

**STUDI PENGARUH PENAMBAHAN MANITOL TERHADAP STABILITAS  
ENZIM  $\alpha$ -AMILASE DARI *Aspergillus sp.***

**(Skripsi)**

**Oleh**

**HARRY FIRMANDA  
NPM 2117011053**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2025**

## **ABSTRAK**

### **STUDI PENGARUH PENAMBAHAN MANITOL TERHADAP STABILITAS ENZIM $\alpha$ -AMILASE DARI *Aspergillus sp.***

**Oleh**

**HARRY FIRMANDA**

Enzim merupakan suatu biokatalisator yang sedang dikembangkan di bidang industri, salah satunya enzim  $\alpha$ -amilase. Di dunia industri penggunaan enzim sudah harus menyesuaikan dengan kriteria yang dibutuhkan, diantaranya memiliki tingkat kestabilan pada kondisi suhu tinggi dan pH yang ekstrem.

Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan stabilitas enzim  $\alpha$ -amilase dari isolat *Aspergillus sp.* dengan pemanfaatan zat aditif berupa manitol. Tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi; produksi, isolasi, pemurnian dengan dua tahap yaitu fraksinasi dengan amonium sulfat dilanjutkan dengan tahap dialisis dan karakterisasi enzim  $\alpha$ -amilase hasil dialisis dan setelah penambahan manitol 0,2; 0,4; dan 0,5 M.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa enzim  $\alpha$ -amilase hasil dialisis dengan aktivitas spesifik sebesar 3.846,472 U/mg mengalami peningkatan sebesar 11 kali lipat dibandingkan ekstrak kasar enzim yang memiliki aktivitas spesifik sebesar 326,448 U/mg. Hasil karakterisasi menunjukkan enzim hasil dialisis dan penambahan manitol (0,2; 0,4; dan 0,5 M) memiliki pH dan suhu optimum yang sama yaitu 4,0 dan 65 °C. Uji stabilitas termal dilakukan pada suhu 60 °C selama 100 menit. Enzim hasil dialisis memiliki aktivitas sisa sebesar 71,336 % dengan waktu paruh 247,5525 menit, sedangkan enzim hasil penambahan manitol 0,2; 0,4; dan 0,5 M menunjukkan aktivitas sisa berturut-turut sebesar 71,362; 84,912; dan 72,902 % serta waktu paruh 266,5950; 533,1901; dan 256,7211 menit. Peningkatan stabilitas enzim hasil penambahan manitol 0,2; 0,4; dan 0,5 M berturut-turut sebesar 1,07; 2,15; dan 1,03 kali dibandingkan dengan enzim hasil dialisis.

Kata kunci:  $\alpha$ -amilase, *Aspergillus sp.*, manitol, kestabilan enzim

## **ABSTRACT**

### **STUDY OF THE EFFECT OF ADDITION OF MANNITOL ON THE STABILITY OF $\alpha$ -AMYLASE ENZYME FROM *Aspergillus sp.***

**By**

**HARRY FIRMANDA**

Enzymes are biocatalysts currently being developed in industry, one of which is  $\alpha$ -amylase. In the industrial world, enzymes must meet specific requirements, including stability at high temperatures and extreme pH.

This study aims to improve the stability of the  $\alpha$ -amylase enzyme from *Aspergillus sp.* isolates by utilizing mannitol as an additive. The stages carried out in this study include production, isolation, and purification in two stages: fractionation with ammonium sulfate followed by dialysis and characterization of the  $\alpha$ -amylase enzyme resulting from dialysis and after the addition of 0.2, 0.4, and 0.5 M mannitol.

The results of the study showed that the  $\alpha$ -amylase enzyme from dialysis with a specific activity of 3,846.472 U/mg experienced an 11-fold increase compared to the crude enzyme extract which had a specific activity of 326.448 U/mg. The characterization results showed that the enzyme from dialysis and the addition of mannitol (0.2; 0.4; and 0.5 M) had the same optimum pH and temperature, namely 4.0 and 65 °C. Thermal stability test was conducted at 60 °C for 100 minutes. The dialyzed enzyme had a residual activity of 71.336 % with a half-life of 247.5525 minutes, while the enzyme with the addition of 0.2; 0.4; and 0.5 M mannitol showed a residual activity of 71.362; 84.912; and 72.902 %, respectively, and a half-life of 266.5950; 533.1901; and 256.7211 minutes. The increase in enzyme stability from the addition of 0.2; 0.4; and 0.5 M mannitol was 1.07; 2.15; and 1.03 times, respectively, compared to the dialyzed enzyme.

Keywords:  $\alpha$ -amylase, *Aspergillus sp.*, mannitol, enzyme stability

**STUDI PENGARUH PENAMBAHAN MANITOL TERHADAP STABILITAS  
ENZIM  $\alpha$ -AMILASE DARI *Aspergillus sp.***

**Oleh**

**HARRY FIRMANDA**

**Skripsi**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar  
SARJANA SAINS**

**Pada**

**Jurusan Kimia  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2025**

Judul Penelitian

: STUDI PENGARUH PENAMBAHAN MANITOL  
TERHADAP STABILITAS ENZIM  $\alpha$ -AMILASE  
DARI *Aspergillus sp.*

Nama Mahasiswa

: Harry Firmando

Nomor Pokok Mahasiswa

: 2117011053

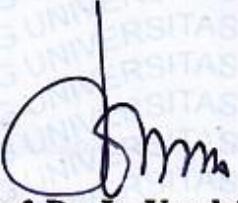
Program Studi

: Kimia

Fakultas

: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



  
Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S.  
NIP. 19509051992031001

  
Prof. Dr. Sutopo Hadi, S.Si., M.Sc.  
NIP. 197104151995121001

2. Ketua Jurusan Kimia

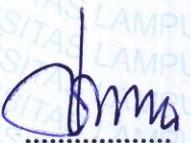
  
Prof. Dr. Mita Rilyanti S.Si., M.Si.  
NIP. 197205302000032001

## **MENGESAHKAN**

### **1. Tim Pengaji**

Ketua

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



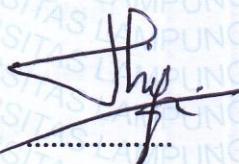
Sekretaris

: Prof. Dr. Sutopo Hadi, S.Si., M.Sc.

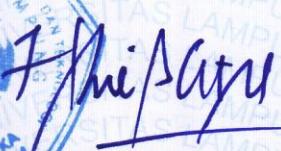


Anggota

: Dr. Syaiful Bahri, S.Si., M.Si.



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



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

NIP. 197110012005011002

**Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 11 Juli 2025**

## **SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI**

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Harry Firmanda  
NPM : 2117011053  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya, bahwa skripsi saya yang berjudul: "**Studi Pengaruh Penambahan Manitol Terhadap Stabilitas Enzim  $\alpha$ -Amilase dari *Aspergillus sp.***" adalah benar karya saya sendiri, baik ide, gagasan, analisis, dan hasilnya. Selanjutnya saya juga tidak keberatan jika data yang ada dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen ataupun program studi terkait kepentingan publikasi, sepanjang nama saya disebutkan dan terdapat kesepakatan sebelum dilakukan publikasi.

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

Bandar Lampung, 23 Juli 2025  
Yang Menyatakan,



## **RIWAYAT HIDUP**



Penulis bernama lengkap Harry Firmando, dilahirkan di Kuripan, pada tanggal 10 November 2003. Penulis merupakan anak kedua dari 3 bersaudara, putra dari Bapak Amir Hamzah dan Ibu Masni.

Jenjang Pendidikan penulis diawali dari Sekolah Dasar Negeri (SDN) 1 Rawi pada tahun 2010-2016. Kemudian, melanjutkan jenjang Sekolah Menengah Tingkat Pertama di SMPN 1 Penengahan pada tahun 2016-2019 dan Sekolah Menengah Atas di MAN 1 Lampung Selatan. Pada tahun 2019, penulis terdaftar sebagai mahasiswa Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN).

Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif dalam kegiatan organisasi kampus meliputi Himpunan Mahasiswa Kimia menjabat sebagai anggota Biro Usaha mandiri pada periode 2022-2023 dan Rohani Islam (ROIS) FMIPA Unila menjabat sebagai Kepala Bidang Kaderisasi pada periode 2023-2024. Pada tahun 2024 penulis melaksanakan program kampus yaitu Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Sripendowo, Kecamatan Bandar Sribhawono, Kabupaten Lampung Timur selama 40 hari. Pada tahun 2023-2024 penulis telah menyelesaikan Praktik Kerja Lapangan di Laboratorium Biokimia. Selain itu, pada tahun 2024-2025 penulis juga pernah menjadi asisten praktikum Biokimia Jurusan Kimia dan asisten praktikum biokimia Jurusan Biologi.

## **MOTTO**

**فَإِنَّ مَعَ الْعُسْرِ يُسْرًا**

**Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan  
(Q.S. Al-Insyirah: 5)**

**وَمَن يَتَوَكَّلْ عَلَى اللَّهِ فَهُوَ حَسْبُهُ**

**Barangsiapa bertawakal kepada Allah, niscaya Allah akan mencukupkan  
(keperluannya)  
(Q.S. At-Talaq: 3)**

**Ilmu itu cahaya, dan cahaya itu tidak akan masuk ke dalam hati yang dipenuhi  
oleh kesombongan  
(Imam Syafi'i)**

**Kesempatan emas yang kau cari ada di dalam dirimu sendiri  
(Orison Sweet Marden)**

**“From Zero To Hero”**

**RIGE**

## **PERSEMBAHAN**

**Segala puji dan syukur kepada Allah SWT serta selawat salam kepada  
junjungan besar Nabi Muhammad SAW dengan keikhlasan hati aku  
persesembahkan karya ini kepada:**

### **Kedua orang tuaku**

Bapak Amir Hamzah dan Ibu Masni yang telah mendidik, membina sekaligus membesarkan penulis sampai pada tahap yang luar biasa ini, selalu memberikan semangat, nasehat, doa, dan dukungan baik materil maupun moril demi keberhasilan penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan karya sederhana ini sebagai bakti atas perjuangan kedua orang tua.

**Abang dan adekku tercinta**, Rizky Rafriansyah dan Khoirul Huda serta seluruh keluarga besar yang selalu memotivasi setiap waktu untuk keberhasilan penulis yang akhirnya dapat menyelesaikan karya ini.

**Pembimbing Penelitianku**, Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S. dan Prof Dr. Sutopo Hadi, S.Si., M.Sc. yang selalu sabar dalam membimbing prosesku.

**Seluruh sahabat dan teman-teman seperjuangan**, yang selalu memberikan waktu luang untuk menyemangati, bertukar pikiran, dan berbagi pengalaman.

Almamater tercinta,  
“Universitas Lampung”

## SANWACANA

Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.

Alhamdulillah puji dan syukur penulis ucapkan kepada Allah SWT serta selawat dan salam selalu tercurahkan kepada junjungan Nabi Muhammad saw atas segala limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "**Studi Pengaruh Penambahan Manitol Terhadap Stabilitas Enzim  $\alpha$ -Amilase dari *Aspergillus sp.***" Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung. Pada kesempatan ini penulis menyampaikan banyak terima kasih atas kritik, saran, dukungan, dan doanya dari berbagai pihak selama penulis menempuh studi dan penyusunan skripsi ini. Sehubungan dengan ini penulis menyampaikan terimakasih kepada:

1. Kedua orang tua tercinta, Bapak Amir Hamzah dan Ibu Masni yang telah mendidik, membentuk karakter yang baik, dan memperjuangkan pendidikan anak keduanya ini supaya dapat dijadikan bekal dalam menjalani kehidupan ke depan dan kelak menjadikan anak yang bermanfaat bagi lingkungan sekitar.
2. Abang dan adek tercinta, Rizky Rafriansyah dan Khoirul Huda yang telah memotivasi dan menemani sekaligus menyemangati disetiap saat.
3. Saudara-saudaraku, Doni, Om Ijal, Om Delah, Om Wan, Ayah Iman, Minan Rat, Minan Nur, Mak Wo Jum, Mak Wo Siti, Ayah Man, Mak Wo Teluk Nenek Mar, Nenek Pesisir, Datuk Ali, dan Datuk Rusli yang selalu memberikan dukungan dan doanya selama penulis menempuh pendidikan di Universitas Lampung.
4. Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S. selaku Pembimbing I atas kesediaan dan keikhlasannya dalam memberikan saran, kritik, bimbingan maupun arahan

sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan skripsi ini. Semoga Allah SWT senantiasa menaungi beliau dalam kesehatan dan kebahagiaan.

5. Bapak Prof. Dr. Sutopo Hadi, S.Si., M.Sc. selaku pembimbing II atas kesediaannya dalam memberikan waktu luang kepada penulis disela-sela kesibukannya sebagai dosen yang telah membimbing, membina, dan memotivasi baik dalam hal apapun sampai penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
6. Bapak Dr. Syaiful Bahri, S.Si., M.Si. selaku penguji atas kesediaan waktunya untuk mengikuti semua kegiatan sidang penulis dengan kerendahan hati dan keikhlasannya telah banyak memotivasi dan menambah wawasan penulis supaya lebih giat lagi dalam mempelajari hal yang sedang ditekuni.
7. Bapak Radho Al Kausar, S.Si., M.Si. selaku pembimbing akademik penulis dengan kesediaan waktunya dalam membimbing, memberi arahan dan masukan selama penulis menjadi mahasiswa Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
8. Bapak Dr. Eng Heri Satria, M.Si. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
9. Ibu Prof. Dr. Mita Rilyanti, M.Si. selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
10. Seluruh dosen dan staff administrasi di Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung yang telah memberikan ilmu pengetahuan maupun wawasan selama penulis mengikuti kegiatan perkuliahan.
11. Mba Dela selaku PLP Laboratorium Biokimia yang telah banyak membantu selama penulis melakukan kegiatan penelitian mulai dari awal hingga akhir penelitian sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
12. Mba Stephani, Mba Depa, Mba Maria, Mba Avi, dan Mba Eza yang telah banyak memberikan informasi dan pengalamannya selama proses penelitian berlangsung sampai penulis dapat menyelesaikan berbagai rintangan dan tantangan dari penelitian ini.

13. Kawan-Kawan PY'21, Anam, Talfa, dan Ulma yang selalu membantu dan menjalani bersama-sama dalam menyelesaikan penelitian sehingga sampai pada tahap kita dapat meraih gelar Sarjana Sains tersebut.
14. Kawan-Kawan BNH'21, PM'21, HR'21, PW'21, BK'21 dan BI'21 yang telah memberikan banyak dukungan, berbagi cerita sekaligus membantu penulis di tengah kesibukan dalam melakukan penelitian.
15. Kawan-Kawan Kelas B'21, yang telah membuatkan banyak cerita perjalanan penulis selama menuntut ilmu di Jurusan Kimia
16. Kawan-Kawan ROIS'21 dan ROIS'20 yang telah membuat cerita dunia perkuliahan dan selalu mengingatkan akan pentingnya sholat disela-sela kesibukan dunia.
17. Kawan-Kawan Majelis Al Iman, Bang Hani, Daffa, Sahrul, dan.. yang telah menemani penulis untuk siraman hati lewat kajian maupun kegiatan lainnya disaat lelah menjalani dunia perkuliahan
18. Kawan-Kawan Majelis Baitul Hikmah, Bang Muzakir dan masyarakat lainnya yang memotivasi penulis untuk terus mendekatkan diri kepada Allah SWT lewat kajian islamnya.
19. Kawan-Kawan Asrama Balik Lampung, Bang Yusrizal, Bang Bayu, Bang Dimas, Bang Figo dan lainnya yang telah memberi warna semangat dalam mencari ilmu di dunia kampus.
20. Abang-Abang Senior Unila, Bang Azis dan Bang Robby yang telah banyak membantu sekaligus memberi saran serta nasihat dalam meniti karir juga masa depan
21. Rekan-Rekan Pencari Rezeki Tuhan, Pak Ali, Ustadz Wahab, Ustad Firman, Om Syamsir, Bang Jun, Yoga, Tama, dan Danu yang telah bersama-sama saling membantu dalam mencari rezeki untuk memenuhi kebutuhan sehari-hari.
22. Diri saya sendiri, Harry Firmando terima kasih sudah mau bekerja sama dengan baik ketika berada dalam keadaan yang benar-benar terpuruk sekalipun, terimakasih sudah selalu mengusahakan target yang telah dibuat, kesanggupan

fisik maupun rohani untuk terus berkembang dan segala usaha mengendalikan diri dengan baik ketika berada dalam tekanan yang cukup diluar kendali.

23. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu telah memberikan bantuan, arahan, nasehat, dan saran dalam penulis menyusun skripsi ini.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa skripsi ini tidaklah lepas dari kekurangan. Namun, penulis berharap skripsi ini dapat dimanfaatkan dan digunakan sebagaimana mestinya bagi teman-teman khususnya mahasiswa kimia dan pembaca pada umumnya, penulis ucapkan banyak terima kasih.

Bandar Lampung, 23 Juli 2025  
Penulis,

Harry Firmanda

## DAFTAR ISI

Halaman

<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR TABEL.....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR RUMUS .....</b>	<b>xv</b>
<b>I. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan Penelitian .....	6
1.3 Manfaat Penelitian .....	6
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>7</b>
2.1 Enzim .....	7
2.2 Enzim $\alpha$ -Amilase .....	8
2.3 <i>Aspergillus sp.</i> .....	11
2.4 Singkong .....	12
2.5 Stabilitas Enzim .....	14
2.6 Pengujian Aktivitas $\alpha$ -Amilase dengan Metode Mandels.....	15
2.7 Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry .....	15
2.8 Kinetika Reaksi Enzim .....	16
2.9 Manitol.....	17
<b>III. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>19</b>
3.1 Waktu dan Tempat.....	19

3.2 Alat dan Bahan.....	19
3.2.1 Alat.....	19
3.2.2 Bahan.....	20
3.3 Prosedur Penelitian .....	20
3.3.1 Peremajaan <i>Aspergillus sp.</i> .....	20
3.3.2 Pembuatan media inokulum dan fermentasi <i>Aspergillus sp.</i> , serta produksi enzim .....	20
3.3.3 Isolasi dan pemurnian enzim $\alpha$ -amilase .....	21
3.3.4 Uji aktivitas enzim $\alpha$ -amilase dengan metode Fuwa .....	25
3.3.5 Uji aktivitas enzim $\alpha$ -amilase dengan metode Mandels.....	26
3.3.6 Penentuan kadar protein metode Lowry .....	27
3.3.7 Penambahan manitol.....	27
3.3.8 Karakterisasi enzim $\alpha$ -amilase .....	28
3.4 Diagram Alir .....	29
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>31</b>
4.1 Produksi dan Isolasi Enzim $\alpha$ -Amilase .....	31
4.2 Pemurnian Enzim $\alpha$ -Amilase .....	31
4.2.1 Fraksinasi menggunakan amonium sulfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ .....	32
4.2.2 Dialisis .....	34
4.3 Karakterisasi Enzim $\alpha$ -amilase dari <i>Aspergilus sp.</i> Hasil Dialisis dan Setelah Penambahan Manitol.....	36
4.3.1 Penentuan pH optimum enzim hasil dialisis dan setelah penambahan manitol.....	36
4.3.2 Penentuan suhu optimum enzim hasil dialisis dan setelah penambahan manitol.....	37
4.3.3 Penentuan $K_M$ dan $V_{\text{maks}}$ enzim dialisis dan setelah penambahan manitol .....	39
4.3.3 Penentuan stabilitas termal enzim hasil dialisis dan setelah penambahan manitol.....	40
4.3.5 Penentuan konstanta laju inaktivasi ( $k_i$ ), waktu paruh ( $t_{1/2}$ ) dan perubahan energi akibat denaturasi ( $\Delta G_i$ ) enzim hasil dialisis dan setelah penambahan manitol.....	42
<b>V. SIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>44</b>
5.1 Simpulan .....	44

5.2. Saran .....	45
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>46</b>

## **DAFTAR GAMBAR**

Gambar	Halaman
1. Struktur enzim $\alpha$ -amilase .....	10
2. Jamur <i>Aspergillus sp.</i> .....	11
3. Singkong .....	13
4. Diagram persamaan Lineweaver-Burk .....	17
5. Struktur sorbitol dan manitol .....	18
6. Skema fraksinasi dengan amonium sulfat.....	23
7. Diagram alir penelitian.....	30
8. Grafik hubungan antara tingkat kejemuhan amonium sulfat dengan aktivitas spesifik enzim $\alpha$ -amilase .....	32
9. Grafik hubungan antara tingkat kejemuhan amonium sulfat fraksi 0-20 dan 20-90 % dengan aktivitas spesifik enzim $\alpha$ -amilase .....	34
10. Grafik pH optimum aktivitas unit enzim enzim $\alpha$ -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i> hasil dialisis dan setelah penambahan manitol .....	37
11. Grafik suhu aktivitas unit enzim enzim $\alpha$ -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i> hasil dialisis dan Penambahan Manitol. ....	38
12. Grafik Lineweaver-Burk enzim $\alpha$ -amilase hasil dialisis dan setelah penambahan manitol .....	39
13. Grafik hubungan antara stabilitas termal enzim dialisis dan setelah penambahan manitol .....	41

14. Grafik $\ln(E_i/E_o)$ enzim $\alpha$ -amilase hasil dialisis dan setelah penambahan manitol.....	42
15. Kurva standar Bovine Serum Albumin (BSA) .....	70
16. Kurva standar glukosa.....	71

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Perhitungan massa garam amonium sulfat untuk fraksinasi dengan berbagai persentase kejemuhan .....	24
2. Rangkuman hasil pemurnian enzim $\alpha$ -amilase dari <i>Aspergillus sp</i> .....	35
3. Nilai $K_M$ dan $V_{maks}$ enzim $\alpha$ -amilase dialisis dan setelah penambahan manitol ...	40
4. Nilai konstanta laju inaktivasi ( $k_i$ ), waktu paruh ( $t_{1/2}$ ), dan perubahan energi akibat denaturasi ( $\Delta G_i$ ) enzim dialisis dan setelah penambahan manitol.....	43
5. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode Fuwa ( $\lambda_{maks}$ 600nm) pada ekstrak kasar enzim, hasil fraksinasi, dan hasil dialisis.....	54
6. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode Lowry ( $\lambda_{maks}$ 750nm) pada ekstrak kasar enzim, hasil fraksinasi, dan hasil dialisis.....	55
7. Hubungan antara persen kejemuhan amonium sulfat dengan aktivitas spesifik enzim $\alpha$ -amilase dari <i>Aspergillus sp</i> .....	56
8. Hubungan antara persen kejemuhan amonium sulfat (0-20) dan (20-90)% dengan aktivitas spesifik enzim $\alpha$ -amilase dari <i>Aspergillus sp</i> .....	56
9. Hubungan antara pH dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim $\alpha$ -amilase dari <i>Aspergillus sp</i> . hasil dialisis.....	57
10. Hubungan antara pH dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim $\alpha$ -amilase dari <i>Aspergillus sp</i> . hasil penambahan manitol 0,2 M.....	57
11. Hubungan antara pH dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim $\alpha$ -amilase dari <i>Aspergillus sp</i> . hasil penambahan manitol 0,4 M.....	58

12. Hubungan antara pH dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim $\alpha$ -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i> hasil penambahan manitol 0,5 M.....	58
13. Hubungan antara suhu dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim $\alpha$ -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i> hasil dialisis. ....	60
14. Hubungan antara suhu dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim $\alpha$ -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i> hasil penambahan manitol 0,2 M.....	60
15. Hubungan antara suhu dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim $\alpha$ -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i> hasil penambahan manitol 0,4 M.....	61
16. Hubungan antara suhu dengan absorbansi, aktivitas unit, dan aktivitas sisa enzim $\alpha$ -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i> hasil penambahan manitol 0,5 M.....	61
17. Hubungan antara konsentrasi substrat dengan absorbansi dan aktivitas unit enzim $\alpha$ -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i> hasil dialisis .....	62
18. Hubungan antara konsentrasi substrat dengan absorbansi dan aktivitas unit enzim $\alpha$ -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i> hasil penambahan manitol 0,2 M.....	62
19. Hubungan antara konsentrasi substrat dengan absorbansi dan aktivitas unit enzim $\alpha$ -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i> hasil penambahan manitol 0,4 M.....	62
20. Hubungan antara konsentrasi substrat dengan absorbansi dan aktivitas unit enzim $\alpha$ -amilase dari <i>Aspergillus sp.</i> hasil penambahan manitol 0,5 M.....	63
21. Hubungan antara aktivitas unit, aktivitas sisa, dan laju inaktivasi termal enzim $\alpha$ -amilase hasil dialisis dengan variasi waktu inaktivasi pada suhu 60 °C. ....	64
22. Hubungan antara aktivitas unit, aktivitas sisa, dan laju inaktivasi termal ( $\ln E_i/E_0$ ) enzim $\alpha$ -amilase hasil penambahan manitol 0,2 M dengan variasi waktu inaktivasi pada suhu 60 °C. ....	64
23. Hubungan antara aktivitas unit, aktivitas sisa, dan laju inaktivasi termal ( $\ln E_i/E_0$ ) enzim $\alpha$ -amilase hasil penambahan manitol 0,4 M dengan variasi waktu inaktivasi pada suhu 60 °C. ....	65
24. Hubungan antara aktivitas unit, aktivitas sisa, dan laju inaktivasi termal ( $\ln E_i/E_0$ ) enzim $\alpha$ -amilase hasil penambahan manitol 0,5 M dengan variasi waktu inaktivasi pada suhu 60 °C. ....	65
25. Data grafik laju termal inaktivasi termal orde satu enzim $\alpha$ -amilase hasil dialisis dan penambahan manitol 0,2: 0,4; dan 0,5 M.....	66

26. Perhitungan waktu paruh ( $t_{1/2}$ ) enzim hasil dialisis dan hasil penambahan manitol 0,2; 0,4; dan 0,5 M.....	67
27. Absorbansi Bovine Serum Albumin (BSA) pada berbagai konsentrasi .....	70
28. Absorbansi glukosa pada berbagai konsentrasi.....	71

## **DAFTAR LAMPIRAN**

Lampiran	Halaman
1. Data Hasil Pengukuran Absorbansi Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis .....	54
2. Data Penentuan Pola Fraksinasi .....	56
3. Data Penentuan pH Optimum Enzim Hasil Dialisis dan Setelah Penambahan Manitol 0,2; 0,4; dan 0,5 M.....	57
4. Data Penentuan Suhu optimum.....	60
5. Penentuan $K_M$ dan $V_{maks}$ .....	62
6. Data Penentuan Kestabilan Termal.....	64
7. Data Grafik Laju Termal Inaktivasi Termal Orde Satu .....	66
8. Perhitungan Waktu Paruh ( $t_{1/2}$ ) .....	67
9. Perhitungan Nilai Energi Bebas Akibat Denaturasi ( $\Delta G_i$ ) .....	68
10. Kurva Standar <i>Bovine Albumin Serum</i> (BSA) .....	70
11. Kurva Standar Glukosa .....	71
12. Persamaan Kuantitasi Enzim .....	72

## **DAFTAR RUMUS**

Rumus	Halaman
1. Persamaan Michaelis-Menten .....	16
2. Lineweaver-Burk.....	16
3. Aktivitas sisa .....	29
4. Konstanta laju inaktivasi ( $k_i$ ).....	29
5. Perubahan energi akibat denaturasi ( $\Delta G_i$ ).....	29
6. Aktivitas unit (AU) .....	54
7. Kadar Protein .....	55
8. Aktivitas spesifik.....	55
9. Penentuan aktivitas unit (AU) menggunakan metode Mandels .....	58
10. Perhitungan aktivitas sisa.....	61
11. Penentuan nilai $K_M$ dan $V_{maks}$ .....	63
12. Nilai $\ln(E_i/E_0)$ .....	66
13. Aktivitas total (mg) .....	72
14. Protein total (mg) .....	72
15. Perolehan (%).....	72
16. Kemurnian .....	72

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Indonesia dikenal sebagai negara dengan potensi sumber daya alam yang melimpah dan tersebar di berbagai wilayah. Sektor pertanian masih memberikan peran penting dalam perekonomian nasional. Indonesia termasuk negara agraris dengan berbagai komoditas unggul, salah satunya tanaman singkong.

Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) masuk ke dalam salah satu komoditas pertanian penting di Indonesia yang memiliki nilai praktis baik dari sisi produksi maupun potensi pemanfaatannya. Tanaman ini termasuk dalam kelompok tanaman pangan yang banyak dibudidayakan oleh petani terutama di daerah pedesaan karena perawatannya relatif mudah dan tahan terhadap berbagai kondisi lingkungan. Berdasarkan data *Food and Agriculture Organization* (2023), Indonesia merupakan negara penghasil singkong terbesar ke 4 di dunia setelah Nigeria, Thailand, dan Republik Demokratik Kongo. Menurut data Badan Pusat Statistik (2024), total produksi singkong di Indonesia pada tahun 2023 mencapai sekitar 15,9 juta ton. Posisi ini menempatkan singkong sebagai komoditas pertanian utama setelah padi dan jagung khususnya dalam hal ketersediaan sumber karbohidrat bagi masyarakat maupun industri (Rukmana, 1997).

Meskipun produksinya sangat melimpah, pemanfaatan singkong di Indonesia masih tergolong terbatas. Sebagian besar hasil panen hanya diolah menjadi tepung singkong (tapioka) ataupun digunakan sebagai bahan pangan tradisional, sehingga potensi ekonominya belum sepenuhnya dioptimalkan. Dari sisi kandungan gizi, singkong diketahui mengandung sekitar 60 % air dan 25–35 % pati, serta dilengkapi dengan berbagai komponen nutrisi lain seperti protein, mineral, serat, kalsium, dan fosfat (Taufiq, 2022). Kandungan pati yang tinggi ini menjadikan

singkong sebagai bahan baku berpotensi untuk diaplikasikan dalam bidang bioteknologi, khususnya pada produksi enzim. Salah satu enzim penting yang dapat dihasilkan dari substrat berpati adalah enzim amilase. Penelitian yang telah dilakukan oleh Pandey *et al.* (2000) menunjukkan bahwa bahan berpati seperti singkong merupakan substrat yang sangat efektif dalam proses fermentasi mikroba untuk produksi enzim amilase secara optimal.

Perkembangan bioteknologi industri telah mendorong peningkatan kebutuhan akan enzim-enzim komersial yang mampu menunjang berbagai proses produksi dan memiliki peran sentral dalam suatu industri. Permintaan global terhadap enzim  $\alpha$ -amilase menunjukkan perkembangan yang terus meningkat dan kini mencakup sekitar 30 % dari keseluruhan produksi enzim di dunia, menjadikannya salah satu enzim komersial yang cukup dominan dimanfaatkan (Choubane *et al.*, 2014; Nisa dkk., 2013). Popularitas enzim ini disebabkan oleh kemampuannya sebagai biokatalisator dalam mempercepat reaksi pemecahan pati menjadi gula sederhana. Oleh karena itu,  $\alpha$ -amilase telah menjadi komponen penting dalam berbagai sektor industri. Dalam industri makanan dan minuman enzim ini biasanya digunakan secara luas dalam pembuatan sirup glukosa, roti, dan permen yang berperan dalam meningkatkan rasa, tekstur, serta kualitas produk akhir. Pada industri nonpangan penggunaannya mencakup proses pemurnian pati, produksi kertas, dan pengolahan tekstil dengan membantu menghilangkan bahan pengganggu seperti pati yang tidak diinginkan. Selain itu,  $\alpha$ -amilase juga memainkan peran penting dalam formulasi detergen modern, produksi bioetanol sebagai bahan bakar terbarukan, industri farmasi, dan bahkan dalam pengolahan limbah untuk meningkatkan efisiensi degradasi bahan organik. Seiring dengan cakupan aplikasi yang begitu luas, enzim ini menjadi salah satu komoditas strategis bioteknologi industri yang sedang gencar dikembangkan (Bal *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2012; Singh, 2014).

Enzim  $\alpha$ -amilase termasuk ke dalam kelompok enzim hidrolitik yang berperan penting pada proses pemecahan molekul polisakarida, khususnya pati menjadi senyawa sederhana seperti glukosa dan maltosa. Proses ini berlangsung melalui mekanisme hidrolisis terhadap ikatan glikosidik yang menghubungkan unit-unit

monosakarida dalam struktur pati (Winarno, 1986). Dengan sifat katalitik tersebut,  $\alpha$ -amilase memegang fungsi vital dalam berbagai reaksi biokimia baik yang terjadi secara alami di dalam tubuh organisme maupun dalam skala industri. Keberadaan enzim ini tidak terbatas pada satu jenis makhluk hidup melainkan tersebar luas di berbagai sumber biologis mencakup tumbuhan, hewan, serta mikroorganisme. Di antara ketiga sumber tersebut, mikroorganisme menjadi fokus utama dalam pengembangan produksi enzim karena efisiensinya yang lebih tinggi. Salah satu mikroorganisme yang dikenal secara luas sebagai penghasil  $\alpha$ -amilase adalah *Aspergillus sp.* Pemanfaatan mikroorganisme sebagai induser memiliki keunggulan dalam memproduksi enzim  $\alpha$ -amilase secara ekstraselular yaitu enzim akan dilepaskan langsung ke medium di luar sel, sehingga mempermudah proses pemisahan dan pemurnian (Maarel *et al.*, 2002). Hal ini memberikan keuntungan praktis dan ekonomis dalam proses produksi enzim, karena tidak memerlukan prosedur rumit untuk memecah sel terlebih dahulu. Oleh karena itu, mikroorganisme sering menjadi pilihan utama dalam berbagai penelitian dan aplikasi industri yang berkaitan dengan produksi  $\alpha$ -amilase (Page, 1997).

Salah satu mikroorganisme yang dapat memproduksi enzim  $\alpha$ -amilase adalah jamur (fungi). Jamur dapat menguraikan amilosa yang terdapat dalam jaringan tumbuhan menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti maltosa maupun glukosa karena kemampuannya dalam menghasilkan enzim amilase secara efektif (De Souza *et al.*, 2010). Jamur penghasil  $\alpha$ -amilase salah satunya adalah *Aspergillus sp.* digolongkan sebagai fungi anamorphik (aseksual) yang bereproduksi dengan menghasilkan phialospora (konidia tumbuh dari fialid). Karakteristik dari genus ini ditandai dengan konidiofor yang khas yaitu ada yang memiliki *uniseriate* atau *biseriate* (Klich, 2002). Sebagian besar *Aspergillus sp.* dapat tumbuh baik pada suhu 27-37 °C dengan kisaran pH luas. Kemampuan *Aspergillus sp.* dalam memproduksi berbagai enzim seperti  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase, glukoamilase, lipase, dan protease telah dilaporkan berturut-turut oleh (Ilyas dkk., 2011, Chimata *et al.*, 2010, Anto dkk., 2006 dan Paranthaman *et al.*, 2009). Hal ini dikarenakan *Aspergillus sp.* dapat diisolasi di tanah dan substrat organik yang membusuk tanpa

menggunakan teknik khusus, karena bersporulasi secara produktif serta bergeminisi secara tepat pada medium umum atau selektif (Labeda, 1990).

Umumnya enzim sendiri termasuk biokatalisator yang sangat penting dalam berbagai proses industri karena kemampuannya untuk mempercepat reaksi kimia secara spesifik, efisien, dan ramah lingkungan. Namun, pemanfaatan enzim dalam skala industri masih menghadapi sejumlah kendala yang cukup signifikan. Salah satu permasalahan utama adalah harga enzim yang relatif mahal, sehingga biaya produksi menjadi tinggi. Selain itu, enzim umumnya hanya dapat digunakan satu kali sehingga keefektifan penggunaannya dalam proses industri menjadi cukup terbatas (Smith, 1990). Kinerja enzim juga sangat dipengaruhi oleh berbagai kondisi lingkungan yang sebagian besar enzim hanya aktif dan stabil pada kondisi fisiologis yaitu pada rentang suhu dan pH tertentu yang relatif sempit. Ketika dihadapkan pada kondisi yang ekstrem seperti suhu tinggi atau pH yang sangat asam maupun basa dapat menyebabkan aktivitas enzim menurun drastis bahkan terinaktivasi sepenuhnya. Enzim dibutuhkan pada aplikasi industri yang mampu mempertahankan aktivitasnya pada kondisi lingkungan yang ekstrem agar proses produksi dapat berjalan efisien dan berkelanjutan (Goddette *et al.*, 1993). Di antara berbagai metode yang ada, penambahan zat aditif menjadi salah satu pilihan yang paling banyak diterapkan. Hal ini dikarenakan penggunaan zat aditif relatif lebih mudah dilakukan dan biayanya yang relatif lebih murah dibandingkan metode lain.

Pemanfaatan zat aditif tertentu dapat membantu menstabilkan struktur enzim sehingga tetap aktif meskipun berada pada lingkungan yang kurang ideal bagi aktivitas enzim. Dengan demikian, optimalisasi penggunaan enzim dalam industri sangat bergantung pada upaya-upaya untuk meningkatkan stabilitas dan efisiensi enzim, baik melalui inovasi teknologi maupun pemanfaatan bahan tambahan yang mendukung kinerja enzim secara keseluruhan (Mosan *and* Combes, 1984). Dalam upaya meningkatkan stabilitas enzim  $\alpha$ -amilase yang diisolasi dari *Aspergillus sp.* poliol menjadi pilihan yang banyak digunakan dalam berbagai aplikasi biokimia karena memiliki sejumlah keunggulan yang dapat mendukung kestabilan enzim. Salah satu alasan utama pemilihan poliol adalah kemampuannya dalam

mempertahankan konformasi tiga dimensi enzim, sehingga enzim tetap berada dalam bentuk aktif dan tidak mudah mengalami denaturasi. Selain itu, poliol juga diketahui dapat mengurangi kemungkinan terjadinya oksidasi pada gugus tiol yang terdapat pada enzim, oksidasi ini dapat menyebabkan perubahan struktur dan penurunan aktivitas enzim (Suhartono, 1989). Stabilitas enzim  $\alpha$ -amilase sangat dipengaruhi oleh berbagai faktor, termasuk suhu, pH, dan kehadiran zat aditif seperti manitol. Manitol sebagai senyawa gula alkohol berfungsi sebagai osmolit yang membantu menstabilkan struktur enzim di bawah kondisi lingkungan yang ekstrem. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa manitol dapat meningkatkan kestabilan termal  $\alpha$ -amilase, sehingga mencegah denaturasi enzim pada suhu tinggi dan mempertahankan aktivitasnya dalam waktu yang lebih lama.

Mekanisme stabilisasi yang ditawarkan oleh manitol terkait dengan kemampuannya untuk berikatan dengan permukaan enzim melalui interaksi hidrogen, yang dapat membantu menjaga konformasi struktural  $\alpha$ -amilase. Kehadiran manitol juga dapat mengurangi efek penghambatan oleh ion logam atau zat penghambat lainnya yang sering ditemukan dalam proses degradasi lignoselulosa. Sebagai tambahan, manitol mampu mengurangi tekanan osmolar yang disebabkan oleh kadar air yang rendah, pada akhirnya mengurangi risiko agregasi protein yang umumnya terjadi pada kondisi stres lingkungan. Hal ini membuktikan bahwa manitol berfungsi sebagai stabilisator yang efektif dalam menjaga kinerja enzim di kondisi lingkungan yang tidak mendukung (Bala *et al.*, 2019).

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka penting dilakukan pengembangan penelitian untuk mengetahui adanya pengaruh metode baru dalam meningkatkan kestabilan enzim  $\alpha$ -amilase dari *Aspergillus sp.* dengan memanfaatkan zat aditif berupa manitol yang memiliki kemampuan dalam melindungi struktur enzim dari berbagai faktor denaturasi sehingga nantinya didapatkan enzim dengan aktivitas terbaik.

## **1.2 Tujuan Penelitian**

Tujuan yang hendak dicapai dalam penelitian ini adalah:

1. Memperoleh Enzim  $\alpha$ -amilase dari *Aspergillus sp.* dengan aktivitas dan tingkat kemurnian yang tinggi dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim.
2. Meningkatkan kestabilan enzim  $\alpha$ -amilase dari *Aspergillus sp.* melalui penambahan manitol.

## **1.3 Manfaat Penelitian**

Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah:

1. Memberikan informasi mengenai teknik isolasi dan pemurnian enzim  $\alpha$ -amilase dari *Aspergillus sp.*
2. Memberikan informasi tentang nilai aktivitas, suhu dan pH optimum,  $K_M$ ,  $V_{maks}$ ,  $k_i$ ,  $t_{1/2}$ , serta  $\Delta G_i$  enzim  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dan hasil penambahan manitol.
3. Memberikan informasi mengenai pengaruh penambahan manitol terhadap kestabilan enzim  $\alpha$ -amilase.

## **II. TINJAUAN PUSTAKA**

### **2.1 Enzim**

Enzim merupakan polimer biologis yang mengkatalisis reaksi kimia esensial untuk merombak *nutrient* sehingga mampu menyediakan energi dan *chemical building blocks*. Penyatuan *chemical building blocks* menghasilkan protein, DNA, membran, sel, dan jaringan serta energi yang dapat digunakan untuk motilitas sel dan kontraksi otot. Mekanisme kerja enzim bersifat sangat spesifik. Hal ini berlaku tidak hanya pada tipe reaksi yang dikatalisis (spesifitas reaksi), tetapi juga sifat dari reaktan (substrat) yang terlibat. Kemampuan katalisis enzim diawali dengan pembentukan *transition state* dalam kompleks enzim-substrat. Substrat akan terikat pada bagian spesifik dari enzim yang disebut sisi aktif (Wahyuni, 2017). Enzim terbentuk dari gugus polipeptida yang dapat mempercepat terjadinya suatu reaksi kimia tanpa habis bereaksi dalam prosesnya (Dzulqaidah dkk., 2021). Secara sederhana enzim dikatakan sebagai biokatalisator atau katalis biologi (Penitobe, 2021). Enzim seperti protein lainnya mempunyai berat molekul berkisar 12.000 sampai lebih dari 1 juta. Beberapa enzim tidak membutuhkan gugus lainnya untuk aktivitasnya selain residu asam aminonya (Azhar, 2016). Secara umum enzim menghasilkan kecepatan, spesifikasi, dan kendali pengaturan terhadap reaksi dalam tubuh (Supriyatna dkk., 2015). Enzim berfungsi sebagai katalisator, yaitu senyawa yang meningkatkan reaksi kimia, suatu enzim dapat mempercepat laju reaksi  $10^8$  sampai  $10^{11}$  kali lebih cepat dibandingkan ketika reaksi tidak menggunakan katalis (Marks dkk., 2014).

Enzim dapat diperoleh dari makhluk hidup seperti hewan, tumbuhan, dan mikroorganisme. Meskipun banyak sumber dapat menghasilkan enzim yang berasal dari hewan dan tumbuhan, namun pemanfaatan mikroorganisme sebagai sumber enzim lebih banyak diminati karena enzim dari mikroorganisme dapat dihasilkan dengan sangat singkat, mudah diproduksi dalam skala besar, proses produksi bisa dikontrol, kemungkinan terkontaminasi oleh senyawa-senyawa lain lebih kecil, dan dapat diproduksi secara berkesinambungan (Thomas, 1989).

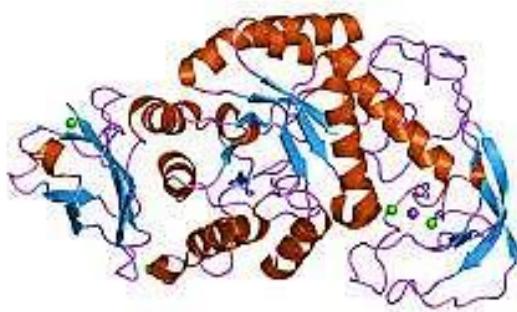
Molekul-molekul enzim merupakan katalis yang sangat efisien dalam mempercepat perubahan substrat menjadi produk akhir. Satu molekul enzim tunggal dapat melakukan perubahan sebanyak seribu molekul substrat per detik. Hal ini menjelaskan bahwa molekul enzim tidak dikonsumsi ataupun mengalami perubahan selama proses reaksi berlangsung. Namun perlu diperhatikan enzim terkadang tidak stabil aktivitasnya dan dapat berkurang atau bahkan menghilang oleh berbagai pengaruh baik kondisi fisik maupun kimia seperti suhu, pH, dan sebagainya (Pelczar *et al.*, 2005).

Aktivitas enzim untuk menghidrolisis, khususnya protein dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti konsentrasi protein, pH, suhu, substrat, inhibitor, dan aktivator. Hal ini dikarenakan setiap enzim untuk dapat beroperasi memiliki pH maksimum (Nurkhotimah dkk., 2017). Setiap enzim memiliki aktivitas maksimum pada suhu tertentu, aktivitas enzim akan semakin meningkat seiring dengan bertambahnya suhu hingga suhu optimum tercapai. Setelah itu kenaikan suhu lebih lanjut akan menyebabkan aktivitas enzim menurun (Meliandari, 2009). Aktivitas enzim adalah kemampuan enzim dalam mengubah sejumlah mol substrat menjadi produk dalam satuan waktu. Aktivitas enzim dapat ditunjukkan dalam satuan aktivitas relatif enzim (%) (Ramadhan dkk., 2021).

## 2.2 Enzim $\alpha$ -Amilase

Amilase merupakan salah satu enzim yang mampu mengkatalisis proses hidrolisis ikatan ( $\alpha$ -1,4) glikosida pada senyawa polimer karbohidrat dengan rumus umum  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . Enzim ini dapat diproduksi oleh berbagai organisme seperti bakteri,

jamur, tumbuhan, dan hewan, serta berfungsi dalam konversi substrat pati menjadi senyawa yang lebih sederhana, seperti glukosa, dekstrosa, fruktosa, maupun maltosa (Whittaker, 1994). Dalam proses hidrolisis pati, amilase memutus ikatan-ikatan tertentu hingga terbentuk maltosa sebagai produk intermediet. Amilase diklasifikasikan menjadi tiga jenis utama, yaitu  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase, dan  $\gamma$ -amilase (Poedjiadi, 2006).  $\alpha$ -amilase bekerja secara acak pada ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosidik di sepanjang rantai polisakarida, menghasilkan maltosa dan maltotriosa sebagai produk utamanya. Enzim ini termasuk dalam kelompok enzim ekstraseluler (Palmer, 1985). Sementara itu,  $\beta$ -amilase bersifat sebagai eksoenzim yang menghidrolisis pati dari sisi rantai untuk membentuk unit-unit maltosa.  $\gamma$ -amilase memiliki kemampuan untuk memecah pati dari ujung nonpereduksi sehingga menghasilkan glukosa sebagai satu-satunya produk, yang membedakannya dari  $\alpha$  dan  $\beta$ -amilase (Winarno, 1986). Pati berperan sebagai substrat enzim  $\alpha$ -amilase dan sebagai sumber karbon bagi pertumbuhan mikroba penghasil enzim tersebut. Pati merupakan suatu karbohidrat golongan polisakarida yang tersusun atas lebih dari delapan satuan monosakarida. Pati merupakan polimer yang tersusun dari monomer  $\alpha$ -D-glukosa yang dihubungkan oleh ikatan  $\alpha$ -1,4 glikosidik dan ikatan  $\alpha$ -1,6 glikosidik pada percabangan rantainya. Secara alami, pati merupakan campuran dari amilosa dan amilopektin sebagai polimer dari  $\alpha$ -D-glukosa (Fessenden dan Fessenden, 1986).  $\alpha$ -amilase merupakan enzim penting dalam proses hidrolisis pati yang bekerja dengan memutus ikatan glikosidik  $\alpha$ -1,4 secara acak menghasilkan senyawa-senyawa seperti dekstrin, maltosa, dan glukosa sebagai produk hidrolisis (Ariandi, 2017). Enzim ini diklasifikasikan sebagai metaloenzim karena memerlukan keberadaan ion kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) untuk mempertahankan aktivitas dan stabilitasnya selama proses katalisis (Algofar *et al.*, 2021). Struktur enzim  $\alpha$ -amilase dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Struktur enzim  $\alpha$ -amilase (Berman *et al.*, 2000).

Struktur  $\alpha$ -amilase tersusun atas tiga domain utama, yaitu domain A berbentuk struktur *Triose Phosphate Isomerase (TIM) barrel* menyerupai tong atau *barrel* dan merupakan domain katalitik tempat terjadinya reaksi enzimatik, domain B yang berupa *loop* panjang bersifat fleksibel dan berperan dalam pengikatan substrat serta stabilisasi struktur enzim, serta domain C dengan struktur  $\beta$ -sheet yang tersusun sebagai antiparalel  $\beta$ -sandwich, biasanya terletak di ujung C-terminal enzim dan berfungsi dalam pengikatan substrat atau interaksi dengan molekul lain. Beberapa residu asam amino, khususnya glutamat dan aspartat berperan krusial dalam aktivitas katalitik enzim ini (Judoamidjojo *et al.*, 1989). Cara kerja  $\alpha$ -amilase melibatkan pemutusan acak pada rantai polisakarida, yang menyebabkan penurunan kekentalan larutan pati dan membentuk produk seperti maltosa dan maltotriosa (Ariandi, 2017). Aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, terutama suhu dan pH. Umumnya, suhu optimum untuk aktivitas enzim ini berada pada kisaran 35-55 °C, tergantung pada sumber mikroorganismenya (Nisak, 2020). Menariknya,  $\alpha$ -amilase yang dihasilkan oleh mikroorganisme termofilik menunjukkan kestabilan yang baik dan aktivitas tinggi pada suhu tinggi, sehingga sangat berpotensi untuk diterapkan dalam berbagai proses industri (Yamin, 2022). Aktivitas  $\alpha$ -amilase ditentukan dengan mengukur hasil degradasi pati, biasanya dapat diamati dari penurunan kadar pati yang larut atau dari kadar dekstrinnya dengan menggunakan substrat

jenuh. Hilangnya substrat dapat diukur dengan pengurangan derajat pewarnaan iodium terhadap substrat (Winarno, 2004).

### **2.3 *Aspergillus sp.***

*Aspergillus* merupakan salah satu kapang yang berasal dari kelas *Ascomycota*. Dilihat dari struktur konidianya yang berbentu semi bulat, oval ataupun bulat. Konidia menempel pada bagian fialid yang menempel pada bagian dari ujung konidiofor yang mengalami pembengkakan atau disebut juga dengan vesikel. *Aspergillus* tumbuh dengan cepat dan menghasilkan hifa aerial yang memiliki struktur konidia yang khas yaitu konidiofor panjang dengan vesikel terminal tempat *philiades* menghasilkan rantai konidia basipetal (Brooks *et al.*, 2013). *Aspergillus* bisa dilihat dari medium biakan dengan cara makroskopis memiliki ciri-ciri diantaranya koloni berwarna hijau dan koloni yang masih muda berwarna putih ditemukannya hifa, konidia, dan konidiofor. Adapun ciri-ciri dari segi mikroskopis yang meliputi bentuk hifa yang bersepta dan miselium yang bercabang (Hasanah, 2017). Isolat jamur *Aspergillus sp.* dapat dilihat pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Jamur *Aspergillus sp.*

*Aspergillus sp.* telah banyak dikenal sebagai saprofit, parasit, dekomposer sehingga penting dalam kesuburan tanah, agen pengendali hayati hingga penghasil mitokosin (De Amorim *et al.*, 2020). Pada pengamatan yang dilakukan oleh

Madigan *et al.*,(2002), mengungkapkan secara makroskopis jamur *Aspergillus sp.* pada media *Potato Sukrose Agar* terlihat saat inkubasi hari pertama masih berwarna putih terbentuk koloni miselium yang tersusun oleh hifa. Pada hari kedua telah mengalami sporulasi berwarna hijau, bentuk koloni yang tidak teratur, permukaan kasar terdapat titik hijau yang merupakan spora jamur dan mudah menyebar ke segala arah. Namun, *Aspergillus sp.* dilihat secara mikroskopis didapati konidia yang berwarna hijau, berbentuk bulat, konidiofor *hyaline* dan tidak bersekat (Madigan *et al.*, 2002). Lebih dari 300 jenis *Aspergillus sp.* dapat diseleksi sebagai jamur yang dapat diberdayagunakan diantaranya berpotensi sebagai biofertilizer dan biopestisida (Saritha and Prasad, 2019). *Aspergillus sp.* juga mempunyai kemampuan dalam menghambat pertumbuhan cendawan patogen karena dapat menghasilkan enzim hidrolitik meliputi lipase, protease, amilase,  $\alpha$ -amilase, dan pektinase (Schuster *et al.*, 2002).

## 2.4 Singkong

Singkong adalah tanaman yang masuk dalam famili *Euphorbiaceae* dan merupakan salah satu tanaman tropis. Umbi singkong sering digunakan masyarakat umum untuk memproduksi tepung tapioka dan juga sebagai bahan baku pengganti makanan pokok (Guntama dkk., 2022). Singkong atau ketela pohon merupakan bahan baku yang sangat potensial untuk dikembangkan dalam produksi enzim  $\alpha$ -amilase. Singkong termasuk bahan pangan yang biasanya diolah menjadi berbagai jenis makanan namun juga dapat dimanfaatkan dalam industri kimia khususnya untuk menghasilkan gula fruktosa (Martiyana, 2022). Kandungan pati yang dimiliki pada singkong sangat tinggi. Sejalan dengan itu, maka akan semakin banyak gula reduksi yang dihasilkan (Mustafa, 2016). Adapun gambar singkong dapat dilihat pada Gambar 3.



**Gambar 3.** Singkong (Prjctreoco, 2021).

Pada umumnya pengaplikasian pati singkong sudah dikembangkan secara luas dalam berbagai sektor industri baik pangan maupun nonpangan. Dalam industri pangan, pati singkong digunakan sebagai bahan pengental dan agen penstabil makanan, sedangkan dalam industri nonpangan, penggunaannya meliputi pembuatan kertas, tekstil, produk kimia, farmasi, *biofuel*, dan etanol (Lu *et al.*, 2011; Koswara, 2006). Pati sendiri termasuk polisakarida yang tersusun dari molekul glukosa dengan ikatan  $\alpha$ -glikosidik dan memiliki kadar air rendah sekitar 10-14 % (Ariyanti, 2013). Pati terdiri dari dua fraksi yaitu amilosa yang larut dalam air panas dan amilopektin yang tidak larut (Permana, 2012). Singkong mengandung sekitar 17 % amilosa, sementara secara umum pati normal terdiri dari 25 % amilosa dan 75 % amilopektin (Wulan, 2006). Penelitian menunjukkan bahwa pati singkong memiliki viskositas yang lebih tinggi dibandingkan tepung lain seperti tepung beras dan terigu, serta waktu gelatinisasi yang lebih cepat, hampir setara dengan tepung ketan (Imanningsih, 2012). Dengan itu, keterlibatan singkong dalam memproduksi enzim  $\alpha$ -amilase yang diisolasi dari mikroorganisme cukup efektif karena selain kandungan pati yang cukup tinggi juga memiliki sifat termostabilitas yang baik memungkinkan proses hidrolisis dilakukan pada suhu tinggi tanpa menurunkan aktivitas enzim secara signifikan (Sundaram *et al.*, 2014 dalam Ainezzahira dkk., 2019).

## 2.5 Stabilitas Enzim

Stabilitas enzim dapat diartikan sebagai kestabilan enzim selama penyimpanan dan penggunaan enzim tersebut, serta kestabilan terhadap senyawa yang bersifat merusak seperti pelarut tertentu (asam atau basa) oleh pengaruh suhu dan pH ekstrim (Kazan *et al.*, 1997). Stabilitas enzim dipengaruhi oleh banyak faktor seperti suhu, pH, pelarut, kofaktor, dan adanya surfaktan (Eijnsink *et al.*, 2005). Dari faktor-faktor tersebut suhu dan pH memegang peranan penting dan sangat tepat untuk dipelajari. Pada suhu tinggi kebanyakan enzim akan membuka (inaktif) yang berarti tidak fungsional lagi. Proses inaktivasi enzim pada suhu tinggi berlangsung melalui dua tahap, pertama adanya pembukaan parsial struktur sekunder, tersier dan kuarter molekul enzim, serta adanya perubahan struktur primer enzim karena adanya kerusakan asam amino tertentu oleh panas (Ahern *and Klibanov*, 1987).

Terdapat dua cara yang dapat dilakukan untuk mendapatkan enzim yang mempunyai stabilitas tinggi, yaitu menggunakan enzim yang memiliki stabilitas ekstrem alami dan mengusahakan peningkatan stabilitas enzim yang secara alami kurang stabil. Berdasarkan faktor lingkungan yang memengaruhinya, stabilitas enzim dapat diklasifikasikan menjadi dua yaitu stabilitas termal enzim dan stabilitas pH enzim.

### 1. Stabilitas Termal Enzim

Pada suhu yang terlalu rendah stabilitas enzim tinggi, namun aktivitasnya rendah sedangkan pada suhu yang terlalu tinggi aktivitas enzim tinggi, namun kestabilannya rendah. Kenaikan suhu sangat memengaruhi kecepatan laju reaksi enzim, tetapi hanya sampai batas tertentu dan selanjutnya akan terjadi proses denaturasi protein (Wirahadikusumah, 1997). Stabilitas termal enzim akan jauh lebih tinggi dalam kondisi kering dibandingkan dengan kondisi basah. Adanya air sebagai pelumas membuat konformasi suatu molekul enzim menjadi sangat fleksibel sehingga menyebabkan kondisi air dalam keadaan kaku ketika hilangnya molekul pada enzim (Virdianingsih, 2002).

## 2. Stabilitas pH Enzim

Pada stabilitas enzim banyak dipengaruhi oleh berbagai faktor yang salah satunya faktor pH. Suatu perubahan pH lingkungan biasanya disebabkan terjadinya perubahan ionisasi enzim, substrat, ataupun kompleks enzim-substrat. Enzim akan menunjukkan aktivitas maksimum pada kisaran pH optimum enzim dengan stabilitas yang cukup tinggi (Winarno, 1998). Pada reaksi enzimatik sebagian besar enzim akan kehilangan aktivitas katalitiknya secara cepat dan *irreversible* pada pH yang jauh dari rentang pH optimum untuk reaksi enzimatik (Kazan *et al.*, 1997).

## 2.6 Pengujian Aktivitas $\alpha$ -Amilase dengan Metode Mandels

Pengujian aktivitas  $\alpha$ -amilase dilakukan dengan metode Mandels (Mandels *et al.*, 1976) yaitu berdasarkan pembentukan glukosa dari substrat pati singkong oleh enzim  $\alpha$ -amilase yang dideteksi dengan penambahan pereaksi *Dinitrosalisolat Acid* (DNS) ke dalam larutan uji serta proses pemanasan sehingga akan dihasilkan larutan berwarna kuning hingga merah pekat. Semakin pekat warna larutan sampel dibandingkan larutan kontrol, maka akan semakin tinggi aktivitasnya.

## 2.7 Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

Salah satu metode yang digunakan untuk menentukan kadar protein adalah metode Lowry. Metode ini bekerja pada lingkungan alkali dan ion tembaga (II) bereaksi membentuk kompleks dengan protein. Selanjutnya reagen Folin-Ciocelteau yang ditambahkan akan mengikat protein. Ikatan ini secara perlahan akan mereduksi reagen Folin menjadi heteromolibdenum dan mengubah warna dari larutan kuning menjadi biru keunguan. Metode pengujian kadar protein ini didasarkan pada pembentukan kompleks  $Cu^{2+}$  dengan ikatan peptida yang akan tereduksi menjadi  $Cu^+$  pada kondisi basa.  $Cu^+$  dan rantai samping tirosin, triptofan, dan sistein akan bereaksi dengan reagen Folin-Ciocelteau. Reagen ini

bereaksi menghasilkan produk yang tidak stabil tereduksi secara lambat menjadi *molybdenum* atau *tungsteen blue*. Metode ini digunakan karena memiliki beberapa keunggulan meliputi relatif sederhana dan dapat diandalkan serta biayanya yang relatif murah. Namun, di samping terdapat juga kekurangan yang dimiliki oleh metode ini meliputi sensitif terhadap perubahan pH dan konsentrasi protein yang rendah (Lowry *et al.*, 1951).

## 2.8 Kinetika Reaksi Enzim

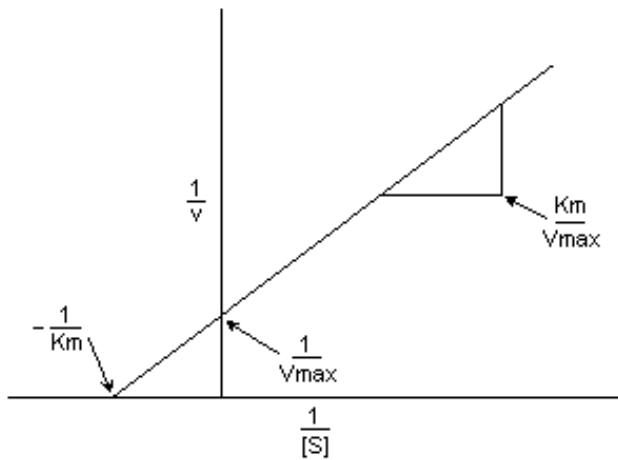
Kinetika enzim memiliki suatu parameter yaitu konstanta Michaelis-Menten ( $K_M$ ) dan laju reaksi maksimum ( $V_{maks}$ ). Berdasarkan postulat Michaelis dan Menten pada suatu reaksi enzimatis terdiri dari beberapa fase yaitu pembentukan kompleks enzim substrat (SE), E merupakan enzim dan S merupakan substrat, modifikasi dari substrat membentuk produk yang masih terkait dengan enzim (EP) (Sahib, 2005).

Pada umumnya enzim memiliki karakteristik dan sifat-sifat tersendiri meliputi spesifitas interaksi enzim terhadap substrat yang dinyatakan dalam persamaan Michaelis-Menten ( $K_M$ ). Nilai  $K_M$  ditunjukkan sebagai konsentrasi substrat tertentu pada saat enzim mencapai setengah kecepatan maksimum (Kamelia dkk., 2005) dapat dilihat pada Persamaan 1.

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

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M [S]}{V_{\text{maks}} + [S]}$$

Nilai  $K_M$  suatu enzim juga dapat dihitung dengan persamaan Lineweaver-Burk yang dapat dilihat dari Persamaan 2.



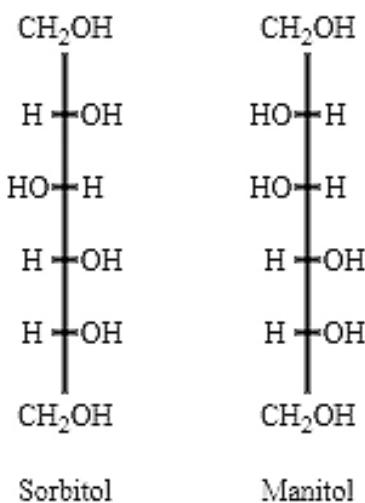
**Gambar 4.** Diagram persamaan Lineweaver-Burk (Suhartono, 1989).

Nilai  $K_M$  yang lebih kecil menunjukkan bahwa kompleks enzim substrat sangat cocok dengan afinitas tinggi terhadap substrat. Sebaliknya jika nilai  $K_M$  suatu enzim besar maka enzim tersebut memiliki nilai afinitas rendah terhadap suatu substrat (Page, 1997).

## 2.9 Manitol

Manitol merupakan gula poliol enam karbon yang paling banyak terdapat di alam. Manitol secara alami terdapat pada bunga dan daun manna, buah zaitun, dan alga (Wisselink, 2004). Manitol dan sorbitol sama-sama mempunyai enam gugus hidroksil, dengan rumus molekul  $C_6H_{14}O_6$ . Keduanya merupakan isomer, namun memiliki perbedaan konfigurasi molekular. Perbedaan antara manitol dan sorbitol terdapat pada orientasi planar dari gugus OH dan H pada atom C2. Hal ini mempunyai pengaruh yang besar dan menyebabkan sifat serta karakteristik yang berbeda pada masing-masing isomer. Perbedaan sifat utama antara kedua isomer ini adalah sorbitol bersifat higroskopik, sedangkan manitol bersifat nonhigroskopik. Sorbitol digunakan sebagai humektan karena afinitasnya terhadap kelembaban dan manitol digunakan sebagai eksipien tablet karena

bersifat inert dan stabil terhadap kelembaban (Jamieson, 2012). Struktur kimia sorbitol dan manitol dapat dilihat pada Gambar 5.



**Gambar 5.** Struktur sorbitol dan manitol (Jamieson, 2012).

Berbagai mikroorganisme telah dimanfaatkan untuk menghasilkan manitol melalui proses fermentasi, diantaranya berbagai spesies bakteri asam laktat, khamir *Candida sp.*, khamir *Torulopsis sp.*, fungi *Aspergillus candidus*, dan fungi *Penicillium scabrosum* (Saha and Racine, 2011). Bakteri asam laktat menghasilkan manitol melalui dua cara. Cara pertama, yaitu dengan mereduksi fruktosa secara langsung menjadi manitol oleh enzim manitol dehidrogenase terkait NAD(P)H. Cara lainnya adalah dengan pembentukan fruktosa-6-fosfat dari fruktosa oleh fruktokinase dan direduksi menjadi manitol-1-fosfat oleh enzim manitol-1-fosfat dehidrogenase terkait NAD(P)H. Manitol-1-fosfat kemudian mengalami defosforilasi menjadi manitol dan fosfat anorganik oleh enzim manitol-1-fosfatase. Proses pertama terjadi pada bakteri asam laktat heterofermentatif, sedangkan proses kedua terjadi pada bakteri asam laktat homofermentatif (Wisselink, 2004).

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilakukan pada Oktober 2024 sampai pada Mei 2025 di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi neraca analitik DJ-V220A Lucky, *Laminar Air Flow* CRUMA model 9005-FL, lemari pendingin, jarum ose, pembakar spiritus, *waterbath shaker incubator* STUART SSL2, kapas, *waterbath* memmert W 350, kain kasa, alumunium foil, *autoclave* sterilosator Gea LS-35L EDAM 63, oven Heraeus, karet gelang, *orbital shaker* KJ-201BD, inkubator Precisterm P'selecta, *centrifuge* Cole and Parmer, lemari es, *magnetic stirrer* STUART, penangas, rak tabung reaksi, *thermometer*, tabung *centrifuge*, pH meter Metrohm, indikator pH dan spektrofotometer UV-Vis Cary-100, UV-Vis Shimadzu 7280.

### **3.2.2 Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi *Aspergillus sp.*, PDA (Himedia) larutan buffer fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) pH 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; dan 6,5,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Merck),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck), urea (Merck),  $\text{MgSO}_4$  (Merck),  $\text{CaCl}_2$  (Merck),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck),  $\text{CoCl}_2$  (Merck), pepton (Merck), pereaksi DNS (Himedia), reagen Folin Ciocelteu (Sigma-Aldrich), akuades, Na(K)-Tartarat (Merck), Na-sitrat (Merck), dan pati singkong (Starch).

## **3.3 Prosedur Penelitian**

### **3.3.1 Peremajaan *Aspergillus sp.***

#### **1) Pembuatan media agar miring**

Ditimbang 3,9 gram PDA lalu dilarutkan dalam 100 mL akuades dan dipanaskan. Kemudian dituangkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 4-5 mL setelah itu disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121 °C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Media disimpan sampai memadat berupa agar.

#### **2) Peremajaan *Aspergillus sp.***

Peremajaan ini dilakukan dengan cara menggoreskan ose pada biakan murni kemudian ditusukkan ke dalam media agar miring. Peremajaan ini dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF) dalam keadaan steril. Lalu diinkubasi selama beberapa hari dalam inkubator pada suhu 37 °C (Yandri dkk., 2010).

### **3.3.2 Pembuatan media inokulum dan fermentasi *Aspergillus sp.*, serta produksi enzim**

#### **1) Pembuatan media inokulum dan fermentasi**

Media inokulasi dibuat dengan cara menimbang  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,7 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g; urea 0,15 g;  $\text{MgSO}_4$  0,15 g;  $\text{CaCl}_2$  0,15 g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,0025 g;

ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,0007 g; CoCl<sub>2</sub> 0,001 g; pepton 0,375 g; dan pati singkong 0,375 g. Lalu semua bahan dilarutkan dengan 50 mL larutan buffer fosfat dengan pH 6,0. Kemudian untuk media fermentasi dibuat dengan menimbang (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3,5 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 g; urea 0,75 g; MgSO<sub>4</sub> 0,75 g; CaCl<sub>2</sub> 0,75 g; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,0125 g; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,0035 g; CoCl<sub>2</sub> 0,005 g; pepton 1,875 g dan pati singkong 1,875 g. Kemudian semua bahan dilarutkan dengan 250 mL larutan buffer fosfat dengan pH 6,0. Media inokulasi dan fermentasi kemudian disterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121 °C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

2) Inokulasi *Aspergillus sp.*

Inokulasi dilakukan dengan cara sebanyak 3 ose *Aspergillus sp.* dari media agar miring dipindahkan ke dalam media inokulum secara aseptik, lalu dikocok menggunakan *waterbath shaker inkubator* dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam.

3) Produksi enzim α-amilase

Produksi enzim α-amilase dilakukan dengan memindahkan media inokulum sebanyak 2 % ke dalam media fermentasi dengan *micropipet* secara aseptik. Selanjutnya dikocok menggunakan *waterbath shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm selama 72 jam.

### 3.3.3 Isolasi dan pemurnian enzim α-amilase

1) Isolasi enzim α-amilase

Isolasi enzim α-amilase dilakukan dengan menggunakan metode sentrifugasi. Metode sentrifugasi berprinsip pada kecepatan sedimentasi dengan cara pemusingan dalam kurun waktu tertentu. Metode ini bertujuan untuk memisahkan antara enzim ekstraseluler dari sisa sel. Sentrifugasi dilakukan pada suhu rendah (di bawah suhu kamar) untuk menjaga kehilangan aktivitas enzim (Suhartono, 1989). Hal ini dilakukan dengan mensentrifugasi enzim dalam tabung sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit yang

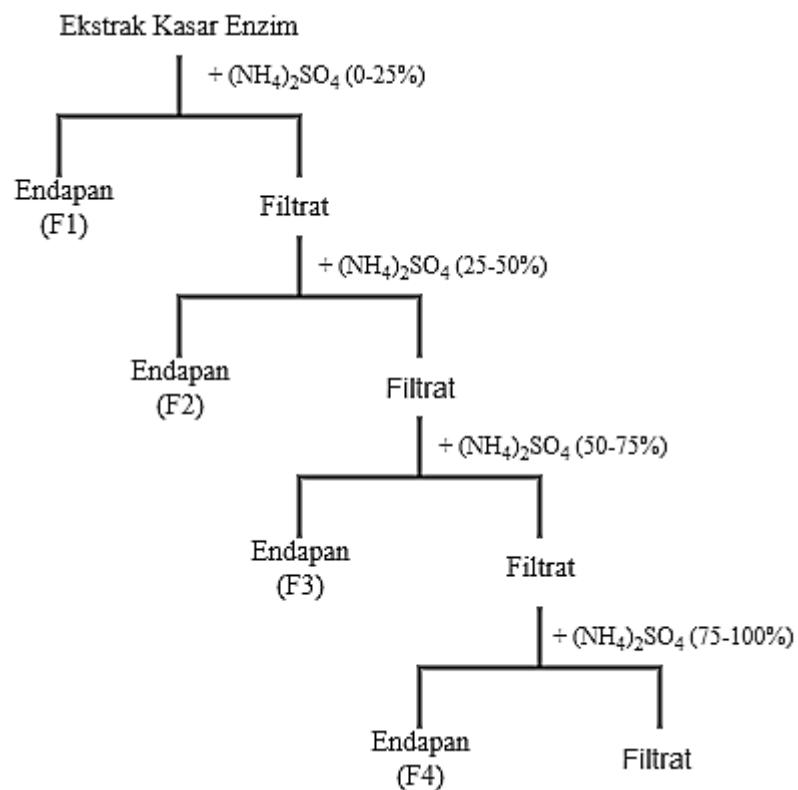
menghasilkan enzim berupa cairan jernih. Filtrat yang diperoleh lalu disaring menggunakan kertas saring dan diuji aktivitasnya dengan metode Mandels.

## 2) Pemurnian enzim $\alpha$ -amilase

Pemurnian enzim  $\alpha$ -amilase dilakukan dengan 2 tahap yaitu fraksinasi menggunakan amonium sulfat dan dialisis.

### 1. Fraksinasi dengan amonium sulfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$

Ekstrak kasar enzim yang diperoleh dimurnikan dengan metode fraksinasi menggunakan garam amonium sulfat pada berbagai derajat kejemuhan yaitu 0-25; 25-50; 50-75; dan 75-100 %. Adapun proses pengerjaannya yaitu ekstrak kasar enzim yang diperoleh diukur volumenya, selanjutnya dilakukan penambahan garam amonium sulfat yang telah dihaluskan secara perlahan sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* pada suhu 4 °C. Endapan protein enzim yang didapatkan setiap fraksi kejemuhan amonium sulfat selanjutnya dipisahkan dari filtratnya dengan sentrifugasi dingin pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Kemudian endapan yang diperoleh dilarutkan dengan buffer fosfat 0,1 M pH 6,0 dan diuji aktivitasnya dengan metode Fuwa, serta diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry untuk mengetahui fraksi-fraksi yang mengandung enzim  $\alpha$ -amilase dengan aktivitas spesifik tinggi. Filtrat yang diperoleh dari fraksi 0-25 % digunakan untuk diendapkan kembali dengan fraksi kejemuhan 25-50 % dengan prosedur yang sama dan seterusnya sampai fraksi 75-100 %. Setelah diketahui fraksi-fraksi yang mengandung enzim  $\alpha$ -amilase dengan aktivitas spesifik tertinggi, maka langkah selanjutnya adalah melakukan fraksinasi ulang pada tingkat tersebut, sehingga enzim dapat terendapkan secara maksimal (Yandri dkk., 2010). Adapun Skema proses pengendapan protein enzim dengan penambahan amonium sulfat ditunjukkan pada Gambar 6.



**Gambar 6.** Skema fraksinasi dengan amonium sulfat.

**Tabel 1.** Perhitungan massa garam ammonium sulfat untuk fraksinasi dengan berbagai persentase kejemuhan (Bollag *et al.*, 1996).

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

## 2. Dialisis

Endapan enzim yang telah dilarutkan dari tiap fraksi amonium sulfat dengan aktivitas spesifik tertinggi dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis dengan buffer fosfat 0,01 M pH 6,0 selama 24 jam pada suhu dingin (Pohl, 1990). Selama dialisis, dilakukan pergantian buffer setiap 4-6 jam sekali agar konsentrasi ion-ion di dalam kantong dialisis dapat dikurangi. Proses ini dilakukan secara kontinyu sampai ion-ion di dalam kantong dialisis dapat diabaikan. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas dengan metode Fuwa, serta diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.

### 3.3.4 Uji aktivitas enzim $\alpha$ -amilase dengan metode Fuwa

Penentuan aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase dilakukan menggunakan metode iodometri sesuai dengan prosedur yang dikembangkan oleh Fuwa (1954). Prinsip dasar metode ini adalah mengukur penurunan kadar pati sebagai hasil dari aktivitas hidrolitik enzim yang ditunjukkan oleh berkurangnya intensitas warna kompleks antara pati dan iodin. Reaksi hidrolisis dimulai dengan mencampurkan 0,25 mL larutan enzim dengan 0,25 mL larutan pati 0,1 % sebagai substrat. Campuran tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 60 °C selama 10 menit untuk memberikan waktu yang cukup bagi enzim dalam mendegradasi pati. Setelah inkubasi, reaksi dihentikan dengan penambahan 0,25 mL larutan HCl 1 N untuk menginaktivasi enzim. Selanjutnya, ditambahkan 0,25 mL larutan iodin yang terdiri dari I<sub>2</sub> 0,2 % dan KI 2 % sebagai pereaksi pewarna, diikuti dengan 4 mL akuades untuk mengencerkan campuran reaksi. Seluruh larutan kemudian dihomogenkan dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda_{\text{maks}}$  600 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh mencerminkan sisa jumlah pati dalam larutan, semakin rendah nilai absorbansi maka semakin tinggi aktivitas enzim terhadap pati. Pada kontrol digunakan larutan enzim yang telah diinaktivasi sebelumnya dengan penambahan HCl dan diperlakukan dengan prosedur yang sama seperti sampel uji. Metode iodometri ini digunakan secara konsisten dalam

berbagai tahapan penelitian, mulai dari isolasi, pemurnian, hingga karakterisasi enzim untuk memastikan validitas dan konsistensi data aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase yang diperoleh (Fuwa, 1954).

### 3.3.5 Uji aktivitas enzim $\alpha$ -amilase dengan metode Mandels

#### 1) Pembuatan pereaksi *Dinitrosalicylic Acid* (DNS)

Ke dalam gelas ukur 250 mL dimasukkan 1 g DNS, 1 g NaOH, 0,2 g fenol, 0,05 g Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 1 mL Na-K tartarat 40 % yang dilarutkan dengan 50 mL akuades. Kemudian larutan dihomogenkan menggunakan *stirrer* dan dipindahkan ke dalam labu takar 100 mL yang ditutup dengan alumunium *foil* lalu ditambahkan akuades hingga batas meniskus.

#### 2) Pembuatan larutan substrat pati 0,1 %

Ke dalam labu takar 100 mL dimasukkan 0,1 g pati, kemudian dilarutkan menggunakan akuades hingga batas meniskus dan dihomogenkan.

#### 3) Uji aktivitas enzim $\alpha$ -amilase dengan metode Mandels

Metode ini didasarkan pada glukosa yang terbentuk. Hal ini dilakukan dengan cara sebanyak 0,25 mL enzim dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan 0,25 mL larutan pati, lalu diinkubasi selama 30 menit dalam *waterbath* dengan suhu 60 °C. Kemudian ditambahkan 1 mL pereaksi DNS dan dididihkan selama 10 menit menggunakan *hotplate*, lalu didinginkan pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan 1,5 mL akuades dan diuji menggunakan spektrofotometer UV-Vis  $\lambda_{\text{maks}}$  510 nm. Kontrol dilakukan dengan prosedur yang sama hanya diinkubasi terlebih dahulu 0,25 mL enzim dalam *waterbath* selama 60 menit sebelum ditambahkan dengan larutan pati. Selain itu, dibuat juga larutan blanko sebagai pembanding untuk spektrofotometer UV-Vis dengan mencampurkan 2,5 mL DNS dan 5 mL akuades.

### **3.3.6 Penentuan kadar protein metode Lowry**

1) Pembuatan pereaksi uji kadar protein menggunakan metode Lowry

- Pereaksi A : 2 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 N.
- Pereaksi B : 5 mL larutan CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 1 % ditambahkan ke dalam 5 mL larutan Na(K) tartarat 1 %.
- Pereaksi C : 2 mL pereaksi B ditambahkan 100 mL pereaksi A.
- Pereaksi D : Reagen folin ciocelteau diencerkan dengan akuades 1:1
- Larutan Standar : Larutan Bovine Serum Albumin (BSA) dengan kadar 20, 40, 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm (Lowry *et al.*, 1951).

2) Uji kadar protein enzim  $\alpha$ -amilase menggunakan metode Lowry

Sebanyak 0,1 mL enzim ditambahkan dengan 0,9 mL akuades. Kemudian direaksikan dengan 5 mL pereaksi C dan dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruang. Setelah itu ditambahkan 0,5 mL pereaksi D, diaduk dengan sempurna dan didinginkan selama 30 menit pada suhu ruang. Pada kontrol 0,1 mL enzim diganti dengan 0,1 mL akuades dengan perlakuan yang sama dengan sampel. Kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda_{\text{maks}}$  750 nm. Penentuan konsentrasi protein enzim  $\alpha$ -amilase menggunakan kurva standar Bovine Serum Albumin (BSA) terdapat pada Lampiran 10. Penentuan kadar protein enzim  $\alpha$ -amilase dengan menggunakan metode Lowry ini dilakukan pada tahap isolasi dan pemurnian (Lowry *et al.*, 1951).

### **3.3.7 Penambahan manitol**

Larutan poliol yang digunakan yaitu berupa manitol. Larutan poliol ditambahkan pada enzim hasil pemurnian dengan konsentrasi 0,2; 0,4; dan 0,5 M bisa mengetahui pengaruh konsentrasi manitol terhadap kestabilan enzim dengan rasio 1:1 digunakan sebagai acuan interaksi antara enzim dan manitol terkontrol dengan baik sehingga memastikan pengaruh manitol dalam kondisi reaksi tertentu.

### 3.3.8 Karakterisasi enzim $\alpha$ -amilase

Karakterisasi enzim  $\alpha$ -amilase hasil dialisis dan hasil penambahan manitol yang dilakukan meliputi:

1) Penentuan pH dan suhu optimum

1. Penentuan pH Optimum

Untuk mengetahui pH optimum enzim sebelum dan sesudah penambahan manitol digunakan buffer fosfat 0,1 M dengan variasi pH sebagai berikut: 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; dan 7,0. Suhu dijaga tetap pada 60 °C, kemudian dilanjutkan dengan pengukuran aktivitas enzim dengan metode Mandels.

2. Penentuan suhu optimum

Untuk mengetahui suhu optimum kerja enzim dilakukan dengan variasi suhu yaitu 40; 45; 50; 55; 60; 65; dan 70 °C, pH tetap dijaga pada pH optimum. Selanjutnya diukur aktivitas enzim dengan metode Mandels.

2) Penentuan data kinetika enzim ( $K_M$  dan  $V_{maks}$ )

Konstanta Michaelis-Menten ( $K_M$ ) dan laju reaksi maksimum ( $V_{maks}$ ) enzim sebelum dan sesudah penambahan manitol ditentukan dari kurva Lineweaver-Burk. Kurva Lineweaver-Burk dibuat dengan menguji aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase dengan variasi konsentrasi substrat 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1 % dalam buffer fosfat pada pH optimum dan suhu optimum. Selanjutnya diukur aktivitas enzim dengan metode Mandels.

3) Uji stabilitas enzim (Yang *et al.*, 1996).

Penentuan stabilitas termal enzim dilakukan dengan mengukur aktivitas sisa enzim setelah diinaktivasi pada suhu 60 °C dengan memvariasikan waktu inkubasi. Caranya adalah dengan mengukur aktivitas enzim menggunakan metode Mandels setelah waktu inkubasi selama 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, dan 100 menit. Aktivitas awal enzim (tanpa proses pemanasan) diberi nilai 100 % (Virdianingsih, 2002). Adapun rumus dapat dilihat pada Persamaan 3.

- 4) Penentuan waktu paruh ( $t_{1/2}$ ), konstanta laju inaktivasi ( $k_i$ ) dan perubahan energi akibat denaturasi ( $\Delta G_i$ )

Penentuan nilai konstanta laju inaktivasi ( $k_i$ ) enzim  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi kimia dilakukan dengan menggunakan persamaan kinetika inaktiviasi orde 1 (Kazan *et al.*, 1997). Adapun rumus dapat dilihat pada Persamaan 4.

sedangkan untuk perubahan energi akibat denaturasi ( $\Delta G_i$ ) enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi kimia dilakukan dengan menggunakan persamaan (Yandri dkk., 2007). Adapun rumus dapat dilihat pada Persamaan 5.

## Keterangan:

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

T = suhu absolut (K)

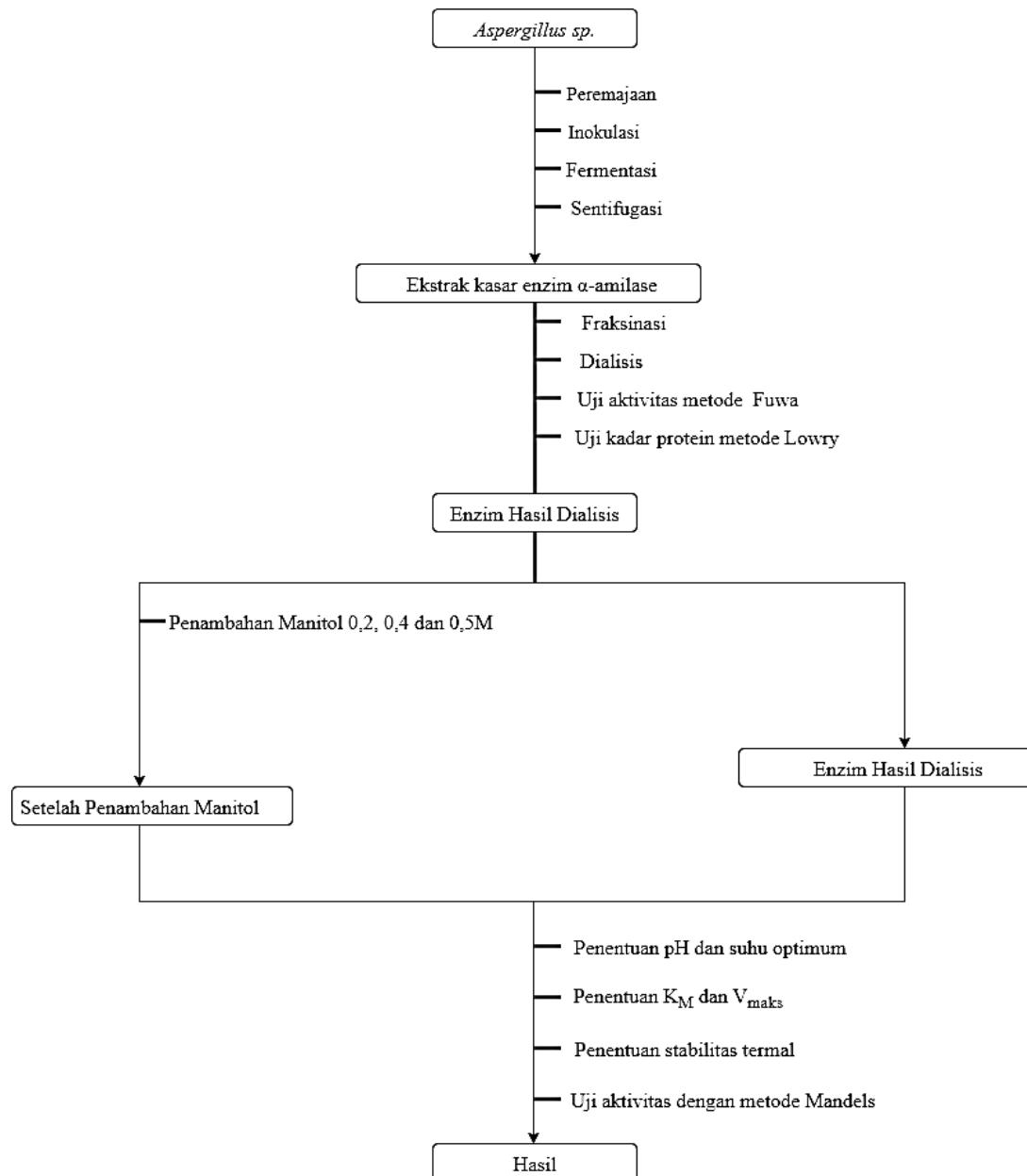
$k_i$  = konstanta laju inaktivasi termal

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

$k_B$  = konstanta Boltzmana ( $1,381 \times 10^{-23}$  JK $^{-1}$ )

### 3.4 Diagram Alir

Adapun diagram alir pada penelitian ini dapat terlihat pada Gambar 7.



**Gambar 7.** Diagram alir penelitian.

## V. SIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil beberapa kesimpulan sebagai berikut:

1. Ekstrak kasar enzim  $\alpha$ -amilase yang dihasilkan dari *Aspergillus sp.* dalam penelitian ini memiliki aktivitas unit sebesar 46,3645 U/mL.
2. Aktivitas spesifik enzim  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian sampai dengan tahap dialisis dari *Aspergillus sp.* adalah 3.846,4720 U/mg, meningkat 11 kali lipat dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim  $\alpha$ -amilase yang memiliki aktivitas spesifik sebesar 326,4483 U/mg.
3. Enzim  $\alpha$ -amilase hasil dialisis dan setelah penambahan manitol memiliki pH dan suhu optimum yang sama yaitu 6 dan 65 °C.
4. Enzim  $\alpha$ -amilase hasil dialisis memiliki  $K_M = 1,2274 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $V_{\text{maks}} = 22,075 \mu\text{mol mL}^{-1}$ ,  $t_{1/2} = 247,5525 \text{ menit}$ ,  $k_i = 0,0028 \text{ menit}^{-1}$ , dan  $\Delta G_i = 106,1151 \text{ kJ mol}^{-1}$
5. Enzim hasil penambahan manitol 0,2 M memiliki  $K_M = 1,8322 \text{ mg mL}^{-1}$ ;  $V_{\text{maks}} = 21,786 \mu\text{mol mL}^{-1}$ ;  $t_{1/2} = 266,5950 \text{ menit}$ ;  $k_i = 0,0026 \text{ menit}^{-1}$ ; dan  $\Delta G_i = 106,3142 \text{ kJ mol}^{-1}$ , sedangkan manitol 0,4 M memiliki  $K_M = 2,0711 \text{ mg mL}^{-1}$ ;  $V_{\text{maks}} = 21,552 \mu\text{mol mL}^{-1}$ ;  $t_{1/2} = 533,1901 \text{ menit}$ ;  $k_i = 0,0013 \text{ menit}^{-1}$ ; dan  $\Delta G_i = 108,1758 \text{ kJ mol}^{-1}$ , serta manitol 0,5 M memiliki  $K_M = 1,8498 \text{ mg mL}^{-1}$ ;

$V_{\text{maks}} = 21,459 \mu\text{mol mL}^{-1}$ ;  $t_{1/2} = 256,7211$  menit;  $k_i = 0,0027 \text{ menit}^{-1}$ ; dan  $\Delta G_i = 106,2128 \text{ kJ mol}^{-1}$ .

6. Pada penelitian ini, berdasarkan nilai  $t_{1/2}$ ,  $k_i$ , dan  $\Delta G_i$  enzim  $\alpha$ -amilase hasil penambahan manitol 0,4 M memiliki tingkat kestabilan tertinggi sebesar 2,15 kali lipat dibandingkan enzim hasil dialisis.

## 5.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, pada penelitian selanjutnya dapat melakukan hal-hal sebagai berikut:

1. Penggunaan konsentrasi manitol yang lebih rendah dari penelitian ini untuk menghasilkan enzim dengan aktivitas dan kestabilan yang optimal.
2. Peningkatan kestabilan enzim lebih lanjut dengan menggunakan zat aditif lain untuk menghasilkan enzim dengan tingkat kestabilan yang lebih tinggi.

## **DAFTAR PUSTAKA**

- Ahern, T.J. and Klibanov, A. M.. 1987. Why do Enzyme irreversibly inactive at high temperature. *Biotech 1. Microbial Genetic Engineering and Enzyme Technology*. Gustav Fischer. Stuttgart. New York. 131-136.
- Ainezzahira, A., Multri, H. D., El Kiyat, W. E., Nacing, N., dan Dari, D. W. 2019. Pemanfaatan enzim alpha-amilase pada modifikasi pati singkong sebagai substitusi gelatin produk marshmallow. *J. Agroindutri Halal*. **5**(2): 220–227.
- Algofar, M. A. A., Rosmansyah, H. F., Rum, I. A., Muhsinin, S., dan Fatmawati, F. 2021. Study  $\alpha$ -amilase dari mikroba serta pemanfaatanya dalam pembuatan maltodekstrin. *Ind. Nat. Res. Phamr. J.* **6**(1): 102-117.
- Anto, H., Trivedi, U., and Patel, K. 2006. Alpha amylase production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 using solid-state fermentation. *Food Technol. Biotechnol.* **44**(2): 241-245.
- Ariandi. 2017. Pengenalan enzim amilase (alpha-amylase) dan reaksi enzimatisnya menghidrolisis amilosa pati menjadi glukosa. *J. Dinamika*. **7**(1): 74–82.
- Ariyanti, D. 2013. Karakteristik dan aplikasi pati singkong dalam industri pangan dan nonpangan. *J. Ilm. Pertan.* **5**(2): 25-34.
- Azhar, M. 2016. *Biomolekul Sel, Karbohidrat, Protein dan Enzim*. UNP Press. Padang.
- Bahri, S., Mirza, M., dan Hasan, M. 2012. Karakterisasi enzim amilase dari kecambah biji jagung (*Zea mays cerantina L.*). *Nat. Sci.* **1**(1): 132-143

- Bal, E., Pinar,O., Kazan, D., Hasan, and Sayar, A. 2016. Immobilization of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* SDP1 isolated from the Rhizosphere of *Acacia cyanophylla* Lindley. *Electronic J. Biol.* **12**(2): 115-121.
- Bala, M., Singh, B., and Bhakti, H. N. 2019. Role of mannitol as a stabilizers in enhancing enzyme performance under unfavorable environmental conditions. *J. ind. Microbiol. Technol.* **42**(6): 123-132.
- Badan Pusat Statistik. 2024. Statistik Tanaman Pangan 2023. Badan Pusat Statistik Republik Indonesia. <https://www.bps.go.id/publication> (Diakses 28 Mei 2025).
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., and Bourne, P. E. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**(1): 235-242.
- Bollag, D. M., Rozycki, M. D., and Edelstein, S. J. 1996. *Protein Methods 2nd Ed.* John Wiley and Sons, Inc. New York. 1-16.
- Brooks, G. F., Carrol, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., and Mietzner, T. A. 2013. *Jawetz, Melnick and Adelberg Medical Microbiology*. Ed. 25. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Chimata, M. K., Sasidhar, P., Challa, S., and Jaganmohan, P. 2010. Production of extracellular lipase by *Aspergillus sp.* in solid state fermentation using gingelly oil cake. *Adv. Biosci. Biotechnol.* **1**(4): 360-365.
- Choubane, S., Khelil, O., and Cheba, B. A. 2014. *Bacillus sp.* R2 and *Bacillus cereus* immobilized amylase for glucose syrup production. *J. Procedia Tech.* **19**(1): 972-979.
- De Amorim, M. R., Wijeratne, E. M. K., Zhou, S., and Gunatilaka, A. A. L. 2020. An Epigenetic Modifier Induces Production of 3-(4-Oxopyrano)-Chromen-2-Ones In *Aspergillus sp.* AST0006, An Endophytic Fungus of *Astragalus Lentiginosus*. *Tetrahedron*. **76**(14): 1-9.
- De Souza, P. M. and De Oliveira Magalhães, P. 2010. Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry. *Braz. J. Microbiol.* **41**(4): 850–861.
- Dzulqaidah, I., Zanuba, R. B., Alwi, A. S. F., Salsabila, A. R P., Mursidi, S., dan Muliasari, H. 2021. Ekstraksi dan uji aktivitas enzim bromelin kasar dari buah nanas. *J. Agritech. Food Process.* **1**(2): 80.
- Eijnsink, G. H., Sigit, G., Torben, and Van de Barg, B. 2005. Directed evolution of enzyme stability. *Biomol. Eng.* **23**(1): 21-30.

- Guntama, D., Yogi, H., Uji, A. S., Rahel L. E., dan Endang, S. 2019. Bioethanol dari limbah kulit singkong (*Manihot esculenta* Crantz) melalui metode hidrolisa dan fermentasi dengan bantuan *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Tek.* **7**(1): 86-89.
- Fessenden, R. J. and Fessenden, J. S. 1992. *Kimia Organik Jilid II*. Erlangga. Jakarta. 395-396.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2023. FAOSTAT. Crops and livestock products and cassava production quantities by country. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (diakses 28 Mei 2025).
- Fuwa, H. 1954. A new method for Microdetermination of Amylase activity By the use of amylase as the substrate. *J. Biochem.* **41**(5): 583-603.
- Goddete, D.W, C., Terri, F.L., Beth, L., Maria, R.M., Jonathan, P., Christian, B.R., Robert, S.Y., Shiow, and Wilson, C. R. 1993. Strategy and implementation of a system for protein engineering. *J. Biotechnol.* **28**: 41-54.
- Hasanah, U. 2017. Mengenal aspergillosis infeksi jamur genus *Aspergillus*. *J. Keluarga Sehat Sejahtera*. **15**(30): 76-86.
- Ilyas, S., Shukor, H., and Mukim, U. 2011. Production of cellulase by *Aspergillus sp.* using banana peel as substrat. *J. Appl. Sci. Environ. Manag.* **15**(2): 269-272.
- Imanningsih, S. 2012. Pengaruh Jenis Tepung Terhadap Viskositas dan Gelatinisasi Pati Pada Berbagai Kondisi Pengolahan Pangan. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Gadjah Mada.
- Jameison, P.R. 2012. *Sorbitol and Mannitol*. In O' Brien Nabors (Ed). Alternative Sweetener. New York. CRC Press. 334-335.
- Judoamidjojo, R. M., Gumbira, S, E., dan Hartoto, L. 1989. *Biokonversi*. Depdikbud Dirjen Dikti. PAU Bioteknologi IPB. Bogor
- Kamelia, R., Muliawati, S., dan Dassy, N. 2005. Isolasi dan Karakterisasi Protease Intraseluler Termostabil dari Bakteri *Bacillus stearothermophilus RP1*. Seminar Nasional MIPA. Departemen Kimia. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Kazan, D, Ertan, H., and Erarslan, A. 1997. Stabilization of *Escherecia coli* penicilin G acylase againts thermal inactivation by cross-linking with dextran dialdehyde polymers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**: 191-197.
- Klich, M.A. 2002. *Identification of Common Aspergillus species*. Netherland: Centralburea Voor Schimmecultures. Utrecht.

- Koswara, A. 2006. *Pemanfaatan Singkong dalam Industri Pangan dan Nonpangan*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Industri Pangan. Jakarta.
- Labeda, D. P. 1990. *Isolation of Biotechnological Organism Form Nature*. Mc-Graw Hill Publishing Company. New York.
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., and Wang, X.. 2012. Technology prospecting on enzymes: application, marketing, and engineering. *Comp. Struct. Biotech. J.* 2(3): 1-11.
- Lowry, O. H., Rosebrough N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein Measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1): 265-275.
- Lu, J. Y., Zhang, X. L., and Liu, G. X. 2011. The application of cassava starch in food and nonfood industries. *J. Food. Sci.* 7(3): 101-107.
- Mandels, M., Andreotti, R., and Roche, C. 1976. Measurament of saccharifying cellulose. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 6: 21-33.
- Marks, D. B., Marks, A. D., dan Smith, C. M. 2014. *Biokimia Kedokteran Dasar: Sebuah Pendekatan Klinis*. EGC. Jakarta.
- Madigan, M. T., Michael, M., and John, P. 2002. *Brock Biology of Microorganism* Prentice Hall International Inc. Englewood Cliff. New York.
- Maarel, M., Van der Veen, B., Uitdeehag, H., Lee, H.H., and Dijkhoven, L. 2002. Properties and application of starch converting enzymes  $\alpha$ -amylase family. *J. Biotechnol.* 94(2): 137-155.
- Martiyana, N. R. 2022. Pemanfaatan Limbag Kulit Singkong (Manigot Utilissima) Sebagai Gula Cair Secara Metode Hidrolisis Enzimatik. Skripsi. UIN Walisongo. Semarang.
- Megiandari, A. 2009. Isolasi dan Pencirian Enzim Protease Keratinolitik dari Usus Biawak Air. Tesis. Jurusan Kimia. FMIPA. IPB. Bogor.
- Mosan, P. and Combes, D. 1984. *Stabilization of enzyme activity*. The Proceedings of Biotechnology Europe Online. Online Publication Ltd. London.
- Mustafa, A. 2016. Analisis proses pembuatan pati ubi kayu (tapioka) berbasis neraca massa. *Agrointek*. 9(2): 118-125.

- Nisa, F. C., Nurhayati, dan Mulyani, S. 2013. Imobilisasi Enzim  $\alpha$ -Amilase dari *Aspergillus sp.* ke dalam Matriks Bacto Agar. Skripsi. Program Studi Kimia. FMIPA. Universitas Lampung. Lampung.
- Nisak, C. 2020. Optimasi Aktivitas Enzim  $\alpha$ -Amilase Dari Jamur *Penicillium Sublateritium* Pada Variasi Suhu. Skripsi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Nurkhotimah, Evy, Y., dan Anna, R. 2017. Pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas enzim fosfatase bakteri termofilik sungai gendol pasca erupsi merapi. *Proc. Biol. Sci.* **6**(8): 1-7.
- Page, D. S. 1997. *Prinsip-Prinsip Biokimia*. Erlangga. Jakarta.
- Palmer, T. 1985. *Understanding Enzyme 3td*. New York. Ellishorwood Publisher.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., and Mohan, R. 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **31**(2): 135–152.
- Parathaman, R., Vidyalakshmi, R., Murugesh, S., Singaravel, K., and Singaram, P. 2009. Optimization of process parameters for the production of  $\alpha$ -amylase from agricultural waste. *J. Environ. Biol.* **30**(5): 735-738.
- Pelczar, M. J. dan Chang, E. C. S. 2005. *Dasar-Dasar Mikrobiologi Jilid I*. UI Press. Jakarta.
- Penitobe, T. 2021. Pengaruh penambahan enzim protease kadar (crude protease enzyme) dari daun kelor (*Moringa olivera*) terhadap uji organoleptik dan kadar asam laurat pada *virgin coconut oil*. *Paper Knowledge*. **1**(1): 49-58.
- Permana, S. 2012. Studi tentang karakteristik pati dan potensinya untuk aplikasi industri. *J. Teknol. Pertan.* **9**(4): 213-220.
- Prjctreoco. 2021. Cara Buat Tepung Singkong. [Online]. Tersedia: <https://www.prjctreoco.com/2021/03/05/cara-buat-tepung-singkong/> [Diakses 17 Mei 2025].
- Poedjiadi, A. dan Suprayanti, T. 2006. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta. UI Press.
- Pohl, T. 1990. *Concentration of Protein Removal of Solute dalam M.P. Deutscher, Method of Enzymology: Guide to Protein Purification*. Academic Press. New York.

- Ramadhan, B. dan Prima, R.W. 2021. Review artikel: aktivitas enzim amilase dari bakteri asam laktat (karakteristik dan aplikasi). *Int. J. Chem. Sci.* **10**(2): 109-120.
- Robinson, P. K. 2015. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essat Biochem.* **59**: 1-41.
- Rukmana, R. H. 1997. *Singkong, Budidaya dan Pasca Panen*. Kanisius. Yogyakarta.
- Saha, B. C. and Racine, F. M. 2011. Biotechnological production of mannitol and its applications. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **89**: 879-891.
- Sahib, N. 2005. *Biologi Molekular Medik I*. Unpad Press. Bandung. 164-167.
- Saritha, M. and Prasad, T. 2019. The status of research and application of biofertilizers and biopesticides: global scenario. *Appl. Microbiol. Biochem. Elsevier.* **103**(1): 195-207.
- Schuster, E. N. D., Coleman, J. C., Frisvad and Van Dijck, P. W. M. 2002. On the safety of *Aspergillus niger*. *App Microbil Biotechnol.* **59**: 426-435.
- Singh, S. 2014. A comparative study on immobilization of alpha amylase enzyme on different matrices. *Int. J. Plant Anim. Env. Sci.* **4**(3): 193-198.
- Smith, J.E. 1990. *Prinsip Bioteknologi*. PT Gramedia. Jakarta.
- Soemitro, S. 2005. Pengaruh modifikasi kimiawi selektif terhadap kestabilan  $\alpha$ -amilase dari *Saccharomyces fibuligera*. *J. Bionatura.* **7**(3): 259-273.
- Suhartono, M.T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. PAU IPB. Bogor.
- Sundaram, A. and Murthy, T.P.K. 2014.  $\alpha$ -amylase production and applications: a review. *J. Appl. Environ. Microbiol.* **2**(4): 166-175
- Supriyatna, A., Dea, A., Ayu, A. J., dan Dyna, H. 2015. Aktivitas enzim amilase, lipase dan protease dari larva. *J. Biol.* **9**(2): 1-15.
- Taufiq, N. 2022. Pengaruh penambahan zat kapur dan lama perendaman terhadap kadar sianida pada singkong (*Manihot esculanta* Crantz). *J. Ilm. Kes.* **17**(2): 133–141.
- Thomas, D.B. 1989. *A Textbook of Industrial Microbiology*. Second Edition. Sinauer Associates. Sunderland. USA.

- Virdianingsih, R. 2002. Mempelajari Stabilitas Termal Dari *Bacillus pumilus* y1 Dalam Pelarut Heksana, Toluena, dan Benzena. Skripsi Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Wahyuni, S. 2017. *Biokimia Enzim dan Karbohidrat*. Cetakan Pertama. Unimal Press. Lhokseumawe.
- Whittaker, J. R. 1994. *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. New York. marcel Dekker Inc.
- Winarno, F. G. 1986. *Enzim Pangan dan Gizi*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Wirahadikusumah, M. 1997. *Biokimia: Protein, Enzim dan Asam Nukleat*. ITB. Press. Bandung.
- Wisselink, H.W. 2004. Metabolit engineering of manitol production in *Lactococcus lactis*. Thesis. Wageningen University. Netherland.
- Wulan, S. 2006. Studi tentang pati singkong dan pengaruhnya terhadap karakteristik pengolahan makanan. *J. Kim. Teknol. Pangan*. **5**(1): 45-50.
- Yandri, A. S., Herasari, D., Dan Suhartati, T. 2007. Isolasi, pemurnian dan karakterisasi enzim protease termostabil dari bakteri isolat lokal *Bacillus subtilis* ITBCCB148. *J. Sains MIPA*. **13**(2): 100-106.
- Yandri, A. S., Suhartati, T., and Hadi, S. 2010. Purification and characterization of extracellular  $\alpha$ -amilase from locale bacteria isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148. *Eur. J. Sci. Res.* **39**(1): 64-74.
- Yamin, I. F. 2022. Isolasi dan Uji Aktivitas  $\alpha$ -amilase Dari Bakteri Termofilik Skripsi. UIN Sunan Gunung Djati Bandung.
- Yang, Z., Michael, D., Robert, A., Fang, X. Y., and Alan, J. R. 1996. Polyethylene glycol-induced stabilization of subtilisin. *Enzym. Microb. Technol.* **18**: 82-89.