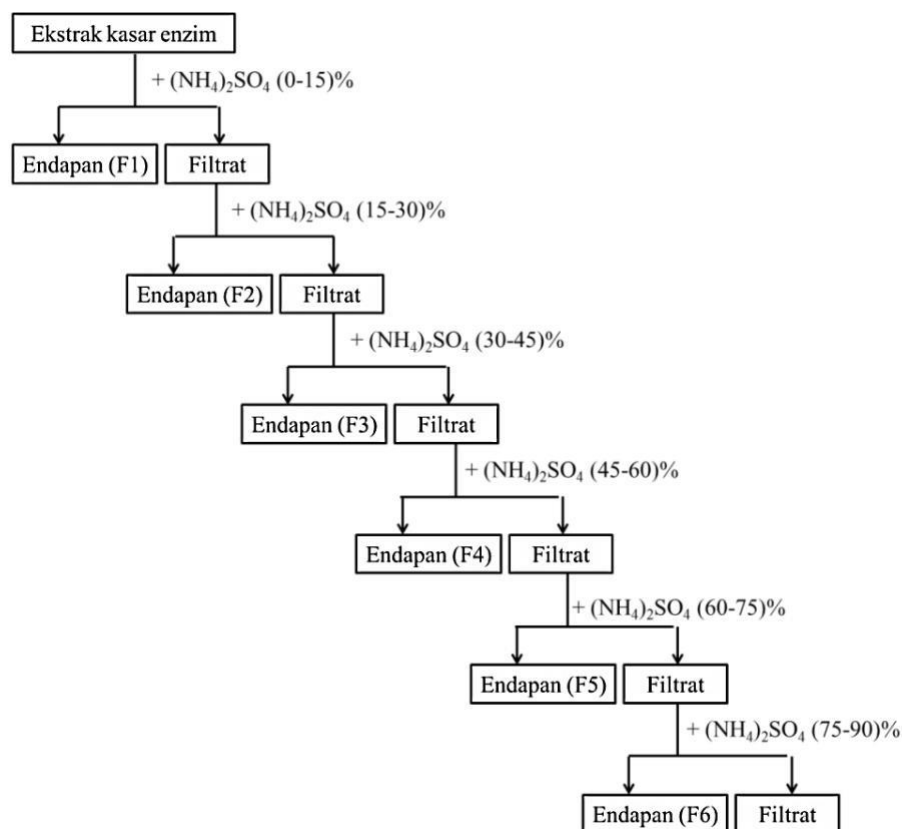
3.3.3. Isolasi Enzim α -amilase dari *A. fumigatus*

Hasil fermentasi disentrifugasi pada kondisi dingin sekitar 2–4 °C selama 15-20 menit dengan kecepatan 5000 rpm. Supernatan (filtrat) dipisahkan dari endapan dan bulir-bulir jamur yang tidak hancur dengan dekantasi dilanjutkan penyaringan dengan kertas saring. Bulir-bulir jamur dapat diperas untuk mengeluarkan enzim. Supernatan yang diperoleh adalah ekstrak kasar enzim. Ekstrak kasar enzim α -amilase ditentukan nilai aktivitasnya dengan metode Fuwa dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry (Bollag *et al.*, 1996; Yandri *et al.*, 2010).

3.3.4. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat

Fraksinasi dengan garam merupakan salah satu cara untuk meningkatkan kemurnian enzim. Prinsip dasar fraksinasi adalah menurunkan kelarutan enzim dengan cara menambahkan garam pada larutan sehingga terjadi *salting out*. Fraksinasi bertingkat dilakukan untuk menentukan kadar garam optimum yang dibutuhkan untuk mendapatkan enzim dengan kemurnian paling tinggi. Garam yang digunakan dalam penentuan pola fraksinasi bertingkat adalah amonium sulfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ (Bollag *et al.*, 1996).

Pada penelitian ini, fraksinasi dilakukan pada urutan konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sebagai berikut: (0-15); (15-30); (30-45); (45-60); (60-75); dan (75-90) %. Skema fraksinasi dapat dilihat pada Gambar 16.



Gambar 16. Skema fraksinasi dengan amonium sulfat.

Ekstrak kasar enzim dimasukkan ke dalam gelas kimia sebanyak 100 mL. Sampel diletakkan pada penangas air dingin dengan suhu sekitar 2–4 °C guna mencegah enzim terdenaturasi. Larutan diaduk dengan kecepatan yang rendah sambil ditambahkan amonium sulfat secara perlahan selama 10 menit pada konsentration 0-15 %. Pengadukan yang terlalu cepat dapat membuat enzim mengalami denaturasi dengan munculnya busa. Setelah larut, hasil fraksinasi disentrifugasi dingin pada suhu 2–4 °C dengan kecepatan 5000 rpm selama 15-20 menit. Endapan yang diperoleh, lalu dipisahkan dari filtratnya menggunakan kertas saring. Endapan diresuspensikan dengan buffer fosfat pH 6,5 sebanyak 1-2 kali volume endapan pada konsentrasi yang rendah untuk menstabilkan pH enzim dari pengaruh sedikit pengasaman selama melarutkan garam (Bollag *et al.*, 1996).

Selanjutnya, filtrat dari tahap fraksi (0-15) % difraksinasi kembali pada urutan persen kejenuhan (15-30) % dengan prosedur yang sama. Langkah kerja tersebut berulang sampai fraksinasi 75-90 %. Setelah seluruh tahap selesai, suspensi endapan enzim α -amilase dari masing-masing fraksi ditentukan nilai aktivitasnya dengan metode Fuwa dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry. Hasil uji ini dibuat grafik pola fraksinasi antara fraksi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ terhadap aktivitas spesifik enzim.

Beberapa fraksi dari pola fraksinasi pertama menghasilkan aktivitas spesifik yang tinggi, maka proses fraksinasi larutan stok ekstrak kasar enzim selanjutnya cukup dibagi menjadi dua fraksi. Hal ini bertujuan untuk menambah rendemen enzim sehingga tidak kehilangan banyak enzim dari proses pemurnian dan aktivitas enzim α -amilase yang akan diperoleh masih cukup tinggi (Yandri *et al.*, 2010). Prosedur ini sama dengan penentuan pola fraksinasi pertama. Fraksinasi dilakukan setiap 1 liter ekstrak kasar enzim.

3.3.5. Dialisis

Setelah metode fraksinasi, pemurnian enzim lebih lanjut dilakukan melalui proses dialisis. Tahap ini bertujuan untuk menghilangkan garam amonium sulfat dari hasil fraksinasi. Secara garis besar, proses dialisis dilakukan dalam tiga tahapan di antaranya menyiapkan kantong selofan, penempatan suspensi enzim, dan proses pengadukan selama dialisis.

Proses dialisis dimulai dengan menyiapkan kantong selofan. Kantong selofan dicuci dengan buffer fosfat 0,01 M pH 6,5 untuk memastikan tidak ada kebocoran pada kantong. Kantong selofan dipotong sebesar 3 kali volume enzim karena umumnya volume enzim hasil dialisis akan bertambah 2 kali semula. Salah satu ujung selofan diikat dan dikaitkan pada batang pengaduk untuk menampung ekstrak kasar enzim. Kantong selofan digantungkan pada gelas kimia dan sebaiknya tidak sampai menyentuh dasar gelas kimia.

Sebanyak 25 mL suspensi enzim hasil fraksinasi dimasukkan perlahan ke dalam kantong selofan menggunakan pipet tetes. Udara dalam kantong selofan dikeluarkan sehingga selofan tidak mengembang. Larutan diaduk menggunakan magnetik stirrer pada kondisi dingin dengan suhu 2–4 °C untuk menghindari denaturasi. Lalu, buffer fosfat 0,01 M pH 6,5 dimasukkan ke dalam gelas kimia sampai seluruh cuplikan enzim dalam selofan terendam seluruhnya.

Enzim didialisis selama 24 jam pada suhu 2–4 °C sambil diaduk dengan pengaduk magnetik. Selama proses dialisis, dilakukan pergantian buffer tiap 4-6 jam untuk memperbaharui larutan buffer yang sudah jenuh dengan ion sulfat dari enzim hasil fraksinasi. Hal tersebut merupakan langkah agar tercapai kesetimbangan osmotik sehingga ion-ion garam di dalam ekstrak kasar enzim bisa dipisahkan. Selanjutnya, enzim hasil dialisis ditentukan nilai aktivitasnya dengan metode Fuwa dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry. Enzim hasil dialisis ini dapat digunakan untuk proses imobilisasi karena kemurnian dan aktivitas enzimnya masih cukup tinggi

3.3.6. Penentuan Aktivitas Unit dengan Metode Fuwa

Sebanyak 0,25 mL enzim ditambahkan ke dalam tabung sampel dan kontrol . Pada tabung kontrol ditambahkan 0,25 mL HCl 1 N sedangkan pada tabung sampel ditambahkan 0,25 mL larutan pati 0,1 %. Keduanya diinkubasi pada suhu 60 °C selama 10 menit. Setelah inkubasi, pada kontrol ditambahkan 0,25 mL larutan pati 0,1 % sedangkan pada sampel ditambahkan 0,25 mL HCl 1 N. Selanjutnya, kedua tabung tersebut ditambahkan 0,25 mL pereaksi iodin dan 4,0 mL akuades, lalu dikocok hingga homogen. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} 600 nm. Sesuai prinsip berkurangnya substrat dari metode Fuwa, maka perhitungan aktivitas unit enzim dapat dihitung menggunakan persamaan di bawah ini.

$$AU = \frac{A_{kontrol} - A_{sampel}}{A_{kontrol}} \times \frac{1}{V_{enzim}} \times FP \dots\dots\dots (6)$$

Keterangan:

$A_{kontrol}$ = absorbansi kontrol

A_{sampel} = absorbansi sampel

FP = faktor pengenceran

V = volume enzim = 0,25 mL.

3.3.7. Penentuan Aktivitas Unit dengan Metode Mandels

A. Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Pada pembuatan kurva standar glukosa, blanko yang digunakan adalah campuran pereaksi DNS dan akuades dengan perbandingan 1:2 mL. Blanko ini digunakan untuk setiap uji Mandels. Larutan deret standar glukosa dimasukkan ke dalam kuvet dan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} 510 nm. Data absorbansi terhadap konsentrasi glukosa diplotkan ke dalam grafik linier. Nilai *intercept* dan *slope* kurva standar glukosa digunakan dalam penentuan kadar glukosa pada sampel.

B. Prosedur Uji Mandels

Disiapkan tabung sampel dan kontrol yang telah ditambahkan enzim masing masing sebanyak 0,25 mL. Pada tabung sampel ditambahkan 0,25 mL larutan pati 0,1 % lalu diinkubasi pada suhu 60 °C selama 30 menit. Pada tabung kontrol, inkubasi dilakukan terlebih dahulu selanjutnya ditambahkan 0,25 mL larutan pati 0,1 %. Setelah itu, kedua tabung ditambahkan 1 mL pereaksi DNS, lalu dididihkan selama 10 menit. Selanjutnya, sampel didinginkan pada suhu ruang. Setelah dingin, sampel lalu ditambahkan 1,5 mL akuades. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} 510 nm. Kadar glukosa sampel ditentukan berdasarkan kurva standar glukosa. Sesuai prinsip terbentuknya produk dari metode Mandels, maka seharusnya $A_{kontrol} < A_{sampel}$. Aktivitas unit dihitung melalui rumus:

$$AU = \frac{(A_{\text{sampel}} - A_{\text{kontrol}}) - b}{a} \times \frac{1}{V_{\text{enzim}}} \times \frac{1}{t_{\text{inkubasi}}} \times \frac{1.000 \times FP}{Mr_{\text{produk}}} \dots\dots\dots (7)$$

Keterangan:

FP = faktor pengenceran

V = volume enzim = 0,25 mL

T = waktu inkubasi = 30 menit

Mr produk = massa relatif molekul glukosa = 180 g/mol b dan a = *intercept* dan *slope* kurva standar glukosa

3.3.8. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

A. Pembuatan Pereaksi Metode Lowry

1. Pereaksi A: 2,0 g Na_2CO_3 dilarutkan ke 100 mL NaOH 0,1 N.
2. Pereaksi B: dicampurkan larutan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 % dengan larutan Na/K tartrat 1 % (1:1).
3. Pereaksi C: 2,0 mL pereaksi B + 100 mL pereaksi A.
4. Pereaksi D: dicampurkan 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.

B. 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} 280 nm. Data absorbansi terhadap konsentrasi BSA diplotkan ke dalam grafik linier. Nilai *intercept* dan *slope* kurva standar BSA digunakan dalam penentuan kadar protein sampel.

C. Penentuan Kadar Protein

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

3.3.9. Imobilisasi Enzim α -Amilase dengan Silika

Imobilisasi enzim dilakukan melalui metode adsorpsi fisik (Ghiaci *et al.*, 2009; Yandri *et al.*, 2018) dengan prosedur sebagai berikut:

A. Penentuan pH Buffer Pengikatan Enzim-silika

Sebanyak 0,20 g silika dimasukkan ke dalam masing-masing 7 tabung berbeda. Kemudian, ditambahkan buffer fosfat 0,1 M hingga tercapai variasi pH : 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; dan 7,5. Campuran disentrifugasi selama 15 menit lalu pisahkan matriks dengan supernatannya. Sebanyak 0,5 mL enzim hasil dialisis dan 0,5 mL buffer fosfat 0,1 ditambahkan pada masing-masing variasi pH. Sampel diinkubasi pada suhu 4 °C selama 30 menit, lalu disentrifugasi 15 menit. Supernatan merupakan enzim kemudian ditentukan nilai aktivitas dengan metode Fuwa. Enzim selanjutnya dielusi dari matriks menggunakan 1,0 mL campuran buffer fosfat pH 8,0 dan NaCl 1 M (1:1) untuk pH 4,5; 5; 5,5; 6,0; dan 6,5 serta campuran buffer fosfat pH 5,5 dan NaCl 1 M (1:1) untuk mengelusi enzim pada

pH 7,0 dan 7,5. Untuk memaksimalkan elusi enzim, sampel diinkubasi pada suhu 4°C selama 30 menit, lalu disentrifugasi 15 menit. Supernatan enzim ditentukan nilai aktivitasnya dengan metode Fuwa. pH buffer yang memberi aktivitas enzim terendah saat proses pengikatan sekaligus memberi aktivitas enzim tertinggi saat proses elusi ditetapkan sebagai pH buffer pengikatan enzim-matriks.

B. Imobilisasi Enzim dengan Silika

Sebanyak 0,20 g silika distabilkan menggunakan buffer pengikatan pH optimum melalui 3-4 kali pergantian buffer dengan sentrifugasi 15 menit hingga pH tercapai. Kemudian, ditambahkan 0,5 mL enzim hasil dialisis dan 0,5 mL buffer pengikatan. Sampel diinkubasi pada suhu 4 °C selama 30 menit, lalu disentrifugasi 15 menit. Supernatan diambil 0,25 mL untuk dijadikan kontrol uji Mandels, lalu ke dalam matriks-enzim ditambahkan 0,75 mL substrat pati dan diinkubasi pada suhu optimum selama 30 menit. Setelah itu, enzim amobil dipisahkan dari matriksnya melalui sentrifugasi selama 30 menit. Supernatan diambil 0,5 mL sebagai sampel uji Mandels.

3.3.10. Sintesis Hibrida Kitosan–Silika Gel 60

A. Pembuatan larutan

1) Larutan CH₃COOH (Mr = 60,05 g/mol) 1,0 M 500 mL

Untuk membuat 100 mL larutan CH₃COOH 1,0 M diperlukan 5,7 mL CH₃COOH glasial yang diencerkan dengan akuades ke dalam labu ukur 100 mL hingga tanda batas, lalu dihomogenkan.

2) Larutan glutaradehida 1 % 5 mL

Sebanyak 25 % glutaraldehida diencerkan menjadi 1,0 % melalui persamaan dengan cara melarutkan 0,2 mL glutaraldehida 25 % ke dalam 4,8 mL akuades dalam tabung reaksi, lalu dihomogenkan.

B. Pembuatan material hibrida kitosan-silika

Sebanyak 5,0 g kitosan disuspensikan ke dalam 500 mL asam asetat 1,0 M sambil diaduk selama 24 jam pada suhu 30°C dengan pengaduk magnetik. Kemudian, 5

mL glutaraldehida 1 % ditambahkan sebagai *cross-linking agent*. Sebanyak 5,0 g silika ditambahkan dan diaduk selama 4 jam pada suhu 60°C sehingga diperoleh hibrida kitosan–silika. Suspensi matriks hibrida dinetralkan dengan akuades melalui sentrifugasi berulang sampai air sisa cucian memiliki pH netral. Endapan matriks dikeringkan menggunakan oven pada suhu 60°C selama sampai kering, kemudian didinginkan dalam desikator. Sampel kering digerus menggunakan mortar dan alu hingga menghasilkan serbuk halus (Baysal *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2018).

3.3.11. Analisis *Fourier-transform Infrared Spectroscopy*

Sebanyak 0,5 g serbuk halus kitosan (Sigma Aldrich™), silika (Sigma Aldrich™), dan hibrida kitosan-silika dilakukan analisis spektroskopi FT-IR pada rentang bilangan gelombang 4000-650 cm⁻¹ (Perez *et al.*, 2020).

3.3.12. Imobilisasi Enzim α -Amilase dengan Hibrida Kitosan–Silika Silika Gel 60

Imobilisasi enzim dilakukan melalui metode adsorpsi fisik (Yandri *et al.*, 2018) dengan prosedur sebagai berikut:

A. Penentuan pH Buffer Pengikatan Enzim-Matriks Hibrida

Sebanyak 0,20 g hibrida kitosan-silika dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi, lalu distabilkan dengan buffer fosfat 0,1 M dengan variasi pH, yaitu: 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; dan 7,5. Kemudian, matriks dipisahkan dari supernatannya melalui sentrifugasi 10-15 menit, lalu ditambahkan 0,5 mL enzim hasil dialisis dan 0,5 mL buffer fosfat 0,1 M sesuai variasi pH masing-masing. Untuk memaksimalkan pengikatan, sampel diinkubasi pada suhu 4°C selama 30 menit, lalu disentrifugasi 10-15 menit. Supernatan ditentukan nilai aktivitasnya dengan metode Fuwa.

Enzim selanjutnya dielusi dari matriks menggunakan 1,0 mL campuran buffer fosfat pH 8,0 dan NaCl 1 M (1:1) untuk pH 4,5; 5; 5,5; 6,0; dan 6,5 serta campuran buffer fosfat pH 5,5 dan NaCl 1 M (1:1) untuk mengelusi enzim

pada pH 7,0 dan 7,5. Untuk memaksimalkan elusi enzim, sampel diinkubasi pada suhu 4°C selama 30 menit, lalu disentrifugasi 15 menit. Supernatan enzim ditentukan nilai aktivitasnya dengan metode Fuwa. pH buffer yang memberi aktivitas enzim terendah saat proses pengikatan sekaligus memberi aktivitas yang tinggi saat proses elusi ditetapkan sebagai pH buffer pengikatan enzim-matriks.

B. Imobilisasi Enzim dengan Hibrida Kitosan-Silika

Sebanyak 0,20 g hibrida kitosan-silika distabilkan menggunakan buffer pengikatan pH optimum melalui 2-3 kali pergantian buffer dengan sentrifugasi 10 menit hingga pH tercapai. Kemudian, ditambahkan 0,5 mL enzim hasil dialisis dan 0,5 mL buffer pengikatan. Sampel diinkubasi pada suhu 4°C selama 30 menit, lalu disentrifugasi 15 menit. Supernatan dipisahkan 0,25 mL untuk dijadikan kontrol uji Mandels, lalu ke dalam matriks-enzim ditambahkan 0,75 mL substrat pati dan diinkubasi pada suhu optimum selama 30 menit. Setelah itu, enzim amobil dipisahkan dari matriksnya melalui sentrifugasi selama 15 menit. Supernatan diambil 0,5 mL sebagai sampel uji Mandels.

3.3.13. Karakterisasi Enzim α -amilase Hasil Pemurnian, Enzim Hasil Imobilisasi dengan Silika Gel 60, dan Hibrida Kitosan-Silika Gel 60

Enzim murni yang digunakan adalah enzim hasil dialisis yang diencerkan 10 kali sedangkan enzim amobil adalah enzim hasil dialisis yang telah melalui tahap imobilisasi pada material kitosan, silika, dan hibrida kitosan-silika.

A. Penentuan Suhu Optimum Enzim α -Amilase Hasil Pemurnian, Enzim Hasil Imobilisasi dengan Silika Gel 60, dan Hibrida Kitosan-Silika Gel 60

Penentuan suhu optimum dilakukan pada variasi suhu inkubasi dalam uji Mandels, yaitu: 50, 55, 60, 65, 70, dan 75°C selama 30 menit (Yandri *et al.*, 2018). Suhu inkubasi yang memberi aktivitas enzim tertinggi ditetapkan sebagai suhu optimum enzim.

B. Penentuan K_M dan V_{maks} Enzim α -Amilase Hasil Pemurnian, Enzim Hasil Imobilisasi dengan Silika Gel 60, dan Hibrida Kitosan-Silika Gel 60

Parameter kinetika, konstanta Michaelis (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}), ditentukan melalui studi pengaruh konsentrasi pati sebagai substrat terhadap enzim murni dan amobil pada variasi konsentrasi berikut: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1,0 % (Robinson, 2015). Enzim diinkubasi pada suhu optimum masing-masing selama 30 menit dan diuji aktivitasnya dengan metode Mandels.

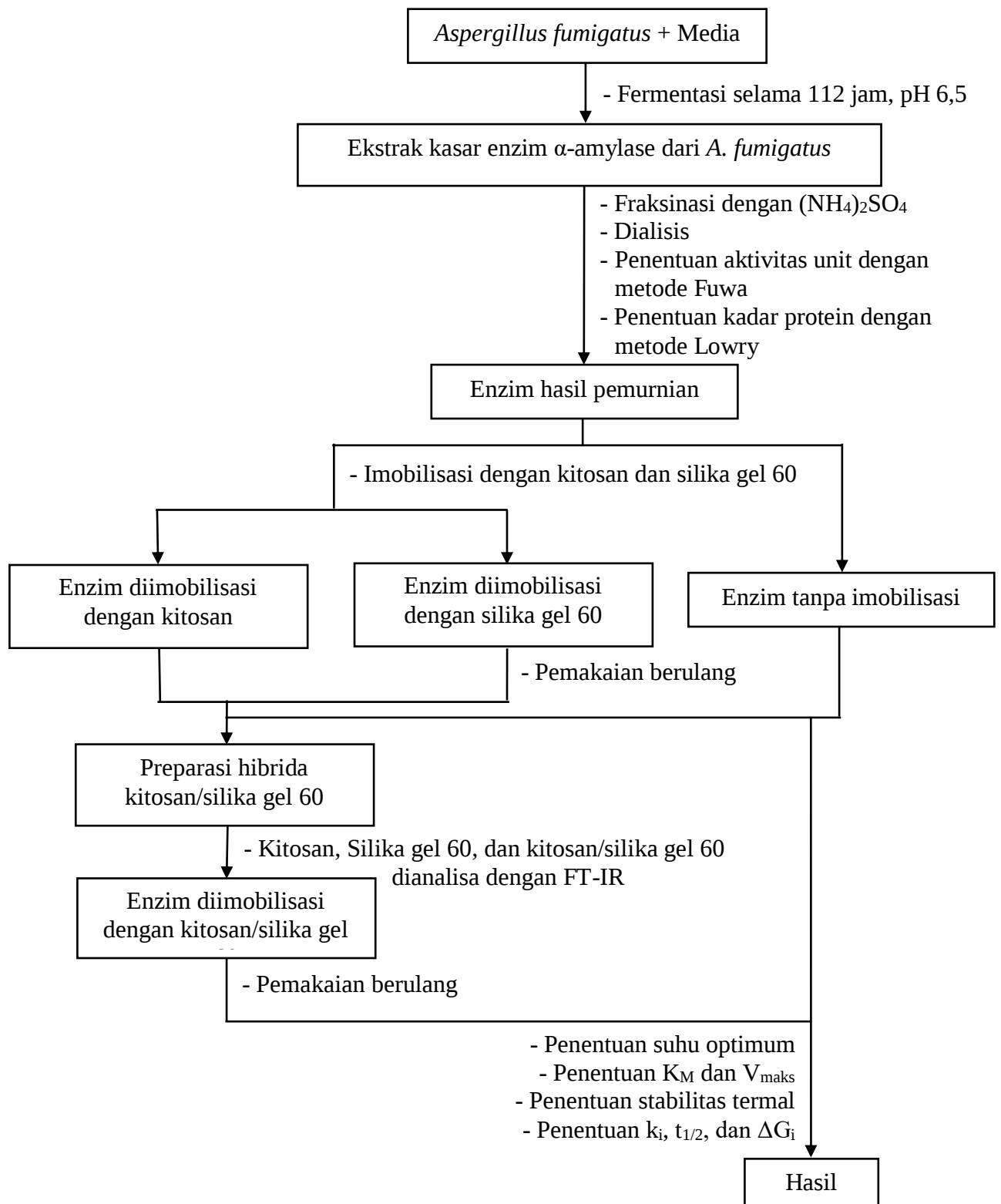
C. Penentuan Kestabilan Termal Enzim α -Amilase Hasil Pemurnian, Enzim Hasil Imobilisasi dengan Silika Gel 60, dan Hibrida Kitosan-Silika Gel 60

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

D. Pemakaian Berulang Enzim α -Amilase Hasil Pemurnian, Enzim Hasil Imobilisasi dengan Silika Gel 60, dan Hibrida Kitosan-Silika Gel 60

Enzim amobil yang telah direaksikan dengan substrat untuk sekali pemakaian dicuci kembali dengan buffer awal melalui sentrifugasi. Supernatan diambil 0,25 mL sebagai kontrol. Kemudian, enzim amobil direaksikan dengan 0,75 mL substrat baru melalui prosedur imobilisasi yang sama. Aktivitas enzim diuji dengan metode Mandels. Prosedur ini dilakukan berulang hingga 6 kali (Baysal *et al.*, 2014).

Skema penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 17.



Gambar 17. Diagram alir penelitian.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Aktivitas spesifik enzim α -amilase hasil pemurnian sampai dengan tahap dialisis yang berasal dari *A. fumigatus* adalah 3.449,43 U/mg dan kemurniannya meningkat 4.9 kali lipat dibandingkan ekstrak kasar enzim.
2. Enzim α -amilase hasil pemurnian memiliki suhu optimum 50°C, $K_M = 3,48 \text{ mg mL}^{-1}$ substrat, $V_{maks} = 12,97 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$, $k_i = 0,0173 \text{ menit}^{-1}$, $t_{1/2} = 39,93 \text{ menit}$, dan $\Delta G_i = 104,43 \text{ kJ mol}^{-1}$.
3. Enzim α -amilase hasil imobilisasi pada matriks silika gel 60 memiliki suhu optimum 55°C, $K_M = 4,62 \text{ mg mL}^{-1}$ substrat, $V_{maks} = 3,73 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$, $k_i = 0,0031 \text{ menit}^{-1}$, $t_{1/2} = 219,81 \text{ menit}$, dan $\Delta G_i = 109,15 \text{ kJ mol}^{-1}$.
4. Enzim α -amilase hasil imobilisasi pada matriks kitosan memiliki suhu optimum 50°C, $K_M = 4,93 \text{ mg mL}^{-1}$ substrat, $V_{maks} = 2,89 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$, $k_i = 0,007 \text{ menit}^{-1}$, $t_{1/2} = 94,18 \text{ menit}$, dan $\Delta G_i = 106,92 \text{ kJ mol}^{-1}$.
5. Enzim α -amilase hasil imobilisasi pada matriks hibrida kitosan–silika gel 60 memiliki suhu optimum 55°C, $K_M = 5,79 \text{ mg mL}^{-1}$ substrat, $V_{maks} = 2,72 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$, $k_i = 0,0026 \text{ menit}^{-1}$, $t_{1/2} = 260,85 \text{ menit}$, dan $\Delta G_i = 109,62 \text{ kJ mol}^{-1}$.
6. Aktivitas sisa enzim α -amilase hasil imobilisasi pada matriks silika gel 60 , kitosan, dan hibrida kitosan–silika gel 60 setelah pemakaian berulang ke-6 berturut-turut sebesar 44,8; 25,1; dan 57,8 %.
7. Uji stabilitas termal pada enzim α -amilase hasil pemurnian pada suhu 60°C selama 80 menit menunjukkan aktivitas sisa sebesar 24,8 %, sedangkan enzim hasil imobilisasi dengan silika gel 60, kitosan, dan hibrida kitosan–silika gel 60

berturut-turut menunjukkan aktivitas sisa sebesar 77,3; 55,1; dan 79 %, pada kondisi yang sama.

8. Imobilisasi enzim α -amilase pada matriks silika gel 60, kitosan, dan hibrida kitosan–silika gel 60 mampu meningkatkan kestabilan berturut-turut sebesar 5,5; 2,4; dan 6,1 kali lipat berdasarkan perbandingan waktu paruh ($t_{1/2}$) terhadap enzim α -amilase hasil pemurnian.

5.2. Saran

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

1. Melakukan pemurnian dan karakterisasi lebih lanjut untuk meningkatkan kemurnian enzim α -amilase.
2. Melakukan imobilisasi dengan matriks lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Aghajari, N., Feller, G., Gerday, C., and Haser, R.. 2002. Structural basis of alpha-amylase activation by chloride. *Protein. Sci.* **11**(6):1435-1441.
- 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.
- Ahmed, K., Valeem, E.E., Khan, M.A., and Haq, Q. 2015. Biosynthesis of alpha amylase from *Aspergillus fumigatus* (Fresenius 1863) in submerged fermentation. *Pak. J. Biotechnol.* **12**(2): 87-92.
- Alnadari, F., Xue, Y., Zhou, L., Hamed, Y. S., Taha, M., and Foda, M. F. 2020. Immobilization of β -glucosidase from *Thermatoga maritima* on chitin-functionalized magnetic nanoparticle via a novel thermostable chitin-binding domain. *Sci. Rep.* **10**(1663): 1-12.
- Al-Sagheer, F., and Muslim, S. 2010. Thermal and mechanical properties of chitosan/SiO₂ hybrid composites. *J. Nanomater.* **3**: 10.
- Anastasescu, C., Anastasescu, and M., Balint, I. 2020. SiO₂-based materials for immobilization of enzymes. nanomaterials - toxicity, human health and environment. *IntechOpen*.
- Battisti, J.A., Rocha, G.B., and Rasbold, L.M. 2024 . Purification, biochemical characterization, and biotechnological applications of a multifunctional enzyme from the *Thermoascus aurantiacus* PI3S3 strain. *Sci. Rep.* **14**: 5037.
- 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.
- Bellino, M.G., Regazzoni, A.E., and Soler-Illia, G.J. 2010. Amylase-functionalized mesoporous silica thin films as robust biocatalyst platforms. *ACS. Appl. Mater. Interfaces.* **2**(2) :360-365.

- Bergthaller, W. and Hollmann, J. 2014. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering: Starch*. Elsevier Inc. London. pp.3-4.
- Bindu, V.U. and Mohanan, P. V. 2017. Enhanced stability of α -amylase via immobilization onto chitosan-TiO₂ nanocomposite. *Nanosci. Technol.* **4**(2): 1-9.
- Brahmachari, G., Demain, A. L., and Adrio, J. L. 2017. *Biotechnology of Microbial Enzymes*. Elsevier Inc. United Kingdom. pp.22.
- Brena, B., González-Pombo, P., and Batista-Viera F. 2013. Immobilization of enzymes: a literature survey. *Methods. Mol. Biol.* **1051**:15-31.
- Cherry, J. R., and Fidantsef, A. L. 2003. Directed evolution of industrial enzymes: An update. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14** (4): 438-443.
- Datta, S., Christena, L.R., and Rajaram, Y.R. 2013. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3. Biotech.* **3**(1):1-9.
- Deb, P., Talukdar, S. A., Mohsina, K., Sarker, P. K., and Sayem, S. A. 2013. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. *SpringerPlus.* **2**(1): 154.
- Diosa, J., Guzmán, F., Bernal, C., and Mesa, M. 2019. Formation mechanisms of chitosan-silica hybrid materials and its performance as solid support for KR-12 peptide adsorption: Impact on KR-12 antimicrobial activity and proteolytic stability. *J. Mater. Res. Technol.* **9**(1): 890-901.
- Dhawade, P., and Jagtap, R.N. 2012. Comparative study of physical and thermal properties of chitosan-silica hybrid coatings prepared by sol-gel method. *Chem. Sin.* **3**(3): 589-601.
- Doğaç, Y.I., Deveci, İ., Teke, M., and Mercimek, B. 2014. TiO₂ beads and TiO₂-chitosan beads for urease immobilization. *Mater. Sci. Eng. C.* **42**: 429–435
- Duong-Ly, K.C., and Gabelli, S.B. 2014. Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. *Methods. Enzymol.* **541**:85-94.
- Ebisike, K., Okoronkwo, A.E., and Alaneme, K.A. 2018. Synthesis and characterization of chitosan–silica hybrid aerogel using sol-gel method. *J. King. Saud. Univ. Sci.* **32**(1) : 550-554.
- Eveleigh, D. E., Mandels, M., Andreotti, R., and Roche, C. 2009. Measurement of saccharifying cellulose. *Biotechnol. Biofuels.* **2**(21): 1-8.
- Far, B. E., Ahmadi, Y., Khosroushahi, A. Y., and Dilmaghani, A. 2020. Microbial alpha-amylase production: progress, challenges and perspectives. *Adv. Pharm. Bull.* **10**(3): 350-358.

- Faustini, M., Nicole, L., Ruiz-Hitzky, E., and Sanchez, C. 2018. History of organic–inorganic hybrid materials: prehistory, art, science, and advanced applications. *Adv. Funct. Mater.* **28**(27): 1-30.
- Fitter, J. 2005. Structural and dynamical features contributing to thermostability in α -amylases. *Cell. Mol. Life.* **62**(17): 1925-1937.
- Gao, Y., Ru, Y., Zhou, L., Wang, X., and Wang, J. 2018. Preparation and characterization of chitosan-zeolite molecular sieve composite for ammonia and nitrate removal. *Adv. Compos. Lett.* **27**(5): 185-192.
- Gee, C. L., Holton, J. M., and McPherson, A. 2021. Structures of two novel crystal forms of *Aspergillus oryzae* alpha amylase (taka-amylase). *J. Biosci. Bioeng.* **131**(6): 605–612.
- Ghiaci, M., Aghaei, H., Soleimanian, S., and Sedaghat, M. E. 2009. Enzyme immobilization Part 1. Modified bentonite as a new and efficient support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. *Appl. Clay. Sci.* **43** (3-4): 289-295.
- Girelli, A.M., Quattrocchi, L., and Scuto, F.R. 2020. Silica-chitosan hybrid support for laccase immobilization. *J. Biotechnol.* **318**:45-50.
- Gonçalves, P., Melo, A., Dias, M. and Almeida, B. 2020. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* harboring the tr34/l98h mutation: First report in Portugal in environmental samples. *Microorganisms.* **9**(1): 2-10.
- Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F., and Stevanato, R. 2013. Enzyme immobilization: an update. *J. Chem. Biol.* **6**(4): 185–205.
- Hwang, E. T. and Gu, M. B. 2013. Enzyme stabilization by nano/microsized hybrid materials. *Eng. Life Sci.* **13**(1): 49-61.
- Kaushal, J., Seema, S., Singh, G., and Arya, A. K. 2018. Immobilization of catalase onto chitosan and chitosan–bentonite complex: a comparative study. *Biotechnol. Rep.* **18**: 1-7.
- Kickelbick, G. *Introduction to hybrid materials*. 2002. Hybrid Materials: synthesis, characterization, and applications chapter 1. Wiley One Library.
- Lewis, T., and Stone, W.L. 2023. *Biochemistry, Proteins enzymes*. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Lujan, M.J. and Ary, T.S. 2014 *Crystalline Silica Primer*. Staff, Branch of Industrial Minerals. Bureau of Mines
- Ma, S.F., Nishikawa, M., Yabe, Y., Yamashita, F., Hashida, M. 2006. Role of tyrosine and tryptophan in chemically modified serum albumin on its tissue distribution. *Biol. Pharm. Bull.* **29**(9):1926-1930.

- Nassar, F.R., Abdelhafez, A.A., El-Tayeb, T.S., and Abu-Hussein, S.H. 2015. Purification, characterization and applications of proteases produced by *Bacillus amyloliquefaciens* 35s isolated from soil of the Nile delta of Egypt. *Br. Microbiol. Res. J.* **6**(5): 286-302.
- 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.
- Nwagu, T. N., Okolo, B. N., and Aoyagi, H. 2011. Immobilization of raw starch digesting amylase on silica gel: A comparative study. *Afr. J. Biotechnol.* **10**(71):15989-15997.
- Okafor, N. and Okeke, B. C. 2018. *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology Second Edition*. CRC Press Taylor and Francis Group. Boca Raton. 489.
- Pace, C.N., Fu, H., Lee, F.K., Landua, J., Trevino, S.R., Schell, D., Thurlkill, R.L., Imura, S., Scholtz, J.M., Gajiwala, K., Sevcik, J., Urbanikova, L., Myers, J.K., Takano, K., Hebert, E.J., Shirley, B.A., and Grimsley, G.R. 2014. Contribution of hydrogen bonds to protein stability. *Protein Sci.* **23**(5): 652-661.
- Parameswaran, B., Varjani, S., and Raveendran, S. 2019. *Green Bio-processes, Energy, Environment, and Sustainability*. Springer Nature Singapore Pte Ltd. Singapore. pp. 451.
- Patel, S.K., Kalia V.C., Choi J.H., Haw J.R., Kim I.W., and Lee J.K. 2014. Immobilization of laccase on SiO₂ nanocarriers improves its stability and reusability. *J Microbiol. Biotechnol.* **24**(5):639-47.
- Perez, J. J., Villanueva, M. M., Sánchez, L., Olliere, R., Alvarez, V., and Copello, G. J. 2020. Low cost and regenerable composites based on chitin/bentonite for the adsorption potential emerging pollutants. *Appl. Clay. Sci.* **194**: 1-7.
- Rahmadina, H. F. 2017. *Biologi Sel Unit Terkecil Penyusun Tubuh Makhluk Hidup*. Cv Selemba Papyrus. Surabaya.
- Rana, M., Kumari, A., Chauhan, G.S., and Chauhan, K. 2014. Modified chitosan microspheres in non-aggregated amylase immobilization. *Int. J. Biol. Macromol.* **66**: 46-51.
- 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.

- Ricci, F., Chen, W., and Aydemir, U. 2007. An ab initio electronic transport database for inorganic materials. *Sci. Data*. **4**: 170085.
- Rizki, K., Pranowo D., and Raharjo, T. J. 2020. Immobilization of lipase in silica gel from rice husk ash and its activity assay to hydrolyze palm oil. *BIO. Web. Conf.* **28** : 03005.
- Robinson, P. K. 2015. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays. Biochem*, **59**:1–41.
- Rurack, K. and Manez, R.M. 2010. *The Supramolecular Chemistry of Organic-Inorganic Hybrid Materials. Hybrid (Nano)Materials Meet Supramolecular Chemistry: A Brief Introduction To Basic Terms And Concepts*. John Wiley and Sons, Inc. New York. pp.1-10.
- Rydberg, E.H., Li, C., Maurus, R., Overall, C.M., Brayer, G.D., and Withers, S.G. Mechanistic analyses of catalysis in human pancreatic alpha-amylase: detailed kinetic and structural studies of mutants of three conserved carboxylic acids. 2002. *Biochemistry*. **41**(13): 4492–4502.
- 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. *IJSR*. **4**(10): 681-684.
- Saqib, A.A., and Siddiqui, K.S. 2018. How to calculate thermostability of enzymes using a simple approach. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **46**(4):398-402.
- Saqib, A.A., and Whitney, P.J. 2011. Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars. *Biomass. Bioenergy*. **35**: 4748-4750.
- Singh R., Mittal A., Kumar M., and Mehta P. K. 2016. Microbial protease in commercial applications. *JPCBS*. **4**: 365–374.
- Singh, S., and Guruprasad, L. 2014. Structure and sequence based analysis of alpha-amylase evolution. *Protein. Pept. Lett.* **21**(9): 948-956.
- Souza, P. M., and Magalhães, P. 2010. Application of microbial α -amylase in industry-A Review. *Braz. J. Microbiol.* **41**(4): 850–861.
- Tadjarodi, A., Haghverdi, M., Mohammadi, V., and Rajabi, M. 2013. Synthesis and characterization of hydrophobic silica serogel by two step (acid-base) sol-gel process. *J. Nanostruct.* **3**(2), 181-189.
- Tiarsa, E. R. 2022. Studi komparatif: peningkatan kestabilan enzim α -Amilase dari *Aspergillus fumigatus* menggunakan metode amobilisasi pada material kitin, bentonit, dan hibrida kitin-bentonit. *Tesis*. Lampung: Universitas Lampung. Hal. 59-60;93.

- Tiarsa, E. R., Yandri, Y., Suhartati, T., Satria, H., Irawan, B., and Hadi, S. 2022. The stability improvement of *Aspergillus fumigatus* α -amylase by immobilization onto chitin-bentonite hybrid. *Biochem. Res. Int.* **2022**: 1–9.
- Veerdonk, V.F.L., Gresnigt, M.S., Romani, L., Netea, M.G., and Latgé, J.P. 2017. *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**(11): 661-674.
- Virgen-Ortíz, J.J., Ibarra-Junquera, V., Osuna-Castro, J.A., Escalante-Minakata, P., Mancilla-Margalli, N.A., and Ornelas-Paz, J.J. 2012. Method to concentrate protein solutions based on dialysis-freezing-centrifugation: enzyme applications. *Anal. Biochem.* **426**(1):4-12.
- Xian, L., Wang, F., Luo, X., Feng Y. L., and Feng J. X. 2015. Purification and characterization of a highly efficient calcium-independent α -amylase from *Talaromyces pinophilus* 1-95. *PloS. one.* **10** (3): 1-18.
- Xiao, Z., Storms, R., and Tsang, A. 2006. A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. *Anal. Biochem.* **351**(1):146-148.
- Yang, Y. M., Wang, J. W., and Tan, R. X. 2004. Immobilization of glucose oxidase on chitosan-SiO₂ gel. *Enzyme. Microb. Technol.* **34**(2): 126–131.
- Yandri, Y., Ropingi, H., Suhartati, T., Hendri, J., Irawan, B., and Hadi, S. 2022. The effect of zeolite/chitosan hybrid matrix for thermal-stabilization enhancement on the immobilization of *Aspergillus fumigatus* α -amylase. *Emerg. Sci. J.* **6**(3): 505–518.
- Yandri, A. S. dan Suhartati, T. 2018. *Peningkatan Kestabilan Enzim*. CV. Anugrah Utama Raharja. Bandar Lampung. 110.
- Yandri, Y., Suhartati, T., and Hadi, S. 2010. Purification and characterization of extracellular α -amylase enzyme from locale bacteria isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148. *Eur. J. Sci. Res.* **39**(1): 64-74.
- Yandri, Y., Suhartati, T., Hadi, S., Satria, H., Widyasmara, A., and Hadi, S. 2020. Increasing stability of α -amylase obtained from *Bacillus subtilis* ITBCCB148 by immobilization with chitosan. *Mediterr. J. Chem.* **10**(2):155-161.
- Yandri, Y., Suhartati, T., Yuwono, S. D., Qudus, H. I., Tiarsa, E. R., and Hadi, S. 2018. Immobilization of α -amylase from *Bacillus subtilis* ITBCCB148 using bentonite. *Asian J. Microbiol. Biotech. Env. Sci.* **20**(2): 487-492.

- Yandri, Y., Tiarsa, E. R., Suhartati, T., Irawan, B., and Hadi, S. 2022. Immobilization and stabilization of *Aspergillus fumigatus* α -amylase by adsorption on a chitin. *Emerg. Sci. J.* **7**(1): 77–89.
- Zdarta, J., Meyer, A. S, Jesionowski, T., and Pinelo, M. A. 2018. A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility. *Catalyst.* **8**(92): 1-27.
- Zusfahair, Ningsih, D.R., Kartika, D., Fatoni, A., and Zuliana, A.L. 2016. *Bacillus thuringiensis* HCB6 amylase immobilization by chitosan beads. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **172** :1-9.